

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DA**  
**BACTÉRIA *Xylella fastidiosa* EM LARANJA DOCE POR**  
**MICROARRANJOS DE DNA**

**María Teresa Federici Rodriguez**

**Orientadora: Prof. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária (Área de Concentração em Microbiologia).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARIA TERESA FEDERICI RODRIGUEZ-** de nacionalidade uruguaia, graduou-se em Biologia pela Universidade da República- Montevideo- Uruguai, e foi mestre em Biotecnologia de Plantas pela Universidade Internacional de Andalucía (UNIA), “Sede Iberoamericana Santa María de la Rábida”, Huelva, España, sendo o trabalho experimental realizado no “National Institute of Agro-Biological Resources” (NIAR), Tsukuba, Japão. Trabalha no “Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria” (INIA) desde fevereiro do ano 2001 (cargo atual: pesquisador adjunto da Unidade de Biotecnologia na Estação Experimental INIA Las Brujas)

*“Todos somos muito ignorantes.  
O que acontece é que nem todos  
ignoramos as mesmas coisas.”*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, à Profa. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos, por me receber no seu laboratório e pela grande oportunidade e credibilidade na realização deste projeto.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Jackson Marcondes, pelo apoio técnico e pela boa disposição de sempre, e por me estender sua mão no momento em que mais precisei.

Também quero agradecer à Dra. Simone C. Picchi, que me ajudou nos trâmites no começo do doutorado, que me deu a orientação inicial no laboratório, assim como seu apoio e amizade.

Meu grande agradecimento ao Rodrigo Pereira, o “poeta”, pela sua orientação no processo seletivo para o Doutorado em Microbiologia Agropecuária e sua grande ajuda com a documentação necessária.

Agradeço ao Dr. João Carlos Campanharo, pela sua paciência e entusiasmo de sempre, por sua constante boa disposição e por todos os conselhos sobre *Xyella fastidiosa*.

A Profa. Dra. Lúcia Alves, pelos conselhos sobre a técnica de microarranjos e dicas importantes nas distintas fases do experimento.

Assim, também meus especiais agradecimentos aos bioinformatas Drs. Luciano Kishi e Mauricio Cantão, por sua pronta disposição, mesmo já fora do laboratório, sempre que precisei de ajuda com o processamento dos meus dados de microarranjos.

Meus agradecimentos ao André Fadel, meu parceiro da *Xylella*, que trouxe alegria e camaradagem para o trabalho em equipe, e por conseguirmos juntos, em dias de intenso trabalho de campo e laboratório, avançar a grandes passos em nossos respectivos trabalhos.

Ao Dr. Eduardo Stuchi, que me recebeu amavelmente no Centro de Citricultura de Bebedouro, e permitiu-me obter as amostras, que foram peças fundamentais do meu trabalho.

Especialmente agradeço ao Dr. Marcelo Laia (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Faculdade de Ciências Agrárias, Diamantina, MG), pelas análises estatísticas com o programa R, por sua inigualável ajuda; pois sem ter vínculo formal me assistiu com seus conhecimentos, seu profissionalismo e sua experiência em análises estatísticas de dados de microarranjos.

Agradeço também à Dra. Larissa Scattolin, e aos colegas Karla Stropa, Wellington Moreira, Ana Rita Raimundo e à Erica Mendes Lopes, pela ajuda no laboratório durante a etapa do desenvolvimento do chip, e a todos os estudantes do LBMP, pela boa energia, companheirismo e por compartilhar as alegrias e dificuldades do nosso trabalho e da própria vida, durante o transcurso dos meus estudos de doutorado. Assim, também agradeço a minha “antecessora” do chip, a Dra. Regiane Travençolo por seus valiosos conselhos e dicas para a fabricação do chip.

Ao Dr. Marcos A. Machado, Coordenador da Unidade de Biotecnologia do APTA Citros Sylvio Moreira, e aos pesquisadores Helvécio e Alessandra de Souza, também pela permissão para coletar as amostras do projeto e sugestões, bem como ao Dr. Leonardo Boava, pelas dicas sobre RT-qPCR e endógenos.

Agradeço especialmente ao Instituto Nacional de Pesquisa Agropecuária do Uruguai (INIA), pelo apoio nos meus estudos de doutorado, à Direção do Programa Nacional de Citricultura (INIA Salto Grande) e da Unidade de Biotecnologia (INIA Las Brujas) considerando as autoridades do momento: Ing. Agr. Msc. Carmen Goñi; Ing. Agr. Dan Piestun, PhD e Ing. Agr. Fabián Capedevielle, PhD e as atuais: Ing. Agr. Marco Dalla-Rizza, PhD e Ing. Agr. Fernando Rivas, PhD. Também agradeço à Ing. Agr. MSc. Elena Perez pelos contatos no Brasil e pela continuação dos projetos em INIA, assim como à Lic. Natalia Rigamonti e a todos os amigos e colegas que me deram forças para sair na capacitação.

Agradeço “in memoriam” ao meu primeiro chefe, o Ing. Agr. Mario Caro, que me introduziu na vida acadêmica na área da agronomia, especificamente na biotecnologia dos citros; à Dra. Marta Francis, que também nos inícios da minha carreira foi-me conduzindo no caminho da ciência aplicada à agronomia. Agradeço a todos que, no transcurso da minha vida profissional, apresentaram-me exemplos de vida e dedicação; de vocação genuína, de gosto pela ciência e pelo serviço à comunidade que tive a oportunidade de conhecer e que foram ajudando a orientar minha vocação: Dr. W. Gaertner, Dr. D. Vaughan, Dr. Jordi Garcia Mas e Dr. Victoriano Valpuesta, entre outros.

Sobre todas as coisas, agradeço à minha família por não condicionar a minha vida, e em especial à minha mãe Elbita, pelo apoio incondicional, sem o qual não teria sido possível esta conquista. Também agradeço ao meu pai José Luis, irmã Laura, os tios Carlos María, Lula e Pocha e aos que já não estão; aos que fazem, e aos que fizeram e parte do meu caminho.

E ao Guillermo, agradeço sua presença na minha vida e sua grande paciência com tantas viagens e tantas idas e voltas.

Assim também agradeço aos meus amigos de Uruguai que estiveram sempre presentes e às novas e verdadeiras amizades do Brasil que me ajudaram em milhares de coisas (sejam materiais ou humanas) de que se precisam quando se muda a vida toda de um País a outro por tanto tempo, em especial a Teté, Rosinha, Denise e Viviane.

Também agradeço à Agência PDT (“Programa de Desarrollo Tecnológico”, Uruguay) e à CAPES (“Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”) pelo co-financiamento do meu trabalho.

## SUMÁRIO

### ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DE *Xylella fastidiosa* em LARANJA DOCE POR MICROARRANJOS DE DNA

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	2
1. Clorose variegada dos citros (CVC).....	2
2. <i>X. fastidiosa</i> : o agente causal.....	5
3. Resistência, tolerância e suscetibilidade de citros à CVC.....	8
4. Interação Patógeno- Hospedeiro.....	11
5. Modelo de colonização na planta e para transmissão ao inseto.....	14
6. A análise da expressão gênica através de microarranjos.....	16
7. A técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) e sua utilização na validação de dados de microarranjos.....	20
<b>III. OBJETIVO</b> .....	24
<b>IV. HIPÓTESE</b> .....	26
<b>V. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
1. Desenho experimental.....	26
2. Isolado bacteriano e material vegetal.....	27
3. Coleta das amostras.....	28
4. Extrações de RNA.....	29
5. Quantificação do RNA.....	29
6. Obtenção do cDNA marcado com compostos fluorescentes Cy3/ Cy5.....	30
6.1 Reação de transcrição inversa.....	30
6.2 Degradação do RNA e concentração do cDNA.....	31
7. Fabricação do microarranjo contendo o genoma total da <i>X. fastidiosa</i> .....	31



7.1	Cultivo do isolado 9a5c e extração do DNA .....	32
7.2	Amplificações por PCR das 2600 ORF e quantificação do produto.....	33
7.3	Concentração e impressão dos produtos de PCR na lâmina.....	33
8.	Hibridação dos microarranjos com os cDNAs marcados e lavagens.....	34
9.	Obtenção e análise das imagens.....	35
9.1	Digitalização da imagem.....	35
9.2	Quantificação e análise das imagens.....	35
9.3	Análises estatísticas.....	36
9.4	Busca dos genes candidatos na base de dados do Projeto Genoma da <i>X. fastidiosa</i> 9a5c.....	36
10.	Validação da técnica por RT-qPCR.....	37
10.1	Fabricação do DNA complementar e quantificação relativa.....	37
10.2	Genes escolhidos e desenho dos “primers” .....	37
10.3	Otimização das condições de reação.....	39
10.4	Validação da eficiência de amplificação e especificidade dos primers.....	39
10.5	Quantificação relativa. Método delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ).....	40

## **VI. RESULTADOS.....41**

1.	Análises Estatísticas.....	41
2.	Busca de informação dos genes potenciais candidatos à patogenicidade.....	43
3.	Perfil Global da expressão gênica.....	43
4.	Genes da categoria VII: “Patogenicidade, virulência e adaptação”.....	46
5.	Genes das categorias IV, V e VI: “Estrutura celular”, “Processos celulares” e “Elementos genéticos móveis”.....	48
6.	Genes da categoria I “Metabolismo intermediário” e II “Biossíntese de pequenas moléculas.....	50
7.	Genes da categoria III “Metabolismo de macromoléculas.....	52

8.	Validação da técnica de microarranjos através de RTqPCR.....	56
8.1	Validações da eficiência de amplificação e curvas de dissociação.....	56
8.2	Quantificação relativa e validação do experimento de microarranjos...	60
<b>VII.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
1.	Fatores que influenciam a agregação celular.....	64
1.1	Constituição do biofilme e regulação da patogenicidade.....	64
1.2	Adesinas (não do tipo fimbria).....	71
2.	Movimento através dos vasos xilêmicos.....	73
2.1	Adesinas tipo fímbrias e movimento “twitching motility” (sistema quimiotático).....	73
2.2	Degradação da parede celular e enzimas degradadoras.....	77
3.	Genes envolvidos na sobrevivência da bactéria.....	78
3.1	Sistemas transportadores .....	78
3.2	Toxinas, detoxificação e resposta antioxidante.....	80
3.3	Homeostase do ferro e outros metais.....	83
3.4	Resposta “heat shock” .....	85
3.5	Adaptação, condições atípicas.....	87
3.6	Sistemas de reparação, restrição e modificação do DNA .....	89
4.	Genes relacionados com elementos genéticos móveis: fagos, profagos e plasmídeos.....	91
5.	Genes de proteínas hipotéticas.....	92
6.	Controles negativos e validação do experimento através de RT-qPCR.....	95
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>IX.</b>	<b>IMPLICAÇÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>X.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>XI.</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>131</b>

## ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DE *Xylella fastidiosa* EM LARANJA DOCE POR MICROARRANJOS DE DNA

**RESUMO-** Foi construído um microarranjo com as 2600 ORFs identificadas no projeto de sequenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa* estirpe 9a5c, e utilizado para analisar diferenças na expressão gênica global da bactéria dentro de uma laranja doce suscetível (Pera) e uma tolerante (cultivar Navelina ISA 315). Foram achados mais genes diferencialmente expressos envolvidos na degradação, reguladores, componentes de membrana, adesinas tipo fímbrias, transportadores, elementos genéticos móveis e genes de patogenicidade na variedade sintomática. Assim, na cultivar Navelina ISA 315, foram diferencialmente expressos mais genes relacionados com a resposta ao estresse, seja detoxificação de espécies reativas do oxigênio ou proteínas chaperonas, assim como uma adesina do tipo hemaglutinina. Isso sugere diferenças na agregação celular e composição do biofilme assim como um maior estresse da bactéria na cultivar tolerante, provocado pelas próprias defesas da planta ou por microrganismos endofíticos que estão competindo com a *X. fastidiosa*. A técnica de microarranjos foi validada pela RT-qPCR, e apresentou-se como uma ferramenta poderosa na análise das mudanças na expressão gênica da bactéria *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce *in vivo*, apresentando uma visão mais real da natureza do que os sistemas *in vitro*, que não conseguem imitar completamente. Foram levantadas neste trabalho algumas hipóteses sobre os mecanismos de patogenicidade mas no entanto, mais pesquisas ainda são necessárias para lograr melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e das interações patógeno-hospedeiro.

**Palabras chave:** *Xylella fastidiosa*, microarranjo, Navelina ISA 315, expressão gênica, citrus

## **ANALYSIS OF GLOBAL GENE EXPRESSION OF *Xylella fastidiosa* IN SWEET ORANGE USING DNA MICROARRAY**

**SUMMARY-** A DNA microarray was constructed containing 2600 ORFs identified by the Genome sequencing project of *Xylella fastidiosa* 9a5c strain, and used to check global gene expression differences in the bacteria within a susceptible and a tolerant sweet orange plant, the variety Pera and the cultivar Navelina ISA 315, respectively. More genes related to degradation, regulation, membrane components, fimbrial adhesins, transport, genetic mobile elements and pathogenicity genes were differentially expressed in Pera variety. On the other hand, in the cultivar Navelina ISA 315, more genes related to stress response, detoxification of oxygen reactive species or other substances, “heat shock” proteins, as well as an adhesin of the hemagglutinin type, suggesting differences in cellular aggregation and biofilm composition, as well as a higher estress of the bacteria in tolerant cultivar, produced either by plant defenses or by endophitic microorganisms which are competing with *X. fastidiosa*. This “handmade” DNA microchip was validated by RT-qPCR, and has revealed as a powerful technique for the analysis of global changes in gene expression of *X. fastidiosa* in sweet orange plants *in vivo*, generating a more real image of what is happening in nature than *in vitro* systems which would never reproduce nature conditions exactly. Some hypotheses were raised in this study about pathogenicity mechanisms, therefore, more research is still necessary to achieve a better understanding of pathogenicity mechanisms and host-pathogen interactions.

**Keywords:** *Xylella fastidiosa*, microarray, Navelina ISA 315, gene expression, citrus

## I. INTRODUÇÃO

O conhecimento da sequência completa do genoma da bactéria *X. fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000) representou um grande passo para a compreensão de suas vias metabólicas, replicativas e para o entendimento de possíveis mecanismos de patogenicidade. Trabalhos publicados têm explorado as informações geradas pelo sequenciamento, destacando uma série de hipóteses para o funcionamento do metabolismo energético, transporte de nutrientes, adesão, agregação, toxicidade, secreção de fatores de patogenicidade, homeostase de ferro, resposta a antioxidantes e outros mecanismos importantes para a patogenicidade (SIMPSON *et al.*, 2000; MEIDANIS *et al.*, 2002; Da SILVA, 2004; KOIDE *et al.*, 2004). Assim, desde que o genoma de *Xylella fastidiosa* foi sequenciado, muito se tem avançado no entendimento dos processos pelos quais a bactéria se dissemina pelos vasos xilemáticos das plantas suscetíveis, assim como sobre os fatores que contribuem para sua aquisição e transmissão pelas cigarrinhas. Muitos dos focos das pesquisas têm sido na busca de informações a respeito da interação entre a bactéria e seus hospedeiros.

De acordo com HAMMOND-KOSACK e JONES (2000), há três razões importantes para estudar a interação planta-patógeno: 1) o estudo detalhado dessa interação disponibilizará soluções para o controle da doença de plantas em culturas economicamente importantes; 2) cada estudo deve elucidar os mecanismos de sinalização pelos quais as células das plantas convivem com a situação de estresse; 3) o conhecimento dos mecanismos de interação levará à descoberta de como organismos de diferentes reinos se comunicam no mesmo ambiente com o hospedeiro. O sequenciamento completo do genoma dessa bactéria gerou importantes informações, que devem contribuir para o entendimento das relações dos isolados da bactéria *X. fastidiosa* com seus hospedeiros e, em consequência, no desenvolvimento de estratégias de controle da doença.

Com base na disponibilidade de informações sobre genes em banco de dados, novas estratégias para estudos dos mesmos tornaram-se necessárias, como a técnica de microarranjos, que permite detectar a expressão global e analisar genes envolvidos na interação patógeno/hospedeiro. Desse modo, o objetivo deste projeto foi analisar, por meio dessa técnica, quais os genes diferencialmente expressos em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) infectadas por *X. fastidiosa*. Para tanto, foram utilizadas as variedades laranja Pera (suscetível à CVC) e Navelina ISA 315.

## **II. REVISÃO DA LITERATURA**

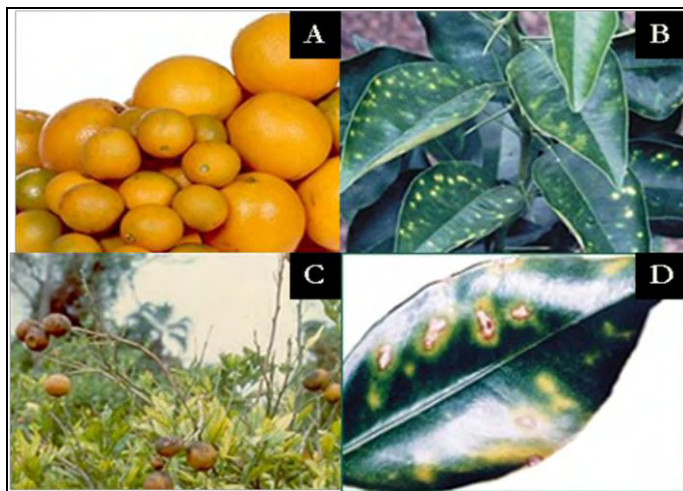
### **1. Clorose variegada dos citros (CVC)**

A Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *X. fastidiosa*, representa uma das principais doenças dos citros, principalmente em função de seu difícil controle, sendo uma das doenças de maior importância na citricultura brasileira. Esta doença foi observada pela primeira vez em 1987 no triângulo mineiro, Estado de Minas Gerais, e nas regiões Norte e Noroeste do Estado de São Paulo, onde um levantamento na época mostrou que cerca de quarenta e sete cidades do Estado tinham a ocorrência da CVC (ROSSETI; DE NEGRI, 1990). CHANG *et al.* (1993) relataram a conclusão dos postulados de Koch, confirmando a bactéria *X. fastidiosa* como agente causal da doença, o que mais tarde foi confirmado por LEE *et al.* (1993).

Sua presença foi confirmada posteriormente nos Estados de Rio Grande do Sul, Paraná, Distrito Federal, Goiás, Rio de Janeiro (TUBELIS; BARROS; CAMPOS LEITE, 1993), Sergipe (LARANJEIRA *et al.*, 1996) e Bahia (SANTOS FILHO *et al.*, 1999). No ano de 2005, cerca de 43% das laranjeiras doces se encontravam

afetadas pela CVC em todas as regiões citrícolas do Brasil, ocasionando um prejuízo de mais de 120 milhões de dólares anuais (BOVÉ; AYRES, 2007).

Plantas afetadas pela CVC apresentam inicialmente, na parte mediana e superior da copa, folhas com clorose na face ventral e pequenas bolhas gomosas cor de palha na face dorsal, usualmente acompanhada de sintomas de deficiências nutricionais. Em estágio mais avançado da doença, os frutos têm tamanho reduzido, são endurecidos, persistentes, com amarelecimento precoce e lesões pardas na casca que podem atingir até metade das áreas superficiais (Figura 1 A - D). Frutos com sintomas típicos de CVC são impróprios para o consumo ou processamento (VITTI *et al.*, 1989; ROSSETTI *et al.*, 1990; DE NEGRI, 1990; MENEGUCCI *et al.*, 1995). Pode-se observar o tamanho dos frutos afetados em comparação com frutos sadios na figura 1 A.



**Figura 1:** Sintomas do CVC: A) em fruto; B) em folha no primeiro estágio; C- D) na planta e na folha durante o estágio mais avançado. Fundeprec Fundo de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Pará ([www.fundepecpr.org.br](http://www.fundepecpr.org.br)).

Além da CVC, *X. fastidiosa* causa doenças em outras culturas de importância econômica, como videira, ameixeira, pessegueiro, pereira (CARLOS; RODRIGUES NETO; BERETTA, 1997) e também em cafeeiro (PARADELLA FILHO *et al.*, 1995).

Outras culturas hospedeiras da *X. fastidiosa* são também a amendoeira, *Prunus amygdalus* Batsch (MIRCETITCH et al., 1976), carvalho, *Quercus rubra* L. (HEARON et al., 1986, citado por HOPKINS, 1989), amoreira, L. (KOSTKA et al., 1986), vinca, *Catharantus roseus* L. G. Don (SHERALD et al., 1983, citado por HOPKINS, 1989).

A doença de Pierce em videiras (*Vitis vinifera* L.) foi encontrada em toda a Região Sul dos Estados Unidos, que cultiva uva comercialmente, da Flórida à Califórnia, e países como Costa Rica e México. O sintoma mais característico da doença causado pela bactéria *X. fastidiosa* em videira, foi relatado como a escaldadura das folhas e a morte repentina de parte das folhas verdes. As áreas afetadas tornam-se necróticas e os tecidos adjacentes, amarelos ou vermelhos, e geralmente começam nas margens das folhas e progridem para o interior (RAJU; WELLS, 1986). Em ameixeira, *X. fastidiosa* causa a doença conhecida como “Escaldadura da Folha” (EFA). A EFA foi inicialmente descrita na Argentina, em 1935 (FERNANDEZ-VALIELA; BAKARCIC, 1954). Posteriormente, a doença foi também constatada no Brasil, Paraguai e sudeste dos Estados Unidos (FRENCH; KITAJIMA et al., 1981; FRENCH; FELICIANO, 1982). Os sintomas associados à EFA caracterizam-se pela necrose marginal, queima de bordos, quebra prematura de folhas, seca de ramos, declínio no vigor e na produção e, finalmente, morte prematura da planta (MOHAN et al., 1980).

*X. fastidiosa* é transmitida por insetos das famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae. Estes, chamados comumente de cigarrinhas, se alimentam sugando a seiva do xilema das plantas infectadas e depois das sadias. Já foram identificadas onze espécies transmissoras (*Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia* SP., *Oncometopia facialis*, *Bucephalogonia xanthophis*, *Plesiommata corniculata*, *Macugonalia leucomelas*, *Sonesimia grossa*, *Ferrariana trivittata*, *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescens* e *Parathona gratiosa*), sendo que todas pertencem à família Cicadellidae (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996; FUNDECITRUS, 1999; KRUGNER et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2002). A rápida disseminação da

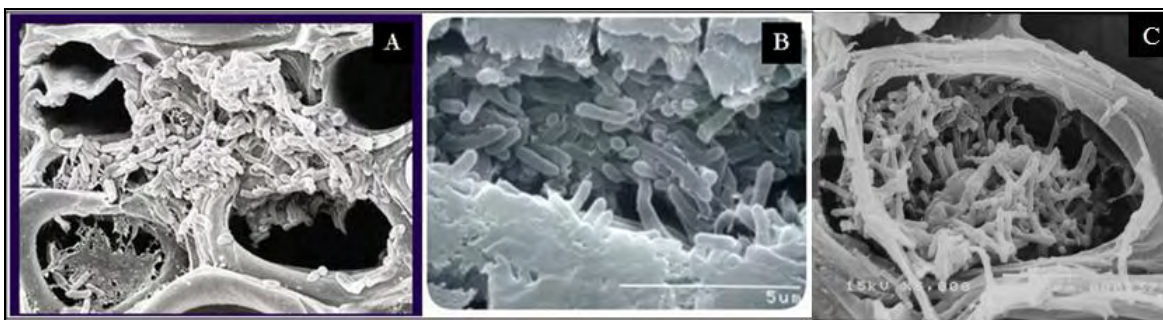


bactéria feita por insetos vetores deve-se ao fato destes se apresentarem em grandes populações e de o patógeno sobreviver no aparelho bucal do sugador. Além dos insetos, o homem também tem participado na disseminação do patógeno através do plantio de mudas doentes, originadas ainda nos viveiros, pela falta de proteção das mudas contra os vetores e/ou pelo uso de borbulhas contaminadas durante o processo de enxertia. Com a norma estadual em São Paulo, que estabelece que a produção de mudas deve ser feita somente em viveiros telados e não mais a céu aberto (FUNDECITRUS, 2003a), a importância do homem na disseminação do patógeno foi consideravelmente reduzida.

Algumas das medidas de manejo propostas para o controle da CVC são: plantio de mudas sadias adquiridas de viveiros protegidos por telas antiafídicas (prevenção), poda de galhos ou ramos doentes com sintomas em plantas acima de dois anos, erradicação de árvores totalmente sintomáticas e controle de insetos vetores com inseticidas.

## **2. *X. fastidiosa*: o agente causal**

*X. fastidiosa* é uma bactéria Gram negativa, aeróbica, restrita ao xilema de plantas (LARANJEIRA *et al.*, 2005) (Figura 2), Apresenta parede celular enrugada em forma de bastonete, podendo ser observada em espaços intercelulares do xilema, tendendo a se acumular em partes específicas, variando em função do hospedeiro e com o tipo de sintoma expresso (PURCELL; HOPKINS, 1996). É estritamente aeróbica e não fermentativa, não halofítica, apigmentada e apresenta ondulações na parede celular que podem estar envolvidas no reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno (FRY; MILHOLLAND, 1990), (WELLS *et al.*, 1987). SCHAAD *et al.* (2004) propôs a classificação da bactéria em três subespécies: *piercei*, *multiplex* e *pauca*, sendo *X. fastidiosa* subsp. *pauca* a responsável pela CVC.



**Figura 2:** Micrografias eletrônicas de um vaso do xilema contendo células de *X. fastidiosa*. A) Foto W. Kitajima. B) (JO Lima). C) Courtesia do Professor Jaime Maia.

O genoma da *X. fastidiosa* compreende um cromossoma circular de 2.609.305 pares de bases (pb) (52,7% rico em bases GC) e dois plasmídeos de 51.158 pb e 1.285 pb, respectivamente. Foi possível atribuir funções putativas a 47% das 2.904 regiões codificantes inferidas (SIMPSON *et al.*, 2000). Os genes ortólogos de algumas proteínas associados à patogenicidade e virulência foram somente identificados em patógenos animais e humanos. Pelo menos 83 genes são derivados de bacteriófagos, os quais incluem genes associados com a virulência de outras bactérias, o que proporciona evidência direta da transferência horizontal mediada por fagos (SIMPSON *et al.*, 2000).

A produção de energia na bactéria *X. fastidiosa* é aparentemente eficiente, sendo observada a presença de todos os genes envolvidos na via glicolítica, no ciclo do ácido tricarboxílico e na fosforilação oxidativa que ocorre nas cadeias de transporte de elétrons. A frutose, manose e glicerol podem ser utilizados em adição à glicose na via glicolítica e há uma completa via para hidrólise de celulose para glicose, consistindo em 1,4 glucanase e glucosidase, sugerindo que a celulose degradada pode suprir a baixa concentração de monossacarídeos existentes no xilema (SIMPSON *et al.*, 2000). A expressão de genes relacionados com a via glicolítica, tais como 6-fosfofructoquinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase e piruvato quinase tipo II, no experimento

de microarranjos realizado por Travensolo *et al.* (2008 e 2009), sugere que esta via está ativa e que a glicose é degradada em piruvato. No entanto Facincani *et al.* (2003) sugeriram que esta bactéria não utiliza a via glicolítica para produzir o piruvato a partir de glicose, valendo-se unicamente da via Entner-Doudoroff.

*Xyella* e *Xanthomonas* são dois gêneros dentro da subdivisão das proteobactérias, *Xanthomonadales*, que pertencem à mesma família. O sequenciamento dos genomas destes patógenos e estudos comparativos entre eles deram a conhecer um alto grau de identidade e colinearidade no esqueleto cromossômico entre espécies e linhagens. As diferenças observadas estão usualmente agrupadas em ilhas genômicas, a maior parte das quais é delimitada por elementos genéticos móveis. Os genes essenciais para a reprodução e sobrevivência envolvidos em funções básicas, associadas com a geração de energia metabólica e com o fluxo de informação genética, são definidos como o genoma “estável”, o genoma “núcleo”, pelo qual é possível seguir a história evolutiva de um organismo (LIU *et al.*, 1999). O genoma “núcleo” de *Xylella* e de *Xanthomonas* compartilha a mesma origem, embora essas espécies tenham evoluído e divergido pelas inserções e deleções potenciais (VITORELLO *et al.*, 2005). Utilizando o algoritmo BlastP para análises comparativas, foi observado que as espécies de *Xylella* compartilham aproximadamente 74% dos genes com as espécies de *Xanthomonas*, enquanto *Xanthomonas* (com um genoma maior) compartilha quase 40% (MOREIRA *et al.*, 2004).

Dentro da espécie *X. fastidiosa*, alguns genomas completos já foram publicados: as estirpes 9a5c, o agente causal da Clorose Variegada dos Citros (SIMPSON *et al.*, 2000) e *X. fastidiosa* Temécula, o agente causal da doença de Pierce da videira (VAN SLUYS *et al.*, 2003). Posteriormente, outras duas estirpes foram parcialmente sequenciadas: Ann-1 (de oleandro) e Dixon (de amêndoa) (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002a,b). No gênero *Xanthomonas*, os genomas completos de duas espécies encontram-se publicamente disponíveis: *Xanthomonas*

*axonopodis* pv. *citri* (Xac) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Da SILVA et al., 2002). Essas quatro estirpes de *X.fastidiosa* compartilham alguns sistemas característicos comumente usados para identificar membros da família e que foram relacionados com importantes funções na sobrevivência e adaptação. Por exemplo, o operon *gum*, o grupo extendido de xanthomonadinas e os genes *rpf*, mesmo identificados nos quatro genomas, apresentam importantes variações na ordem e conteúdo dos genes, e essas variações são provavelmente um dos fatores que diferenciam o fenótipo de cada linhagem.

### **3. Resistência, tolerância e suscetibilidade de citros à CVC**

A resistência de uma planta hospedeira é definida como a capacidade desta em atrasar ou impedir a entrada ou uma possível atividade do patógeno em seus tecidos. Embora na natureza as plantas estejam normalmente expostas a um grande número de microrganismos, a resistência mostra-se como regra, e a suscetibilidade, como exceção. A resistência envolve uma sequência de mecanismos dinâmicos e coordenados, que se iniciam após o contato do patógeno com o hospedeiro. O nível de resistência resulta do somatório das contribuições individuais destes diferentes mecanismos de resistência. Neste caso, as células vegetais constituem-se em barreiras naturais que impedem o ataque dos patógenos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Se o patógeno conseguir transpor a barreira física (a cutícula, os tricomas, os estômatos, as fibras dos vasos condutores, as papilas, camadas de cortiça e tiloses), ele poderá encontrar pela frente substâncias tóxicas já presentes no interior das células do hospedeiro ou substâncias produzidas por este em resposta à atividade agressora (fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos e fitoalexinas.)

Logo após a descrição desta doença em citros, acreditava-se que, como acontece com a maioria das culturas agrícolas, a resistência varietal pudesse ser explorada no controle da CVC. A grande decepção foi observar que as variedades

comerciais de laranja-doce eram todas suscetíveis ao patógeno (MACHADO *et al.*, 1993). No entanto, as tangerinas e os limões não eram e continuam não sendo afetados pela CVC no campo (POMPEU *et al.*, 1998; LARANJEIRA *et al.*, 1998). Existem distintas hipóteses sobre essa aparente resistência ou tolerância. Uma hipótese seria que tangerinas e limões não são preferidos pelas cigarrinhas que colonizam as laranjas-doce (que são suscetíveis), não sendo, portanto, inoculadas pelos vetores. Outra hipótese seria que os mecanismos físicos ou químicos do sistema vascular dessas plantas não permitem a multiplicação da bactéria em seus tecidos. Mas observações indicam que tangerinas e limões são tão preferidos pelos insetos quanto às laranjas; por isso, a primeira hipótese foi descartada. A causa da resistência poderia estar na incapacidade do patógeno em colonizar o xilema das plantas.

De LIMA GARCIA (2007) estudou em detalhes a aparente resistência dos limões e tangerinas, comparando-os com as laranjas-doce, por meio de inoculações artificiais da bactéria em condições de casa de vegetação e da análise morfológica das estruturas internas das plantas. As laranjas-doces Caipira, Natal e Valência; as tangerinas Sunki, Poncã, Cravo e Cleópatra assim como a lima da Pérsia, lima ácida Galego e o limão Cravo foram avaliados pela observação visual dos sintomas, isolamento do patógeno, serologia, microscopia ótica e PCR. Observou-se neste estudo uma grande quantidade de plantas de laranja assintomáticas com presença de *X. fastidiosa*, sendo esta também detectada entre as limas, limões e tangerinas. Observou-se uma alta similaridade das estruturas internas dos vasos do xilema de pecíolos foliares entre os materiais resistentes e os suscetíveis à CVC e sugeriu-se, portanto, que a resistência das tangerinas, limas e limões não está associada, aparentemente, às barreiras físicas que impedem a multiplicação do patógeno no interior da planta, mas, sim, a uma possível presença de substâncias desconhecidas presentes na seiva do xilema ou na parede dos vasos. Das variedades suscetíveis, a laranja Pera foi a que

apresentou maior número de vasos xilemáticos aparentemente obstruídos, e modificações estruturais no tecido condutor foram observadas.

A não ocorrência de CVC em limas e limões poderia estar relacionada com a presença de microrganismos endofíticos que, por intermédio de competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira ou da produção de compostos antimicrobianos, poderia estar controlando a concentração do patógeno no interior da planta, por impedir sua multiplicação. Experimentos com inrações entre endofíticos e *X.fastidiosa* indicam que o crescimento desta foi estimulado *in vitro* por *Methylobacterium extorquens* e inibido por *Curtobacterium flaccumaciens*, evidenciando que realmente ocorre uma interação entre endofíticos e o patógeno (LACAVA *et al.*, 2004)

A Navelina ISA 315 (*Citrus sinensis* L.Osbek.) teve origem na Itália, sendo resultante de um clone recuperado *in vitro* por cultivo de óvulos não desenvolvidos e foi introduzido no Brasil e estabelecido em campo no ano de 2000, para início de estudos relacionados à resistência a CVC. Segundo SOUZA *et al.* (2006), a Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343 apresentaram-se como hospedeiras assintomáticas de *X. fastidiosa*. STUCHI *et al.* (2007) relataram que apenas a Navelina ISA 315 permaneceu sem sintomas após sete anos no campo, mesmo em condições de alta pressão de inóculo ou após receber inoculações artificiais via subenxertia com plantas sintomáticas. FADEL (2011) reportou esta cultivar como tolerante após avaliações visuais e por meio da PCR em tempo real. Ainda há necessidade de estudos mais aprofundados em relação à interação patógeno-hospedeiro, para que este cultivar possa ser utilizado comercialmente e em programas de melhoramento vegetal.

A laranja Pera e a cultivar Navelina ISA315 foram escolhidas para este estudo pela alta suscetibilidade e por não desenvolver sintomas, respectivamente.

#### 4. Interação Patógeno- Hospedeiro

As interações patógeno-hospedeiro podem ser classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) e incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado conduzindo à resistência, mas é tardiamente ativado ou não ativado em interações compatíveis condicionando a doença (RESENDE *et al.*, 2003). O principal problema das interações de compatibilidade é o grande arsenal de patogenicidade que o patógeno dispõe para atacar seu hospedeiro, como a produção de toxinas, secreção de enzimas extracelulares e a liberação de fatores de virulência (WHITE *et al.*, 2000), tornando a planta bastante suscetível a esse ataque.

A proteção contra a maioria dos fitopatógenos em vegetais é conseguida por meio de barreiras pré-formadas, tais como cutículas espessas e presença de compostos antimicrobianos (HAMMOND-KOSACK, 2000). A defesa induzida segue um caminho básico de reconhecimento e transdução de sinais para ativar as respostas de defesas, tais como: geração de espécies ativas de oxigênio (DIXON, 1994; BOLWELL, 1995), morte programada de células no sítio de infecção (HR) (HAMMOND-KOSACK, 1996), deposição de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (CORBIN, 1987), lignificação da parede das células (GRAND, 1987), síntese e acúmulo de fitoalexinas (GUSTINE, 1990) e síntese de proteínas PR antimicrobianas (DIXON, 1994).

Os mecanismos de defesa de plantas suscetíveis respondem mais lentamente e em menor intensidade após a infecção. Assim, o tempo de reconhecimento a um microrganismo invadindo uma planta e a rápida resposta a essa invasão diferem entre as plantas resistentes e as suscetíveis (KELLER, 1999; YANG, 1997). O patógeno, por sua parte, tenta contrapor essas defesas, desenvolvendo novas estratégias em função da resposta do hospedeiro, induzindo

ou reprimindo genes que ajudam na sobrevivência da bactéria no xilema nas condições particulares de cada planta.

Patogenicidade e virulência são termos que definem a capacidade de um microrganismo em causar doença em um hospedeiro suscetível, através de um conjunto de recursos que possibilitam sua sobrevivência e multiplicação no hospedeiro. A patogenicidade refere-se aos mecanismos de infecção e desenvolvimento da doença, e a virulência mede a intensidade da patogenicidade (Da SILVA, 2004). Fungos e bactérias patogênicos expressam grupos de genes envolvidos no estabelecimento da infecção, enquanto outros genes são expressos no hospedeiro como resposta. A regulação dos genes de patogenicidade envolve uma complexa troca de sinais entre o hospedeiro e o patógeno (DIXON; LAMB, 1990). O sucesso da infecção por microrganismos patogênicos requer ligação à superfície do hospedeiro, degradação das barreiras químicas e físicas do hospedeiro, produção de toxinas e inativação das defesas da planta (LAMB *et al.*, 1989).

Em relação aos mecanismos de colonização e patogenicidade da *X. fastidiosa*, estes são baseados principalmente em estudos com a doença mal de Pierce em videiras (HOPKINS, 1989). Segundo o mecanismo proposto para essa bactéria, agregados de bactérias (biofilmes), gomas e tiloses presentes no xilema obstruirão a passagem de água, entretanto não se sabe como ocorre a obstrução suficiente para gerar estresse hídrico. A bactéria agrega-se nos vasos xilemáticos através de goma polissacarídica e outras estruturas, como as fímbrias (HOPKINS, 1989). Essas gomas podem funcionar como uma resina trocadora de cátions, ligando nutrientes iônicos e disponibilizando-os de forma concentrada para a bactéria, o que seria um importante mecanismo de sobrevivência em um ambiente onde os nutrientes estão muito diluídos. Outro aspecto importante é o movimento sistêmico, ou seja, como a bactéria se propaga para colonizar o hospedeiro. Para a bactéria movimentar-se pelos vasos xilemáticos, é preciso a degradação dos



compostos da membrana (celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteína) por enzimas digestivas produzidas pela bactéria contra o tecido do hospedeiro.

A habilidade para colonizar o hospedeiro está associada com capacidade eficiente de aderência e multiplicação nos vasos, o que resulta no bloqueio do xilema e consequentes sintomas provocados pelo estresse hídrico. As células que compõem o biofilme apresentam maior resistência a biocidas, antibióticos e resposta de defesa do hospedeiro (SOUZA *et al.*, 2004). Assim, também nestas células é possível identificar genes de patogenicidade ligados à adesão, e de adaptação (SOUZA *et al.*, 2005).

O conhecimento da sequência completa deste genoma representou um grande passo para a compreensão das vias metabólicas, replicativas e para a determinação dos mecanismos de patogenicidade, mas ainda é preciso ter mais informação para chegar a um entendimento mais profundo sobre os mecanismos que permitem à bactéria sobreviver num ambiente inóspito e adaptar-se a um espectro de hospedeiro tão amplo e diverso. Estudos em genômica funcional e proteômica estão sendo desenvolvidos no intuito de conhecer melhor o complexo e dinâmico sistema de sinais e fatores de patogenicidade que operam em conjunto, ocasionando a virulência ou a tolerância na planta hospedeira. SIMPSON *et al.* (2000) apresentam os distintos sistemas relacionados com patogenicidade na *X. fastidiosa*: detoxificação e adaptação; produção de antibióticos e fluxo de drogas, síntese de toxinas e secreção; degradação de paredes celulares, regulação dos fatores de patogenicidade, síntese e secreção dos EPSs, genes relacionados à virulência, biogênese das fímbrias, adesão e captura do ferro.

Assim, existem distintos tipos de genes relacionados à patogenicidade e à virulência nas bactérias fitopatógenas (classificados como Classe I, II e III). Os genes de degradação de tecidos, de toxinas de alto ou baixo peso molecular e de enzimas que destroem a integridade estrutural do tecido do hospedeiro, estão

incluídos na Classe I de virulência ou “genes de virulência verdadeiros”. São classificados como genes de virulência Classe II aqueles que codificam fatores de regulação e atividade da expressão dos genes da Classe I, como as proteases específicas, metilases, chaperoninas, etc. E, finalmente, os genes de virulência da Classe III são aqueles que codificam proteínas que comprometem a resposta da planta contra o patógeno, como transportadores específicos, sistema proteção redox, degradadores xenobióticos, osmossensores e reguladores de pH (WASSENAAR; GAASTRA, 2001).

Têm surgido na literatura alguns modelos, nos quais se tenta explicar quais vias de transdução de sinais a nível molecular que promovem ou inibem a adesão aos tecidos do hospedeiro, entre as próprias células da bactéria, e a secreção de exopolissacarídeos ou gomas. Assim, também tentam explicar como todos esses fatores operam em conjunto obstruindo a passagem de seiva e nutrientes através dos vasos do xilema ou, pelo contrário, permitindo a movimentação entre os vasos do xilema e colonização da planta, ou transmissão ao inseto vetor.

## **5. Modelo de colonização na planta e transmissão ao inseto**

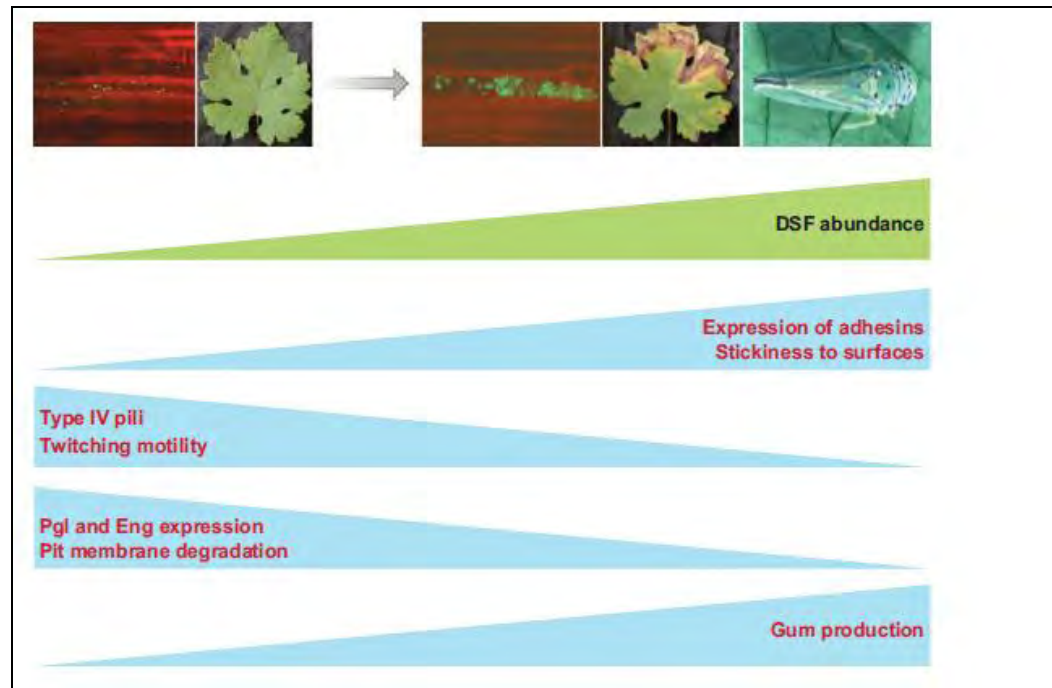
Segundo CHATERJEE *et al.* (2008), o complexo estilo de vida da *X. fastidiosa* como colonizador de ambas, a planta e o inseto, envolve características em conflito com esses estádios; portanto necessita de um esquema de regulação gênica que permita às células expressar distintas características para poder coexistir na planta. Este autor sugere, portanto, a adaptação da percepção e função da mesma molécula de sinalização, o fator DSF, às próprias necessidades para a colonização dos distintos hospedeiros.

De forma simplista, a virulência em *X. fastidiosa* está influenciada principalmente por: adesinas (fímbricas e afímbricas) envolvidas na adesão a superfícies e célula-célula para formar o biofilme; os pili tipo IV envolvidos no

movimento “twitching motility” ao longo dos vasos xilemáticos e talvez também entre eles; e enzimas extracelulares, tais como poligalacturonases, endoglucanases que são requeridas para a degradação das membranas de pontuação que permitem passar de um vaso a outro.

Todas essas características estão controladas pelo acúmulo do fator DSF, portanto exibem uma dependência do tamanho populacional. Curiosamente, a produção de pili tipo IV e as enzimas extracelulares são reguladas de maneira oposta às adesinas, pelo DSF, sendo reprimidas com altas concentrações deste fator. A colonização da planta e o desenvolvimento dos sintomas são mais eficientes quando as células não expressam adesinas, o que permite sua livre movimentação dentro dos vasos do xilema.

Quando a concentração do DSF está em baixa concentração nos vasos que não possuem grandes colônias de *X. fastidiosa*, a expressão das adesinas seria baixa e a das enzimas extracelulares e *pili* tipo IV alta. Esta seria uma fase exploratória da colonização da planta na qual se espera um movimento mais frequente até novos vasos xilemáticos. Por outro lado, nos vasos onde se formam colônias maiores, os níveis do DSF aumentariam, suprimindo a subsequente produção de enzimas e *pili* tipo IV, embora produzindo mais adesinas que dificultariam o movimento. Assim, também provavelmente, o DSF suprime a multiplicação da bactéria nos vasos, enquanto o número celular aumenta e o DSF se acumula. Este mecanismo atuaria como um “feedback” negativo para prevenir o crescimento excessivo nos vasos, o que pode resultar deletério no caso de bloqueio do vaso. (Figura 3)



**Figura 3:** Modelo para a transdução de sinais, colonização da planta e aquisição pelo inseto para *X. fastidiosa*. Fonte: CHATERJEE *et al*, 2008.

## 6. A análise da expressão gênica através de microarranjos

A genômica, ciência que estuda como os genes ou a informação genética estão organizados no genoma e de que forma essa organização determina sua função, permite a análise sistemática e simultânea de um grande número de genes e o estudo dos processos biológicos como um todo. A “Genômica” é constituída pela “Genômica Funcional”, que emprega a informação da genômica estrutural para avaliar os processos biológicos de uma forma sistemática (STAUDT *et al.*, 2000).

O aparecimento dos microarranjos de DNA, na metade da década de 1990, forneceu uma metodologia capaz de permitir a análise do padrão de expressão de milhares de genes simultaneamente. Trata-se de um sistema avançado para o estudo simultâneo de expressão de genes (DIEHN; RELMAN, 2001; FREEMAN *et*

*al.*, 2000). Essa técnica é baseada em um arranjo de alta densidade de sequências gênicas específicas, as quais são hibridizadas com cDNA marcados pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes através de uma reação com a enzima transcriptase reversa. O desenvolvimento da tecnologia de microarranjos de DNA proporcionou uma excelente oportunidade para caracterizar os genes responsáveis pelas doenças causadas pela bactéria *X. fastidiosa*.

Atualmente, existem muitas plataformas de microarranjos além dos microarranjos chamados de “home made” (fabricados no próprio laboratório), tais como as Plataformas Affimetrix, Agilent, Nimblegen, Illumina, entre outras, que utilizam métodos distintos para a fabricação dos arranjos. A companhia Affymetrix foi a primeira a lançar os microarranjos de oligonucleotídeos, através da combinação de microfotolitografia (que é usada para a manufatura de chips de computadores), e de química combinatória, (empregada na indústria farmacêutica). A Affimetrix patenteou um método industrial de produção de microarranjos de DNA de alta qualidade. Ao invés de ligar as sondas de cDNA ao arranjo, por meio da síntese química direcionada por luz, são construídos oligonucleotídeos em posições determinadas sobre uma placa de quartzo. Cada placa pode comportar de 500 a 400 GeneChips, dependendo do número de sondas sobre o microarranjo. Os arranjos de oligonucleotídeos são considerados mais exatos e mais versáteis que os arranjos impressos de cDNA (MIKLOS; FREYER, 2005).

Mais recentemente, o sequenciamento direto dos transcritos pelas tecnologias de alto desempenho, chamadas de “hight throughput” (RNA-Seq), tornou-se uma alternativa adicional aos microarranjos e começou a substituir as técnicas de SAGE e MPSS (BUSH; LOHMANN, 2007). Assim como estas, RNA-Seq não depende da anotação genômica para a seleção prévia das sondas e evita os vieses da hibridização dos microarranjos. Por outro lado, RNA-Seq possui novos algoritmos e desafios logísticos, e as estratégias laboratoriais requerem

demorados procedimentos. Portanto, RNA-Seq é o método de escolha em projetos que utilizam organismos não modelos e para a descoberta de transcritos e anotação genômica. Os microarranjos, por sua vez, devido aos sólidos processos para o processamento de dados e a análise de amostras, ainda são preferidos para projetos que envolvem um grande número de amostras, e para a análise de transcriptomas em organismos modelos com genomas bem caracterizados e anotados (BAGINSKY *et al.*, 2010).

Técnicas, como Microarranjos de DNA de alta densidade, utilizadas na Genômica Funcional, têm permitido o estudo da estrutura, organização e função de milhares de genes e sua expressão simultânea em um único experimento. Conjuntamente, a ampliação de sequências de DNA depositadas em bancos de genes, resultante de diversos projetos genoma realizados nos últimos anos, permitiu o aperfeiçoamento de novas estratégias para a elucidação do padrão de expressão gênica em diversos organismos. Um dos campos nos quais esta tecnologia causou maior impacto e aumentou sua importância, é o da análise da interação patógeno-hospedeiro (DIEHN; RELMAN, 2001). A alteração no padrão de expressão da planta hospedeira, quando infectada, e a classificação do agente causal com base neste padrão induzido são de suma importância na diagnose e no tratamento de doenças de plantas.

NUNES *et al.* (2003) apresentaram evidências de um controle coordenado da transcrição dos elementos de transferência horizontal, comparando 12 isolados de *X. fastidiosa* através de microarranjos.

KOIDE *et al.* (2004) compararam, através da técnica de microarranjos, isolados de *X. fastidiosa* patogênico e não patogênico e observaram que o isolado J1a12, quando inoculado em tabaco e em citros, não apresentou sintomas. Quando este foi comparado com o isolado 9a5c, considerado altamente patogênico, não apresentou genes relacionados à adesão e patogenicidade.

Assim, também KOIDE *et al.* (2006) analisaram a expressão gênica global da resposta a altas temperaturas (“heat shock”) através de microarranjos, revelando uma complexa rede de genes que atuam juntos em resposta à temperatura.

SOUZA *et al.* (2003) analisaram a expressão gênica em dois estádios de crescimento na *X. fastidiosa* (uma e quarenta e seis vezes de passagem por meio de cultura) e sua relação com a patogenicidade através de microarranjos. Foi observado que a maioria dos genes induzidos após uma passagem estava associada com adesão e provavelmente adaptação ao ambiente. Assim, também, SOUZA *et al.* (2004) analisaram o padrão de expressão gênica da *X. fastidiosa* durante a formação do biofilme através de microarranjos, observando que a expressão gênica nas células que estão desenvolvendo o biofilme é similar aos outros sistemas já caracterizados.

TRAVENSOLO *et al.* (2008; 2009) analisaram por microarranjos a expressão da bactéria *X. fastidiosa* em diferentes meios de cultura (meio XDM e BCYE). Foi observada a expressão de genes relacionados com metabolismo de aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, energético, entre outros, sugerindo que esta bactéria é capaz de sintetizar substâncias de acordo com a sua necessidade e de acordo com a escassez de nutrientes no meio de cultura.

ZAINI *et al.* (2008) estudaram o perfil de expressão gênica de *X. fastidiosa* em resposta à limitação de ferro através de microarranjos e observaram a indução de genes que codificam pilis tipo IV, assim como bactericinas do tipo Colicina V.

SHI *et al.* (2007) analisaram o papel do gene *algU* através de mutação e a análise global da expressão gênica através de microarranjos, encontrando diminuição na agregação célula-célula, adesão, formação do biofilme e virulência no mutante. Do mesmo modo, SHI *et al.* (2009) identificaram vários genes regulados pelo gene *GacA* também através de mutação e da análise da expressão

gênica através de microarranjos, sugerindo o envolvimento deste gene na regulação de vários fatores que contribuem na adesão e formação do biofilme, assim como em processos fisiológicos que poderiam potencializar a adaptação ao estresse do ambiente, ou mesmo a competição dentro do xilema.

## **7. A técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) e sua utilização na validação de dados de microarranjos**

A validação dos dados obtidos em análises de microarranjos torna-se cada vez mais necessária e criteriosa, uma vez que, além do grande volume de dados obtidos, os mesmos são analisados de forma integrada, fornecendo padrões globais de transcriptoma para determinados sistemas biológicos. A ferramenta de PCR quantitativa em tempo real surgiu como uma tecnologia eficiente para validação de dados de arranjos devido a algumas características, como quantificação, rapidez e economia de RNA, utilizando até 1.000 vezes menos RNA que nos ensaios convencionais (RAJEEVAN, 2001a).

A diferença com a PCR convencional (ou PCR qualitativa) é que o produto da amplificação é analisado ao término do processo, por meio de eletroforese. Na PCR em tempo real, esse passo pode ser evitado, pois a tecnologia combina a amplificação de DNA com a imediata detecção de produtos em um único tubo, diminuindo o risco de contaminação causada pela abertura do tubo após a reação. Além disso, a PCR em tempo real demanda menos tempo do que análises baseadas em gel e pode gerar um resultado quantitativo (KUBISTA *et al.*, 2006). Os métodos de detecção atual são baseados nas mudanças da fluorescência que, por sua vez, é proporcional ao acúmulo de cópias do alvo. A fluorescência é monitorada durante cada ciclo da PCR, gerando um gráfico da amplificação, o que permite que o usuário acompanhe a reação em tempo real.



O sistema baseia-se na detecção e na quantificação de um repórter fluorescente, enquanto ocorre a amplificação. Este repórter consiste em oligonucleotídeos e sondas específicas marcadas, ou fluoróforos intercalantes na cadeia do DNA, que emitem fluorescência a cada hibridização e a cada passo de amplificação (KUBISTA *et al.*, 2006). No caso deste trabalho, foi escolhida a molécula intercalante SYBR Green, a qual emite fluorescência repórter que é determinada no final de cada ciclo da PCR. A curva de amplificação define três etapas: baseline, fase exponencial e fase estacionária. O “cycle treshold” (Ct) é definido como o número de ciclos nos quais a reação inicia a sua fase exponencial de amplificação, cruzando o “threshold” (limiar), que é definido pela linha de início de sinais gerados. Em todas as reações se usa o corante Rox como referência passiva, o qual normaliza a fluorescência presente no meio e a fluorescência do repórter.

Na análise e comparação dos resultados de ensaios de PCR em tempo real, muitos pesquisadores são confrontados com muitas variáveis incontrolláveis que podem causar interpretação errada dos resultados. Tais variáveis podem ser a quantidade de material inicial, eficiência enzimática e diferenças entre tecidos, indivíduos ou condições experimentais. Como o objetivo é fazer uma boa comparação, a normalização pode ser utilizada como método de correção para essas variáveis. O método mais usado é a normalização por um gene endógeno, excluindo a variação em virtude de diferentes quantidades de RNA; no entanto, é fundamental que o gene endógeno esteja expresso constantemente e em mesmo nível, independentemente do grupo experimental ou das diferentes amostras. Os dois métodos mais utilizados de quantificação são a quantificação absoluta e a quantificação relativa (SELLARS *et al.*, 2007). Na quantificação absoluta, o número exato de cópias do gene de interesse é calculado. Já na quantificação relativa, a expressão do gene de interesse em uma amostra é relativamente expressa ao mesmo gene de outra amostra, utilizada como uma referência.

Para a quantificação relativa, os níveis de expressão gênica são calculados pela razão entre a quantidade do gene-alvo e a quantidade do gene endógeno que, por sua vez, está presente nas amostras. Existem métodos simples e mais complexos para a quantificação relativa, dependendo da eficiência da PCR e do número de genes de referência utilizados. O método delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) é o mais simples, pois é utilizada uma comparação direta dos valores de Ct entre o gene-alvo e o gene de referência. Porém, as eficiências da PCR do gene-alvo e do gene de referência devem estar perto de 100%, e não podem diferir mais do que 10%. A validação da eficiência de amplificação dos “primers” e do controle endógeno é requerida para uma quantificação por este método segundo o guia de informação mínima requerida para a publicação de experimentos RT-qPCR (BUSTIN *et al*, 2009). Portanto, somente o início do experimento requer uma curva-padrão para comparar a eficiência da PCR do alvo e do controle endógeno (SCHMITTGEN, 2008).

Assim, a quantificação relativa envolve a escolha da amostra calibradora. A amostra calibradora pode ser qualquer amostra do experimento que possa ser comparada com as outras amostras. Inicialmente, o  $\Delta Ct$  entre o gene-alvo e o gene de referência (endógeno) é calculado para cada amostra (para amostra de interesse e também para amostra calibradora). Então, a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra de interesse e o  $\Delta Ct$  do calibrador é calculada, gerando o valor do  $\Delta\Delta Ct$ . O valor normalizado da expressão do gene-alvo é igual a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , valor que pode ser usado para comparar os níveis de expressão das amostras.

Os microarranjos de DNA proporcionam maior vantagem para estudos genômicos, embora a qualidade dos dados de expressão gênica, obtida através de microarranjos, possa variar segundo a plataforma e os procedimentos utilizados. A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é uma ferramenta comumente utilizada para a confirmação dos dados de expressão gênica, obtidos por meio de análises de microarranjos, embora muitas vezes estes dados não se

correspondam. Atualmente, não existe uma definição padrão da validação, pois as correlações de RT-qPCR com dados de microarranjos raramente são apresentadas na literatura; e os dados que não se correspondem são raramente explicados.

Encontra-se bem documentado que ambas as técnicas RT-qPCR e os microarranjos possuem características próprias (BUSTIN, 2002; CHYAQUI, 2002; FREEMAN, 1999; WURUMBACH, 2003) que podem influenciar de forma significativa os dados obtidos por cada um dos métodos. Aliás, existem muitas plataformas distintas para ambos os microarranjos e análises RT-qPCR, o que gerou um debate sobre qual dos métodos produz a medida mais precisa da expressão gênica (BARRET, 2003; BRAZEAU, 2004; BUSTIN, 2000; MAH, 2004; YAUK, 2004; ZHU, 2005). Fatores tais como a qualidade do RNA, eficiência das transcriptases reversas, eficiências distintas de incorporação dos fluoróforos, hibridações inespecíficas nos microchips e erros próprios da RT-qPCR, assim como os distintos tipos de normalização aplicados para os microarranjos e para RT-qPCR, produzem variabilidade, o que pode influir nas correlações entre esses dois métodos.

O mais comum na literatura é simplesmente afirmar que os resultados se encontram validados geralmente sem achar uma correlação ou com uma correlação extremamente baixa. RAJEEVAN *et al.* (2001a) consideram um resultado válido, quando o valor de FC medido por ambos os microarranjos e a RT-qPCR é igual ou maior que 2 vezes, sem considerar a magnitude da diferença. Vários estudos têm procurado determinar quais os fatores que influenciam essa variação. Menores correlações foram reportadas para genes exibindo valores de FC menores que 2 do que para aqueles maiores que 2 (WURUMBACH, 2003; ETIENNE, 2004; RAJEEVAN, 2001b). ETIENNE *et al.* (2004) acharam que a maior distância entre a localização dos “primers” e as sondas do microarranjo em um determinado gene diminui também a correlação entre os métodos. BECKMAN

*et al.* (2004) acharam que os “spots” de baixa intensidade nos microarranjos em dois canais (duas cores) possuem consideravelmente menores correlações com os dados da RT-qPCR que os “spots” de alta intensidade.

Este trabalho vai levar em consideração o sentido da expressão, não a extensão do valor LogFC nem o número de vezes a mais, que foi diferencialmente expresso em uma, ou outra condição.

### III. OBJETIVO

1. Identificar e analisar a expressão de genes diferencialmente expressos através de lâminas de microarranjos representando todos as “ORF” identificados no projeto de sequenciamento da bactéria *X. fastidiosa* em duas situações:

1.a- Dentro de uma planta que está manifestando os sintomas de CVC, a variedade suscetível (Pera);

1.b- Quando a bactéria se encontra dentro de uma variedade tolerante, a cultivar Navelina ISA 315. Esta cultivar foi reportada como hospedeiro assintomático por Souza *et al.* (2006) e foi confirmada sua tolerância por FADEL (2011) através de avaliação visual e RT-qPCR.

2. Relacionar a informação obtida sobre possíveis genes de patogenicidade com os fenótipos sintomático e assintomático das variedades, e, com os mecanismos de patogenicidade descritos na literatura.

2.a- Identificar os genes diferencialmente expressos através de “software” específico: Imogene (Biodiscovery); Array Weights e R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)): pacote Limma ([bioconductor.org/packages/2.4/bioc/HTML/limma.html](http://bioconductor.org/packages/2.4/bioc/HTML/limma.html));

2.b- Categorizar os genes diferencialmente expressos nas categorias descritas no “site” do projeto Genoma: <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>;

2.c- Analisar a distribuição e número de genes diferencialmente expressos entre as subcategorias relacionadas com patogenicidade para cada categoria;

2.d- Analisar os dados de expressão gênica dos genes que poderiam ter influência nos distintos processos bioquímicos associados à patogenicidade descritos por SIMPSON *et al.* (2000) ou por outros autores, tais como detoxificação e adaptação, secreção e síntese de EPS, adesão, síntese e secreção de toxinas e biogênese das fímbrias entre outros.

3. Validação do experimento de microarranjos através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR).

3.a- Escolha e desenho dos “primers” e controle endógeno, utilizando o “software” “Primer Express 3.0” (*Applied Biosystems*);

3.b- Otimização das condições de amplificação com o aparelho de PCR em tempo real: *Applied Biosystems* modelo 7500;

3.c- Validação da especificidade e eficiência de amplificação dos “primers” (curvas de “melting” e curvas-padrão);

3.d- Quantificação relativa, utilizando o método delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )

3.e- Validação do experimento de microarranjos por intermédio da comparação da expressão diferencial pelas duas técnicas em número de vezes mais expresso e  $\text{Log}_2\text{FC}$ .

#### **IV. HIPÓTESE**

Podem existir diferenças nos níveis de expressão dos genes relacionados com a patogenicidade entre as plantas suscetíveis e as tolerantes; com uma maior expressão de genes de virulência, degradação e mobilidade nas suscetíveis, que permita a colonização da planta. Por sua vez, nas plantas tolerantes, a bactéria poderia apresentar maior expressão de genes de adesinas, de regulação negativa da patogenicidade ou de resposta ao estresse, seja em resposta às defesas da planta hospedeira ou à interação com algum microrganismo endófito.

#### **V. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **1. Desenho Experimental**

O desenho experimental consistiu em três preparações independentes de cDNA marcado com fluoróforos, derivados de RNAs de três repetições independentes de cada condição biológica (3 plantas de laranja Pera e 3 de laranja Navelina). Esses cDNAs foram hibridizados em lâminas, contendo produtos de PCRs impressos em duplicata contendo controles negativos distantes geneticamente. Esse microarranjo da *X. fastidiosa* (com as 2600 ORF e os controles negativos), foi padronizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP de Jaboticabal por TRAVENSOLO (2008 e 2009).

A condição da bactéria *X. fastidiosa* dentro da cultivar assintomática Navelina ISA 315 foi considerada, nesta análise, como condição experimental (marcada com fluoróforo Cy5) e dentro da variedade suscetível Pera como controle (marcada com fluoróforo Cy3).

Também, foram realizadas três hibridações entre uma planta sadia Navelina ISA 315 (condição experimental) e a planta sadia Pera (condição controle), para descartar amplificação inespecífica com o genoma da planta. Ambas, a Pera e a Navelina ISA 315 sadias, foram coletadas dentro da casa de vegetação, protegidas de qualquer contaminação via inseto, e produzidas por microenxertia.

## **2. Isolado bacteriano e material vegetal**

A linhagem bacteriana de *X. fastidiosa* utilizada foi a 9a5c (isolado de citros), sequenciada no Projeto Genoma ONSA-FAPESP. Para o experimento, as bactérias foram cultivadas em meio BCYE (WELLS *et al.*, 1981), a 28°C, em agitação por 6 dias.

As amostras vegetais das variedades mencionadas foram fornecidas pelo Dr. Stuchi e coletadas no campo, na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, São Paulo. As condições climáticas e de solo dessa Estação foram semelhantes, já que os sítios de coleta se separam por aproximadamente 500 m. O clima é considerado subtropical: temperatura média de 16,8°C a 30,6°C, chuva média anual de 1.550 mm. O tipo de solo é Latossolo vermelho distrófico típico, com textura média. A Estação Experimental se encontra a 20°53'16" S (latitude), 48°28'11" W (longitude) em São Paulo, Brasil. As amostras de laranjeira Pera foram coletadas em plantas com sintomas típicos de CVC, dispostas em talhão experimental, enquanto as amostras da cultivar Navelina foram coletadas em plantas utilizadas em estudo de avaliação da tolerância desta cultivar à CVC (FADEL, 2007). Em Novembro de 2006, plantas de Pera com sintomas avançados de CVC, com grau três, pela escala diagramática de AMORIM *et al.* (2003), enxertadas sobre portainjerto limão cravo foram submetidas à poda drástica. Em Março de 2007, realizou-se, naquelas plantas de Pera, a enxertia em "T" invertido utilizando borbulhas de plantas assintomáticas da cultivar Navelina ISA 315, oriundas de três plantas estabelecidas em campo no ano de 2000. Essas plantas,

apesar de expostas a condições naturais de infecção há sete anos, não apresentaram sintomas de CVC, porém foram positivas para presença de *X. fastidiosa* via PCR (STUCHI *et al.*, 2007). Em Dezembro de 2008 já se havia formado uma nova copa da variedade Navelina ISA 315 nessas plantas. O manejo e tratos culturais foram usuais, somente sem aplicação de inseticidas visando à manutenção da população de cigarrinhas e conseqüente inoculação natural de *X. fastidiosa*. Em Janeiro e Agosto de 2009, a concentração da bactéria foi avaliada em 10 plantas através da observação de sintomas (utilizando a escala diagramática acima citada) e da quantificação absoluta pela RT-qPCR usando a curva padrão desenvolvida por OLIVEIRA *et al.* (2002). Por meio das citadas avaliações, a cultivar Navelina ISA 315 foi reportada tolerante à CVC por FADEL (2011).

As plantas usadas como controles sadios, por sua vez, provêm de microenxertia, e foram mantidos e coletados na casa de vegetação.

### **3. Coleta das amostras**

As folhas da laranjeira Pera foram coletadas de ramos com sintomas avançados, com grau três, pela escala diagramática de AMORIM *et al.* (1993), enquanto da laranjeira assintomática, Navelina ISA 315, as folhas foram coletadas em uma amostra composta (folhas pertencentes a vários ramos assintomáticos). Foram coletadas de 30-35 folhas de três plantas por cada variedade.

Assim, foram escolhidas para a análise de expressão gênica, as três plantas da cultivar Navelina ISA 315 com a maior concentração bacteriana na avaliação por RT-qPCR (realizada em Janeiro de 2009), que não apresentaram variações significativas na avaliação de Agosto de 2009. As concentrações de *X. fastidiosa* nessas 3 plantas foram de  $6,8 \times 10^3$ ,  $6,5 \times 10^3$  e  $6,3 \times 10^3$  cópias de *X. fastidiosa*/ DNA total na primeira avaliação; e de  $8,2 \times 10^3$ ,  $1,29 \times 10^4$  e  $5,07 \times 10^3$  na



segunda avaliação, respectivamente.

Do mesmo modo, foi coletado da casa de vegetação, o mesmo número de folhas de três plantas sadias de cada variedade, para usar como controles negativos.

#### **4. Extrações de RNA**

Aproximadamente 200 mg de pecíolo e nervura central das folhas sintomáticas e das assintomáticas foram cortados e macerados em N<sub>2</sub> líquido em cadinho e transferidos a microtubo do tipo “ependorf”, contendo 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen). O material foi misturado em vórtex e incubado, por 5 min, a 25 °C. Imediatamente, 2 mL de clorofórmio foram adicionados e misturados. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 3 min a 25°C para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Após esse tempo, o material foi centrifugado a 7.500 xg, por 10 min, a 5 °C. Após a centrifugação, a fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo, e o RNA foi precipitado pela adição de 2,5 mL de álcool isopropílico. A solução foi incubada a 25°C por 10 min e centrifugada a 12.000 xg por 10 min, a 5°C. Removido o sobrenadante, o sedimento formado foi lavado com 5 mL de etanol a 75%, sendo novamente coletado por meio de centrifugação a 7.500 xg, por 5 min, a 5 °C. No final do procedimento, o RNA foi secado rapidamente e solubilizado em H<sub>2</sub>O livre de RNase (água Milli-Q tratada com DEPC - 0,01% - H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>).

#### **5. Quantificação do RNA**

A integridade das amostras de RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, contendo tampão de MOPS [10x] (MOPS 200 mM, AcNa 50 mM, EDTA 10 mM) e 5,5 % v/v com formaldeído absoluto. Foram dissolvidos aproximadamente 1 -2 µg de RNA em 5 µL de formamida deionizada e

adicionados 5  $\mu\text{L}$  de solução de corrida para RNA (1 volume de tampão [10x] de formaldeído, 2 volumes de formaldeído absoluto, 1 volume de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio e 1 volume de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ ), e aquecidos a  $65^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Imediatamente, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de SDS/glicerol/azul de bromofenol [10x] para cada amostra e aplicado no gel. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão de corrida [1x] (MOPS 20 mM, AcNa 5 mM, EDTA 1 mM), durante 1h 30min a 80 V constantes. Como marcador molecular de RNA, foi utilizado o RNA “ladder” (“Life Technologies”), com seis fragmentos visualizados de 0,24 a 9,49 Kb.

## **6. Obtenção do cDNA marcado com compostos fluorescentes Cy3 e Cy5**

### **6.1. Reação de transcrição reversa**

A obtenção de cDNAs fluorescentes para as reações de hibridização foi realizada em um microtubo contendo 100  $\mu\text{g}$  de RNA total, 15  $\mu\text{g}$  de oligonucleotídeos exâmeros aleatórios pdN<sub>6</sub> (“Amersham Bioscience”), 4U de RNAsin (Promega) e água para completar o volume final para 9,0  $\mu\text{L}$ . Essa mistura foi agitada por pipetagens, incubada a  $70^\circ\text{C}$  por 5 min e mantida a  $4^\circ\text{C}$  por 5 min, para permitir o pareamento dos oligonucleotídeos com o RNA. Foram utilizados 100  $\mu\text{g}$ , considerando que o RNA bacteriano possa estar diluído com RNA de origem vegetal.

Após a incubação, foi adicionada a cada tubo uma solução contendo: 6  $\mu\text{L}$  de tampão 5X ImProm, 3,6  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25mM, 3  $\mu\text{L}$  dNTPs 5mM A/C/G, 2mM T; 2  $\mu\text{L}$  de ImPromII Reverse transcriptase (“Promega”) e 2 $\mu\text{L}$  do dUTP-Cy3 (ao RNA Pera) ou dUTP-Cy5 (ao RNA Navelina). Para a síntese do cDNA fluorescente, as amostras foram incubadas a  $25^\circ\text{C}$ , por 5 min, e  $40^\circ\text{C}$  durante 3 horas no termociclador PC-100 “Programmable Thermal Controller” (“MJ Research INC.”).

Três reações de transcrição reversa distintas (uma para cada amostra biológica: as três plantas) foram realizadas para as duas variedades, assim como para os controles sadios (Pera e Navelina ISA 315). Essas amostras foram, posteriormente, hibridizadas em triplicata (em três lâminas distintas, uma para cada planta), para diminuir a variação na expressão gênica não relacionada com a presença da *X. fastidiosa*.

## **6.2 Degradação do RNA e concentração do cDNA**

Após a síntese do cDNA, foi incluído um passo de degradação do RNA por meio de incubação a 37°C, durante 4 min, em uma solução com 2,5µL EDTA 0,5M (pH 8,0) e 5,0µL de NaOH 1M. Foi então ressuspensão o cDNA de cada amostra em 400 µL de tampão TE (10 mM e 1 mM EDTA, pH 7,5) e 12,5 µL de Tris-HCL 1M, pH 7,5 e concentrado em uma coluna tipo Microcon-YM30 (“Millipore”). Essas colunas foram centrifugadas por 15 min, a 15°C, a 15.294 xg., e o filtro foi logo lavado com 200 µL de TE e centrifugado por 10 min a 15°C, a 15.294 xg. A coluna foi, posteriormente, invertida em um novo tubo e aplicados 30 µL de água ultrapura. Os tubos foram logo submetidos à centrifugação por 10 min a 15.294 xg a 15 °C, a coluna descartada e o fluido quantificado.

## **7. Fabricação do microarranjo contendo o genoma total da *X. fastidiosa***

A padronização da técnica de microarranjos para *X. fastidiosa* foi realizada previamente no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV) por TRAVENSOLO (2008) e (2009). Assim, foi desenvolvida uma estratégia para monitorar múltiplos genes simultaneamente com a disponibilidade do genoma inteiro desta bactéria. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar os 2.600 ORFs identificados no genoma, usando o “software” PRIMER3. Assim, uma temperatura

de pareado de 48°C até 57 °C foi determinada para todos eles. Assim, foram amplificados as 2.600 ORFs anotados no projeto Genoma da *X. fastidiosa* ONSA FAPESP, tanto aqueles que codificam para proteínas com funções putativas assinaladas por homologia de sequência com outros organismos, como aqueles que não apresentam homologia com proteínas funcionais conhecidas (hipotéticos e hipotéticos conservados).

O arranjo final obtido apresentou aproximadamente 5.200 “spots” oriundos da duplicação de cada produto amplificado. As ORFs amplificadas foram dispostas na lâmina na forma de arranjo com a distância de 250 µm. Esse adensamento permitiu minimizar o volume da solução de hibridação para a lâmina inteira.

### **7.1 Cultivo do isolado 9a5c e extração do DNA**

A bactéria foi cultivada em meio líquido BCYE (WELLS *et al.*, 1981) a 28°C, mantido em agitação por 6 dias. Para o meio BCYE, 10 g de ACES foram hidratados em 500 mL de água destilada a 50°C. A solução de ACES foi misturada com 40 mL de uma solução 1,0 N KOH, em 440 mL de água destilada, sendo, posteriormente, utilizada para hidratar 2 g de carvão ativado, 10 g de extrato de levedura e 17 g de ágar, autoclavada e equilibrada para 50°C. Então, 0,4 g de L-cisteína e 0,25 g de pirofosfato férrico foram dissolvidos em 20 mL de água, esterilizados por filtração e adicionados ao meio.

O método de extração de amostras de DNA utilizado foi o descrito por AUSUBEL *et al.* (1987) com algumas modificações. Suspensões bacterianas (1 mL) foram transferidas para um tubo estéril de 1,5 mL e centrifugadas a 14.000 x g por 2 min. Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados, ressuspensos em 567 µL de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0), 30 µL de 10% SDS e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL). Nessa etapa, foram acrescentados 100 µL de solução de RNase (200 µg/mL), e as soluções foram

incubadas a 37°C por 1h 30 min. Em seguida, continuou-se com o procedimento sugerido pelo protocolo.

A quantificação das amostras de DNA foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN-DU 640), medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A integridade do material genético foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % em TBE 1X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 0,022 M N<sub>2</sub>EDTA), deslocando-se a 90 V, por 90 min.

## **7.2 Amplificações por PCR dos 2.600 ORFs e quantificação do produto**

As reacções de PCR foram realizadas partindo do DNA extraído do isolado bacteriano mencionado no item 7.1, em tampão PCR [1x] (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTP, 2 U *Taq*. DNA polimerase, 5 pmols de cada primer, 60 ng do DNA genômico e água ultrapura estéril para completar um volume de 10µL. As seguintes condições de reacção foram usadas: 94°C/2 min, 35 ciclos de 94°C/1min, 58°C/1 min, 72°C/1min 30s, seguidos de uma extensão final de 72°C/5 min. Todos os produtos foram analisados e quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE 1X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 0,022 M N<sub>2</sub>EDTA) com 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

## **7.3 Concentração e impressão dos produtos de PCR na lâmina**

Os produtos amplificados foram levados até uma concentração de 200-350 µg/µL com base na quantificação realizada. Após a concentração, cada produto foi ressuspenso em 50 % DMSO v/v numa concentração final de 100-300 ng/ µL com base na quantificação realizada. O DMSO é bastante utilizado em experimentos com arranjos, inicialmente devido a sua propriedade higroscópica e baixa evaporação, permitindo a armazenagem do DNA por longos períodos e

proporcionando uma maior uniformidade na área do “spot” (HEGDE *et al.*, 2000). Os produtos que não resultaram um produto de PCR na concentração acima mencionada foram novamente amplificados até a obtenção da a concentração desejada.

A impressão dos microarranjos foi feita em lâminas de vidro, previamente tratadas com aminosilano (GMT-GAPS, Corning, Cat. Nº 40004), por um dispositivo robotizado, modelo GMS 417 Arrayer (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Os “spots” foram impressos a uma distância de 250 µm na forma de arranjo, em réplica (dois “spots”/amostra)

Após a impressão robótica, os DNAs foram reidratados (42 °C por um seg), secos (70 °C por 1 min) e fixados na lâmina por meio da câmara UV “cross-link” (130x 10 µJ cm<sup>2</sup>). As lâminas foram mantidas a 70°C por duas horas e, posteriormente, guardadas no vácuo à temperatura ambiente.

## **8. Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados e lavagens**

As etapas de hibridização e lavagens foram realizadas em um aparelho “GeneTac hybridization” (“Genomic Solutions” TM, Ann Arbor, Michigan, USA). Inicialmente, as lâminas foram mantidas a 65°C por 5 min. Sobre essas lâminas, foi aplicada uma solução de hibridização, contendo 8 µL de líquido bloqueador (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA RPN 3601), 1 µL de SSC 2X, 5,5 uL de SDS 2% (w/v), e o cDNA marcado com Cy3/ Cy5, em um volume final de 11 µL. Essa solução foi injetada na câmara de hibridação de forma a cobrir todo o microarranjo. A hibridização foi realizada a uma temperatura de 42°C durante 16 horas.

As lavagens foram realizadas em forma automática após as 16 horas da hibridação. Desse modo, os transcritos que não acharam homologia foram

retirados. As lâminas foram lavadas com SSC 2X /SDS 0,5 % (w/v) em 10 ciclos de 10 seg de fluxo e 20 seg de incubação, com SSC 0,5X a 25°C em 10 ciclos de 10 seg de fluxo, 20 seg de incubação e, finalmente, com SSC 0,05X a 25°C, com 10 seg de fluxo e 20 seg de incubação. Todas as etapas de lavagem consistiram de ciclos de 1 seg de fluxo e 2 seg de incubação. Após a lavagem, as lâminas foram centrifugadas individualmente, dentro de tubos de centrífuga de 50 mL (tubo Falcon), por 5 min a 201 xg, secas à temperatura ambiente por 15 min para serem, posteriormente, submetidas à detecção da fluorescência.

## **9. Obtenção e análise das imagens**

### **9.1 Digitalização da imagem**

As imagens foram obtidas pelo Scanner (Gene Pix 4000 B Molecular Devices Agilent), e as leituras foram feitas sob diferentes comprimentos de onda, para permitir a excitação dos marcadores fluorescentes contidos nos cDNAs: 550 nm (Cy3) e 650 nm (Cy5). A localização e a identidade de cada gene na lâmina foram definidas em um arquivo-texto, criado com auxílio do Programa Clone Tracker2 (BioDiscovery, Los Angeles, USA) por Travensolo (2008; 2009).

### **9.2 Quantificação e análise das imagens**

O sinal foi quantificado por intermédio do “software” ImaGene (v. 4.1 BioDiscovery, Los Angeles, USA), no qual as duas imagens, a vermelha (emissão fluorescência Cy5) e a verde (emissão fluorescência Cy3), foram superpostas, e os “spots” classificados em função da sua morfologia e da sua intensidade.

Os “spots” foram então quantificados pela medida da intensidade de todos os “pixels” delimitados por um círculo fixo, e o “background” também foi

quantificado para cada “spot” pela medida da intensidade de todos os pixels do local ao redor do “spot”.

### 9.3 Análises estatísticas

A normalização e as análises estatísticas foram realizadas usando o programa R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) (R. Development Core Team, 2009) e o pacote Limma ([http:// bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/limma.html](http://bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/limma.html)) (SMYTH, 2005). O “software” “Array Weights” foi utilizado para testar a qualidade dos arranjos, e o sinal do “background” foi descontado do sinal de cada “spot” pelo método normexp, com um limiar igual a 1 (RITCHIE, 2006). Posteriormente, os “spots” foram normalizados pelo método “loess” (RITCHIE, 2006; YANG, 2001; YANG, 2002; SMYTH, 2003) e, finalmente, o teste T de “Students” foi aplicado (SMYTH, 2004; SMYTH, 2005).

### 9.4 Busca dos genes candidatos na base de dados do projeto Genoma *Xylella fastidiosa* 9a5c

A informação referente a cada um dos genes candidatos foi achada no sítio “web” do Projeto Genoma da *X. fastidiosa* linhagem 9a5c (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>). Na base de dados foram recoletadas informações, tais como o nome do gene e a categoria funcional, o produto gênico e a informação anotada sobre possíveis funções por meio da homologia de sequência com proteínas relacionadas de outros organismos na base de dados do NCBI (utilizando o algoritmo Blast).



## 10. Validação da técnica por RT-qPCR

### 10.1 Fabricação do DNA complementar e quantificação relativa

A transcrição reversa (RT) foi realizada usando 2 µg do RNA total da *X. fastidiosa*, 1,5 µL de “random primer hexamers” pdN<sub>6</sub> (Invitrogen) e a enzima transcriptase reverse Improm II (Promega), seguindo as instruções desse kit. O RNA utilizado nessa reação incluiu proporções iguais dos RNAs das três plantas utilizadas no experimento de microarranjos (para cada condição). Essa mistura foi incubada por 1h 30 min, a 40°C, para a obtenção do cDNA. Após essa síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C. Para verificar sua integridade, foram aplicados 5 µL dessa solução, junto com 3 µL de tampão “bromofenol blue” em um gel de agarose a 1,5%, e realizada a eletroforese, durante 1h 30 min a 85 volts.

### 10.2 Genes escolhidos e desenho dos primers

Os genes candidatos para validar foram escolhidos dentre aqueles relacionados à patogenicidade pela literatura que, por sua vez, tivessem valores de LogFC que se destacaram nas duas condições analisadas, assim como também valores médios. As sequências “fasta” foram selecionadas no banco de dados do Projeto Genoma de *X. fastidiosa*, linhagem 9a5c (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>), e desenhados os oligonucleotídeos iniciadores com o auxílio do “software” do aparelho de PCR em tempo real de “Applied Biosystems” modelo 7500: “Primer Express Software for Real Time PCR 3.0”. Cinquenta sequências foram analisadas uma a uma para cada um dos genes para não incluir, se possível, estruturas secundárias tipo “hairpin” ou dímeros de “primer” que produzem fragmentos inespecíficos que interferem na quantificação relativa. A Tabela 1 apresenta a sequência dos “primers” escolhidos, assim como o valor de LogFC obtido para cada gene no microarranjo.

O controle endógeno foi escolhido dentre os genes que apresentaram uma expressão constante nas condições do experimento de microarranjos e que tenha sido usado em trabalhos anteriores para este patógeno. O gene escolhido foi *Nuo A* (XF0305), cujo produto gênico é NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO7 subunidade (15.4 kDa), categoria I.C.1 (metabolismo energético, carbono, respiração aeróbica). Este gene apresentou um valor de LogFC de -0,75 e -0,21, e a expressão promédio foi de 5,86 e 5,61 para cada uma das réplicas no microarranjo.

**Tabela 1:** Genes escolhidos, LogFC (microarranjo) e sequência dos “primers” respectivos (“software Primer Express for real time PCR 3.0”).

ID/ Nome do gene	LogFC	Sequencia (5'-3')
XF0305 <i>NUOA</i> forward	-	CATTGATATTGATTGGCAGGTTTC
XF0305 <i>NUOA</i> reverse	-	GAGGACAGCTTTTCGGAATCAG
XFa 0052 <i>Vap D</i> forward	-1,71	CGTCAGACAAGCACATGGAACT
XFa 0052 <i>Vap D</i> reverse	-	TCGAACCATTGGAAGCGTATG
XF0369 <i>Pil M</i> forward	-4,37	CAGCTTTCCCGCAGTGGTA
XF0369 <i>Pil M</i> reverse	-	GGTAGCGGCTCCACAGCATA
XF1632 <i>Pil U</i> forward	-2,08	TCGAGAAAGTCCATGAATGCAA
XF1632 <i>Pil U</i> reverse	-	GCGGAAGCGACCAATGTT
XF1626 <i>AlgR</i> forward	-5,5	CGGCTGCGTGTGTTGCT
XF1626 <i>AlgR</i> reverse	-	AGCCTCAGCCACCACCTCTA
XF1625 <i>AlgZ</i> forward	-1,39	CAGCATTGCGCATCGTCTT
XF1625 <i>AlgZ</i> reverse	-	CCAAAACCCCGTCATTCCG
XF2535 <i>ColS</i> forward	1,66	GCCTCGGTCATGTCGTAAGC
XF2535 <i>ColS</i> reverse	-	ACTCGCGGTACGCAAAGC
XF1952 <i>chpA</i> forward	1,78	GACCCAGGCAGTATTCATTCCG
XF1952 <i>chpA</i> reverse	-	AAGCCACCGGAACTGCAA
XF2339 <i>DNA J</i> forward	1,31	GCGGACGAGGCGTTATTATTC
XF2339 <i>DNA J</i> reverse	-	AACACGCCAGCACCATT
XF0978 <i>HTPG</i> forward	1,71	CCCAAGCCACCCACTCATC
XF0978 <i>HTPG</i> reverse	-	CGCAAACGGTCCATGTCT

### 10.3 Otimização das condições de reação

Foram otimizadas as condições de reação para os “primers” escolhidos, utilizando-se quatro concentrações de “primer” (400, 600, 800 e 1.000 nM) e duas de cDNA (60 e 200ng) na reação. Após a otimização, 400 nM de “primer” e 200 ng de cDNA foram escolhidos para realizar a quantificação relativa.

### 10.4 Validação da eficiência de amplificação e especificidade dos “primers”

Essa validação é recomendada na guia da informação mínima para a publicação de experimentos de RT-qPCR (BUSTIN, 2009). Utilizou-se uma mistura do cDNA das duas condições (cDNA Navelina ISA315 e Pera), em proporções iguais, e diluições seriadas deste cDNA foram submetidas a RT-qPCR, para a fabricação das curvas-padrão de cada par de “primers” usando o “software 7500 System SDS”. O fator de diluição foi registrado no “software”, já que o interesse não é determinar concentração exata da amostra inicial, mas, sim, calcular eficiências de amplificação dos primers que logo serão utilizados na quantificação relativa. Aliás, não se recomenda quantificar a concentração inicial de cDNA em virtude dos restos da reação de transcrição reversa influírem na medição.

A fórmula da reta padrão determinada pelo cálculo de regressão linear para a curva padrão RT-qPCR é:  $y = mx + b$ , na qual  $y$  representa o Ct;  $m$  é o valor da inclinação da curva;  $b$  é a intersecção dos eixos, e o valor de  $x$  determinará a concentração em escala logarítmica da amostra de interesse. Tomando como exemplo os valores obtidos pela curva-padrão do gene *Nuo A*, gerados neste trabalho (Figura 17), a reta gerada é representada pela equação, a saber:  $y = -3,400087x + 25,901331$ . A intersecção é o ponto em que o eixo do gráfico que define a concentração em valores logarítmicos cruza com um determinado Ct no

ponto zero da escala logarítmica (abscissa), o qual apresenta o valor de 25,901331. O coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) foi 0,935680.

A eficiência é, entretanto, definida por meio da inclinação da curva, assumindo 100% de amplificação. Segundo PFAFFL (2004), a eficiência da PCR deve ser de  $E = 100 \pm 20\%$ , correspondente a  $-3,6 < \text{inclinação} < -3,1$ . A eficiência da amplificação é determinada pela fórmula:  $E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100 \%$ . No caso do gene *NuoA*, a eficiência calculada foi 96,851. Calculou-se a eficiência de amplificação para todos os “primers” e para o controle endógeno pela fórmula acima mencionada.

Fabricaram-se também as curvas de dissociação ou curvas de “melting” para cada par de “primers”, utilizando-se o “software” SDS (“Applied Biosystems”). Essas curvas foram utilizadas como controle de especificidade dos “primers”, para identificar amplificação inespecífica que poderia interferir nos resultados da RT-qPCR.

### **10.5 Quantificação relativa para estudos de expressão gênica- Método Delta Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )**

Duzentos ng do cDNA, 400 nM “primers” e, 6,25  $\mu\text{L}$  do reativo “SYBR Green PCR Master Mix” (“Applied Biosystems”) foram utilizados na reação de RT-qPCR, num volume final de 25  $\mu\text{L}$ , no aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 (“Applied Biosystems”), usando o programa “default” do termociclador. As reações foram realizadas em triplicata para cada um dos genes e para o endógeno.

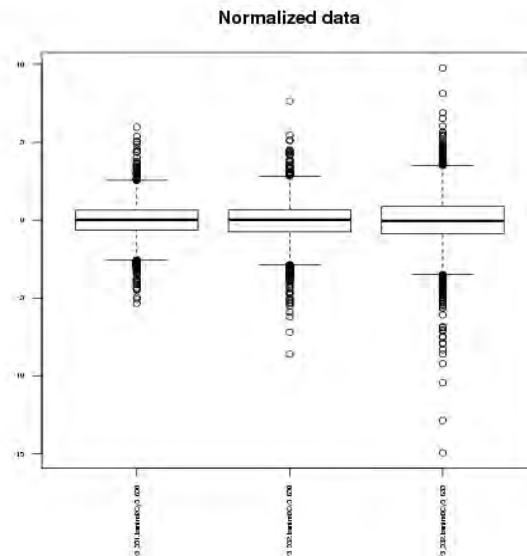
A quantificação relativa foi calculada pelo método Delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) para todos os primers validados pela eficiência de amplificação e curvas de dissociação, utilizando-se o gene endógeno *NuoA* para a normalização, e, a variedade Pera como calibrador.

Foram calculados os  $\text{Log}_2$  da Razão entre o valor da expressão relativa (ER) da cultivar Navelina ISA 315 e da Pera, partindo do  $\text{Log}_{10}$  da ER extraído do “software” SDS. Ambos,  $\text{Log}_2$  obtido pelo microarranjo e pela RT-qPCR, foram comparados. Do mesmo modo, foi calculado o número de vezes que um gene foi mais expresso em uma variedade do que na outra pelo RT-qPCR, e comparado com o número de vezes mais expresso que apresentou no microarranjo. Com esses valores, o  $\text{Log}_2$  (ER) e o número de vezes mais expresso (pela RT-qPCR e pelo microarranjo), foram construídos os gráficos das Figuras 18 e 19, respectivamente. Na Figura 18, pode-se observar o sentido da expressão gênica, ou seja, em qual planta foi diferencialmente expresso.

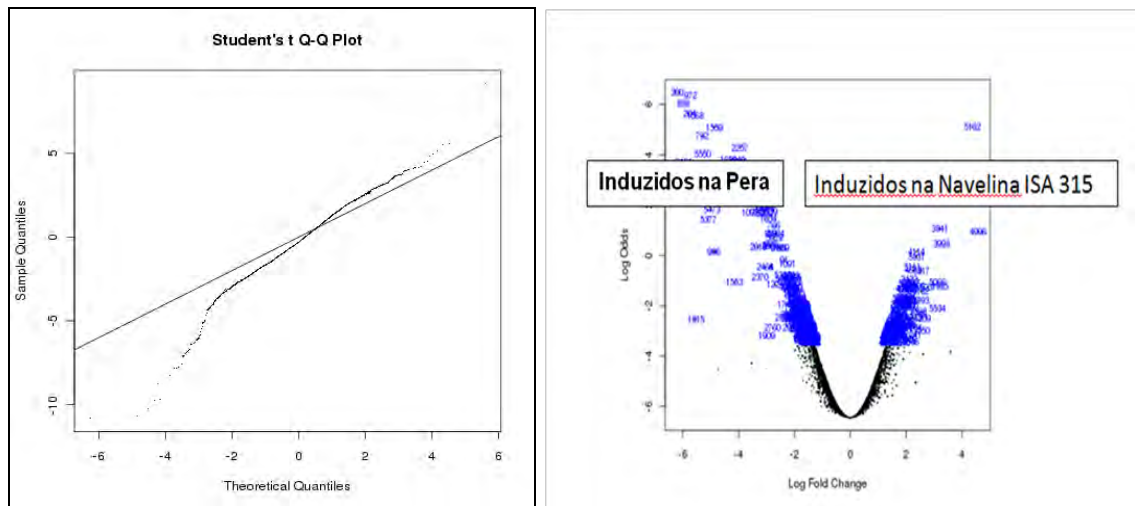
## **VI. RESULTADOS**

### **1. Análises Estatísticas**

Foram identificados 400 genes como diferencialmente expressos, definindo um limiar de 1,0 Log FC (logaritmo do “fold change”, ou seja, logaritmo da razão entre o sinal do experimento/controle), para identificar sinais baixos, mas que poderiam ser biologicamente significativos. Portanto, os genes com valores superiores a  $\text{LogFC}=1$  foram considerados induzidos na cultivar Navelina ISA 315, enquanto os valores menores que -1 foram considerados diferencialmente expressos na variedade Pera. O gráfico da Figura 4 apresenta os dados normalizados e a dispersão destes em cada uma das três lâminas pelo método “loess”, utilizando-se o programa R (pacote Limma). Na Figura 5, podem-se observar os gráficos do teste T de “Students” e o “Volcano plot”.



**Figura 4:** Dados normalizados por meio do programa R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), pelo método “loess”, usando-se o pacote limma ([http:// bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/limma.html](http://bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/limma.html)).



**Figura 5:** Testes estatísticos (Programa R) Genes diferencialmente expressos em função do valor de LogFC (Fold change) (LogFC). a) Teste “students”; b) Gráfico volcano: Logaritmo da probabilidade em função do LogFC.

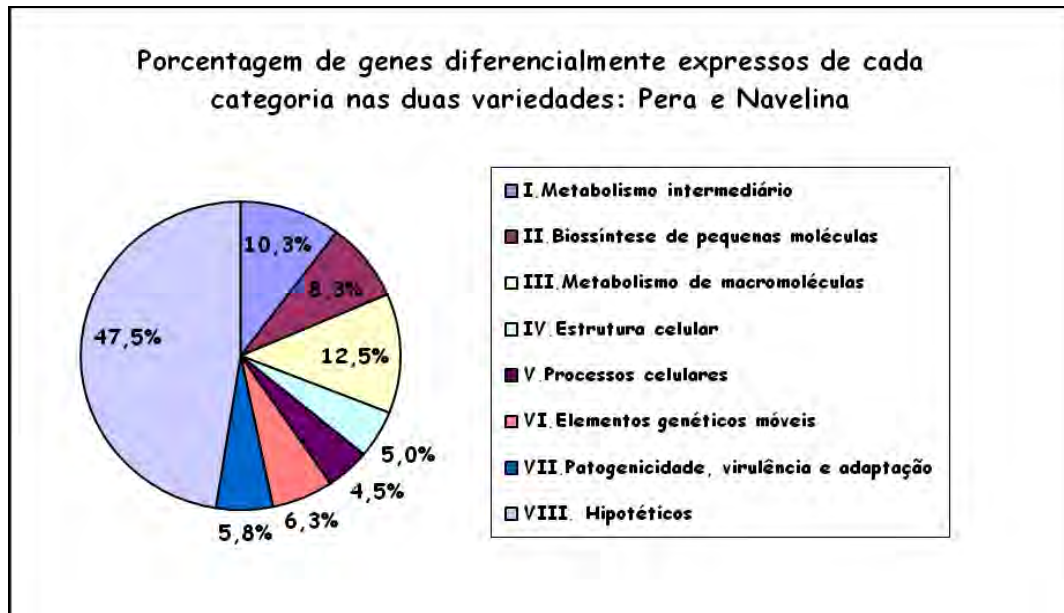
## **2. Busca de informação dos genes potenciais candidatos à patogenicidade**

Os 400 genes diferencialmente expressos foram distribuídos nas categorias funcionais, e estas foram analisadas em função do número de genes de cada subcategoria, para cada condição biológica (dentro das variedades Pera e cultivar Navelina ISA 315) (Figuras 6 e 7)

Posteriormente à busca de informação dos 400 genes na base de dados do Genoma da *X. fastidiosa*, à luz dos valores de LogFC e da literatura, foram selecionados alguns genes para a discussão dentre as distintas categorias funcionais, segundo a literatura, pelo possível envolvimento na virulência, e a informação da base de dados, transcrita no Apêndice. Sua implicação na patogenicidade foi posteriormente tratada em função da expressão gênica obtida neste experimento. Do mesmo modo, alguns desses genes foram escolhidos para a análise de validação por RT-qPCR.

## **3. Perfil Global de expressão gênica**

Genes diferencialmente expressos foram achados dentro das oito categorias oficiais descritas no site <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>, nas duas variedades. Só um gene diferencialmente expresso na variedade Pera apresentou-se na nona categoria: “ORFs de categoria indefinida”, mas, como este foi descrito como uma proteína integral de membrana passou-se para a categoria IV “Estruturas celulares”, para uma melhor visualização gráfica. Como pode-se observar na Figura 6, a maior percentagem de genes diferencialmente expressos da bactéria nas duas variedades foi achada para a categoria VIII (Proteínas hipotéticas), 47,5%.

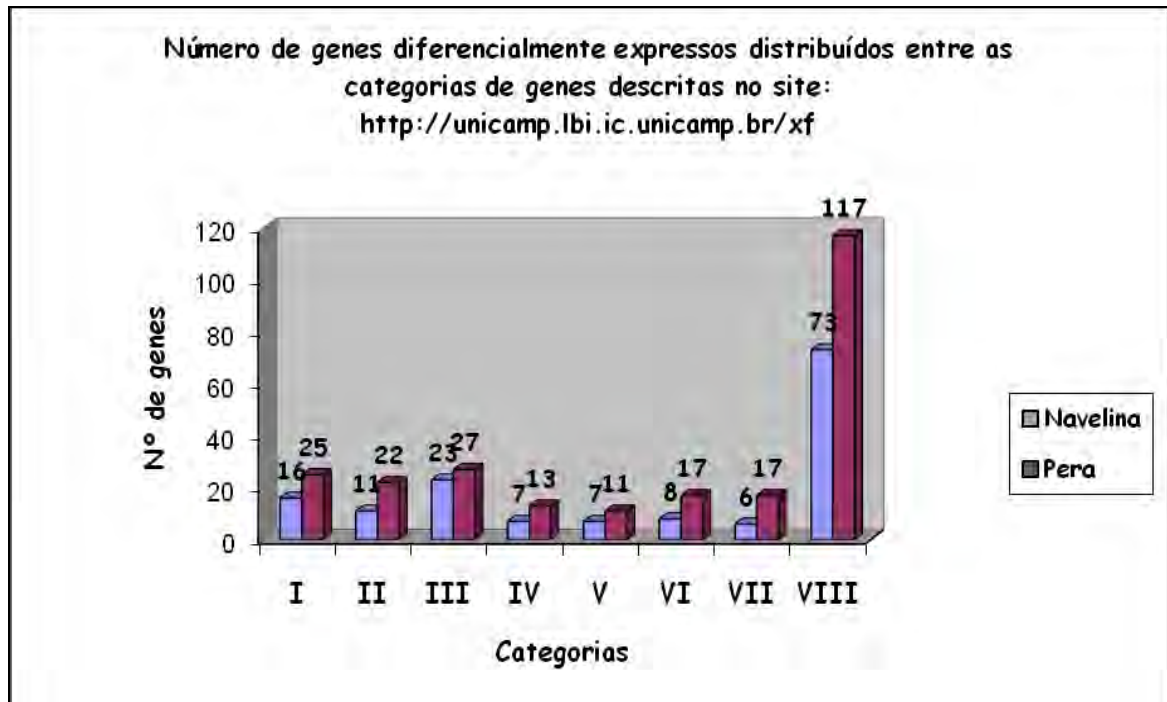


**Figura 6:** Porcentagem que os genes diferencialmente expressos de cada categoria funcional representam dos 400 genes diferencialmente expressos nas duas variedades.

Dentre os genes analisados, aproximadamente 15,4% (400 genes) foram diferencialmente expressos: 249 genes (62,25 %) apresentaram-se induzidos na variedade suscetível Pera, e 151 genes (37,75%) na variedade assintomática cultivar Navelina ISA 315.

Na figura 7, pode-se observar que quando a bactéria infecta a variedade suscetível Pera, expressa maior número de genes do que dentro da planta assintomática cultivar Navelina ISA 315 em todas as categorias descritas.





**Figura 7:** Número de genes diferencialmente expressos por categoria funcional. (I: Metabolismo intermediário; II: Biossíntese de pequenas moléculas; III: Metabolismo de Macromoléculas; IV: Estrutura Celular; V: Processos celulares; VI: Elementos genéticos móveis; VII: Patogenicidade, virulência e adaptação; VIII: Hipotéticos).

Na Tabela 1 do Apêndice, apresentam-se os 400 genes de expressão diferencial (ID, nome do gene, LogFC e produto gênico) seguidos dos nomes das categorias de genes descritas, e o número de genes total identificado no genoma para cada uma delas. Pode-se observar o número de genes total identificado em cada categoria ou subcategoria, assim como aqueles que foram diferencialmente expressos na Pera e na Navelina. Genes diferencialmente expressos foram encontrados para todas as categorias descritas, em algumas das respectivas subcategorias.

Após a descrição das categorias, foi transcrita a informação obtida na página web do Genoma da *X. fastidiosa* para os genes que foram tratados na discussão.

Finalmente, as Figuras do Apêndice: A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7, permitem visualizar a extensão da expressão gênica, expressada em LogFC, nas duas condições para as categorias mencionadas, o que facilita a análise e apresenta o perfil global da expressão gênica dos distintos processos vinculados à patogenicidade.

Pode-se confirmar a eficiência do microarranjo padronizado para a linhagem 9a5c na hibridização de distintas linhagens de *Xylella fastidiosa*; já que todos os genes impressos no microarranjo hibridaram com as linhagens de *X. fastidiosa* presentes nas duas variedades (Pera e Navelina) coletadas no campo.

Por sua vez, os controles negativos das hibridações com as plantas sadias, não apresentaram hibridação (somente fluorescência de base), confirmando que a hibridação obtida no microarranjo para a Navelina e para a Pera é da *X. fastidiosa*, e, não representa uma hibridação inespecífica com o genoma da planta.

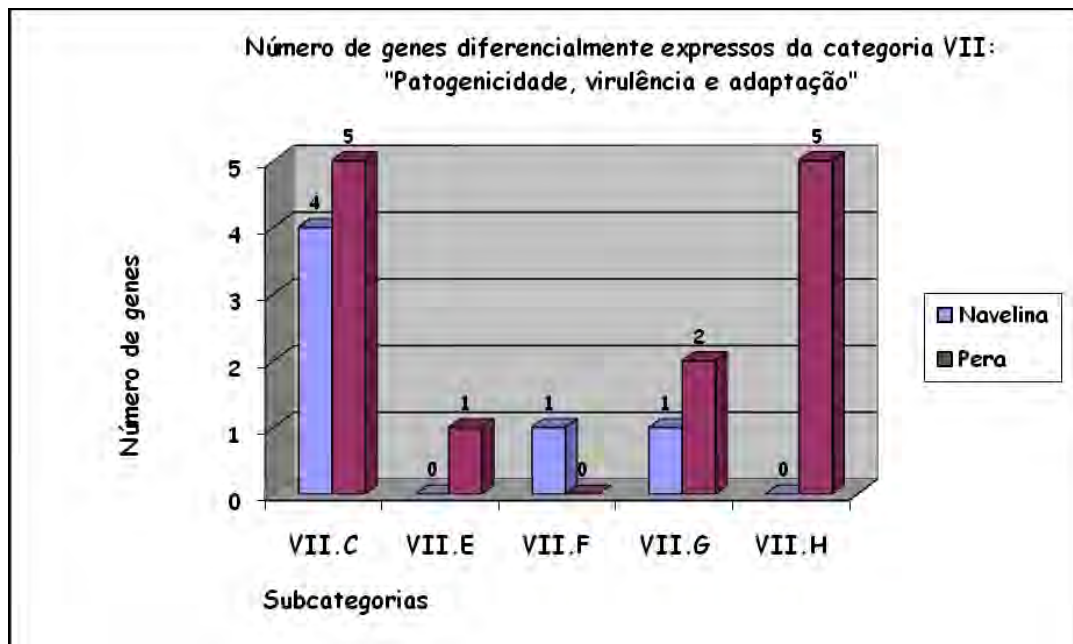
#### **4. Genes da categoria VII: Patogenicidade, virulência e adaptação**

Genes diferencialmente expressos da categoria VII: Patogenicidade, virulência e adaptação, foram classificados dentro das respectivas subcategorias: produção de toxinas e detoxificação, exopolissacarídeos, proteínas de superfície, adaptação e condições atípicas e outros (Figura 8).

Pode-se observar, na Figura 8, que todas as subcategorias incluem mais genes diferencialmente expressos na Pera, com exceção da subcategoria “proteínas de superfície”. Quatro genes foram diferencialmente expressos na cultivar Navelina ISA 315, na subcategoria “produção de toxinas e detoxificação”, codificando para a dimetiladenosine transferase, catalase/peroxidase, peptídeo sintase e proteína beta-lactamase. Na Pera, os valores mais altos de logFC foram

achados para a subunidade C da alkyl-hidroperóxide redutase (-2,0), e uma proteína tipo hemolisina de união ao cálcio (-3,4). Dentro desta subcategoria, o gene que codifica para a proteína de homeostase do cobre, assim como a proteína do sistema de efluxo de cátions e o fator de exportação de membrana externa (codificado pelo gene *ToIC*), foram também diferencialmente expressos na Pera.

Dentro da subcategoria “exopolissacarídeos”, somente o gene *GumE* (-1,37 LogFC) foi diferencialmente expresso na variedade suscetível, enquanto, na subcategoria “proteínas de superfície”, só o gene *uspA1* (1,58 LogFC) foi diferencialmente expresso na cultivar Navelina ISA 315. Dentre os genes da subcategoria “adaptação e condições atípicas”, dois genes relacionados à biossíntese dos glucanos, *MDOG* e *MDOH* foram diferencialmente expressos na Pera e na cultivar Navelina ISA 315, com valores de -1,5 e 1,54 LogFC, respectivamente. Também, dentro dessa subcategoria, uma proteína “heat shock” (codificada pelo gene *HTRA*) foi diferencialmente expressa na Pera. A respeito da subcategoria “outros”, os genes *xpsG*, *xpsF* (que codificam as proteínas G e F da via geral de secreção, respectivamente) foram diferencialmente expressos quando a bactéria se encontra na variedade suscetível. Aliás, uma quitinase e duas proteínas regulatórias (proteína D associada à virulência codificada pelo gene *VapD* e o fator regulador de patogenicidade codificado pelo gene *RPFC*) foram diferencialmente expressos na variedade Pera.

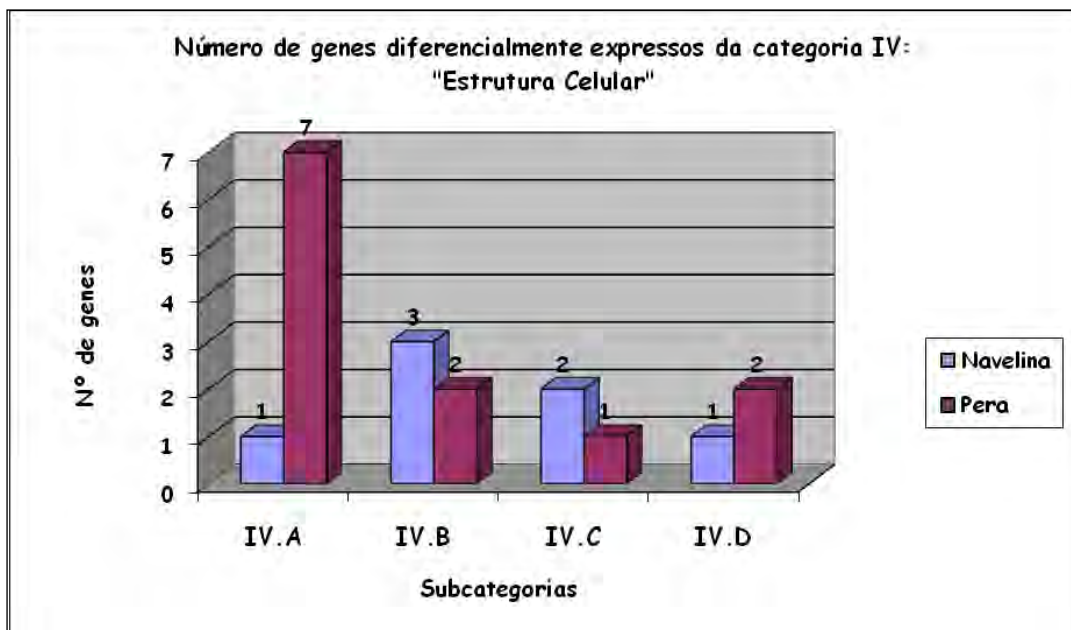


**Figura 8:** Número de genes diferencialmente expressos da categoria VII, distribuído entre as respectivas subcategorias (VII.C: Produção de toxinas, detoxificação; VII.E: Exopolissacarídeos; VII.F: Proteínas de superfície; VII.G: Adaptação e condições atípicas; VII.H: Outros).

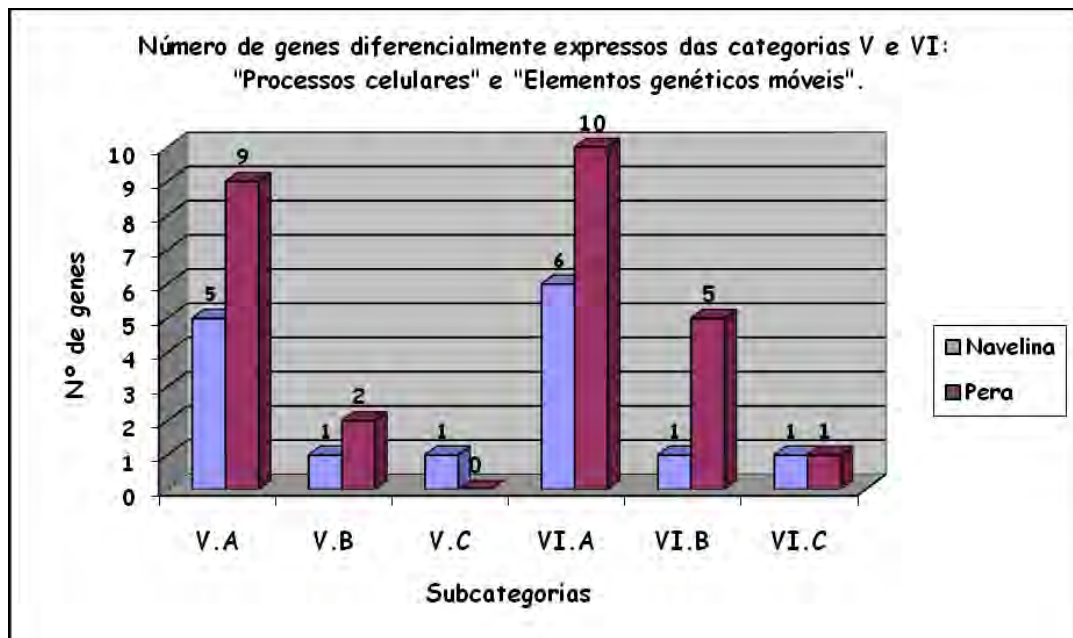
## 5. Genes das categorias IV, V e VI: Estrutura celular, Processos celulares e Elementos genéticos móveis

Em relação às categorias acima mencionadas e subcategorias respectivas, uma maior quantidade de genes foi achada diferencialmente expressa na variedade Pera. As subcategorias “componentes de membrana” da categoria “estrutura celular” apresenta significativamente mais genes diferencialmente expressos na variedade Pera do que na cultivar Navelina ISA 315. As subcategorias *murein*, *sacculus*, peptidoglicosos” (IV.B), polissacarídeos, lipopolissacarídeos e antígenos de superfície”(IV.C) da categoria estrutura celular”, assim como as subcategorias “quimotaxis e mobilidade”(V.C) da categoria “processos celulares” incluem mais genes diferencialmente expressos na cultivar Navelina ISA 315 (Figuras 9 e 10). Esta última categoria mencionada inclui só um gene diferencialmente expresso na cultivar Navelina ISA 315 (*chpA*), que codifica

uma proteína quinase relacionada a quimiotáxis com um valor logFC de 1,8. Dentro da subcategoria “componentes de membrana”, diferentes genes relacionados à mobilidade resultaram diferencialmente expressos na Pera: *pilM* (que codifica uma proteína de montagem das fímbrias) e *pilU* (que codifica a proteína “twitching motility” com altos valores de LogFC (-4,4 e -2,0), respectivamente. Somente uma proteína das fímbrias de 15 kDa foi diferencialmente expressa na cultivar Navelina ISA 315 com um valor de LogFC de 1,3. Na categoria “elementos genéticos móveis”, as subcategorias “funções relacionadas com fagos”, assim como “funções relacionadas com plasmídeos” incluem mais genes diferencialmente expressos dentro da variedade Pera do que dentro da cultivar Navelina ISA 315.



**Figura 9:** Número de genes da categoria IV, distribuído entre as respectivas subcategorias (IV.A: Componentes de membrana; IV.B: *Murein sacculus*, peptidoglicano; VI.C: Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos, e antígenos; IV.C: Estruturas de superfície).

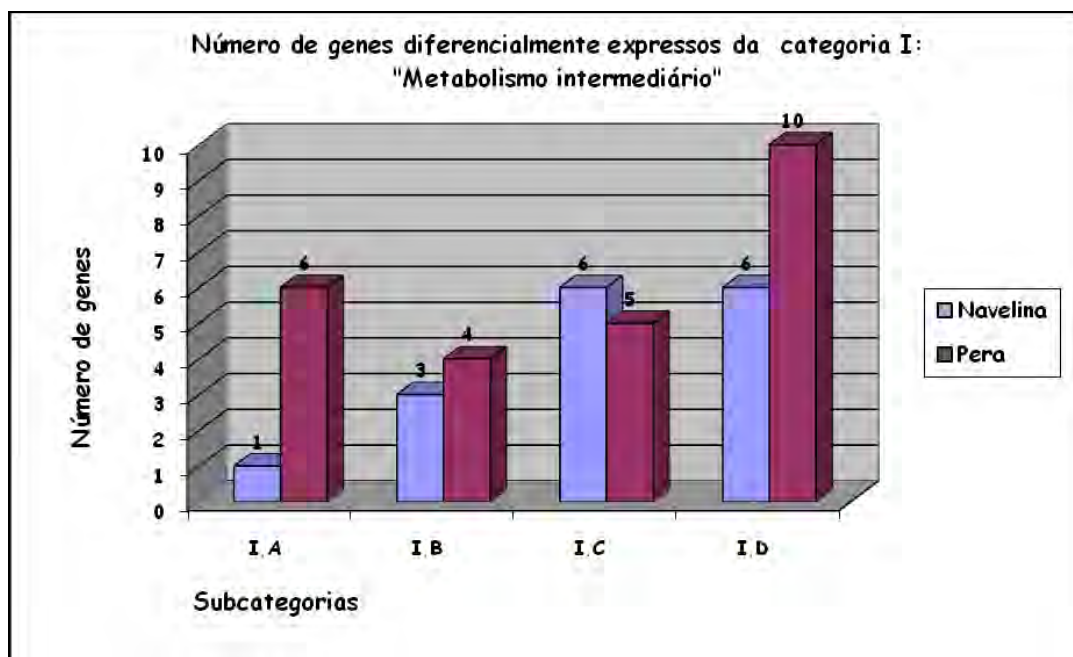


**Figura 10:** Número de genes das Categorias V, e VI, distribuídos entre as respectivas subcategorias (V.A: Transporte; V.B: Divisão celular; V.C: Quimotáxis e mobilidade; VI.A: Funções relacionadas a fagos e profagos; VI.B: Funções relacionadas a plasmídeos; VI.C: Funções relacionadas a transposones e intrones).

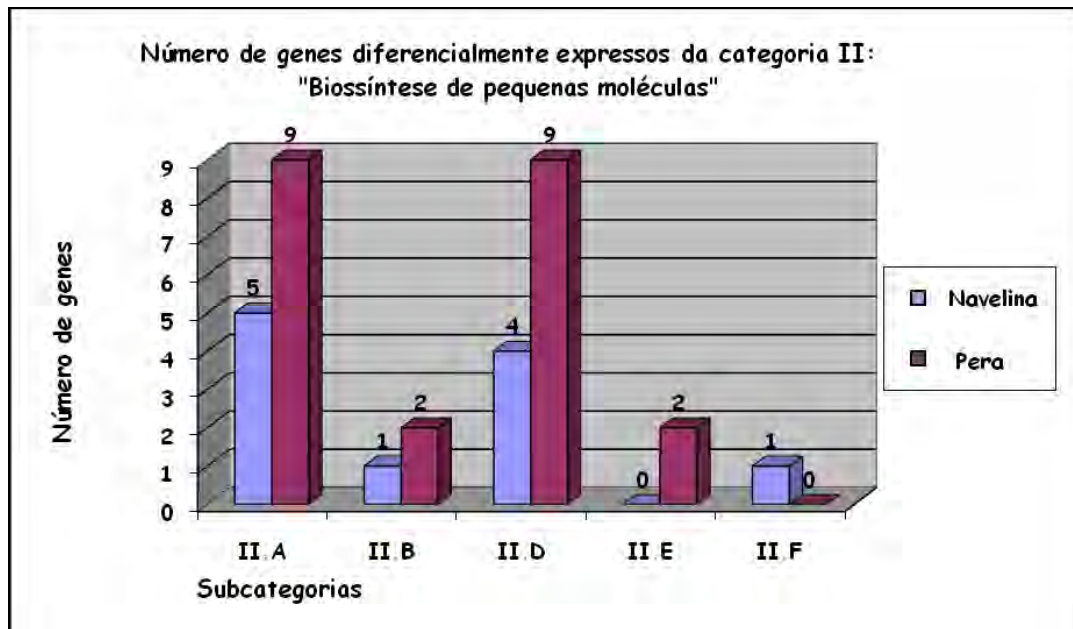
## 6. Genes das categorias I “Metabolismo intermediário” e II “Biossíntese de pequenas moléculas”

As subcategorias “degradação” e “funções regulatórias” da categoria “metabolismo intermediário”, assim como as subcategorias “biossíntese de aminoácidos” e “biossíntese de nucleotídeos” e “cofatores, grupos prostéticos, carregadores biossintéticos” da categoria “biossíntese de pequenas moléculas” incluem também mais genes diferencialmente expressos na Pera (Figuras 11 e 12). Dentre os genes com funções regulatórias, o gene *ALGR* (proteína regulatória do sistema em dois componentes) e o gene *SSPB* (proteína induzida em condições de ausência de nutrientes) possuem os maiores valores de LogFC, -5,5 e -3,3, respectivamente. Assim, também, o gene *rpoD*, que codifica o fator sigma-70, diferencialmente expresso na variedade Pera, apresentou alto valor de LogFC

(-2,86). Outro sistema em dois componentes, formado pelos produtos dos genes *colR* e *colS*, diferencialmente expressos na variedade assintomática, apresentaram alto valor de LogFC (-2,86). Por outro lado, na variedade Pera, outro gene chamado *colR* encontra-se diferencialmente expresso. De igual modo, muitos outros reguladores transcricionais e repressores foram diferencialmente expressos nas duas variedades (Apêndice: Tabela 1). Pode-se observar que a subcategoria “degradação”, da categoria “metabolismo intermediário”, seguida pela subcategoria “funções regulatórias”, incluem mais genes diferencialmente expressos na Pera do que na cultivar Navelina ISA 315. Os genes acima mencionados encontram-se distribuídos dentre as subcategorias de genes que se apresentam nas Figuras 11 e 12 e detalhados na Tabela 1 do Apêndice.



**Figura 11:** Número de genes da categoria I “Metabolismo intermediário”, distribuído entre as respectivas subcategorias (I.A: Degradação de polissacarídeos e pequenas moléculas; I.B: Metabolismo intermediário central; I.C: Metabolismo energético, carbono; I.D: Funções regulatórias).



**Figura 12:** Número de genes da categoria “Biossíntese de pequenas moléculas”, distribuído entre as respectivas subcategorias (II.A: Biossíntese de aminoácidos; II.B: Biossíntese de nucleotídeos; II.D: Cofatores, grupos prostéticos, carregadores biossintéticos; II.D: Biossíntese dos ácidos graxos e fosfatídicos; II.F: Biossíntese das poliaminas).

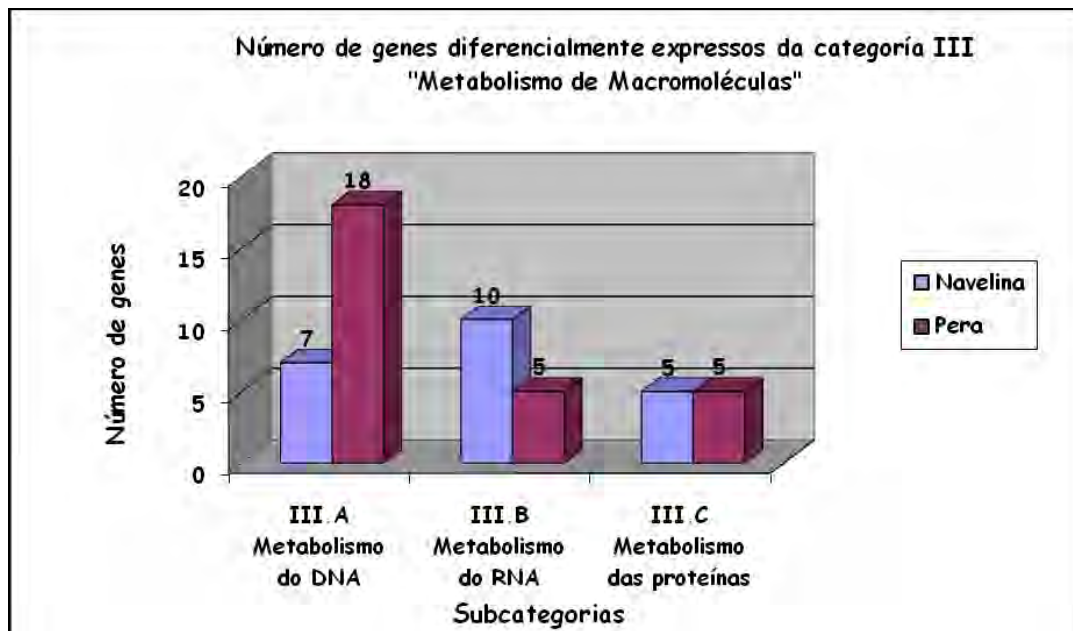
## 7. Genes da categoria III “Metabolismo de macromoléculas”

Os genes desta categoria foram distribuídos nas subcategorias “metabolismo do DNA”, “metabolismo do RNA” e “metabolismo de Proteínas”. A subcategoria “metabolismo do DNA” apresentou mais genes diferencialmente expressos dentro da variedade Pera, enquanto a subcategoria “metabolismo do RNA” apresentou na cultivar Navelina ISA 315. Por sua parte, a subcategoria “metabolismo de Proteínas” apresentou o mesmo número de genes nas duas variedades. (Figura 13) As subcategorias “reparação do DNA” e “restrição e modificação do DNA” da categoria “metabolismo do DNA” foram as que apresentaram mais genes diferencialmente expressos na variedade Pera, enquanto a subcategoria “chaperonas”, da categoria “metabolismo de proteínas”,

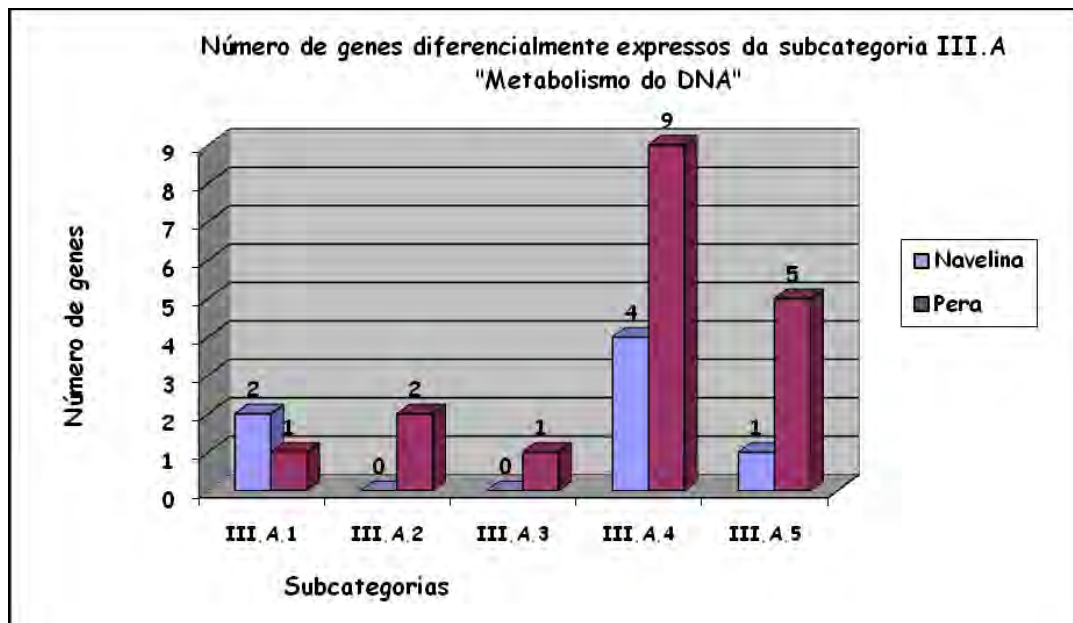


apresentou somente genes diferencialmente expressos na cultivar Navelina ISA 315 (Figuras 14 e 15 respectivamente).

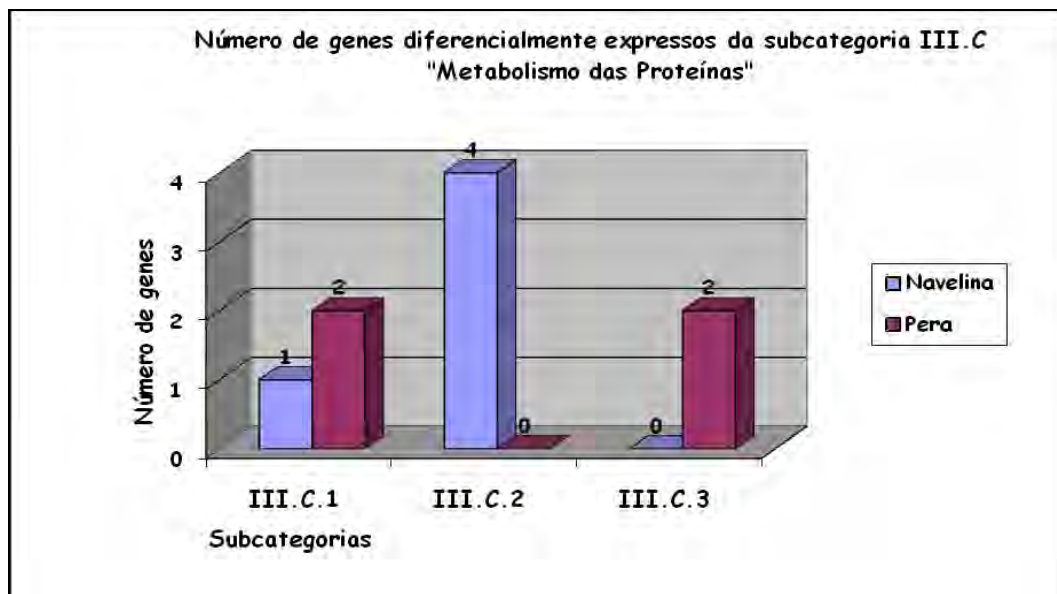
Na Figura 16, apresentam-se os genes da subcategoria “metabolismo do RNA” distribuídos entre as respectivas subcategorias. Dessas, destaca-se a subcategoria “aminoacil-tRNA sintetases” com um maior número de genes diferencialmente expressos na variedade Navelina ISA 315.



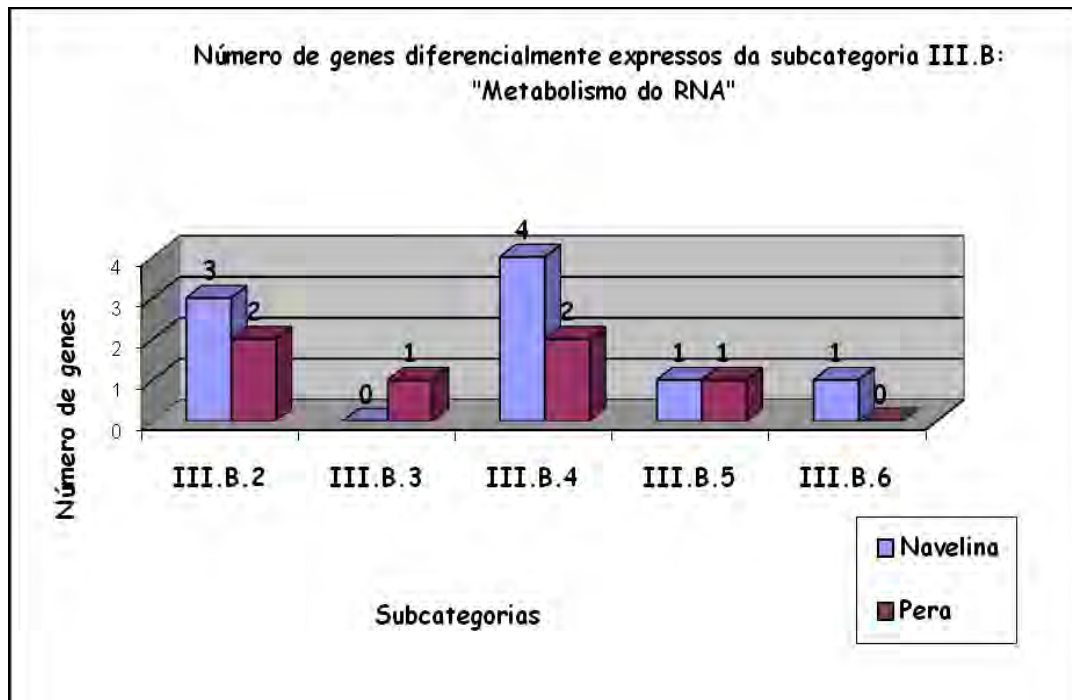
**Gráfico 13:** Número de genes da Categoria III, distribuído dentre as respectivas subcategorias (III.A: Metabolismo do DNA; III.B: Metabolismo do RNA; III.C: Metabolismo das proteínas).



**Figura 14:** Número de genes da subcategoria “Metabolismo do DNA”, distribuído dentre as respectivas subcategorias (III.A.1: Replicação; III.A.2: Proteínas estruturais de união ao DNA; III.A.3: Recombinação; III.A.4: Reparação; III.A.5: Restrição, modificação).



**Figura 15:** Número de genes da subcategoria “Metabolismo das Proteínas”, distribuído dentre as respectivas subcategorias (III.C.1: Tradução e modificação; III.C.2: Chaperonas; III.C.3: Degradação de proteínas).



**Figura 16:** Número de genes da subcategoria “Metabolismo do RNA”, distribuído dentre as respectivas subcategorias (III.B.2: Proteínas ribossomais; III.B.3: Ribossomos-maturação e modificação; III.B.4: Aminoacil-tRNA sintetases, modificação tRNA; III.B.5: Síntese do RNA, modificação, transcrição do DNA; III.B.6: Degradação do RNA).

Informação mais detalhada de todos os genes descritos em “Resultados” encontra-se no Apêndice. A Tabela 1 apresenta os 400 genes diferencialmente expressos (Gene ID, nome do gene, LogFC, produto gênico) seguida das abreviações das categorias e da transcrição da informação da base de dados dos genes que foram citados na discussão (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>). Assim, apresenta-se o número de genes identificado para às categorias e subcategorias de genes descritas, assim como a quantidade desses genes que apresentaram expressão diferencial em cada uma das variedades. Os gráficos A1-A8 do Apêndice, por sua vez, apresentam a extensão do LogFC para cada gene diferencialmente expresso das categorias mencionadas.

## 8. Validação da técnica de microarranjos através de RT-qPCR

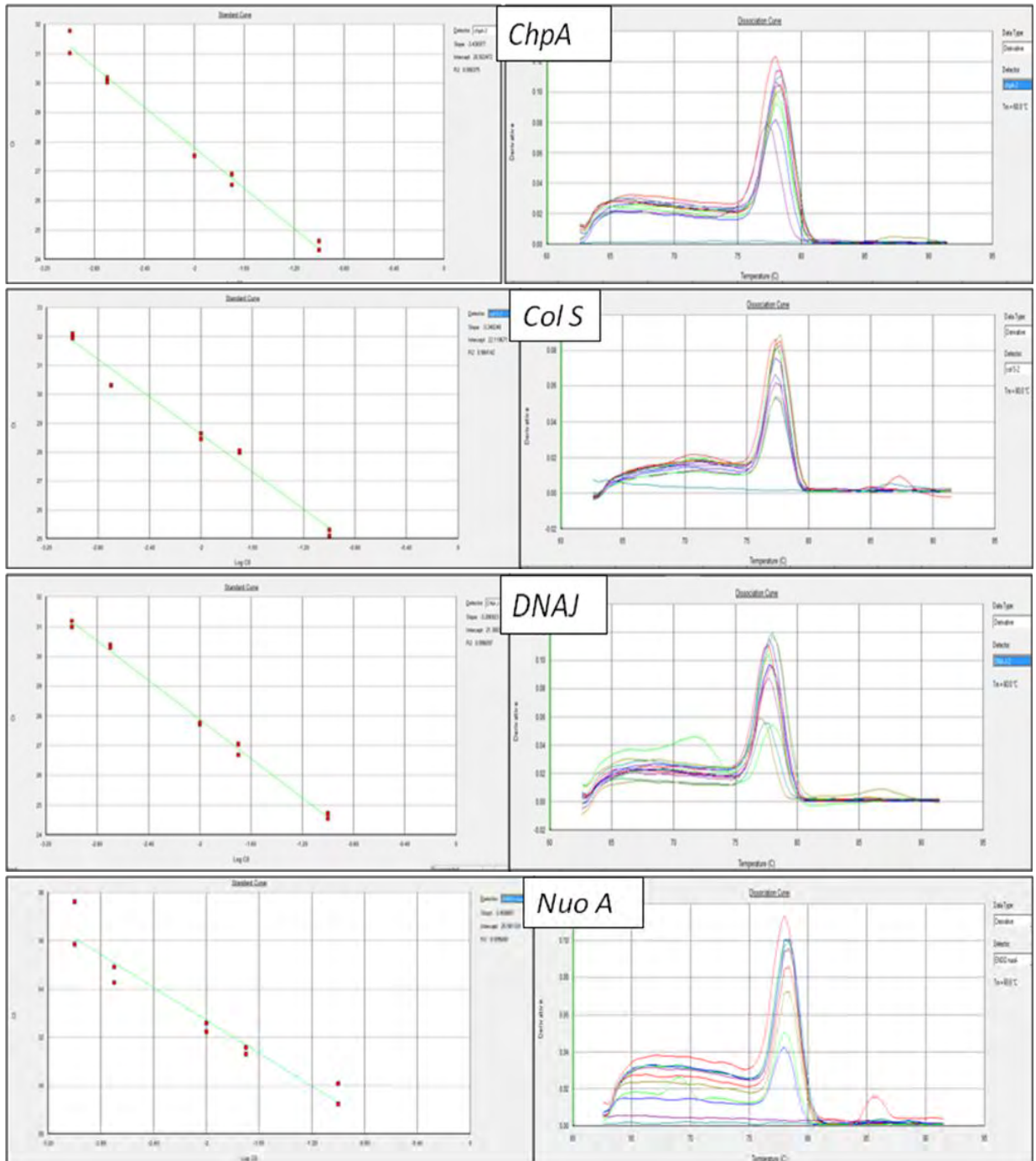
Em primeiro lugar, obteve-se para todos os “primers” (genes escolhidos e controle endógeno) a curva-padrão com valores de inclinação (“slope”) e  $R^2$  perto dos sugeridos na literatura, sendo calculada a eficiência de amplificação para cada um deles. Após essa validação, foi unicamente desconsiderado o “primer” *AlgZ* devido a uma maior eficiência de amplificação a respeito dos outros “primers” e controle endógeno, superando os valores sugeridos na literatura. Foi possível comparar a expressão gênica nas distintas condições (cultivar Navelina ISA 315 e Pera) por meio da quantificação relativa (método  $\Delta\Delta Ct$ ) para os primers validados. Desse modo, todos os “primers” coincidiram no sentido da expressão nas duas técnicas.

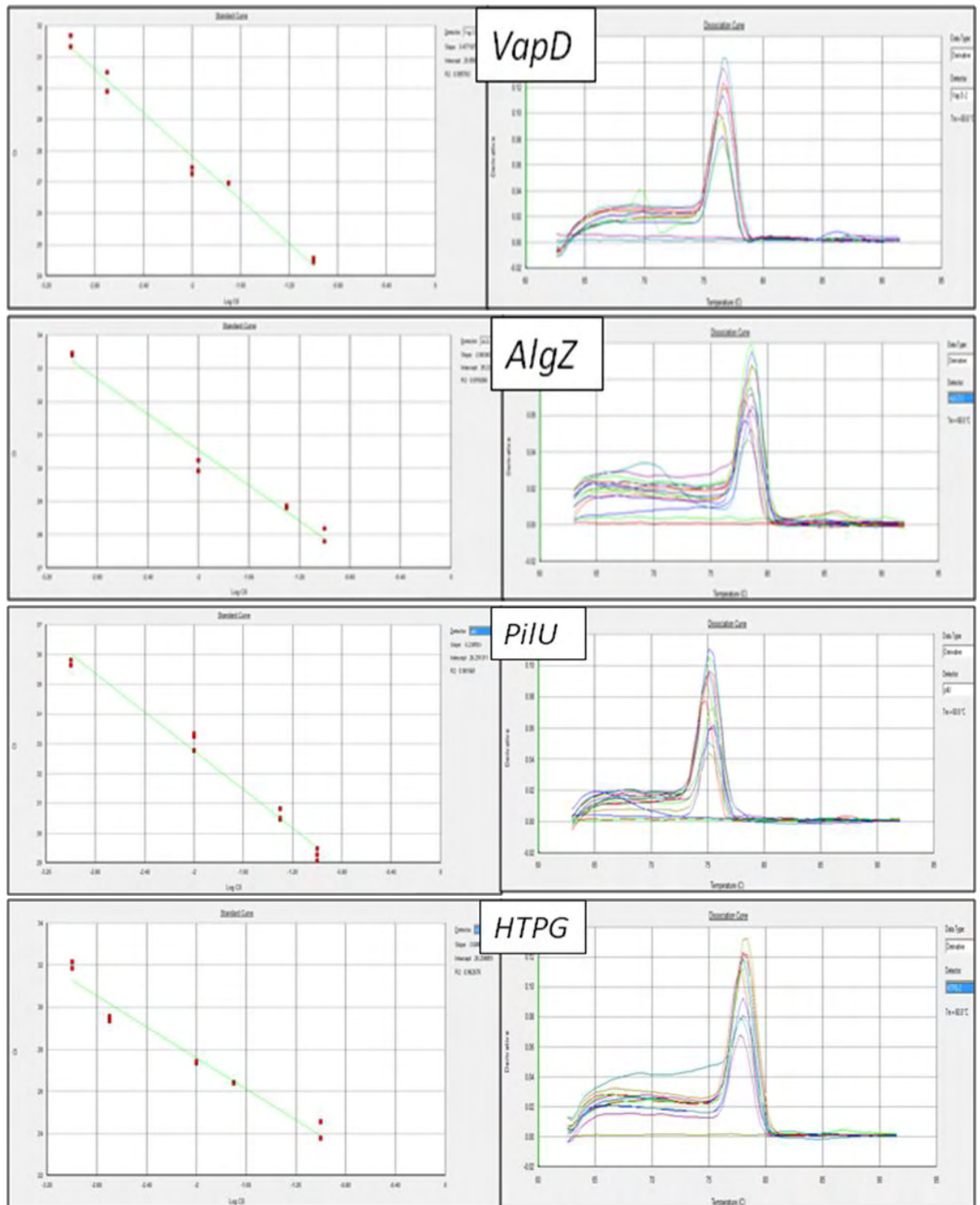
### 8.1 Validações da eficiência de amplificação e curvas de dissociação

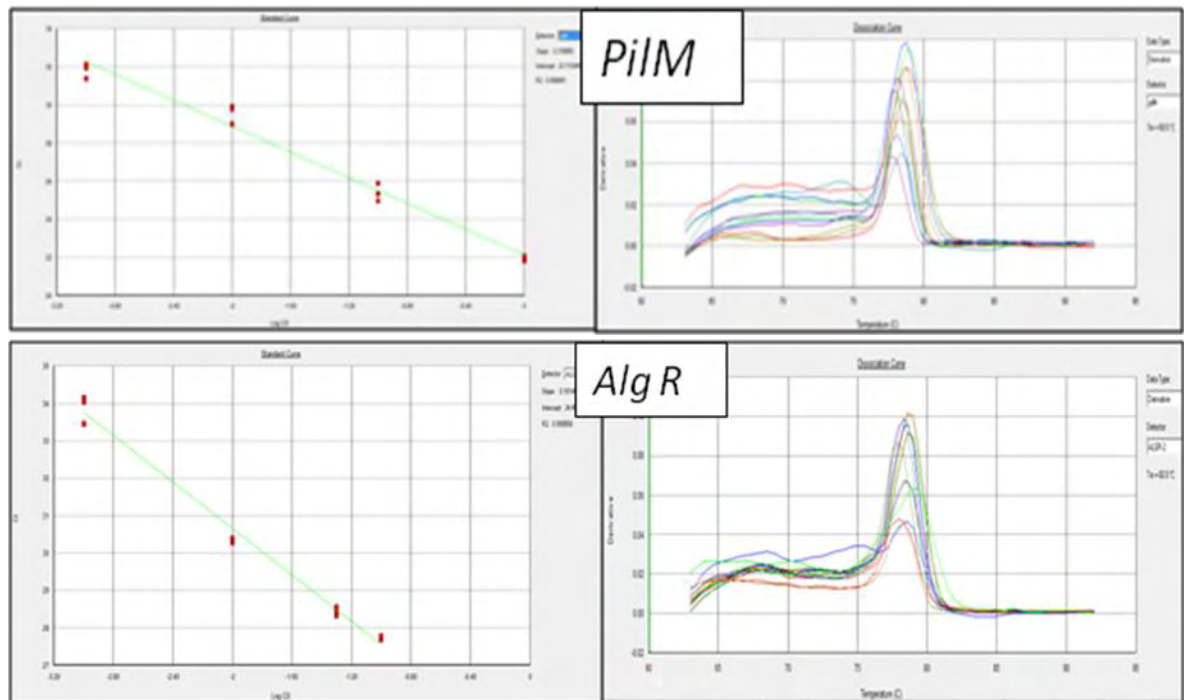
As curvas-padrão foram fabricadas para cada par de “primers” e, a partir dessas, foi calculada a eficiência de amplificação dos mesmos. Para todos eles, os valores de R apresentaram-se perto da unidade, a inclinação ou “slope” encontrou-se entre -3,6 e -3,1, e as eficiências de amplificação foram de aproximadamente de 100% +/- 20 (Figura 17 e Tabela 2). Somente o gene *AlgZ*, ultrapassou este limite, apresentando uma eficiência de 137,38, mas, também foi incluída nos gráficos, tendo presente que, por causa da alta eficiência de amplificação em relação ao gene endógeno e aos outros, não seria comparável por RT-qPCR.

As curvas de dissociação ou “melting” foram também realizadas para cada “primer” e apresentam-se a seguir. Para alguns “primers” observou-se uma amplificação inespecífica, porém muito baixa (*NuoA*, *colS*, *DNAJ*, *HTPG*, *VapD* e *AlgZ*), a qual se separa do produto específico em mais de cinco ciclos; portanto, considera-se muito distante e sem interferência com o produto específico a ser

amplificado segundo BUSTIN, 2009. Assim também, nesses casos, somente uma réplica da triplicata apresenta essa amplificação inespecífica, podendo representar alguma contaminação particular dessa réplica, não da amostra.







**Figura 17:** Curvas- padrão e curvas de dissociação para cada par de “primers” utilizado: *ChpA*, *ColS*, *DNAJ*, *NuoA*, *VapD*, *AlgZ*, *PilU*, *HTPG*, *pilM*, *AlgR*.

**Tabela 2:** Inclinação da reta (“slope”) e eficiência da amplificação ( $E = (10^{(-1/slope)} - 1) \times 100\%$ ). Em vermelho indica-se o gene que não apresentou uma eficiência dentro dos parâmetros estabelecidos por PFAFFL, 2004

Gene	“Slope”	Eficiência
<i>NuoA</i>	-3,40009	96,838
<i>Chp A</i>	-3,43698	95,412
<i>Col S</i>	-3,24825	103,169
<i>DNA J</i>	-3,28692	101,481
<i>HTPG</i>	-3,68886	86,675
<i>pil U</i>	-3,2385	103,603
<i>Vap D</i>	-3,47711	93,907
<i>Alg Z</i>	-2,66342	137,387
<i>Alg R</i>	-3,10141	110,103
<i>pil M</i>	-3,37805	97,710

Por tudo o que foi exposto acima, esses primers foram escolhidos para a quantificação relativa, com exceção do gene *AlgZ* que será incluído nos gráficos da quantificação relativa, mas não se considera validado. Assim, não foi possível fabricar uma curva-padrão para o “primer” *SCJ21.16* já que não foi obtida uma boa correlação entre as diluições e os Cts correspondentes e, portanto, não foi incluído na análise RT-qPCR.

## 8.2 Quantificação relativa e validação do experimento de microarranjos

O sentido da expressão diferencial dos genes *ChpA*, *CoIS*, *DNAJ*, *HTPG*, *pilU*, *VapD*, *AlgZ*, *AlgR* e *PilM* obtido pela RT-qPCR foi correlacionado com o sentido da expressão diferencial obtido pelo experimento de microarranjos, ou seja, os genes *ChpA*, *CoIS*, *DNAJ* e *HTPG* apresentaram uma expressão diferencial na cultivar Navelina ISA 315 em ambas as técnicas, microarranjo e RT-qPCR, enquanto os genes *pilU*, *VapD*, *AlgZ*, *AlgR* e *PilM* foram diferencialmente expressos na Pera, também pelas duas análises.

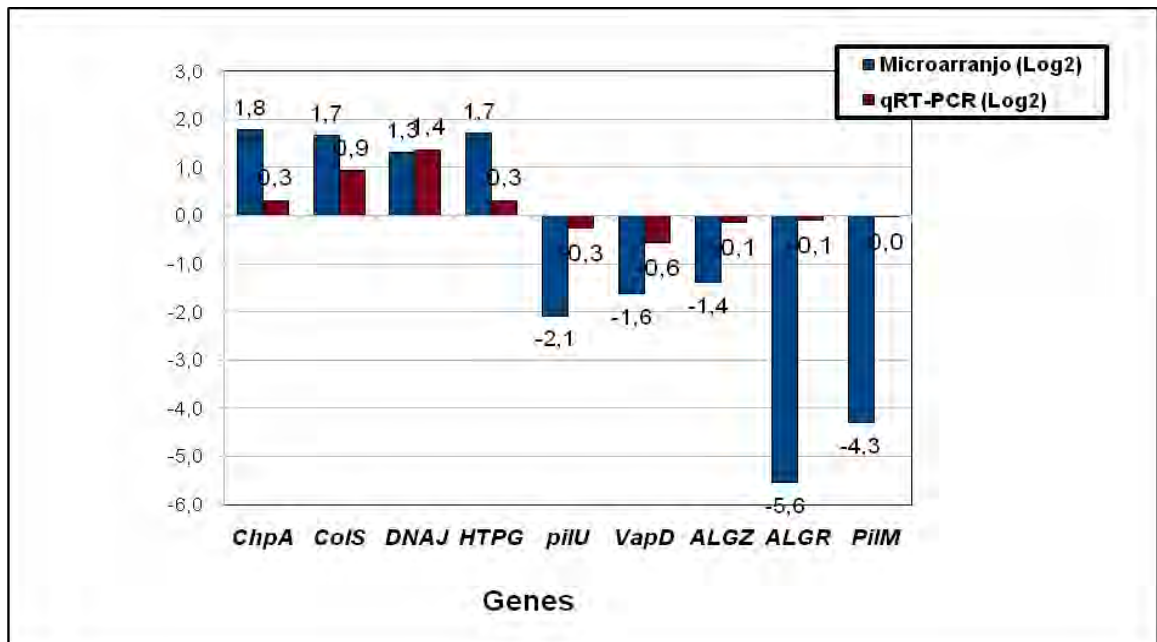
Na Tabela 3, observam-se os valores de Log<sub>2</sub>FC do microarranjo e do Log<sub>10</sub> do RT-qPCR, junto aos valores calculados para cada gene do número de vezes diferencialmente expresso pelas duas técnicas, assim como o Log<sub>2</sub> calculado a partir do Log<sub>10</sub> da RT-qPCR. O Log<sub>2</sub>FC do microarranjo e o Log<sub>10</sub>FC do RT-qPCR, foram convertidos em número de vezes para comparar no mesmo gráfico.

Na Figura 18, pode observar-se o gráfico com os valores de Log<sub>2</sub>FC, comparando-se as duas técnicas, enquanto na Figura 19, observa-se outro gráfico com o número de vezes mais expresso em cada variedade, para cada um dos genes.

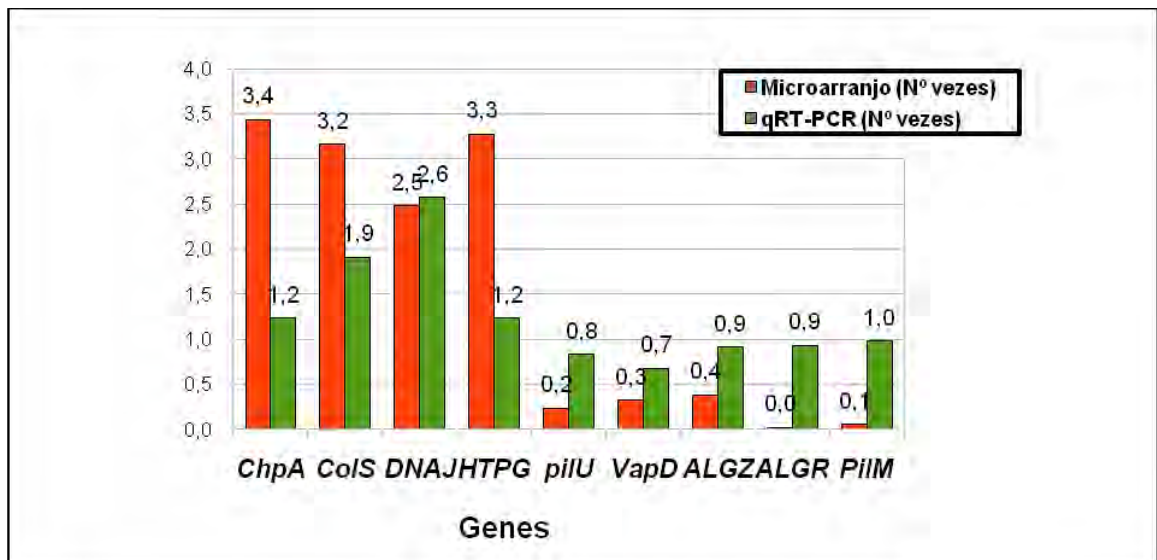


**Tabela 3:** Valores de LogFC dos microarranjos transformados em número de vezes; e Log<sub>10</sub> do RT-qPCR transformado em número de vezes e Log<sub>2</sub>. Os genes com valores positivos indicam a expressão diferencial na cultivar Navelina ISA 315, enquanto os negativos, na variedade Pera.

Gene	Microarranjos		qRT-PCR		
	Log <sub>2</sub>	Nº vezes	Log10	Nº vezes	Log <sub>2</sub>
<i>ChpA</i>	1,78	3,43	0,09	1,23	0,30
<i>ColS</i>	1,66	3,16	0,28	1,91	0,93
<i>DNAJ</i>	1,31	2,48	0,41	2,57	1,36
<i>HTPG</i>	1,71	3,27	0,09	1,23	0,30
<i>pilU</i>	-2,08	0,24	-0,08	0,83	-0,27
<i>VapD</i>	-1,63	0,32	-0,17	0,68	-0,56
<i>ALGZ</i>	-1,39	0,38	-0,04	0,91	-0,13
<i>ALGR</i>	-5,55	0,02	-0,03	0,93	-0,10
<i>PiIM</i>	-4,30	0,05	-0,01	0,98	-0,03



**Figura 18:** Log<sub>2</sub> da razão da expressão gênica (cultivar Navelina ISA315/ Pera) dos genes, obtida pela RT-qPCR (barra vermelha) e pelo experimento de microarranjos (barra azul).

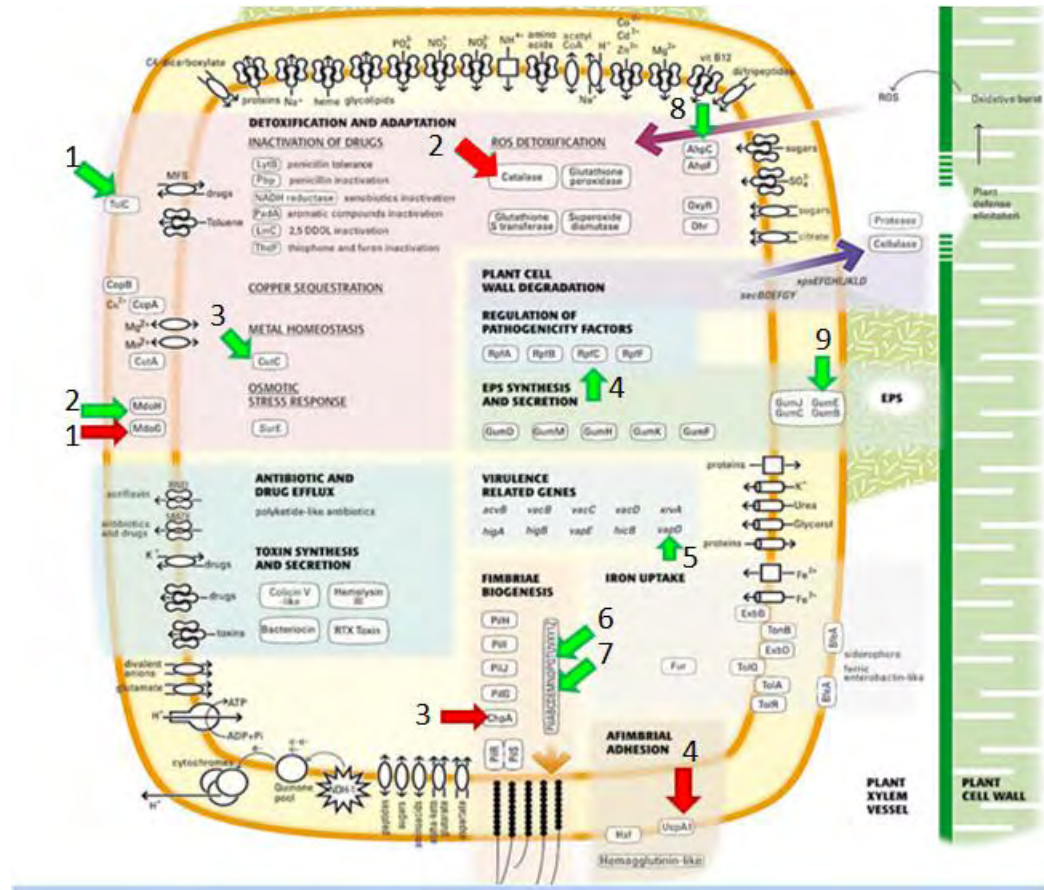


**Figura 19:** Número de vezes mais expresso em uma condição do que na outra pela RT-qPCR (barra laranja) e pelo experimento de microarranjos (barra verde) para todos os genes analisados: *ChpA*, *ColS*, *DNAJ* e *HTPG* (diferencialmente expressos na cultivar Navelina ISA 315) e *pilU*, *VapD*, *ALGZ*, *ALGR* e *PiIM* (diferencialmente expressos na variedade Pêra).

## VII. DISCUSSÃO

A influência sobre o desenvolvimento dos sintomas, e sobre patogenicidade de alguns dos genes de expressão diferencial em Pera ou na cultivar Navelina ISA 315, será discutida nos seguintes itens: processos de agregação celular; movimento através dos vasos xilemáticos, e mecanismos de sobrevivência (homeostase do ferro, resposta antioxidante, resposta “heat shock”, sistemas transportadores e detoxificação, toxinas e adaptação a condições atípicas). Assim, também, nesta discussão será abordado o papel dos elementos genéticos móveis na adaptação e plasticidade genotípica, e, será procurada nova informação na base de dados do NCBI para alguns genes cujo produto ainda aparece como proteínas hipotéticas na base de dados da *X. fastidiosa*.

A Figura 20 apresenta os genes envolvidos nos processos bioquímicos relacionados com a patogenicidade e sobrevivência da *X. fastidiosa*, segundo SIMPSON *et al.* (2000). Vários genes diferencialmente expressos no experimento de microarranjos encontram-se representados neste esquema: *ToIC*, *MdoH*, *CutC*, *RpfC*, *VapD*, *pilU*, *pil M*, *AhpC*, *GumE* na variedade Pera (setas verdes nomeadas de 1 a 9, respectivamente ) e *MdoG*, *cpeB* (catalase) *UspA1*, *ChpA* na cultivar Navelina ISA315 (setas vermelhas nomeadas de 1 a 4, respectivamente)



**Figura 20:** Visão completa dos processos bioquímicos envolvidos na patogenicidade e sobrevivência da *X. fastidiosa* no hospedeiro. (SIMPSON *et al.*, 2000). As setas verdes indicam genes diferencialmente expressos na variedade Pera, enquanto as setas vermelhas indicam genes diferencialmente expressos na variedade cultivar Navelina ISA 315.

## 1. Fatores que influenciam a agregação celular

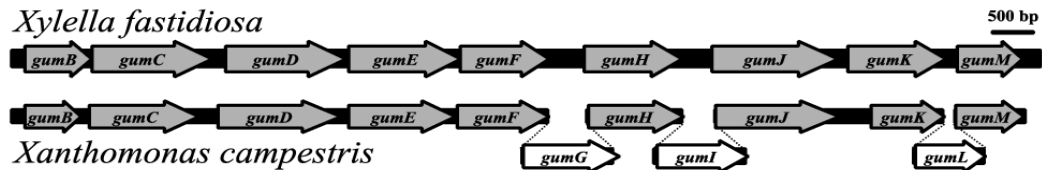
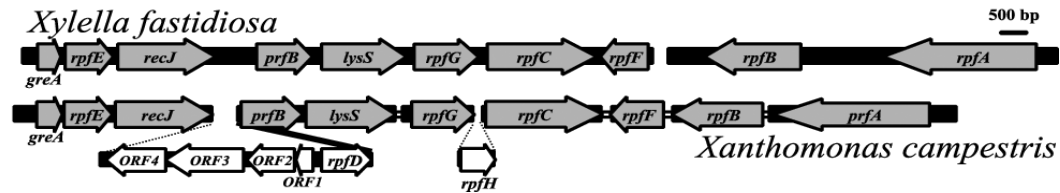
### 1.1 Constituição do biofilme e regulação da patogenicidade

Neste experimento, o gene *GumE*, que codifica o polissacarídeo gumE foi diferencialmente expresso na variedade Pera com um valor de LogFC de -1,37, com uma provável contribuição na formação do biofilme e agregados celulares.

Assim, também, o gene *rpfC* apresentou-se diferencialmente expresso na variedade Pera. Os outros genes do óperon *rpf*: *rpfF*, *G*, *A* e *B* apresentaram maior expressão na variedade Pera, mas as diferenças foram muito baixas e não chegaram ao limiar estabelecido  $-1/1$ , para considerá-los diferencialmente expressos. Esses dados sugerem a transcrição linear do óperon, mas com mínimas diferenças de expressão entre ambas as variedades, sintomática e assintomática.

Por meio da análise da sequência completa do genoma desta bactéria, deduz-se que a matriz extracelular é composta por polissacarídeos (EPSs) sintetizados por enzimas muito relacionadas com aquelas da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), que produz o que é comercialmente conhecido, como a goma xantana. Comparando-se com Xcc, esta não possui *GumI* (que codifica glicosiltransferase V e incorpora a manose terminal), nem *GumL*, nem *GumG*, o que sugere uma matriz menos viscosa que Xcc (SIMPSON, 2000). *Xylella fastidiosa* possui, portanto, somente os genes *GumJ*, *GumE*, *GumC* e *GumB* (Figura 21 A).

A regulação positiva dessas enzimas extracelulares e dos EPS (exopolissacarídeos) em *Xanthomonas* é afetada por proteínas codificadas pelo agrupamento de genes RPF (“regulation of pathogenicity factors”). Na figura 21 B, é apresentado um esquema deste óperon comparado à sequência do mesmo óperon na bactéria *X. campestris*. Mutações desses genes resultam na perda de síntese dos EPS, transformando-se em bactérias não patogênicas. A *Xylella fastidiosa*, por sua vez, possui os genes que codificam para RpfA, RpfB, RpfC e Rpf F, o que sugere que ambas as bactérias devem regular a síntese de EPS patogênico através de mecanismos similares (SIMPSON *et al.*, 2000). No entanto, novas informações sugerem que as *xanthomonadales* têm-se adaptado à percepção e função do mesmo tipo de molécula sinalizadora, para alcançar as necessidades específicas de colonização de hospedeiros distintos.

(A) *gum* operon(B) *rpf* operon

**Figura 21:** Mapa genético dos óperons *gum* (A) e *rpf* (B), comparando-se as regiões de genes homólogos em *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas campestris* (DA SILVA *et al.*, 2006). As barras pretas representam a sequência de DNA, e as flechas sobre as mesmas representam os genes. Os genes representados com barras brancas nos óperons de *X. campestris* não se encontram em *X. fastidiosa* e foram representados fora da sequência para conseguir manter o alinhamento. A pequena barra preta por cima de cada figura representa 500 nucleotídeos.

O biofilme constitui-se de uma comunidade microbiana aderida e envolta por uma matriz de substâncias extracelulares por ela mesma secretada (COSTERTON *et al.*, 1999). A formação do biofilme é resultado de uma série de eventos que englobam, inicialmente, a adesão de uma ou poucas células a uma superfície sólida. Essas células, uma vez fixadas, começam a crescer e a dividir-se, iniciando, então, a produção e a secreção de EPS. Esses EPS formam uma camada protetora que possui papel importante, tanto na sobrevivência quanto na virulência bacteriana, moldando a estrutura dos biofilmes (XAVIER *et al.*, 2003). Assim, também, os EPS estão associados à estabilidade mecânica dos biofilmes (MAYER *et al.*, 1999), permitindo-lhes suportar tensões consideráveis. De modo geral, essas substâncias trazem grandes vantagens às comunidades de microrganismos que as secretam, tais como proteção contra antibióticos,

resistência à radiação UV, alterações de pH e choques osmóticos, assim como proteção contra a desidratação, por ser uma matriz altamente hidratada e agir como uma barreira física (SAUER *et al.*, 2002; CERI *et al.*, 2001; ELASRI; MILLER, 1999). Isso garante, sobretudo, a sobrevivência da comunidade em ambientes adversos. Além disso, esses EPSs aproximam as células bacterianas e permitem uma cooperação metabólica que facilita a troca de substrato e a remoção e distribuição de metabólitos (DAVEY *et al.*, 2000).

SCATTOLIN *et al.* (2010) encontraram alterações da composição de EPS do biofilme entre mutantes *rpf* e tipo selvagem de *X. fastidiosa* (linhagem temécula) através de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) e microscopia eletrônica de varredura. O biofilme das plantas assintomáticas poderia possivelmente ter uma composição distinta de EPS, com menor quantidade de goma fastidiosa, distinto da variedade suscetível, já que a bactéria não bloqueia os vasos como na Pera para produzir os típicos sintomas de CVC. Mas a bactéria também aparece em altas concentrações na variedade cultivar Navelina ISA 315, segundo as análises de RT-qPCR (FADEL, 2011). Seguindo essa hipótese, *gumE* foi diferencialmente expresso na variedade Pera, enquanto a cultivar Navelina ISA 315 não apresentou nenhum gene *gum* diferencialmente expresso. Isso sugere a possibilidade de diferenças na composição do biofilme entre a planta assintomática e a sintomática.

A formação dos biofilmes requer interações coordenadas entre os microrganismos que os compõem, através de “quorum sensing”, mecanismo de regulação da expressão gênica dependente da densidade celular. Esse fenômeno é responsável para que um conjunto de células independentes, sob a geração de sinais extracelulares, desenvolva comportamentos sociais coordenados. Muitas bactérias Gram-negativas, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P.aureofasciens*, *Escherichia coli*, e *Rhizobium leguminosarum*, possuem mecanismos “quorum sensing” homólogos

ao *LuxR/LuxI* do *Vibrio fischeri* envolvido na regulação dos genes de virulência/patogenicidade, transferência de plasmídeos por conjugação e síntese de antibióticos. Não têm sido identificados genes homólogos a *luxI* no genoma da *X. fastidiosa*, mas, sim, dois genes que codificam proteínas que pertencem à família de reguladores transcricionais LuxR (SIMPSON *et al.*, 2000).

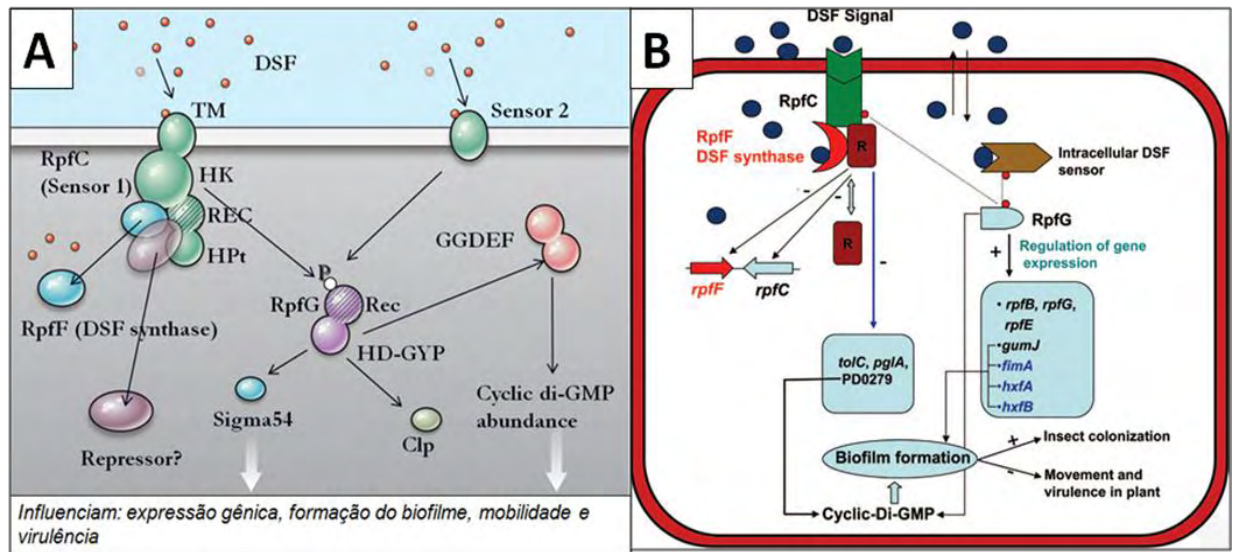
O longo período requerido para a observação dos sintomas da CVC após a infecção com *X. fastidiosa* e a existência aparente de um limite no número de células, associado com o desenvolvimento da CVC, sugere que a síntese dos fatores de patogenicidade está regulada pelo mecanismo “quorum sensing”. Assim, também, a alta homologia de dois genes da *X. fastidiosa* com os genes *rpfB* e *rpfF* da *X. campestris* pv *campestris*, os quais estão envolvidos na síntese do fator de sinal difusível (DSF), sugere que *X. fastidiosa* possui um sistema de sinalização similar a esta bactéria (SIMPSON *et al.*, 2000). A formação do biofilme na *X. fastidiosa* foi caracterizada e observou-se que varia em função da linhagem analisada, assim como das condições microambientais analisadas (MARQUES, 2002).

Sobre o sistema de sinalização de dois componentes (*RpfC/RpfG*), alguns modelos de sinalização foram propostos na literatura que serão descritos com mais detalhe a seguir. DOW (2008) propôs um modelo para o grupo *Xanthomonadales*, enquanto CHATERJEE *et al.* (2007), propuseram para *X. fastidiosa* (Figura 22) Esses modelos envolvem cascatas de regulação gênica e transdução de sinais que levam ou não, em última instância, ao desenvolvimento dos sintomas na planta. Assim, CHATERJEE *et al.* (2008) propuseram um modelo para a colonização da planta e transmissão ao inseto de *Xylella fastidiosa* que foi descrito na Figura 3 no item II (Revisão da Literatura).

A virulência das bactérias patogênicas de plantas pertencentes ao gênero *Xanthomonas* e *Xylella* encontra-se relacionada com um sistema de sinalização



mediado pelo sinal difusível, o fator DSF (“difusible signaling factor”) (ALMEIDA, 2005; FEIL, 2007; ANDRADE, 2006; De La FUENTE, 2007; FEDATTO, 2006). A síntese do DSF depende do gene *rpfF*, enquanto o sistema em dois componentes *rpfC/ rpfG* está implicado na percepção e transdução do sinal. CHATERJEE *et al.* (2008) propuseram que a mesma molécula sensora é requerida para desenvolver a virulência, assim como para a transmissão ao inseto.



**Figura 22:** Modelos de transdução de sinais A- Para *Xanthomonadales* (DOW, 2008). B- Para *Xylella fastidiosa* (CHATERJEE *et al.*, 2007).

Segundo o modelo de DOW (2008) (Figura 22 A) Rpf F é a enzima responsável pela síntese do DSF. RpfC é um complexo sensor tipo quinase responsável pela percepção do DSF, que sequestra RpfF e talvez outros reguladores que podem ser liberados após câmbios estruturais que ocorrem depois da união do DSF com o domínio sensível de RpfC. As consequências são uma autoindução da síntese do DSF e uma alteração na expressão de um grupo particular de genes. A união do DSF também leva a uma autofosforilação de RpfC e a uma liberação do RpfG, portanto ativa a degradação cíclica do di-GMP pelo domínio HD-GYP. Esta molécula poderia também interagir fisicamente com as

proteínas de domínio GGDEF (di-GMP sintase), o que influencia as concentrações do di-GMP cíclico, e, junto com outros reguladores (*c/p*, Sigma 54), modula a transcrição gênica, fabricação do biofilme, mobilidade e virulência. RpfG participa em múltiplas cascatas de transdução de sinais independentes que acoplam a percepção do DSF à síntese ou expressão de distintos fatores de virulência. Poderia também acontecer que o mesmo “pool” de di-GMP cíclico controlasse ambas: a síntese de enzimas extracelulares e a mobilidade, mas com distintos limiares de ativação.

Na bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc), o sistema em dois componentes, *RpfG/ RpfC*, está implicado na percepção e resposta ao fator difusível DSF, que é essencial na sinalização célula-célula. Este fator está envolvido na síntese de DSF, e mutações nos genes *rpfF*, *rpfG* e *rpfC* levam a uma redução coordenada da síntese de fatores de virulência, tais como enzimas extracelulares, estruturas do biofilme e mobilidade (RYAN et al., 2010). Na *X. fastidiosa*, um segundo sensor fosforilaria *rpfG* em resposta à DSF (DOW et al., 2008), que poderia estar ligado à membrana ou não, mesmo que na Figura 22 A apareça ligado.

O sensor *rpfC* regula negativamente a síntese do DSF (BURR, 2007). Mutações do gene *rpfF* na *X. fastidiosa* (linhagem temécula) potenciam a virulência em videira e previnem a colonização do inseto vetor (De LA FUENTE, 2007), enquanto os mutantes *rpfC* são deficientes na virulência e no movimento através dos vasos xilemáticos. Os mutantes *rpfC*, mesmo podendo colonizar o inseto vetor (De LA FUENTE, 2007), não são transmitidos à planta hospedeira (BACKUS, 1982, BURR, 2007). De igual modo, mutações do *rpfC* levam à maior expressão dos genes que codificam as adesinas HxfA, HxfB e FimA (BURR, 2007). Já, na *X. fastidiosa* linhagem 9a5c, os mutantes *rpfC* resultaram hipervirulentos (CHATERJEE et al., 2008).

Segundo o modelo de DOW (2008), uma menor expressão do gene *rpfC* na variedade cultivar Navelina ISA 315 pode relacionar-se com ausência de virulência. Na planta suscetível, uma maior expressão desse gene poderia provavelmente potencializar a virulência, regulando positivamente o gene *rpfG* que ativa, por sua vez, outros genes reguladores e fatores de virulência e reprime as adesinas.

Por outro lado, genes de outros sistemas em dois componentes foram diferencialmente expressos neste estudo, tais como *ALGR*, *colR*, *algZ*, *colR* e *colS*, os três primeiros na variedade Pera, e os dois últimos, na cultivar Navelina ISA 315, respectivamente (Apêndice: Tabela1 e Figura A6. O fato de que reguladores distintos e proteínas sensoras tenham sido induzidos na bactéria nessas duas variedades, sugere uma adaptação a distintas condições ou mecanismos de defesa distintos.

O gene *VapD* foi induzido na variedade suscetível Pera com um valor LogFC de -1,6. Este gene (ORF XFa0052) codifica uma proteína similar com o fator D associado à virulência (VapD) (NUNES, 2003; MARQUES, 2001), e é encontrado em muitos outros patógenos bacterianos (KATZ, 1992). O gene cromossômico *VapD* em *D. nodosus* é parte de uma região *vap* maior (designada *vap ABCD*), que é significativamente mais frequente nos isolados virulentos do que nos isolados benignos (KATZ, 1992). Essa expressão diferencial sugere a participação desse fator de virulência no desenvolvimento dos sintomas na variedade Pera.

## 1.2 Adesinas (não do tipo fímbria)

Assim como as fímbrias foram bem caracterizadas como fatores de virulência cruciais nos dois patógenos de plantas e de humanos, as adesinas (não fímbrias) foram somente relacionadas com patógenos humanos e animais,

promovendo a aderência aos tecidos epiteliais. Mas três adesinas deste tipo em *X. fastidiosa* apresentaram similaridade de sequência com adesinas de outros patógenos (XF1981, XF1529 e XF1516) (SIMPSON *et al.*, 2000) Assim, a ORF XF1516, apresentou-se diferencialmente expressa na variedade cultivar Navelina ISA 315 com um valor de 1,58 de LogFC. O produto deste gene é similar ao produto do gene *uspA1* de *Moraxella catarrhalis* (COPE, 1999).

Este fato poderia relacionar-se com um padrão de adesão distinto da bactéria nas duas situações, com uma tendência maior à adesão na cultivar Navelina ISA 315. Embora a composição do biofilme (gomas de exopolissacarídeos) esteja mais relacionada com a oclusão dos vasos xilemáticos e sintomas, esta adesina, diferencialmente expressa, sugere diferenças na adesão aos tecidos do hospedeiro e nos contatos intercelulares dentro das variedades. Nesta variedade, talvez, a bactéria se encontraria em uma fase distinta da colonização do hospedeiro.

Segundo CHATERJEE (2008), as adesinas seriam mais expressas na fase de aquisição pelo inseto, quando a bactéria já colonizou a planta. (Figura 3). Na cultivar Navelina ISA 315, a bactéria poderia encontrar-se em uma etapa de adesão aos vasos do xilema, tendo já colonizado a planta em altas concentrações. Nessa etapa, essas estruturas seriam necessárias, podendo, talvez até serem transmitidas ao inseto, representando uma fonte de inóculo. Uma análise de ambas as variedades, por meio de microscopia de varredura, poderia dar mais luz ao assunto.

## 2. Movimento através dos vasos xilemáticos

### 2.1 Adesinas tipo fímbrias e movimento “twitching motility” (sistema quimiotático)

Estruturas tipo fímbrias são visíveis nas células de *X. fastidiosa* através de microscopia eletrônica dentro dos dois hospedeiros: planta e inseto. Esta bactéria possui os dois, *pili* curtos tipo I (0,4- 1,0  $\mu\text{m}$  de comprimento), e longos, tipo IV (1,0- 5,8  $\mu\text{m}$  de comprimento) no mesmo polo (MENG, 2005). Dentre os *pili* tipo IV, dois genes foram induzidos na Pera, *pilM*, que codifica uma proteína de membrana constitutiva da fímbria, e *pilU*, que codifica uma proteína de movimento (“TM”), os dois com altos valores de LogFC (-4,4 e -2,0, respectivamente). Na cultivar Navelina ISA 315, somente uma proteína da fímbria de 15kDa foi diferencialmente expressa.

Diferentes tipos de *pili* tipo IV poderiam estar ativos nestas variedades segundo as distintas condições dentro da planta, assim como a fase do ciclo da bactéria e sua mobilidade; portanto, os genes *pilU* e *pilM*, diferencialmente induzidos na variedade Pera, indicariam uma maior atividade destes *pili* nessa variedade.

Do mesmo modo, outros ORFs relacionados com *pili*, foram diferencialmente expressos na variedade Pera: XF1519, XF0849, XF1518, XF0473. Na informação anotada para o produto do gene *xpsG* (XF1519), diz-se que ela apresenta uma similaridade com a proteína dependente de *PilD* em *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, também, na anotação do gene *xpsF* (XF1518), especifica-se que o produto desse gene possui uma similaridade com a proteína de montagem da fímbria *PilC* de *Pseudomonas aureginosa*. Os comentários são: proteína envolvida na traslocação dos *pili* tipo IV (*pilA*), proteína integral de

membrana possivelmente interna. Assim, esses genes codificam proteínas componentes do sistema secretório geral (proteínas G e F, respectivamente).

Também duas proteínas hipotéticas encontram-se relacionadas com *pili*. A proteína hipotética conservada, codificada pelo ORF XF0849, foi relacionada com *PilB*, enquanto a ORF XF0473 que produz uma proteína hipotética, apresenta sequências “leader” *pré-pillin*. O comentário para a ORF XF0849 no banco de dados é a similaridade da proteína hipotética com a família *PILB*. Existem vários “hits” ou resultados do algoritmo Blast com proteínas similares ao repressor da regulação da transcrição (*pilB*) em vários organismos: *Homo sapiens*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*.

Assim, no experimento de microarranjos, o gene *chpA* foi induzido na cultivar Navelina ISA 315 com um valor de LogFC de 1,8. Este codifica para uma proteína quinase relacionada à quimiotáxis que forma parte de um sistema regulatório quimiossensorial relacionado com o movimento “twitching motility” das fímbrias tipo IV.

Os outros genes *pili*: *pilB*, *pilC* e *pilD* não apresentaram expressão diferencial na variedade Pera, enquanto os genes *pilM* e *pilU* foram altamente induzidos; talvez eles possam ser requeridos para uma maior movimentação da bactéria através dos vasos xilemáticos, enquanto os outros, não.

Estudos têm indicado que mutantes *pilA* (deficientes em *pili*) de *P. aureginosa* são avirulentos ou possuem virulência reduzida (COMOLLI *et al.*, 1991); e que os mutantes *pilA*, *pilT* e *pilQ* do fitopatógeno *R. solanacearum* causam um desenvolvimento mais lento da doença e sintomas menos severos do murchamento das plantas de tomate (KANG *et al.*, 2002); LIU *et al.*, 2001)

O movimento chamado “twitching motility” (TM) é um meio de as bactérias

se movimentarem sobre superfícies úmidas de forma independente dos flagelos (MATTICK, 2002). Este movimento aparece na colonização do hospedeiro, e, ocorre através da extensão, adesão e retração das estruturas polares *pili* tipo IV. Foi observado na maior parte das bactérias saprofiticas e nos patógenos animais. Dentre as bactérias associadas com plantas, o movimento “twitching motility” foi observado em *Ralstonia solanacearum* (KANG *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2001) e *X. fastidiosa* (MENG *et al.*, 2005).

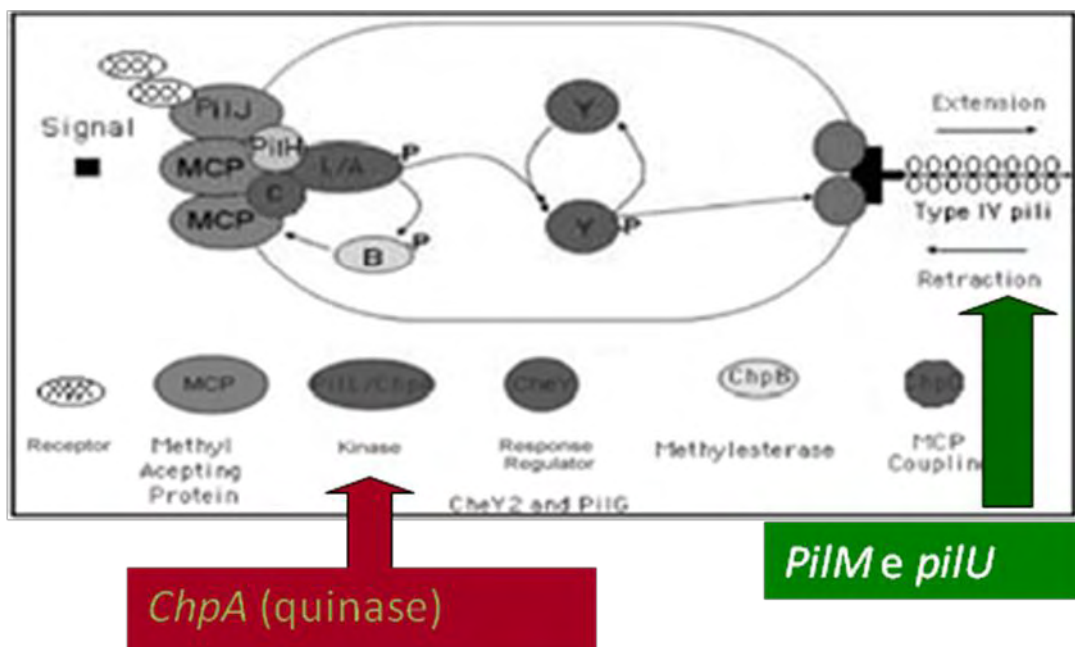
Em *P. aureginosa*, a TM está regulada por um sistema quimiossensorial que envolve dois agrupamentos de genes: *pilG-K* e *ChpA-E*, que são análogos a outros sistemas quimiotáticos que controlam a mobilidade em resposta a estímulos ambientais (WHITCHUCH *et al.*, 2004). Os sistemas quimiossensores estão compostos por receptores sensoriais que atuam junto com componentes citoplásmicos de cascatas de fosforilação e desfosforilação (MARICONDA *et al.*, 2006).

MENG *et al.* (2005) revelaram que na *X. fastidiosa* (isolado da Temécua tipo selvagem) possui ambos, os *pili* tipo I e tipo IV. Os *pili* tipo I possuem um papel importante na adesão e na formação do biofilme, enquanto os *pili* tipo IV mediam o movimento “twitching” nas superfícies sólidas e contra o fluxo do meio de cultura em “câmaras de microfluidos”.

Na *X. fastidiosa*, foram identificados genes que codificam proteínas que controlam a produção dos *pili* e o movimento “twitching” em resposta aos estímulos ambientais. Esses genes incluem o par de genes do sistema em dois componentes: *pilS/pilR*, os quais se encontram associados ao sistema regulatório quimiossensorial: *pilG-pilK* e *chpA-chpE* (LI, 2007). Assim, CURSINO *et al.* (2008) reportaram 3 genes associados a este sistema na *X. fastidiosa* linhagem temécua: *cheY2*, *pilL* e *tonB3*. *CheY2* e *pilL* foram associados a “twitching motility”,

enquanto *tonB3* poderia ser o responsável pelo transporte de subunidades *pili* fora da célula.

Segundo o modelo acima apresentado na Figura 22, receptores de superfície celular detectam mudanças nas concentrações de fatores, causando mudanças no nível de fosforilação das proteínas sinalizadoras difusíveis CheY2 e pilG. Essas proteínas já fosforiladas, por sua vez, modulam a extensão e a retração das proteínas das fímbrias, portanto afetam o movimento “twitching” da célula. PilL/ChpA é uma quinase que fosforila aos reguladores CheY2 e pilG, assim como à metilesterase ChpB. ChpC é uma proteína adaptadora que acopla as proteínas pilL/ChpA com as MCPs (PilJ).



**Figura 22:** Modelo para o movimento “twitching motility” (CURSINO *et al.*, 2008)

A expressão diferencial do gene *chpA* na cultivar Navelina ISA 315, poderia sugerir que o movimento “twitching” esteja sendo potencializado nas proteínas das fímbrias dentro desta variedade. Como foi mencionado, o produto deste gene



é uma quinase que fosforila as proteínas reguladoras cheY2 e pilG, e a metilesterase ChpB, as que, quando fosforiladas, modulam a extensão e retração das proteínas das fímbrias. Os outros componentes do sistema quimiossensor não apresentaram expressão diferencial nas variedades dentro do limite estabelecido.

Por outro lado, o fato dos genes que codificam as fímbrias tipo IV, *PilM* e *PilU* serem diferencialmente expressas na variedade Pera, sugere que talvez, distintas fímbrias poderiam estar mais ativas na Pera e na Navelina, o que influiria na mobilidade por “twitching motility”.

## 2.2 Degradação da parede celular e enzimas degradadoras

Neste trabalho, mais genes da subcategoria A (Degradação de polissacarídeos e pequenas moléculas) da Categoria I (Metabolismo intermediário) foram diferencialmente expressos na Pera: *estA*, *est*, *slpD*, *pepQ* e *chi* com valores de LogFC de -1,6, -1,5, -3,3, -1,5, -1,4, respectivamente. Estes codificam as enzimas lipase-esterase, esterase, prolindipeptidase e uma quitinase (ver Figura 11 e Tabela 1 de Apêndices).

A maioria dos patógenos de plantas consegue produzir uma variedade de enzimas degradadoras de plantas, tais como xilanases, pectinases e proteases, as quais podem ser importantes fatores de patogenicidade (NORMAN-SETTERBLAD *et al.*, 2000). Na *X. fastidiosa*, as enzimas secretadas que degradam a parede celular poderiam ter um papel importante na migração através dos vasos do xilema, por meio da degradação da membrana de pontuação. Por outro lado, uma degradação localizada da parede celular das células da planta liberaria os carboidratos necessários ao crescimento bacteriano no xilema (SIMPSON *et al.*, 2000; LAMBAIS *et al.*, 2000). A migração entre os vasos xilemáticos é crucial para conseguir uma efetiva colonização da bactéria. Assim, na *X. fastidiosa* foram identificados um precursor de poligaracturonase e uma celulase apresentando

uma alta similaridade com os ortólogos de *Ralstonia solanaearum* que infecta o tomate. Também foram identificadas várias proteases, assim como a maquinaria completa necessária para secretar as enzimas degradadoras da parede celular (SIMPSON *et al.*, 2000).

A maior expressão da quitinase na variedade Pera poderia, talvez, sugerir que a bactéria se encontra preparada para a fase de aquisição pelo inseto, começando a produzir uma enzima própria para quebrar a quitina do intestino anterior do inseto. Essa proteína foi anotada como quitinase por homologia de sequência com chitinases de outros organismos. Portanto, embora a Navelina não apresente sintomas, poderia representar uma fonte de inóculo.

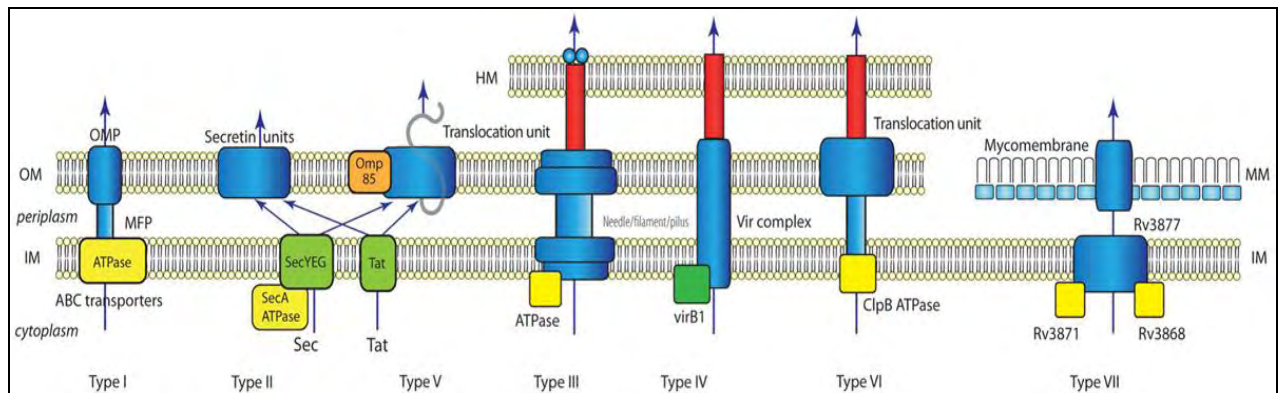
### **3 Genes envolvidos na sobrevivência da bactéria**

#### **3.1 Sistemas transportadores**

Observa-se, neste estudo, a expressão diferencial do gene *ToIC* (XF2586) na variedade Pera com um valor de -1,48 LogFC. Esse gene é também chamado MTCB/ MUKA ou REFI) e é classificado como fator de exportação da membrana externa. Também os genes *xpsG* e *F* (*PEFG*) que codificam as proteínas do sistema secretório geral F e G, respectivamente, foram induzidos na Pera com valores de LogFC de -1,61 e -1,46, respectivamente.

Assim, também, sete genes relacionados com o sistema transportador ABC resultaram diferencialmente expressos na variedade suscetível, enquanto somente quatro apresentaram expressão diferencial na cultivar Navelina ISA 315 (Tabela 1 do Apêndice: categoria V.A). Também pode-se observar a quantidade de genes diferencialmente expressos relacionados com o transporte entre Pera e Navelina na Figura 10 (Categoria Processos celulares), na subcategoria transporte (V.A).

Os sistemas de transporte são componentes centrais da relação patógeno-hospedeiro. Nas bactérias Gram (-), nas quais a secreção envolve translocação através das membranas interna e externa, são conhecidas seis classes gerais de sistemas de secreção. As bactérias Gram (+) compartilham dois deles: Sec (sistema secretório geral) e Tat (sistema de translocação de duas argininas), e apresentam um sistema específico do grupo, o sistema tipo VII. (TSAI-TIEN *et al.*, 2009)(Figura 23) Em *X. fastidiosa*, um total de 140 genes que codificam proteínas relacionadas ao transporte foram identificados (2,8% do total das ORFs). Dentre eles, foram identificados 23 sistemas de transporte ABC que compreendem 41 genes.



**Figura 23:** Resumo dos sistemas de secreção bacterianos conhecidos (TSAI-TIEN TSENG *et al.*, 2009). HM: membrana do hospedeiro; OM: membrana externa; IM: membrana interna; MM: micomembrana; OMP: proteína de membrana externa; MFP: proteína de membrana de fusão. ATPases e chaperonas são apresentadas em amarelo.

O sistema ABC (“ATP binding cassette”) acopla o transporte de antibióticos através da membrana celular com a hidrólise de ATP. Esses transportadores formam parte dos sistemas de secreção tipo I, junto com os fatores de membrana externa (OMFs) e as proteínas de membrana de fusão (MFP) (Figura 23). O gene *ToIC* pertence à família PRTF de proteínas de secreção e é requerido em *E.coli* para a expressão de genes de proteínas da membrana externa, tais como OMPF,

NMPC, Protein2, hemolysin, Colicin V, ou Colicin E1. Esse gene poderia ter função na secreção extracelular independente de sinal de sequência, das bactérias Gram (-). (informação adicional da base de dados do genoma da *X. fastidiosa*: Apêndice). Assim, os sistemas transportadores ABC encontram-se envolvidos na secreção de antibióticos através da membrana celular e contribuem com a própria resistência ao mesmo antibiótico produzido (MÉNDEZ, 2000).

Mais genes diferencialmente expressos, relacionados com transportadores ABC na variedade susceptível, podem sugerir uma maior atividade deste sistema relacionada com a virulência, seja pela secreção de antibióticos e resistência a estes, permitindo-lhe competir com outros microrganismos e sobreviver. Assim, a expressão diferencial do gene *ToIC* sugere uma importante atividade desse transportador na variedade suscetível.

### **3.2. Toxinas, detoxificação e resposta antioxidante**

Quatro genes foram diferencialmente expressos na cultivar Navelina ISA 315, na subcategoria “Produção de toxinas e detoxificação” dentro da Categoria “Patogenicidade, virulência e adaptação”, os genes *KSGA*, *cpeB*, *stF7.11* e *pbp* codificando para a dimetiladenosine transferase, catalase/peroxidase, peptideo sintase e proteína beta-lactamase, respectivamente. Os valores de LogFC apresentados foram de 1,3 (*KSGA*), 1,5 (*cpeB*), 1,5 (*stF7.11*) e 2,2 (*pbp*), respectivamente. Nessa mesma subcategoria, na variedade Pera, os genes *FRPC* (XF0668), *AHPC* (XF1530), *cutC* (XF1341), *CZCA* (XF2083) e *ToIC* (XF2586) apresentaram uma expressão diferencial com valores de -3,4, -2,0 e -1,4 os três últimos. Esses genes codificam para uma proteína de união ao cálcio do tipo hemolisina, a subunidade C da hidróperóxido redutase, proteína relacionada à homeostase do cobre, proteína de sistema de fluxo catiônico e o fator de membrana externa, respectivamente

Destaca-se dentre esses genes, a alta expressão do gene FRPC. Este gene possui similaridade com outros genes de hemolisinas da família RTX. O produto deste se localiza na membrana externa e é secretado. Possui uma região rica em GLY, provavelmente envolvida na união ao cálcio, o qual é requerido por sua parte na união com as células-alvo ou na atividade citossólica (informação adicional da base de dados do genoma da *X. fastidiosa* em Apêndice). Dentre os genes que codificam toxinas na *X. fastidiosa*, quatro são do tipo hemolisina pertencentes à família RTX (SIMPSON *et al.*, 2000). Essas toxinas formam poros que interagem com a membrana plasmática do hospedeiro, causando perdas de compostos celulares (LALLY *et al.*, 1999).

As colicinas-V (Col V) constituem um dos diversos grupos de peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, os quais apresentam atividade contra espécies bacterianas relacionadas, geralmente, para controlar o crescimento de espécies que habitam o mesmo ambiente, diminuindo a competição por nutrientes (RILEY; WERTZ, 2002a, RILEY; WERTZ, 2002b). Já foi descrito que membros desse sistema, incluindo os genes *cvaC*, são expressos em diferentes condições experimentais (SOUZA *et al.*, 2003; PASHLIDIS *et al.*, 2005). Mas, neste experimento, as colicinas-V não se apresentaram diferencialmente expressas.

Dentre os genes mencionados, os genes *cpeB* (catalase/peroxidase) e o *AHPC* (subunidade C da enzima alkyl-hidroperóxide redutase) foram relacionados com a resposta antioxidante. Durante a infecção com *X. fastidiosa*, elicitores das respostas de defesa das plantas, sintetizados pela bactéria e liberados pela degradação parcial da parede celular das células do hospede, possivelmente, induzem a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS), tais como superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais provavelmente inibem o crescimento bacteriano e o desenvolvimento da doença (WOJTASZEK, 1997). Muitos genes envolvidos na detoxificação ROS têm sido identificados no genoma da *X. fastidiosa*, incluindo aqueles que codificam para a catalase, superóxido

dismutase, glutathione peroxidase, e os genes *oxyR* e *Ohr*, sugerindo que *X. fastidiosa* pode responder ao estresse oxidativo (SIMPSON *et al.*, 2000).

A subunidade C da alkyl-hidroperóxide redutase (codificada pelo gene *AhpC*) é a subunidade catalítica responsável pelo metabolismo do Alkyl-peróxido em *Xanthomonas*. Um aumento na atividade da catalase representa uma resposta compensatória à falta da alkyl-hidroperóxide redutase, através de uma complexa resposta regulatória que difere de outras bactérias (MONGKOLSUK *et al.*, 2000). Portanto, a maior expressão do gene *cpeB* que codifica a catalase/peroxidase na cultivar Navelina ISA 315 poderia estar compensando a baixa expressão do gene *AHPC*, enquanto *AHPC* se apresenta mais expresso na Pera. Provavelmente, a bactéria *X. fastidiosa* estaria reagindo de modo distinto dentro das plantas sintomáticas e assintomáticas em função da resposta ROS da planta, o que se reflete nas proteínas antioxidantes diferencialmente expressas.

Os genes *cutC* e *czca* serão analisados no item seguinte, já que foram relacionados com a homeostase do ferro e resistência ao cobre, respectivamente.

Assim, também, uma ORF da categoria VII (XFa0032), o gene *SCJ21.16*, que codifica uma proteína hipotética conservada de 27,1 kDa, recentemente caracterizada como uma  $\alpha$  hidroxinitrile lyase, apresentou expressão diferencial na cultivar Navelina ISA 315 com alto valor LogFC (2,4). As  $\alpha$  hidroxinitrile liases (HNLs) são enzimas de defesa das plantas que protegem as células vegetais dos herbívoros ou do ataque microbiano, produzindo HCN (ácido hidrocianico) através de um processo chamado cianogênese (CARUSSO *et al.*, 2009). A *X. fastidiosa* poderia estar produzindo essa enzima em maior quantidade dentro da cultivar Navelina ISA 315, respondendo às defesas da planta. A cultivar Navelina ISA 315, assim como algum microrganismo endofítico poderia secretar mais HCN, que é um composto tóxico para se defender da *X. fastidiosa* ou de outros microrganismos dentro da planta. Por outro lado, a *X. fastidiosa* produziria mais  $\alpha$

hidroxinitrile liase para detoxificar o ambiente e sobreviver.

### 3.3. Homeostase do ferro e outros metais

Dentre algumas ORFs putativas identificadas na *X. fastidiosa* relacionadas com o transporte de ferro (XF0599, XF1038, XF2135, XF2137 e XF2276) (SILVA-STENICO, 2005), só as ORFs XF0599 (gene *YBIL* que codifica o receptor dependente de TonB) e XF1038 (gene *St3F7.11* que codifica a enzima peptídeo sintase) foram diferencialmente expressos com valores de -1,7 e 1,5 de LogFC na Pera e na cultivar Navelina ISA 315, respectivamente. Assim, o gene *RpfA* que codifica para a aconitato hidratase, também envolvida na homeostase do ferro, não apresentou expressão diferencial entre essas duas variedades, considerando-se o limiar estabelecido.

SIMPSON *et al.* (2000) propõem que a absorção do ferro e possivelmente de outros íons metálicos, tais como manganês, causam redução nos micronutrientes essenciais do xilema da planta, contribuindo com os sintomas típicos da clorose variegada. Em *X. campestris* pv *campestris*, os genes relacionados à absorção do ferro são essenciais para a indução da resposta hipersensível (HR) nas plantas não hospedeiras e dos sintomas da doença na planta hospedeira (WIGGERICH, 2000). Existem cinco receptores de membrana externos na *X. fastidiosa* que incluem sideróforos, cromorreceptores do ferro e hemo, os quais estão associados com o transporte do ferro. Assim, existem vários complexos energéticos: TonB-ExbB-ExbD e os parálogos TolA-TolR-TolQ, essenciais ao funcionamento dos receptores de membrana externos. No total, 67 genes codificam proteínas responsáveis pelo metabolismo do ferro na *X. fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000)

Quando as bactérias patogênicas são desafiadas com concentrações limitantes de ferro, como acontece nos tecidos do hospedeiro, elas mantêm a

homeostase deste metal, liberando ferro dos reservatórios intracelulares e aumentando a expressão dos sistemas de aquisição do ferro (RATLEDGE *et al.*, 2000). Esse sistema permite a sobrevivência das bactérias em ambientes que seriam inóspitos, uma vez que o ferro é um cofator essencial para muitas proteínas que medeiam à transferência de elétrons e reações redox. Um estrito controle do metabolismo do ferro é observado nas bactérias e, na maioria dos casos, ele é liberado pelo regulador férrico Fur (ANDREWS *et al.*, 2003).

ZAINI *et al.* (2008) reportaram uma análise do estado constante dos níveis de transcritos da *X. fastidiosa* em condições limitantes e sem limitação de ferro através de microarranjos. Eles observaram a modulação de muitos CDS relacionados com funções regulatórias, patogenicidade e estrutura celular, incluindo genes relacionados à síntese e secreção de colicina V, e funções dos pili/fimbrias.

Possivelmente existam diferenças na disponibilidade do ferro nas variedades estudadas o que pode influir no comportamento da bactéria, ou seja, provocar mudanças dos níveis de expressão dos genes envolvidos na absorção de ferro na variedade que a submeta à maior limitação desse metal. Dessa forma, também os genes envolvidos na patogenicidade poderiam mudar sua expressão segundo ZAINI *et al.* (2008). Na variedade Pera, poderia ocorrer essa situação, o que se correlaciona com a virulência e aparição dos sintomas. Assim, o fato do gene *YBIL* apresentar-se induzido na variedade Pera, poderia provavelmente ter influência no transporte do ferro através do complexo energético TonB-ExbB-ExbD que teria uma maior atividade, portanto ajudaria na sobrevivência da bactéria e no desenvolvimento dos sintomas, sugerindo um transporte mais eficiente nessa variedade.

LACAVA *et al.* (2008) reportaram que o crescimento *in vitro* de *X. fastidiosa* foi estimulado pela presença de sideróforos no sobrenadante de *Methylobacterium*



*mesophilicum* endofítica. Portanto, a absorção do ferro poderia ocorrer na variedade susceptível tanto por uma maior eficiência dos transportadores, ou pela presença de sideróforos desta bactéria endofítica associada.

Os genes envolvidos com a resistência ao cobre: *cutC* (XF1341), *czc* (XF2083) e *ToIC* (XF2586), apresentaram também uma expressão diferencial na Pera com valores de LogFC de -1,42, -1,49 e -1,48, respectivamente. RODRIGUES *et al.* (2008) acharam uma maior resistência ao cobre em células formando biofilme do que em células planctônicas, assim como uma maior expressão desses genes. Possivelmente, a maior resistência ao cobre das células do biofilme na planta susceptível, asseguraria a sobrevivência desta no xilema, ocasionando uma maior oclusão dos vasos e, portanto, provocando os sintomas característicos da CVC.

#### **3.4. Resposta “heat shock”**

Três genes que codificam chaperonas foram induzidos na cultivar Navelina ISA 315 (*DNA J*, *HTPG* e *DNA K*), enquanto somente um foi induzido na variedade Pera, o gene *HTRA*. (Figura 15 e Tabela 1 do Apêndice: subcategoria III.C.2)

As proteínas “heat shock” pertencem à classe das chaperonas moleculares, definidas como proteínas celulares que medeiam a montagem correta de outros polipeptídeos e, em alguns casos, sua montagem em estruturas oligoméricas (NABERHAUS, 2002). A função principal das chaperonas é uma interação transiente com proteínas, evitando, desse modo, agregados que seriam deletéreos para a célula. As proteínas “heat shock” são produzidas pelas células, quando submetidas a condições de estresse por altas temperaturas, mas também são fisiologicamente reguladas por distintas condições fisiológicas (CRACK *et al.*, 2002).

A proteína DNAK (chaperona da família Hsp70) de *E.coli* interatua com os substratos proteicos, junto das co-chaperonas DNAJ e GrpE na montagem e desmontagem de complexos polipeptídicos através de vários ciclos de reações dependentes do ATP (SOON-YOUNG KIM, 2002). O sistema DNA K/ DNA J/ GrpE participa ativamente na resposta ao “shock” osmótico e por temperatura, prevenindo a agregação das proteínas desagregadas pelo estresse, desagregando-as.

O gene HTRA codifica uma proteína que possui uma grande similaridade com a proteína “heat shock” de *E. coli*, a qual é produzida a altas temperaturas e encontra-se envolvida na degradação de proteínas danificadas. Essa proteína é indispensável para a sobrevivência da bactéria em altas temperaturas superiores a 42°C (informação adicional da base de dados de *X. fastidiosa* no Apêndice). É possível que essa atividade ajude na sobrevivência da bactéria em altas temperaturas, dentro da variedade Pera, e na degradação dos polipeptídeos danificados.

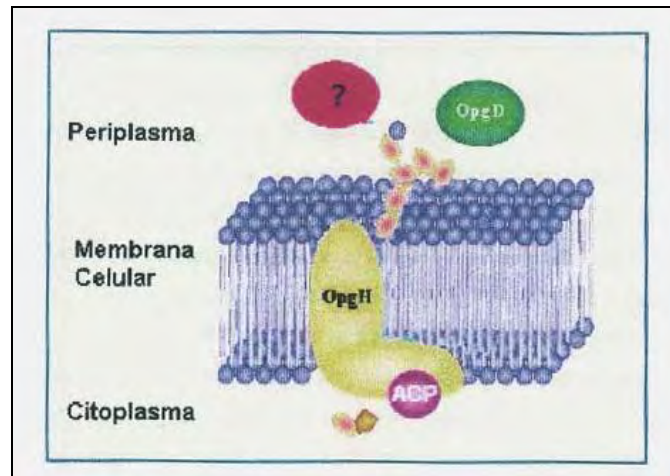
Talvez, na cultivar Navelina ISA 315, a bactéria poderia estar submetida a um estresse maior devido às defesas dessa cultivar ou aos microrganismos endófitos; portanto o sistema DNAK/DNAJ/GrpE estaria mais ativo na função da desmontagem dos peptídeos desagregados. Na Pera, possivelmente, as defesas são menos efetivas, e a bactéria não teria tantos peptídeos danificados, portanto, não precisaria tanta atividade do sistema *DNAK/DNAJ/GrpE*, embora a proteína HTRA poderia ter uma função similar nas condições dessa variedade. Assim, poderia existir uma resposta bacteriana “heat shock” distinta provocada pelas defesas dessas variedades, ou mesmo por diferentes microrganismos endófitos.

### 3.5. Adaptação, condições atípicas

Os genes *MDOH* (XF1623) e *MDOG* (XF2682) da subcategoria “Adaptação a condições atípicas” da Categoria VII, foram diferencialmente expressos na cultivar Navelina ISA 315 e na Pera com valores similares de LogFC, 1,55 e -1,51, respectivamente. Esses genes estão relacionados com a síntese das chamadas “glicanas periplasmáticas osmorreguladas” (OPG).

As OPG são importantes componentes do envelope celular das bactérias Gram-negativas. Seu papel biológico está envolvido com a sobrevivência em baixa concentração de nutrientes e condições osmóticas inadequadas, especialmente, quando as bactérias interagem com hospedeiros eucariotos e, normalmente, se associam a processos de fitopatogenicidade (BOHIN, 2000). Tem-se demonstrado que, em *E.coli*, a síntese das OPGs é controlada por um óperon de dois genes (*mdoGH*) sob controle osmótico (LOUBENS *et al.*, 1993). Esses genes foram posteriormente nomeados *OpgDH*. Mutações no gene *mdoH* (*OpgH*) abolem completamente a produção de glicanas, enquanto mutações no gene *mdoG* (*OpgG*) resultam na síntese de pequenas quantidades destas (BOHIN, 2000; PICCHI, 2006).

Em *X. fastidiosa*, as duas ORFs diferencialmente expressas, acima mencionadas foram descritas no genoma com alta homologia com os genes *mdoH* e *mdo D* de *E.coli*. VILAS- BÔAS (2002) propôs um modelo da síntese das OPGs em *X. fastidiosa*. Neste, a polimerização das moléculas de glicose é feita pela ação do domínio citoplasmático de glicosil-transferase da proteína *OpgH*, associada com uma das proteínas *Acp*. A molécula nascente de glicana é então transportada para o espaço periplasmático, onde é modificada pela proteína periplasmática *OpgD* (rearranjo da estrutura lineal ou adição de ramificações), o que gera a forma final da molécula de glicana (Figura 24)



**Figura 24:** Modelo da síntese das OPGs em *Xylella fastidiosa*. Fonte: VILAS BÔAS, 2002.

Na Pera e na Navelina ISA 315, poderia existir uma regulação oposta da síntese das glicanas baseada no nível de expressão dos dois genes deste óperon, de forma que pudesse dirigir à patogenicidade através das glicanas, dependendo das condições do meio, ou seja, por meio da indução do gene *OpgH* (na Navelina ISA 315) e do *OpgD* (na Navelina Pera). Ambas as situações permitiriam a formação de glicanas em distinto grau de concentração, dependendo de uma maior ou menor quantidade de cada uma dessas proteínas. Por sua vez, a concentração das glicanas poderia ter influência na interação patógeno-hospedeiro, portanto, no desenvolvimento dos sintomas.

Assim, na cultivar Navelina ISA 315, a osmolaridade do meio poderia induzir a expressão do gene *opgH*, mas a menor concentração do *opgD*, que permite o rearranjo final da molécula, afetaria a formação correta das glicanas e, influiria, portanto, na interação com o hospedeiro e na patogenicidade.

Assim, também, o gene *SspB*, que codifica para uma proteína B induzida em condições de ausência de nutrientes, está altamente ativado na Pera (-3,7 LogFC). O gene *SspA*, que codifica outra proteína desse tipo, está envolvido na

sobrevivência da bactéria na ausência de nutrientes durante uma prolongada fase estacionária (PERRETT, 1999). Na *Escherichia coli*, o produto do gene *SspA* é um ativador transcricional para o desenvolvimento do ciclo lítico do fago P1, o qual induz tolerância a ácido (De LA FORTELLE, 1997). Recentemente, foi demonstrado que esse gene possui um papel importante na resposta ao estresse (incluindo tolerância a ácido) através da regulação negativa do nível global do regulador H-NS, que regula negativamente múltiplos sistemas de defesa (VASSYLYEV, 2002; COWTAN, 1994). Esse gene está altamente conservado entre as bactérias Gram-negativas, sendo constatado que ortólogos de *SspA* em *Neisseria gonorrhoeae*, *Francisella novicida*, *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae* afetaram a expressão dos genes envolvidos na patogênese (LAURIANO, 2004; MOONEY, 1998; ENGH, 1991; LASKOWSKI, 1993).

O alto valor LogFC do gene *SspB* na Pera poderia também ser indicativo de uma função do produto gênico na sobrevivência da bactéria, em condições de ausência de nutrientes na seiva, produzida pelo consumo destes, e de indicar uma indução da tolerância a ácido durante a fase estacionária. Assim, também, o gene *SspB* poderia regular outros genes relacionados à patogenicidade, de modo a coordenar a replicação bacteriana e os sistemas de defesa. Possivelmente, a *X. fastidiosa* poderia ter desenvolvido diferentes mecanismos nessas duas plantas, para conseguir ultrapassar o estresse produzido pelos distintos mecanismos de defesa ou pelas condições dentro destas.

### **3.6 Sistemas de reparação, restrição e modificação do DNA**

Dentro das subcategorias do “Metabolismo do DNA”, as subcategorias “Reparação do DNA” (III.A.4) e “Restrição e Modificação do DNA”(III.A.5) possuem significativamente mais genes diferencialmente expressos na variedade Pera do que na cultivar Navelina ISA 315 (Figura 14, Tabela 1 e Figura A4 do Apêndice). Dos sistemas de restrição e modificação do DNA, foram diferencialmente

expressos, na variedade Pera, o gene *hsdR1* (XF2721) que codifica uma endonuclease, e o gene *hsdS* (XF2726) que é um determinante da especificidade, com valores de LogFC de -1,77 e -1,43, respectivamente. Assim, destaca-se a alta expressão também nesta variedade dos genes RUVC (XF1905) e RUVA (XF1904), que codificam uma endodeoxiribonuclease e uma DNA helicase com valores de -4,05 e -4,8 LogFC, respectivamente.

Os sistemas de restrição e modificação (RM) do DNA em bactérias são compostos por endonucleases, metilases e desmetilases de DNA, sendo responsáveis por diversos processos celulares, mas, principalmente, por limitar a entrada de DNA exógeno. Esses sistemas são classificados em RM-I, RM-II e RM-III (WILSON; MURRAY, 1991). A análise da composição genômica de *X. fastidiosa*-CVC revelou a presença de quatro cópias do sistema RM-I. Cada uma das três cópias do sistema RM-I apresenta três genes em sua composição, nomeados *hsdSRM*, que codificam, respectivamente, para um determinante de especificidade, uma endonuclease e uma DNA metilase. Embora *X. fastidiosa*-CVC apresente múltiplas cópias do sistema RM-I, nenhuma cópia dos outros dois sistemas RM foi encontrada no seu genoma. Assim, embora fossem identificados no genoma os principais genes da via SOS, *recA* e *lexA*, faltam as ORFs correspondentes às três DNA polimerases desta via I, II e II, o que indica que a via seria distinta (SIMPSON *et al.*, 2000)

A maior quantidade de genes relacionados com os sistemas de reparação, restrição e modificação do DNA, com expressão diferencial na variedade Pera, poderia estar sugerindo uma resposta maior ao dano do DNA produzido pelos sistemas de defesa da planta. Dessa forma, a bactéria conseguiria uma maior sobrevivência nos vasos xilemáticos, ultrapassando as defesas e provocando os sintomas. Podem-se observar várias endonucleases, excinucleases e proteínas relacionadas a esses sistemas nas subcategorias III.A.4 e III.A.5 com altos valores de LogFC em Apêndice (Tabela 1 e Figura A4).

#### **4 Genes relacionados com elementos genéticos móveis: fagos, profagos e plasmídeos**

Neste estudo, alguns genes diferencialmente expressos encontram-se dentro de elementos genéticos móveis: o *VapD* (XFa0052) e o *SCJ2116* (XFa0032), diferencialmente expressos na Pera e na cultivar Navelina ISA 315. Ambas estão relacionadas com a virulência e detoxificação, respectivamente.

Assim, também, pode-se observar maior quantidade de genes diferencialmente expressos que se encontram em sequências de fagos, profagos e plasmídeos, quando a bactéria se encontra na variedade suscetível Pera (Figura 10). Assim, as ORFs que apresentaram uma expressão diferencial na variedade Pera foram XFa0061 (-1,48 LogFC), XFa0007 (-6,20 LogFC), XFa0012 (-2,74 LogFC), XFa0040 (-1,60 LogFC) que codificam uma proteína de união ao DNA de fita simples e três proteínas relacionadas à conjugação, respectivamente. Assim, também, três genes de proteínas hipotéticas (XFa0035, XFa0017 e XFa0031) de expressão diferencial na Pera se encontram em regiões gênicas de profagos. Na cultivar Navelina ISA 315, somente quatro ORFs de genes de proteínas hipotéticas se encontram nessas regiões gênicas (Tabela 1 e Figura A5 do Apêndice)

O fato de encontrar mais genes de expressão diferencial na Pera em regiões de profagos poderia estar evidenciando maior atividade transcricional destes elementos, talvez propiciando a sobrevivência e virulência desta bactéria, provocando os sintomas na planta.

No genoma de *X. fastidiosa*-CVC, foram identificadas quatro regiões com alta densidade de ORFs homólogos às sequências de fagos (que são consideradas profagos), fora das sequências de fagos dispersas no genoma. Dois desses profagos (cada um com 42 kbp), designados XfP1 e XfP2, são similares

entre si e encontram-se em orientações opostas em regiões distintas do dsDNA de profagos. Os outros profagos XfP3 e XfP4 também são similares em sequência um com o outro e com o profago crítico de *H. influenzae*. Esses profagos são defeituosos, já que não foram encontrados genes para a montagem das partículas. Mas a presença de genes associados com a virulência, dentro das sequências dos profagos, é uma evidência forte do importante papel da transferência horizontal de genes mediada por bacteriófagos, em relação à definição do fenótipo bacteriano (HENDRIX, 1999).

Assim, NUNES *et al.* (2003) demonstraram que a *X. fastidiosa* possui o maior “pool” gênico de elementos de transmissão lateral caracterizados até hoje, tais como profagos, plasmídeos e ilhas genômicas, que contribuem até com 18% da composição total do genoma. Estudos de transcriptoma confirmam que estes elementos estão transcricionalmente ativos e que sua expressão pode responder a estímulos ambientais. O estudo desses elementos de transferência lateral pode ajudar a explicar a adaptabilidade da *X. fastidiosa* para infectar um espectro tão amplo de hospedeiros. Portanto, as ORFs que apresentaram uma alta expressão nas variedades analisadas confirmam a atividade transcricional desses elementos. Aquelas ORF relacionadas com virulência são em parte as responsáveis pela grande adaptabilidade da *X. fastidiosa* a condições e hospedeiros tão diversos, sugerindo uma grande plasticidade genotípica por transferência horizontal.

## **5. Genes de proteínas hipotéticas**

Consideram-se proteínas hipotéticas os produtos de genes que não apresentaram homologia, ou que tiveram baixa homologia com outras sequências do banco de dados. Como se pode observar na Figura 6, as proteínas hipotéticas, e as hipotéticas conservadas, representam 47% do total dos genes diferencialmente expressos nas duas variedades (29,25% na Pera e 18,25% na



cultivar Navelina ISA 315) que incluem um total de 194 genes (Figura 7).

É importante mencionar que um número elevado de proteínas hipotéticas diferencialmente expressas na variedade Pera apresentaram alto valor de LogFC. Esse fato sugere um possível papel na patogenicidade para muitos desses genes ainda sem explorar. A sequência das 30 proteínas hipotéticas com os maiores valores de LogFC para as duas variedades foi procurada no site do Genoma da *X. fastidiosa* e usada para procurar homologia dessas sequências com novas sequências reportadas nos últimos anos na base de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) por meio do algoritmo BlastX.

Dessas ORF analisadas, algumas apresentaram homologia (“score” maior a 200) com outras proteínas do banco de dados do NCBI: XF2575, XF0385, XF0385 e XF0842, as primeiras duas com expressão diferencial na Pêra (-5,76 e -4,9 LogFC respectivamente), e as últimas na cultivar Navelina ISA 315 (2,02 e 1,84 LogFC respectivamente). A ORF XF2575 apresentou 100% de homologia com um gene que codifica uma 4 hidroxí-3-methylbut-2-em-1-il difosfato sintase de *X. fastidiosa* 9a5c reportado por MEIDANIS *et al.* (2002). A ORF XF0385, por sua vez, apresentou homologia de sequência com a ORF reportada também por MEIDANIS *et al.* (2002) que codifica para uma tRNA- sintetase dihydrouridine A, também na *X. fastidiosa* 9a5c.

A ORF XF0339 apresentou 99% de homologia com a ORF que codifica um receptor dependente de TonB nas linhagens *X. fastidiosa* M12 (sequência submetida em 2008), Dixon (2002), Ann-1 (2005) e Temécula (2004). E a ORF XF0842, por sua vez, apresentou homologia de 97% com ORF das quatro linhagens mencionadas que codificam uma enzima alpha-1,2- manosidase putativa (em Ann-1 e Dixon) e uma proteína nomeada como antígeno (em Temécula1 e M12).

Esta busca no “GeneBank” do NCBI, sugere que várias proteínas que ainda aparecem no banco de dados da *X. fastidiosa* como hipotéticas tais como essas ORF cuja informação foi atualizada, podem ter grande influência na patogenicidade, e precisam ser exploradas.

Assim, também, uma proteína ainda classificada como proteína hipotética conservada, no Banco de dados do Genoma da *X. fastidiosa*, codificada pelo ORF XFa0032 de 27,1 kDa, foi recentemente identificada como uma  $\alpha$  hidroxinitrile liasa com alto valor LogFC (2,4), diferencialmente expressa na cultivar Navelina ISA 315 (CARUSSO *et al.*, 2009). Esta se relaciona com o processo de cianogênese e reflete o possível envolvimento dessa proteína com a sobrevivência da bactéria nesta cultivar, conforme discutido anteriormente no item 3.2.

Muitas proteínas hipotéticas apresentam alto grau de similaridade e mantêm considerável sintenia com os genes da ilha de patogenicidade putativa SPI-7 de *Salmonella entérica* (PIKARD *et al.*, 2003). Dezesesseis genes, dos quais quatorze foram anotados como proteínas hipotéticas, apresentam alto grau de similaridade e mantêm uma considerável sintenia com os genes presentes nessa ilha de patogenicidade (MOREIRA, 2006). O mais interessante é que esta sintenia também é observada em outros organismos, muitos deles bactérias de solo, como *P. fluorescens*, *B. fulgorum* ou *R. metallidurans*, caracterizando uma possível ilha de transferência lateral relativamente frequente. Esses genes encontram-se agrupados em uma única região genômica que compreende a PinDel 8 de XF-CVC (homóloga de PinDel4 em Xac). A média do conteúdo de GC da ilha SPI é 65% em ambos os genomas, indicando a ocorrência de inserção recente em ambos os organismos. Essas observações permitem especular que essa ilha possivelmente teria importância na interação desses fitopatógenos com seus hospedeiros específicos (MOREIRA, 2006). Dentre estes genes, três apresentaram expressão diferencial neste experimento: XF1772, XF1758 e XF1757; o primeiro mais expresso na cultivar Navelina ISA 315 com um valor de

2,08 LogFC e os dois últimos na Pera com LogFC -1,83 e -2,4, respectivamente, sugerindo seu envolvimento com a virulência e patogenicidade. Foi realizada uma busca de homologia dessas ORF com sequências do banco de dados do NCBI por meio do algoritmo BlastX, mas não foi achada nova informação sobre essas ORF.

## **6. Controles negativos e validação do experimento por RT-qPCR**

Os controles das plantas sadias Pera e Navelina ISA 315 não revelaram fluorescência devida à possível hibridação inespecífica ao genoma da planta. Assim, também, realizou-se o escaneado de uma placa sem hibridar, obtendo-se uma fluorescência de base similar aos controles sadios. Esse resultado, junto aos controles internos do microarranjo, confirma que a fluorescência obtida é resultado da hibridação dos genes da bactéria *X. fastidiosa* nas condições biológicas estudadas.

A variedade Pera (usada como calibrador neste experimento) foi usada como controle (marcada com fluoróforo Cy3) no experimento de microarranjos, mas, simplesmente neste estudo, permite uma visualização gráfica no “software” SDS no qual os genes de maior expressão na cultivar Navelina ISA 315 aparecem induzidos, e os de maior expressão na Pera aparecem reprimidos na cultivar Navelina ISA 315.

Os genes escolhidos para validação foram alguns dos discutidos pela possível influência na patogenicidade, dentre aqueles que apresentaram valores altos e médios de LogFC nas duas variedades pelo microarranjo. Os “primers” desenhados foram analisados pela sua eficiência de amplificação (curva-padrão), assim como pela sua especificidade através da curva de dissociação ou curva de “melting”.

Dos nove “primers” analisados para seu uso na quantificação relativa por RT-qPCR, através da curva padrão e o cálculo da eficiência de amplificação (*ChpA*, *ColS*, *DNAJ*, *HTPG*, *pilU*, *VapD*, *AlgZ*, *AlgR* e *pilM*), só o *AlgZ* não foi validado, já que apresentou uma eficiência de amplificação fora dos valores estabelecidos. Os outros foram validados para a quantificação relativa por RT-qPCR, apresentando eficiências similares entre eles e com o controle endógeno de 100% +/- 20. Algumas curvas de dissociação ou “melting” apresentaram amplificação inespecífica (possíveis dímeros de “primer”) depreciável pela distância com o último ciclo do produto específico em poucas réplicas.

A ORF correspondente ao gene endógeno usado, *NuoA* (XF0305), que codifica para a NADH-ubiquinone oxidoreductase (subunidade NQ07), provavelmente pertence a um óperon que contém várias subunidades da NADH deidrogenase I, que é uma proteína multimérica. Essa enzima é participante da respiração aeróbica, sendo, portanto, expressa de maneira constante e invariável na bactéria, servindo como padrão normalizador das variações de expressão dos genes analisados. Assim, também, nas condições experimentais deste estudo, a expressão deste gene endógeno não variou significativamente (LogFC: -0,2) como se detalha nos resultados.

Os genes *ChpA*, *ColS*, *DNAJ*, *HTPG*, *pilU*, *VapD*, *AlgR* e *pilM* coincidiram no sentido da expressão com o experimento de microarranjos, portanto, validaram o microarranjo “hand made” da *X. fastidiosa* no sistema estudado. Como foi detalhado na introdução, as múltiplas variações que existem entre o processamento e normalização de ambos os métodos, a extensão da expressão relativa destes não é comparável, e o sentido da expressão considera-se suficiente para validar os dados do experimento de microarranjos.

## VIII. CONCLUSÕES

A técnica de microarranjos de DNA impressos no laboratório (“hand made”) foi uma ferramenta eficiente na análise das mudanças globais da expressão gênica em *X. fastidiosa*, quando esta se encontra infectando plantas de citros (sistema *in vivo*). Essa técnica poderia também ser usada para monitorar mudanças da expressão gênica no curso do tempo em plantas com CVC no campo.

Os genes dos *pili* tipo IV (*pilM* e *pilU*) e o gene *VapD* que codifica o fator de patogenicidade, assim como uma maior quantidade de enzimas de degradação foram diferencialmente expressos na variedade Pera. Poder-se-ia inferir que a bactéria está movimentando-se mais eficientemente para colonizar o hospedeiro, embora a concentração da bactéria já seja suficiente para produzir oclusão dos vasos xilemáticos e, portanto, a aparição dos sintomas. O gene *rpfF*, que codifica o fator difusível DSF, não foi diferencialmente expresso, embora os genes *rpfC* e *GumE*, com uma maior expressão na variedade Pera, estariam relacionados à formação do biofilme nessa variedade.

A expressão diferencial do gene *uspA1* (hemaglutinina) na cultivar Navelina ISA 315, pode sugerir maior adesão aos tecidos do hospedeiro. O modelo de CHATERJEE (2008) apresenta a expressão das adesinas na fase de aquisição do inseto e de presença dos sintomas. Mas a expressão diferencial dessa adesina na cultivar assintomática poderia representar uma etapa prévia de adesão aos tecidos do hospedeiro, na qual a acumulação do fator difusível ainda não seria suficiente para ativar as vias de transdução de sinais que levam à expressão dos fatores de patogenicidade e à aparição dos sintomas.

Mesmo que a concentração bacteriana seja alta na cultivar Navelina ISA 315 pela quantificação por RT-qPCR, provavelmente não bloqueia a passagem da

seiva através dos vasos do xilema, da mesma forma que na variedade Pera, portanto, não provoca sintomas. A agregação celular nessa variedade poderia ser influenciada pela maior expressão do gene *UspA*, e possivelmente dessa proteína, assim como por uma composição do biofilme distinta com uma menor quantidade de GumE. Talvez, na variedade Pera, a bactéria se movimenta mais eficientemente através dos vasos do xilema em agregados menores, o que levaria a sintomas mais severos devido à maior distribuição na planta. A movimentação através dos vasos do xilema estaria auxiliada pelos *pili* tipo IV (genes *pil M* e *pil U* altamente expressados nessa variedade), usando o movimento “twitching motility”. O exopolissacarídeo GumE poderia participar da formação desses agregados celulares nesta variedade. E, talvez, devido à distinta composição do biofilme, esses agregados poderiam ser mais facilmente transportados através da seiva, conseguindo colonizar a planta mais eficientemente e provocar os sintomas. Do mesmo modo, as membranas de pontuação seriam mais eficientemente degradadas na variedade Pera, utilizando as enzimas citadas diferencialmente expressas, permitindo a passagem através dos vasos do xilema e, subsequentemente, os sintomas da CVC distribuídos na planta toda.

Assim, também, distintos padrões de expressão dos fatores de patogenicidade e sobrevivência foram achados nas duas condições analisadas, que poderiam levar ao fenótipo sintomático e assintomático. Por exemplo, o fator de virulência VapD e os genes relacionados com a homeostase e resistência aos metais Fe e Cu (*TonB*, *czcA*, *cutC* e *ToIC*), induzidos na variedade susceptível, ajudam na sobrevivência da comunidade bacteriana no biofilme, que produz oclusão dos vasos xilemáticos. O fato de achar mais genes bacterianos diferencialmente expressos na variedade susceptível poderia estar relacionado com uma maior atividade da bactéria em relação ao movimento, replicação, degradação e sobrevivência, assim como a produção de fatores de virulência. Tudo isso favoreceria o bloqueio da passagem de nutrientes e água pelos vasos

do xilema, a degradação dos tecidos vegetais e a movimentação, enquanto a bactéria vai colonizando as distintas partes da planta suscetível.

## IX. IMPLICAÇÕES

Distintos níveis de expressão dos genes de virulência ou patogenicidade poderiam ser a chave da grande habilidade da bactéria *X. fastidiosa* para conseguir colonizar distintos hospedeiros e sobreviver em condições adversas. Assim, também, a grande quantidade de genes derivados de fagos e profagos indicam uma capacidade de adaptação pela transferência horizontal de genes, portanto, uma importante plasticidade genotípica. A variabilidade interespecífica devida a mutações, assim como a capacidade de resposta aos distintos estímulos através de mudanças na expressão gênica, poderiam ter influência na sobrevivência da *X. fastidiosa* nos distintos hospedeiros, contribuindo desta maneira com a alta dispersão da mesma, seja através do inseto vetor, seja pela transferência de material não certificado na região, podendo-se desenvolver como patogênica ou não, dependendo do ambiente encontrado no hospedeiro.

A importância da análise da expressão gênica feita é que esta fornece uma visão global (no nível de genoma) do comportamento de todas as categorias de genes e vias metabólicas induzidas ou reprimidas *in vivo*. Ou seja, não existe um mascaramento nem um viés por causa da cultura da bactéria. Também por ser um estudo *in vivo* e não em condições controladas, muitos fatores estão influenciando a expressão desses genes que tem que ser considerados, podendo ser os mecanismos de defesa da planta, as condições do ambiente dentro dos vasos xilemáticos, ou mesmo diferenças na diversidade dos microrganismos endofíticos presentes em cada planta. Estudos da expressão gênica *in vivo* podem brindar informações de grande utilidade sobre aqueles genes que se ativam ou reprimem em determinadas circunstâncias e podem ajudar a esclarecer mais os

mecanismos de patogenicidade da *X. fastidiosa*, capaz de sobreviver em tão diversos ambientes.

Os genes que foram discutidos neste artigo se encontram relacionados a diversos mecanismos de patogenicidade, virulência e adaptação em outras bactérias patogênicas vegetais e animais. As conclusões derivadas deste estudo sobre a possível influência desses genes na patogenicidade ou virulência precisam de mais estudos confirmatórios, seja de complementação gênica, seja, posteriormente, proteômica. Mesmo assim, as diferenças encontradas na variedade sintomática e assintomática sugerem que vias regulatórias distintas podem ser ativadas em resposta a distintos ambientes, que levam a bactéria a comportar-se de um ou outro modo e a desenvolver distintas estratégias, seja variando a composição do biofilme, apresentando diferenças na adesão, mobilidade ou toxinas secretadas, seja nas respostas: antioxidante, “heat shock” ou de detoxificação. Essas estratégias de sobrevivência responderiam aos estímulos provocados pelas defesas de cada hospedeiro, microrganismos endofíticos, ou mecanismos de “quorum sensing”.

Já em relação ao controle da doença, as estratégias de melhoramento, conhecendo-se as possibilidades de adaptação dessa bactéria, poderiam ser mais eficazes. Embora a cultivar Navelina ISA 315 não apresente sintomas, poderia representar uma fonte de inóculo devido à alta concentração de bactéria. As defesas da cultivar Navelina ISA 315 poderiam ser mais eficientes do que as da Pera e gerar um maior estresse na *X. fastidiosa*. Assim, esta poderia apresentar diferenças na expressão gênica dentro da cultivar Navelina ISA 315 e da Pera, com uma maior expressão de genes de virulência, degradação e mobilidade na planta susceptível, seja em resposta às defesas do hospedeiro ou a interação com algum microrganismo endofítico.



Os microrganismos endofíticos, assim como os distintos mecanismos de defesa nas plantas hospedeiras, teriam uma grande influência para o desenvolvimento da doença, podendo a planta permanecer assintomática, mesmo tratando-se de hospedeiros potencialmente suscetíveis. Seria interessante realizar um estudo paralelo sobre a diversidade de endofíticos nesse material.

Outro estudo que complementaria muito bem este trabalho seria a análise global da expressão gênica dos hospedeiros (Pera e cultivar Navelina ISA 315), focada nos genes de resistência, utilizando microarranjos com o genoma parcial de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) do Genoma dos citros. Desse modo, os mecanismos relacionados à relação patógeno-hospedeiro poderiam ser mais explorados.

Foram levantadas algumas hipóteses em função da expressão diferencial de genes sobre a composição do biofilme, sistemas sensores e padrões de migração, assim como distintas respostas a condições de estresse, tais como a alta expressão de proteínas de detoxificação e chaperonas. No entanto, mais pesquisas ainda são necessárias para lograr um melhor entendimento do processo de infecção e do complexo sistema de sinais que coordenam o comportamento da bactéria *X. fastidiosa*, para lograr melhor compreensão dos seus mecanismos de patogenicidade, assim como das interações patógeno-hospedeiro. Sugerem-se estudos de microscopia de varredura, diversidade de endofíticos ou mutações com análises de complementação dos mutantes dos genes discutidos neste trabalho, para alcançar um conhecimento mais profundo dos processos bioquímicos relacionados à patogenicidade.

## X. REFERÊNCIAS

ALFANO, J. R.; COLLMER A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.*, v. 179, p.5655-5662, 1997.

ALMEIDA R.P.P. et al. Vector transmission of *X. fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Ann. Entomol.Soc. AM.*, v.98, p.775-86, 2005.

AMORIM, L. et al. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da doença. *Fitopatol. Bras.*, v.17, n.1, p.42-48,1993

ANDRADE M.O. et al. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Mol. Microbiol.*,v.62, p.537-51, 2006

ANDREWS, S. C. et al. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.27, p.215-237, 2003

ATLUNG, T.; INGMER, H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.*, v.24, p.7–17, 1997

AUSUBEL, F.M. et al. *Current protocols in molecular biology, greene*. New york: Publishing Associates/Wiley Interscience, 1987.

AYRES,A.J. *Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do triangulo mineiro*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

AZZONI, A.R. et al. Expression and purification of a small heat shock protein from the plant pathogen *Xylella fastiosa*. *Protein Expression and Purification*, v.33, p.297-303, 2004.

BACKUS E.A. McLean DL. The sensory systems and feeding behavior of leafhoppers. I. The aster leafhopper, *Macrostelus fascifrons* Stal (Homoptera, Cicadellidae). *J. Morphol.*, v.172, p.361–79, 1982.

BAGINSKY et al. Update on gene expression analysis, proteomics, and network discovery. *Plant Physiol.*, v. 152, 2010.

BARBER, C. E. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.*, v.24, p.555–566, 1997.

BARON, G. S.; NANO, F. E. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol. Microbiol.*, v.29, n.1, p. 247–259, 1998.

BARRET, J.C.; KAWASAKI, ES. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov. Today*, v. 8, p.134, 2003.

BAUM, T.J. The use of DNA microarrays for the developmental expression analysis of cDNAs from the oesophageal gland cell region of Heterodera glycines. *Mol. Plant Pathol.*, v. 3, n. 4, p. 261-270, 2002.

BECKMAN, K.B. et al. Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by highthroughput Q-PCR. *Mitochondrion*, v.4, p.453, 2004

BERETTA, M.J. et al. First report of *X. fastidiosa* in coffee. *Plant Dis.*, v.80, p.821, 1996.

BHATTACHARYYA, A. et al. Draft sequencing and comparative genomics of *X. fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Gen. Res.*, v.12, p.1556-1563, 2002

- BLATTNER, F.R. et al. The complete genome sequence de Escherichia coli K-12. *Science*, v.277, p.1453-62. 1997
- BOER, J.M. et al. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad.Res.*, v.23, n. 6, p. 517–532, 1995.
- BOHIN, J.P. et al. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. v.186, p.11-19, 2000
- BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin.Microbiol.* v. 5, n. 1, p. 44–50, 2002.
- BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Life*, Oxford, v.59, n.4/5, p.346-354, 2007.
- BRAZEAU, D.A. Combining genome-wide and targeted gene expression profiling in drug discovery: microarrays and real-time PCR. *Drug Discov. Today*, v.9, p.838-845, 2004.
- BURR T.J. et al. The role that different pili classes in *X. fastidiosa* play in colonization of grapevines and Pierce’s disease pathogenesis: Chemosensory cluster controlling twitching motility. In: PIERCE’S DISEASE SYPOSIUM, 2007, San Diego. **Proceedings**. San Diego: Calif. Dep. Food Agric., 2007. p.123-26
- BUSCH W,; LOHMANN J.U. Profiling a plant: expression analysis in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v.10, p.136–141, 2007
- BUSTIN,S. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* v.55, n.4, p.611-622, 2009.

BUSTIN, S. Invited review: quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 29, p.23-39, 2002.

BUSTIN, S. Review: absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 25, p.169-193, 2000.

CARUSSO, C.S. et al.  $\alpha$  Hydroxynitrile lyase protein from *X. fastidiosa*: Cloning, expression, and characterization. *Microbial Pathogenesis*, v.47, p.118-127, 2009

CATANI, C.F., et al. Cloning, expression, and purification of the virulence-associated protein D from *X. fastidiosa*. *Protein Expression and Purification*, v.37, p.320-326, 2004.

CHANG, C.J. et al. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strains of *X. fastidiosa*. *Curr. Microbiol.*, New York, v.27, p.137-142, 1993.

CHATTERJEE S.; SONTI, R. V. *rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v.15, p.463–47, 2002.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, P.P.R.; LINDOW, S. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.46, p.243-71, 2008.

CHATTERJEE, S. WISTROM, C. LINDOW, S. E. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *X. fastidiosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.105, p.2670–2675, 2008

CHE, F. S. et al. Identification of novel genes differentially expressed in compatible and incompatible interactions between rice and *Pseudomonas avenae*. *Plant Sci.*, v. 162, n. 3, p.449–458.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Diazotrophic associated with maize, p.779-792. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.). *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2000a.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.783-787, 2000b

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v.162, p.156-159, 1987.

CHYAQUI, R.F., Bonner RF, Best CJM, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V, Emmert-Buck MR. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat. Genet.*, v.32, p.509-514, 2002.

CIAPINA L.P. et al. A putative twin-arginine translocation system in the phytopathogenic bacterium *X. fastidiosa* Canadian J. Microbiol. *No prelo*.

COMOLLI, J. C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect. Immun.*, v. 67, p.3625–3630, 1999.

CORBIN, D. R.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cel. Biol.*, v. 7, n. 12, p. 1987.4337–4344.

COWTAN, K. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, v 31, p.34–38, 1994

CRACK, J.A. et al. Functional analysis of a small heat shock/a-crystallin protein from *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.*, v.269, p.933-942, 2002.

CURSINO, L. et al. Identification of a chemosensory signal transduction system in *X. fastidiosa* associated with twitching motility and biofilm formation. *Phytopathology*, v.98,p. S44, 2008.

CURSINO, L. et al. Twitching motility and biofilm formation are associated with tonB1 in *X. fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett.*, v 299, 2009.

Da SILVA F.R. et al. Fastidian gum: the *X. fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters*, v. 203 p.165-171, 2001.

Da SILVA NETO J.F. et al. Role of  $\sigma_{54}$  in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *X. fastidiosa*. *Arch. Microbiol.*, v.189, p.249-261, 2008.

Da SILVA, A.C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, v. 417, p.459-463, 2002.

Da SILVA, D.S. *Análise dos proteomas e do acúmulo de moléculas sinais durante o crescimento de X. fastidiosa 9a5c in vitro*. 2004. 93f.. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Microbiologia Agrícola) -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004

DAVINO, S. et al. Performance of Navelina sweet orange on five rootstocks inoculated with citrus viroids. Em: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004, Monterrey.

*Proceedings...* Riverside: International Organization of Citrus Virologists, University of California, 2005. p.312-319.

De LA FORTELLE, E.; BRICOGNE, G. *Methods Enzymol.*, v.276, p. 472–494, 1997

De LA FUENTE L.; BURR, T.J.; HOCH, H.C. Mutations in Type I and Type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *X. fastidiosa*. *J. Bacteriol.*, v.189, p.7507–10, 2007.

De LIMA GARCIA. *Caracterização patológica e morfológica da resistência das limas, tangerinas e do limão cravo à clorose variegada dos citros*. 2007. Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

De LIMA, J.E.O. et al. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *X. fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.*, v..82, p.94-97,1998.

DE NEGRI, J.D. *Clorose variegada dos citros: uma nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais*. Campinas: CATI, 1990. p.6. (Com. Tec., 82).

De REUSE, H. and TAHA, M. K. RegF, an SspA homologue, regulates de expression of the *Neisseria gonorrhoeae pilE* gene. *Res. Microbiol.*, v.148, p.289-303,1997.

DeRISI, J. et al. Use of a cDNA microarrays to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Gen.*, v. 14, p.457-460, 1996

DeRISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, v.278, p.680-6, 1997.



DHARMAPURI, S.; SONTI, R.V. A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol Lett*, v.179, p.53-59,1999.

DIEHN, M.; RELMAN, D.A. Comparing functional genomic datasets: lessons from DNA microarray analyses of host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 4, p. 95-101, 2001.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. *Ann. Rev.Phytopathol.*, v. 32, p. 479–501, 1994.

DIXON, R.A; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.41, p.339-367, 1990.

DONG, Y. et al. Genomic interspecies micrarrays hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, n.4, p.1911-1921, 2001.

DOW, M. Diversification of the Function of Cell-to Cell Signaling in Regulation of Virulence within Plant Pathogenic *Xanthomonads*. *Science Signaling*, v. 1, n.21, p.23, 2008

ENGH, R. A.; HUBER, R. *Acta Crystallogr. Sect. A*, v.47, p.392–400, 1991

ETIENNE, W., MEYER MH, PEPPERS J, MEYER JR, R.A. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *BioTechniques*, v. 36, p.618-621, 2004

FACINCANI, A.G. et al. Carbohydrate metabolism of *X. fastidiosa*: Detection of glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes and cloning and expression of the enolase gene. *Gen. Mol. Biol.*, v.26, n.2, p.203-211, 2003.

FADEL, A. L. *Determinação da tolerancia da laranjeira Navelina ISA 315 à clorose variegada dos citros*. 41f. Tese (mestrado em Produção Agropecuária). Universidade Estadual Paulista/UNESP de Jaboticabal, Jaboticabal- SP, 2011.

FATH, M.J.; ZHANG, L.H.; RUSH, J.; KOLTER, R. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry*, v.33, p.6911-7, 1994.

FEDATTO L.M. et al. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *X. fastidiosa*. *Microbiol. Res.*, p.161, n.263, p.72, 2006.

FEIL H.; FEIL, W.S.; LINDOW, S.E. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *X. fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology*, v. 97, p.318–24, 2007.

FEIL, H. et al. Site-directed disruption of the fimA and fimF genes of *X. fastidiosa*. *Phytopathology*, v. 93, p.675–682, 2003.

FERNANDEZ VALIELA, M.V., BAKARCIC, M. Nuevas enfermedades del ciruelo en el Delta del Paraná. *Inf. Invest. Agr.*, v.84, p.2-4, 1954.

FERNANDEZ, L.A.; BERENQUER J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, p.21-44, 2000.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SCOTT, H.M.L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.*, v.122, p.299-305, 1992.

FLEISCHMANN, R.D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, v.28, n.269, p.496-512, 1995.

FREEMAN, W.M.; WALKER S.J.; VRANA KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, v. 26, p.112-125, 1999.

FREEMAN, W.M; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*, v. 29, p. 1042-1055, 2000.

FRENCH, W.J.; FELICIANO, A. Distribution and severity of plum leaf disease in Brazil. *Plant Dis.*, v.66, p.515-7. 1982.

FRENCH, W.J., KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald disease in Brazil and Paraguay. *Plant Dis.*, v.62, p.1035-8, 1981.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *X. fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant and susceptible to Pierce's disease. *Phytopatology*, v.80, p.61-65, 1990.

FUNDECITRUS. Descobertos mais seis vetores da CVC. *Rev. Fundecitrus*, v.94, p.8, 1999.

FUNDECITRUS. *Manual de CVC*. Araraquara, 2003. 13p.

FUNDECITRUS *Manual de viveiros*. Araraquara, 2003a. 10p.

GALAN, J. E.; COLLMER, A. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host. *Science*, v.284, n.5418 p.1322-1328, 1999.

GARNIER, M.; BOVE, J. Recent developments in vascular-restricted, walled bacteria of citrus *X. fastidiosa* and the liberobacters, proteobacterial plant pathogens. *Fruits*, v.52, p.361-9, 1997.

GILSON, L., MAHANTY, H.K.; KOLTER, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export and immunity. *J. Bacteriol*, v. 169, p.2466-2470,1987.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, p. 546-567, 1996.

GRAND, C.; SARNI, F.; LAMB, C. J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. *European J. Biochem.*, v. 169, n. 1, p. 73–77, 1987.

GUILHABERT, M. R. KIRKPATRICK, B. C. Identification of *X. fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 18, p.856- 868, 2005.

GUSTINE, D. L. et al. Metabolites from *pseudomonas-corrugata* elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. *Phytopathology*, v. 80, n. 12, p. 1427–1432, 1990.

HALL, N.L.W. et al. The application of DNA microarray in gene expression analysis. *J. Biotechnol.*, v.78, p.271-280, 2000.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, v. 8, n. 10, p. 1773–1791,1996

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 21, p. 1102–1156.

HANSEN, A.M.; GU Y.; LI, M.; ANDRYKOVITCH, M.; WAUGH, D.S., JIN J.D.; JI, X. Structural Basis for the Function of Stringent Starvation Protein A. *Biol.Chem.*, v. 280, n.17, p.17380-17391.

HARVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*, v. 140, p.2383–2389, 1994.

HAZLETT, L. D. et al. Analysis of adhesion, piliation, protease production and ocular infectivity of several *P. aeruginosa* strains. *Curr. Eye Res.*, v. 10, p.351–362, 1991

HENDRIX, R. W. et al. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc. Natl Acad. Sci.* v.96, p.2192-2197,1999.

HOMMAIS F. KRIN, E. et al. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* v.40, p.20-36, 2001

HOPKINS, D.L. *X. fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v.27,p. 271-290, 1989.

HOPKINS, D.L. *X. fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Ann. Rev. Phytopath.*, v.22, p.271-90, 1989.

HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H.; FRENCH, W.J. Occurrence of a rickettsia-like bacterium in the xylem of peach trees with phony disease. *Phytopathology*, v.63, p.1422-3, 1973.

HORTA, B.B. et al. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Q beta from *X. fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p.16065, 2010

KANG, Y. et al. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.46, p.427–437, 2002

KATZ M.E.; STRUGNELL,R.A.; ROOD, J.I. Molecular characterization of a genomic region associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*. *Infect. Immun.*, v.60, p.4586-4592, 1992.

KELLER, H. et al. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, v. 11, n. 2, p. 223–235, 1999.

KITAJIMA, E.W. et al. Ocorrência da Escaldadura das folhas da ameixeira nos Estados do Paraná e Santa Catarina. *Fitopatol. Bras.*, v.6, p.285-292, 1981.

KOIDE, T.; VÊNCIO, R.Z.N.; GOMES, S.L. Global Gene Expression Analysis of the Heat Shock Response in the Phytopathogen *X. fastidiosa*. *J. Bacteriol.*, v.186, p. 5821-5830, 2006.

KOIDE, T.; ZAINI, P.A.; MOREIRA, L.M. et al. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *X. fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence *J. Bacteriol.*, v.186, n.16, p.5442-5449, 2004.

KOSTKA, S.J.; TATTAR, T.A.; SHERALD, J.L.; HURTT, S.S. Mulberry leaf scorch, new disease caused by a fastidious, xylem-inhabiting bacterium. *Plant Dis.*, v.70, p.690-3, 1986.

KOSZELAK-ROSENBLUM, M. et al. *J. Bio.l Chem.*, v. 283, p.24962-24971, 2008

KRÜGNER, R. et al. Transmission efficiency of *X. fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS 14. *Proceedings...* p.81, 1998.

KUBISTA, A. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, v.27, p. 95-125, 2006.

LACAVA, P.T.; ARAUJO W.L.; MARCON, J. et al Interaction between endophytic bacteria from citrus plant and the phytopathogenic bacteria *X. fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. *Lett. Appl. Microbiol*, v.39, p.55-59, 2004.

LAIA M.L. *Análise funcional de genes de Xanthomonas axonopodis pv. citri implicados na patogênese*. Jaboticabal. 2007. 356f. Tese (Doutorado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

LALLY, E. T. et al. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.*, v. 7, p.356-361,1999.

LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, v.56, n.2, p.215-224, 1989.

LAMBAIS, M.R. et al. A genomic approach to the understanding of *X. fastidiosa* pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 3, p.459-462, 2000.

LARANJERIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; KARAKAVA, R; FIGUERERDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.K. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatol. Bras.*,v.23, n.2, p 147-153,1998.

LARANJEIRA, F.F.; MÜLLER, G.W.; TRINDADE, J.; SILVA, L.M.S. Constatação da clorose variegada dos citros (CVC) no Estado de Sergipe. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21,n.4, p.521, 1996

LASKOWSKI, R. A. et al. Titulo do artigo. *J. Appl. Crystallogr.*, v.26, p.283–291,1993.

LAURIANO, C. M. et al. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.101, p.4246-4249, 2004.

LEE, R.F. et al. Citrus variegated chlorosis confirmation of a *X. fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v.19, p.123-125, 1993.

- LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JR., R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa* em plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. *Fitopatol. Bras.*, v.22, p.54-7, 1997.
- LI, Y. et al. Type I and type IV pili of *X. fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell aggregation. *Microbiology*. v.153, p.719–726, 2007.
- LIMA, J.E.O. et al. Coffea leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity and comparison with *X. fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.*, v.82, p.94-97, 1998.
- LIMA, J.E.O. et al. Distribuição de *X. fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras e seu isolamento in vitro. *Fitopatol. Bras.*, v.21, n.3, p.392-393, 1996.
- LIMA, J.E.O., MIRANDA, V.S., ROBERTO, S.R. Diagnosis of citrus variegated chlorosis through high microscopy. *Fitopatol. Bras.*, v.22, p.370-4, 1997.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, v.22, p.631-677, 1988.
- LIU, H. et al. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*, v. 147, p.3215–3229, 2001.
- LIU, S.L.; SCHRYVERS, A.B.; SANDERSON, K.E. et al. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure *J. Bacteriol.*, v.181, p. 6747-6755, 1999
- LOCKHART, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.*, v. 14, p. 1675-1680, 1996.
- LOOS, A. et al. Development and validation of *Corynebacterium* DNA Microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, n.5, p.2310-2318, 2001.
- LOPES, J.R.S. et al. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *X. fastidiosa*. *Fitopatol. Bras.*, v. 21, p. 343, 1996



LOUBENS, I. et al. Homology between a genetic-locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic-locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol* v.10, p.329- 340, 1993.

MACHADO, M.A.; SILVEIRO, J.L.BAPTISTA C.R.; LARANJEIRA, F.F.; BERETTA, M.J.G. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à Clorose Variegada dos Citros (CVC) II. *Laranja*, v.14, n.1, p.167-178, 1993.

MAH, N. et al. A comparison of oligonucleotide and cDNA-based microarray systems. *Physiol Genomics*, v. 16, p.361-370, 2004.

MARICONDA S., WANG Q.F., HARSHEY R.M.A. Mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility *Mol.Microbiol*, v. 60. p.1590, 2006

MARQUES, J.O. “*Expressed sequence tags*” de cana-de-açúcar diferencialmente expressos em folha e colmo maduros. 2003. 98f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MARQUES, L.L.R. et al. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Dis.*, v. 86, p.633-638, 2002

MARQUES, M.V., SILVA, A.M.da, GOMES, S.L. Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *X. fastidiosa*. *Plasmid*, v. 45, p.184-199, 2001.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 56, p.289–314, 2002.

MEIDANIS, J.; BRAGA, M.D.V.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Whole-genome analysis of transporters in the plant pathogen *X. fastidiosa*. *Microbiol. Mol.Biol. Rev.*, v.66, p.272-299, 2002.

MENDEZ, C.,;SALAS, J.A. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res. Microbiol.*, v.152 p.341-350, 2001

MENEGUCCI, J.L.P. et al. Alterações físico-químicas de frutos de laranja Valência com sintomas de CVC. *Rev. Brás. Frutic.*,v.17,n.1,p.153-5,1995.

MENG, Y., Li et al. Upstream migration of *X. fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J. Bacteriol.*, v. 187p.5560- 5567, 2005

MERRELL, D. S.; HAVA, D. L.; CAMILLI, A. Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* v.43, p. 1471-1491, 2002.

MIKLOS,D.A.; FREYER G.A.; CROTTY D.A. *A ciência do DNA*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MINSAVAGE, G. V. et al. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *X. fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, v. 84, p. 456-461, 1994.

MIRCETITCH, S.M.; LOWE, S.K.; MOLLER, W.J.; NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Pytopathol.*, v. 66, p.17-24, 1976.

MOHAN, S.K. et al. *Problema de escaldadura de folha de ameixeira no Estado de Paraná*. Londrina: IAPAR, 1980. 5p. (Informe de Pesquisa, 31)

MONGKOLSUK, S. et al. A *Xanthomonas* Alkyl hydroperoxide Reductase Subunit C (ahpC) mutant showed an altered Peroxide Stress Response and Complex Regulation of the Compensatory Response of Peroxide Detoxification Enzymes. *J. Bacteriol.*, v.182, n. 23, p.6845-6849, 2000.

MONTEIRO VITORELLO, C.B. et AL. CIVEROLO & VAN SLUYS. *Xylella* and *Xanthomonas* Mobil´omics. OMICS A. *J. Integrative Biol.*, v 9, n.2, 2005

MOONEY, R. A.; ARTISMOVITCH, I.; LANDICK, R. Information processing by RNA polymerase: Recognition of regulatory signals during RNA chain elongation (invited review) *J. Bacteriol.*, v.180, p.3265–3275, 1998

MOREIRA et al. Comparative Analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* Complete Genomes. *OMICS J. Integrative Biol.*, v.9, n.1, 2005

MOREIRA et al. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, v. 42, p.163-184, 2004

MOREIRA L.M. *Análise estrutural e funcional do genoma de Xanthomonas axonopodis pv. citri*. 2006. 170 f. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

MOREY, RYAN, VAN DOLAH. Microarray validation: factores influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced.*, v.8, n.1, p.175-193, 2006

NABERHAUS, F. A-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network, *Microb. Mol. Biol. Rev.*, v.66, p. 64-96, 2002.

NEWMAN, K. L.; ALMEIDA, R. P.; PURCELL, A. H.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *X. fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.101, p.1737–1742, 2004.

NORMAN-SETTERBLAD C.; VIDAL S.; PALVA, E.T. Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 4:430-438, 2000.

NUNES, L.R. et al. Microarray analyses of *X. fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. *Gen. Res.* 13: 570-578, 2003

O'TOOLE, G.A.; KOLTER R: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol*, v.30 p.295-304. 1998

OLIVEIRA, A.C., VALLIM, M.A., SEMIGHINI, C.P., ARAÚJO, W.L., GOLDMAN, G.H., MACHADO, M.A. Quantification of *X. fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopatology*, v. 92 p.1048- 1054, 2002

PALLEN, M.J.; CHAUDHURI, R.R.; HENDERSON, R. Genomic analysis of secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.6, p. 519-527, 2003

PALUS, J.A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* L. and *Doebley*. *Plant Soil*, v.186, p.135-142, 1996.

PARADELA FILHO, O. et al. Occurrence of *X. fastidiosa* in coffee plants in Brazil. *Summ. Phytopathol*, v.23, p.46-49, 1997.

PARADELA FILHO, O. et al. Primeira constatação em cafeeiro da *X. fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja*, v.16, 1995.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, I. (Ed). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.417-453.

PERRET, S.; Freeman, S.J.; Butler, P.J.; Fersht, A.R. Equilibrium folding properties of the yeast prion protein determinant Ure2. *J. Mol. Biol.*, v.290, p.331-345, 1999.

PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time. *PCR*, v.3, p. 87-112, 2004.

PICCHI, S.C. *Expressão heteróloga do gene *opgD* de *X. fastidiosa* e obtenção de mutantes *opgH* Jaboticabal*. 2006. 78 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Genética

e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006

POMPEU J.R. et al. Detecção de sintomas de Clorose Variegada dos Citros e *X. fastidiosa* em plantas cítricas infectadas em condições de campo. *Laranja*, v.19, n.2, p.321-330, 1998

PURCEL, A.H.X. *fastidiosa*, a regional problem or global threat? *J. Plant Pathol.*, v.79, p.99-105, 1997.

PURCELL, H.A.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem limited bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v.34, p.131-51, 1996.

PUTHOFF, D.P. et al. Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J.*, v. 33, p. 911-921, 2003.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM. *A language and environment for statistical computing*. Viena: R. Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível: <[http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org)> .

RAJEEVAN, M.S. et al. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.*, v.3, p.26-31, 2001 b.

RAJEEVAN, M.S. et al. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, v.25, p.443-451, 2001a

RAJU, B.C., WELLS, J.M. Disease caused by fastidious xylem-limited. *Plant Dis.*, v.70, n.3, p.182-86, 1986.

RAMSAY, G. DNA chips: state-of-the art. *Nat. Biotech.*, v.16, p.40-44, 1998.

RATLEDGE, C.; Dover L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.54, p.881-941, 2000.

RAYAN R.P. et al. Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Microbiol. PNAS*, v.107,n.13, p.5989-5994, 2010

REYMOND, P. DNA microarrays and plant defense. *Plant Physiol. Bioch.*, v. 39, p. 313-321, 2001.

RICHMOND, C.S., et al. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucl. Acids Res.*, v.27, p.3821-35, 1999.

RILEY, M.A.; WERTZ J.E. Bacteriocins evolution, ecology and application. *Annu Rev Microbiol.*, 56, 117-37, 2002b.

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, v.84, p.357-64, 2002a.

RITCHIE et al. Empirical array quality weights in the analysis of microarray data. *BMC Bioinformatics* v.7, n.261, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/261>>.

RITCHIE M.E. et al A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*, v.23, p.2700-2707,2007. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/btm412>>.

ROBERTO S.R. et al. Transmissão de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobpterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. *Fitopatol. Bras.*, v.21, p.517- 518, 1996.

ROSSETTI, V. et al. Présence de bactéries dans le xylème d'oranger atteints de chorose variegée, une nouvelle maladie des agrumes au Brasil. *C. R. Acad. Sci. Paris*, v.310, p.345-349, 1990.

ROSSETTI, V. DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros- revisão. Laranja, Cordeirópolis, v.11, n.1, p. 1-14, 1990

SAIZIEU, A., et al. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J. Bacteriol.*, v.182, n.17, p.4696-4703, 2000.

SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA, C.J.; MATRANGOLO, W.J.R.; RIBEIRO, J.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; MIRANDA, M. Ocorrência da clorose variegada dos citros (CVC) no Estado da Bahia. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.24, n.2, p.190, 1999.

SCARPARI, L.M. *Modulação da expressão de genes de patogenicidade putativos em X. fastidiosa sob condições de baixa e alta densidade celular*. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SCATTOLIN, L. *Análises de mutantes para os genes rpf de Xyella fastidiosa e participação destes na formação do biofilme*. Tese (Doutor) – Universidade Estadual Paulista, 2010.

SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of genes expression pattern with a complementary DNA microarrays. *Science*, v.270, p.467-50, 1995.

SCHENA, M. Genome analysis with gene expression microarrayss. *BioEssays*, v.18, n.5, p.427-431, 1996.

SCHMITTGEN; LIVAK Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. 2008. Disponível em: [http: <www.nature.com/natureprotocols>](http://www.nature.com/natureprotocols).

SELLARS et al. Real-time RT PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: A comparison of relative and absolute quantification procedures. *J. Biotechnol.*, v.129, n.3, 2007

SHALON, D.; SMITH, S.J.; BROWN, P.O.A. DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.*, v. 6, p. 639-645, 1996.

SHI, X. Y. et al. Characterization of regulatory pathways in *X. fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *algU*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, n.21, p. 6748–6756, 2007.

SHI, X.Y. et al. Characterization of Regulatory Pathways in *X. fastidiosa*: Genes and Phenotypes Controlled by *gacA*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, n.8, p.2275-2283, 2009

SICILIANO, F. et al. Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri pathogenesis in Citrus limon. *Electron. J. Biotechnol.*, v.9, p.200–204, 2006.

SILVA-STENICO M.E. et al. Growth and siderophore production of *X. fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol. Res.*, n.160, p. 429-436, 2005

SIMPSON, A.J.G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *X. fastidiosa*. *Nature*, v.406, p.151-157, 2000

SIMPSON, et al. The genome sequence of the plant pathogen *X. fastidiosa*. *Nature*, v.406, p.151-157, 2000.

SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES A.; BARBER C. E.; DANIELS M. J.; DOW, J. M. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.*, v.38, p.986-1003, 2000.



SMOLKA, M.B. et al. Proteome analysis of the plant pathogen *X. fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics*, v.3, p.224–23, 2003

SMYTH, G.K. *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments: statistical applications in genetics and molecular biology*. v.3. 2004. Disponível: <<http://www.bepress.com/sagmb/vol3/iss1/art3>>.

SMYTH, G.K. Limma: linear models for microarray data. In: GENTILEMAN, R.; CAREY, V.; DUDOIT, S.; IRIZARRY, R.; HUBER, W. (Ed.) *Bioinformatics and computational biology solutions using r and bioconductor*”springer. New York, 2005. p.397-420.

SMYTH, G.K.; SPEED, T.P. Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, v. 31, p.265-273, 2003.

SMYTH,G.K.; MICHAUD, J.; SCOTT, H. The use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, v.21. n.9, p.2067-2075, 2005. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/cgi/content/short/21/9/2067>>.

SOON-YOUNG K. et al. Interaction of the DnaK and DnaJ Chaperone System with a Native Substrate, P1 RepA. *The Journal of Biological Chemistry* v.277, n.47 p.44778-44783, 2002

SOUZA, P.S.; GOES, A.; STUCHI, E.S.; JAIMES, E.P.G.; WICKERT, E.; SILVA, S.R.; DONADIO,L.C. Reação de variedades de clones de laranjas a *Xylella fastidiosa*. *Revista Brasileira de fruticultura*, Jaboticabal, v.28, n.1, p.145-147, 2006

SOUZA A. et al. Gene expression profile of the plant pathogen *X. fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol. Letters*, v.237, p. 341- 353, 2004

SOUZA A. et al. Analysis of gene expression in two growth states of *x. fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *MPMI*, v.16, n.10, p.867-875, 2003.

SPIRO, A.; LOWE, M.; BROWN, D. A bead-based methods for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, n.10, p.4258-4265, 2000.

STAUDT, L.M.; BROWN, P.O. Genomic views of the immune system. *Ann.Rev. Immunol.*, v.18, p.829-859, 2000.

STUCHI, E.S. et al. Navelina ISA 315 sweet orange: a citrus variegated chlorosis (CVC) resistant cultivar. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 17., 2007. Riverside. *Program & Abstracts.*. Turkey: International Organization of Citrus Virologists, 2007. p.89, 2007.

TAN, P.K. et al. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucl Acids Res*; v.31, p.5676-5684, 2003

TENHAKEN, R. et al. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* v.92, p.4158-4163, 1995.

TRAVENSOLO, R.F et al. *X. fastidiosa* gene expression analysis by DNA microarrays. *Gen. Mol. Biol.* 2008. Disponível em: <[www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br)>.

TRAVENSOLO, R.F. et al Production of DNA Microarray and Expression Analysis of Genes from *X. fastidiosa* in different culture media brazilian. *Arch. Biol. Technol.*, v.52, n.3, p. 555-566, 2009.

TSAI-TIEN TSENG, TYLER, B.M. e SETUBAL, J.C. Review. Protein secretion systems in bacterial- host associations, and their description in the gene ontology. *BMC Microbiology*, v.9, *supl.1.*, p.S2, 2009.

TUBELIS, A.,; BARROS, J.C.S.M.; CAMPOS LEITE, R.M.V.B. Difusão da cloreose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. *Laranja, Cordeirópolis*, v.14,n.1,p.239-254, 1993

TUSHER, V., TIBSHIRANI, R., CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.5116-5121, 2001.

VAN SLUYS M.A. et al. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *X. fastidiosa*. *J. Bacteriol.*, v.185, p.1018- 1026, 2003

VASIL, M.L., OCHSNER U.A. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.3, p.399-413, 1999.

VASSYLYEV, D. G., et al. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*, v. 417, p.712–719, 2002

VILAS-BÔAS, L. A.; Análise estrutural e funcional de genes envolvidos na produção de glicanas osmorreguladas em *Xylella fastidiosa*. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal –SP, 2002.

VITTI, G.C., et al. *Estudos de prováveis desequilíbrios nutricionais em pomares cítricos no município de Colina-SP*. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1989, p.12.

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Letter*, v.201, p.1-7, 2001.

WEI, Y. High-density microarray mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v. 183, n. 2, p. 545-556, 2001.

WELLS, J.M. et al. *Xylella fastidiosa* gen nov., sp. Nov. gram negative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xantomonas* spp. *Int. J. Sys. Phytopathol.*, v.73, n.6, p.136-43, 1987.

WELLS, J.M. et al. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum peaf scald and phony peach disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.42, p.357-63, 1981.

WHITCHURCH, et al. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 52: 873-893, 2004.

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, n. 4, p. 291–298, 2000.

WIGGERICH, H.G.; PÜLER A. The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). *Microbiology*, v.146, p.1053-1060, 2000

WILLIAMS, M. D.; OUYANG, T. X.; FLICKINGER, M. C. Starvation-induced expression of *SspA* and *SspB*: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol. Microbiol.*, v.11, p.1029-1043, 1994.

WILSON,G.G.; MURRAY, N.E. Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.*, v.25, p.585-627, 1991.

WODICKA, L. et al. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol.*, v.15, p.1359-1367, 1997.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.*, v.322, p.681-692, 1997.

WRZACZEK, M. et al. Arabidopsis GRI is involved in the regulation of cell death induced by extracellular ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.106, p.5412-5417, 2009

WURUMBACH E.; YUEN T.; SEALFON S.C. Focused microarray analysis. *Methods*, v.31, p. 306-316, 2003.

XU,Q., DZIEJMAN, M., MEKALANOS J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, v.100, p.1286-1291, 2003.

YAMAMOTO, P.T. et al. Transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathol.*, v.28, p.178-181, 2002.

YANG, Y. O.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in defense responses. *Genes & Development*, v. 11, n. 13, p. 1621–1639, 1997

YANG, Y.H. et al Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.*, v.30, n.4, p.15, 2002.

YANG, Y.H. et al. Normalization for cDNA microarray data. In: BITTNER, M.KL.; CHEN, YL., DORSEL, A.N.; DOUGHERTY, E.R. (Ed.). Microarrays: optical technologies and informatics. *Proceedings of SPIE*, v. 4266, p.141-152, 2001.

YANG, Y.H. et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl. Acids Res.*, v.30, n.4. p.15, 2002

YAUK, C.L. et al. Comprehensive comparison of six microarray technologies. *Nucl. Acids Res.*, v.32 , p.124, 2004.

YE, R.W. et al. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, v.182, n.16, p.4458-4465, 2000.

YOUNG, G. M.; SCHMIEL, D.H.; MILLER, V.L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 96, 6456–6461, 1999.

ZHANG, G. et al. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*, v.98, n.6, p. 811-824, 1999.

ZHANG, L.H.; FATH, M.J.; KOLTER, R. Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics*, v.141, p.25-32, 1995

ZHENG, M. et al. DNA microarray mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.*, v.183, p.4562-4570, 2001.

ZHU, B.; PING G.; SHINOHARA Y.; ZHANG Y.; BABA Y. Comparison of gene expression measurements from cDNA and 60-mer oligonucleotide microarrays. *Genomics*, v 85, p.657-665, 2005.

## **APÊNDICE**

**Tabela A1:** Genes diferencialmente expressos (ordem por categorias: I- IX. Aqueles genes que foram mais discutidos no texto estão indicados em negrita).

Gene ID	Gene_Name	logFC	Categoria	Produto
XF0846	<i>TM1624</i>	-4,16	I.A.2	beta-mannosidase precursor (100.9 kDa)
XF1472	<i>BEDB</i>	-3,02	I.A.2	benzene 1,2-dioxygenase, ferredoxin protein (12.3 kDa)
XF1234	<i>PRPB</i>	-2,86	I.A.2	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase (32.4 kDa)
XF0781	<i>estA</i>	-1,63	I.A.2	lipase/esterase (64.3 kDa)
XF1743	<i>est</i>	-1,58	I.A.2	esterase (37.8 kDa)
XF0840	<i>BGA</i>	1,82	I.A.2	beta-galactosidase (67.9 kDa)
XF2677	<i>AAO</i>	-1,39	I.A.2, VII.G	L-ascorbate oxidase (80.9 kDa)
XF2268	<i>GLPK</i>	-2,92	I.B.10	glycerol kinase (57.1 kDa)
XF1889	<i>FPR</i>	2,06	I.B.10	ferredoxin-NADP reductase (29.5 kDa)
XF2095	<i>None</i>	2,36	I.B.10	carbonic anhydrase (22.8 kDa)
XF1468	<i>MRSA</i>	-3,05	I.B.11	phosphomannomutase (47.4 kDa)
XF0609	<i>GMD</i>	-1,93	I.B.11	GDP-mannose 4,6 dehydratase (39.0 kDa)
XF0259	<i>XANB</i>	-1,58	I.B.11,III.D.1	phosphomannose isomerase-GDP-mannose pyrophosphorylase (53.0 kDa)
XF0904	<i>YBEZ</i>	2,12	I.B.9	ATP-binding protein (36.2 kDa)
XF0311	<i>nuoG</i>	-5,73	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (79.5 kDa)
XF0307	<i>NUOC</i>	-3,30	I.C.1	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO5 subunit (28.1 kDa)
XF2459	<i>CYCJ</i>	-1,60	I.C.3	c-type cytochrome biogenesis protein (17.3 kDa)
XF0557	<i>az1</i>	1,46	I.C.3	electron transfer protein azurin I (16.3 kDa)
XF1387	<i>CYOD</i>	1,62	I.C.3	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit IV (12.6 kDa)
XF0908	<i>PETA</i>	1,93	I.C.3	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, iron-sulfur subunit (22.9 kDa)
XF0868	<i>lpdA or lpd</i>	-1,60	I.C.6, I.C.7	dihydrolipoamide dehydrogenase (63.9 kDa)
XF1073	<i>SDHB</i>	-1,71	I.C.7	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein (29.5 kDa)
XF1535	<i>GLTA</i>	1,83	I.C.7	citrate synthase (47.9 kDa)
XF1144	<i>ATPG OR UNCG OR PAPC</i>	1,50	I.C.8	ATP synthase, gamma chain (32.3 kDa)
XF1145	<i>ATPA OR UNCA</i>	2,11	I.C.8	ATP synthase, alpha chain (56.0 kDa)
<b>XF1626</b>	<b>ALGR</b>	<b>-5,55</b>	<b>I.D</b>	<b>two-component system, regulatory protein (28.7 kDa)</b>
<b>XF0912</b>	<b>SSPB</b>	<b>-3,69</b>	<b>I.D</b>	<b>stringent starvation protein B (15.7 kDa)</b>
XF1350	<i>rpoD</i>	-2,86	I.D	RNA polymerase sigma-70 factor (69.9 kDa)



XF1749	<i>OPDE</i>	-1,69	I.D	transcriptional regulator (42.4 kDa)
XF0833	<i>CYSB OR HI1200</i>	-1,63	I.D	transcriptional regulator (LysR family) (37.7 kDa)
XF2534	<i>colR</i>	-1,62	I.D	two-component system, regulatory protein (25.0 kDa)
XF1730	<i>YAFC</i>	-1,53	I.D	transcriptional regulator (LysR family) (31.9 kDa)
XF2476	<i>SUHB OR SSYA</i>	-1,51	I.D	extragenic supressor (30.2 kDa)
XF1275	<i>phaF</i>	-1,40	I.D	poly(hydroxyalcanoate) granule associated protein (20.5 kDa)
<b>XF1625</b>	<b><i>algZ</i></b>	<b>-1,39</b>	<b>I.D</b>	<b>two-component system, sensor protein (38.6 kDa)</b>
XF1133	<i>AF0343</i>	1,39	I.D	tryptophan repressor binding protein (20.5 kDa)
XF1996	<i>C2</i>	1,51	I.D	transcriptional regulator (PbsX family) (14.1 kDa)
XF2336	<i>colR</i>	1,65	I.D	two-component system, regulatory protein (27.3 kDa)
<b>XF2535</b>	<b><i>colS</i></b>	<b>1,66</b>	<b>I.D</b>	<b>two-component system, sensor protein (41.6 kDa)</b>
XF0833	<i>CYSB OR HI1200</i>	1,69	I.D	transcriptional regulator (LysR family) (37.7 kDa)
XF0125	<i>csrA</i>	1,99	I.D	carbon storage regulator (8.3 kDa)
XF1000	<i>ARGE</i>	-1,78	II.A.1	acetylornithine deacetylase (38.9 kDa)
XF1001	<i>argB</i>	-1,72	II.A.1	acetylglutamate kinase (48.9 kDa)
XF1005	<i>PROA</i>	-1,68	II.A.1	gamma-glutamyl phosphate reductase (52.2 kDa)
XF1003	<i>ASL</i>	1,56	II.A.1	argininosuccinate lyase (48.9 kDa)
XF1004	<i>DR1827</i>	3,26	II.A.1	glutamate 5-kinase (40.9 kDa)
XF1121	<i>METF OR AQ_1429</i>	-5,54	II.A.2	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (30.5 kDa)
XF1121	<i>METF OR AQ_1429</i>	-2,12	II.A.2	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (30.5 kDa)
XF0118	<i>ASNB</i>	-1,80	II.A.2	asparagine synthase B (62.9 kDa)
XF1481	<i>dapF</i>	-1,71	II.A.2	diaminopimelate epimerase (30.1 kDa)
XF0863	<i>MET2</i>	1,73	II.A.2	homoserine O-acetyltransferase (37.7 kDa)
XF1375	<i>TRPB</i>	-1,55	II.A.4	tryptophan synthase beta chain (48.0 kDa)
XF0212	<i>TRPD</i>	2,43	II.A.4	anthranilate phosphoribosyltransferase (36.7 kDa)
XF2217	<i>HISB</i>	-1,50	II.A.5	hyphoimidazoleglycerolphosphate dehydratase/histidinol-phosphate phosphatase bifunctional enzyme (41.4 kDa)thetical protein (33.8 kDa)othetical protein (33.8 kDa)
XF2213	<i>HISI OR HISIE</i>	1,51	II.A.5	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase bifunctional enzyme (22.6 kDa)

XF2644	<i>PRSA OR PRS</i>	-2,99	II.B.1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase (33.8 kDa)
XF2571	<i>PYRD</i>	2,52	II.B.2	dihydroorotate dehydrogenase (38.7 kDa)
XF2332	<i>THYA</i>	-2,19	II.B.4	thymidylate synthase (30.1 kDa)
XF1356	<i>BIOH OR BIOB</i>	-1,76	II.D.1	biotin biosynthesis protein (27.6 kDa)
XF1199	<i>TRXA</i>	-1,47	II.D.10 ,I.C.3	thioredoxin (11.9 kDa)
XF0661	<i>ISPA</i>	-4,01	II.D.11	geranyltranstransferase (farnesyl-diphosphate synthase) (31.6 kDa)
XF1391	<i>ISPB OR CEL</i>	-2,03	II.D.11	octaprenyl-diphosphate synthase (36.2 kDa)
XF1797	<i>HEMY</i>	-3,61	II.D.12	porphyrin biosynthesis protein (44.4 kDa)
XF1512	<i>HEMK</i>	-1,37	II.D.12	protoporphyrinogen oxidase (29.5 kDa)
XF0436	<i>FOLB</i>	-1,83	II.D.2	dihydroneopterin aldolase (13.5 kDa)
XF0228	<i>FOLK OR HI0064</i>	-1,56	II.D.2	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase (18.9 kDa)
XF0230	<i>PANC</i>	1,92	II.D.5	pantoate--beta-alanine ligase (31.2 kDa)
XF0839	<i>PDXA</i>	1,65	II.D.6	pyridoxal phosphate biosynthetic protein (34.6 kDa)
XF1097	<i>PNCB</i>	1,94	II.D.7	nicotinate phosphoribosyltransferase (45.0 kDa)
XF1961	<i>NADE OR ADGA</i>	2,59	II.D.7	NH <sub>3</sub> -dependent NAD synthetase (59.3 kDa)
XF1888	<i>THIC OR THIA</i>	-1,79	II.D.8	thiamine biosynthesis protein (69.4 kDa)
XF0671	<i>FABG</i>	-2,00	II.E	3-oxoacyl-[ACP] reductase (25.5 kDa)
XF0673	<i>FABF</i>	-1,73	II.E	3-oxoacyl-[ACP] synthase II (43.3 kDa)
XF0144	<i>SPEA</i>	1,65	II.F	biosynthetic arginine decarboxylase (69.2 kDa)
XFa0061	<i>SSB</i>	-1,48	III.A.1	single-strand binding protein (15.4 kDa)
XF1353	<i>parC</i>	1,39	III.A.1	topoisomerase IV subunit (83.4 kDa)
XF0920	<i>TOPA OR RP326</i>	1,38	III.A.1, III.A.4	DNA topoisomerase I (91.8 kDa)
XF1943		-1,68	III.A.2	histone-like protein (13.9 kDa)
XF1644	<i>SSB</i>	-1,41	III.A.2	single-stranded DNA binding protein (16.9 kDa)
XF0423	<i>RECB OR RORA</i>	-2,12	III.A.3	exodeoxyribonuclease V beta chain (134.1 kDa)
XF1904	<i>RUVA</i>	-4,87	III.A.4	holliday junction binding protein, DNA helicase (20.9 kDa)
XF1905	<i>RUVC</i>	-4,06	III.A.4	holliday junction resolvase, endodeoxyribonuclease (22.0 kDa)
XF0967	<i>uvrB</i>	-3,06	III.A.4	excinuclease ABC subunit B (75.6 kDa)
XF2022	<i>SBCB OR XONA OR CPEA</i>	-2,23	III.A.4	exodeoxyribonuclease I (56.9 kDa)
XF2426	<i>UVRA</i>	-2,13	III.A.4	excinuclease ABC subunit A (106.9 kDa)
XF1299	<i>alkB</i>	-1,94	III.A.4	DNA repair system specific for alkylated DNA (22.6 kDa)
XF0755	<i>XSEA</i>	-1,87	III.A.4	exodeoxyribonuclease VII large subunit (49.9 kDa)

XF2081	<i>DINJ</i>	-1,59	III.A.4	DNA-damage-inducible protein (9.0 kDa)
XF1904	<i>RUVA</i>	-1,44	III.A.4	holliday junction binding protein, DNA helicase (20.9 kDa)
XF0164	<i>SCE87.25c</i>	1,69	III.A.4	exodeoxyribonuclease (30.8 kDa)
XF2311	<i>UVRC</i>	2,00	III.A.4	excinuclease ABC subunit C (69.8 kDa)
XF2022	<i>SBCB OR XONA OR CPEA</i>	2,09	III.A.4	exodeoxyribonuclease I (56.9 kDa)
XF2081	<i>DINJ</i>	2,20	III.A.4	DNA-damage-inducible protein (9.0 kDa)
<b>XF2721</b>	<b><i>hsdR1</i></b>	<b>-1,78</b>	<b>III.A.5</b>	<b>type I restriction-modification system endonuclease (114.5 kDa)</b>
XF0641	<i>sfilM</i>	-1,74	III.A.5	DNA methyltransferase (41.9 kDa)
XF0641	<i>sfilM</i>	-1,58	III.A.5	DNA methyltransferase (41.9 kDa)
<b>XF2726</b>	<b><i>hsds</i></b>	<b>-1,43</b>	<b>III.A.5</b>	<b>type I restriction-modification system specificity determinant (45.8 kDa)</b>
XF0924	<i>SMF OR DPRA OR HI0985</i>	1,90	III.A.5	DNA processing chain A (41.0 kDa)
XF0935	<i>llaIA</i>	-1,58	III.A.5, III.A.4	methyltransferase (35.9 kDa)
XF1163	<i>RPLX OR RP648</i>	-1,81	III.B.2	50S ribosomal protein L24 (11.4 kDa)
XF1177	<i>rpIQ</i>	1,54	III.B.2	50S ribosomal protein L17 (14.4 kDa)
XF1173	<i>rpsM</i>	2,55	III.B.2	30S ribosomal protein S13 (13.6 kDa)
XF0107	<i>RPSP OR RPS16 OR HI0204</i>	1,95	III.B.2, III.A.5	30S ribosomal protein S16 (9.7 kDa)
XF2438	<i>RPSA OR SSYF</i>	-1,57	III.B.2, III.C.1	30S ribosomal protein S1 (62.9 kDa)
XF2201	<i>PRMA</i>	-1,67	III.B.3	ribosomal protein L11 methyltransferase (34.9 kDa)
XF2176	<i>LEUS</i>	-3,30	III.B.4	leucyl-tRNA synthetase (100.7 kDa)
XF1440	<i>TRMU OR ASUE</i>	-1,88	III.B.4	tRNA methyltransferase (43.0 kDa)
XF0169	<i>TYRS OR HI1610</i>	1,40	III.B.4	tyrosyl-tRNA synthetase (46.6 kDa)
XF0927	<i>FMT</i>	1,75	III.B.4	methionyl-tRNA formyltransferase (33.2 kDa)
XF0741	<i>PHES</i>	2,16	III.B.4	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain (37.8 kDa)
XF1314	<i>QUEA</i>	2,26	III.B.4	S-adenosylmethionine: tRNA ribosyltransferase-isomerase (38.9 kDa)
XF2632	<i>RPOC OR TABB</i>	1,96	III.B.5	RNA polymerase beta' subunit (158.7 kDa)
XF0227	<i>PCNB</i>	4,58	III.B.5	polynucleotide adenyltransferase (47.6 kDa)
XF0239	<i>PNP</i>	1,33	III.B.6	polynucleotide phosphorylase (78.2 kDa)
XF0174	<i>PRFC OR HI1735</i>	-1,82	III.C.1	peptide chain release factor 3 (60.9 kDa)
XF2628	<i>tufA</i>	-1,63	III.C.1	elongation factor Tu (42.9 kDa)
XF2298	<i>stp1</i>	1,74	III.C.1	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase (17.3 kDa)
<b>XF2339</b>	<b><i>DNAJ</i></b>	<b>1,32</b>	<b>III.C.2</b>	<b>DnaJ protein (40.4 kDa)</b>

<b>XF0978</b>	<b>HTPG</b>	<b>1,71</b>	<b>III.C.2</b>	<b>heat shock protein G (71.8 kDa)</b>
<b>XF2177</b>		<b>1,73</b>	<b>III.C.2</b>	<b>heat shock protein G (71.8 kDa)</b>
<b>XF2340</b>	<b>DNAK OR GRPF OR GROP OR SEG</b>	<b>3,20</b>	<b>III.C.2</b>	<b>DnaK protein (68.5 kDa)</b>
XF2330	<i>slpD</i>	-3,31	III.C.3	proteinase (57.5 kDa)
XF0220	<i>pepQ</i>	-1,59	III.C.3	proline dipeptidase (43.4 kDa)
XF2330	<i>slpD</i>	1,68	III.C.3	proteinase (57.5 kDa)
XF2230	<i>DACC</i>	-2,69	IV.A.1	penicillin-binding protein 6 precursor (43.2 kDa)
XF2334	<i>DGKA</i>	-2,08	IV.A.1	diacylglycerol kinase (16.7 kDa)
XF0764	<i>SCF56.03</i>	1,47	IV.A.1	membrane protein (27.4 kDa)
XF0851	<i>DADA OR DADR</i>	-1,58	IV.A.1,I.A.2	D-amino acid dehydrogenase subunit (47.5 kDa)
XF1363	<i>SLT OR SLTY</i>	-3,60	IV.A.2	soluble lytic murein transglycosylase precursor (80.0 kDa)
XF0321	<i>OPRO</i>	-1,90	IV.A.2	porin O precursor (45.0 kDa)
XF0384	<i>phuR</i>	-1,89	IV.A.2	outer membrane hemin receptor (74.1 kDa)
XF0872	<i>OMPW</i>	-1,64	IV.A.2	outer membrane protein (19.9 kDa)
XF1614	<i>pbp4</i>	-1,91	IV.B	penicillin binding protein (52.9 kDa)
XF0416	<i>VACJ</i>	-1,60	IV.B	lipoprotein precursor (38.9 kDa)
XF2572	<i>MURB</i>	1,54	IV.B	UDP-N-acetylpyruvoylglucosamine reductase (39.1 kDa)
XF0276	<i>MPL</i>	1,54	IV.B	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase (50.8 kDa)
XF0542		1,55	IV.B	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase (50.8 kDa)
XF0486	<i>lpxD</i>	1,43	IV.C	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase (21.6 kDa)
XF1637	<i>spsQ</i>	1,64	IV.C	glycosyl transferase (32.8 kDa)
XF0803	<i>lpxC</i>	-1,72	IV.C	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase (33.5 kDa)
<b>XF0369</b>	<b><i>pilM</i></b>	<b>-4,38</b>	<b>IV.D</b>	<b>fimbrial assembly membrane protein (42.1 kDa)</b>
<b>XF1632</b>	<b><i>pilU</i></b>	<b>-2,08</b>	<b>IV.D</b>	<b>twitching motility protein (42.5 kDa)</b>
<b>XF2542</b>		<b>1,35</b>	<b>IV.D</b>	<b>fimbrial protein (15.0 kDa)</b>
XF1192	<i>SCF73.09</i>	-2,03	IX	integral membrane protein (37.6 kDa)
XF0500	<i>RACR</i>	-1,56	phageVI.A - related repressor protein (15.3 kDa)	phage-related repressor protein (15.3 kDa)
XF2730	<i>RHTC</i>	-1,72	V.A.1	amino acid transporter (23.6 kDa)
XF2730	<i>RHTC</i>	-1,45	V.A.1	amino acid transporter (23.6 kDa)
XF1346	<i>CYSW OR SLR1454</i>	-1,95	V.A.2	ABC transporter sulfate permease (34.8 kDa)

XF2144	<i>PSTB OR PHOT</i>	1,82	V.A.2	phosphate ABC transporter ATP-binding protein (30.1 kDa)
XF1402	<i>PHBI</i>	-4,87	V.A.3	phosphotransferase system enzyme I (65.3 kDa)
XF2448	<i>malE</i>	-1,77	V.A.3	ABC transporter sugar-binding protein (49.1 kDa)
<b>XF0599</b>	<b><i>YBIL</i></b>	<b>-1,72</b>	<b>V.A.4</b>	<b>TonB-dependent receptor for iron transport (85.4 kDa)</b>
XF1401	<i>mgtE</i>	3,64	V.A.4	Mg <sup>++</sup> transporter (31.0 kDa)
XF1223	<i>YADG</i>	-3,95	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein (34.2 kDa)
XF1409	<i>HI1148</i>	-1,91	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein (26.3 kDa)
XF2617	<i>UUP</i>	-1,39	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein (70.4 kDa)
XF1475	<i>YNHD</i>	1,40	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein (30.8 kDa)
XF1728	<i>f451</i>	1,67	V.A.7	transport protein (46.1 kDa)
XF2133	<i>YHES</i>	1,92	V.A.7	ABC transporter ATP-binding protein (71.1 kDa)
XF1322	<i>MINC</i>	-2,78	V.B	cell division inhibitor (26.2 kDa)
XF2557	<i>ZIPA</i>	2,54	V.B	cell division protein (27.3 kDa)
XF0800	<i>FTSQ</i>	-1,40	V.B,IV.A.1	cell division protein (30.8 kDa)
<b>XF1952</b>	<b><i>chpA</i></b>	<b>1,86</b>	<b>V.C, IV.D</b>	<b>chemotaxis-related protein kinase (194.0 kDa)</b>
XF0500	<i>RACR</i>	-5,98	VI.A	phage-related repressor protein (15.3 kDa)
XF0682/XF2292/XF2526		-2,27	VI.A	phage-related protein (10.5 kDa)
XF1786		-2,09	VI.A	phage-related protein (8.5 kDa)
XF2132	<i>INT</i>	-1,86	VI.A	phage-related protein (25.5 kDa)
XF2291		-1,85	VI.A	phage-related protein (28.0 kDa)
XF0728	<i>FIIR2</i>	-1,59	VI.A	phage-related contractile tail tube protein (18.6 kDa)
XF2530	<i>INT</i>	-1,56	VI.A	phage-related integrase (38.4 kDa)
XF1146	<i>ATPH OR UNCH</i>	-1,56	VI.A	ATP synthase, delta chain (18.8 kDa)
XF0684		-1,37	VI.A	phage-related protein (55.3 kDa)
XF1555	<i>INT</i>	1,37	VI.A	phage-related protein (32.1 kDa)
XF1658	<i>CI</i>	1,48	VI.A	phage-related repressor protein (25.7 kDa)
XF2530	<i>INT</i>	1,52	VI.A	phage-related integrase (38.4 kDa)
XF0719	<i>gpV</i>	1,52	VI.A	phage-related baseplate assembly protein (20.4 kDa)
XF2479		1,66	VI.A	phage-related protein (39.0 kDa)
XF0710/XF2501	<i>NOHA</i>	1,71	VI.A	phage-related protein (21.7 kDa)
XF2525	<i>dpoL</i>	-1,68	VI.A, III.A.1	phage-related DNA polymerase (79.8 kDa)
XFa0007	<i>traB or virB4</i>	-6,20	VI.B	conjugal transfer protein (91.5 kDa)
XFa0012	<i>traE or virB8</i>	-2,74	VI.B	conjugal transfer protein (30.6 kDa)

XF2052	<i>trbF</i>	-1,77	VI.B	conjugal transfer protein (26.8 kDa)
XFa0040	<i>trbl</i>	-1,60	VI.B	conjugal transfer protein (50.0 kDa)
XF2061	<i>TRAC</i>	-1,40	VI.B	DNA primase (154.5 kDa)
XF2053	<i>trbE</i>	1,70	VI.B	conjugal transfer protein (91.9 kDa)
XF1775	<i>IS629</i>	-2,04	VI.C	reverse transcriptase (64.7 kDa)
XF0325/XF0535		1,48	VI.C	transposase OrfA (11.9 kDa)
<b>XF1530</b>	<b>AHPC</b>	<b>-2,06</b>	<b>VII.C</b>	<b>subunit C of alkyl hydroperoxide reductase (22.9 kDa)</b>
<b>XF1341</b>	<b>cutC</b>	<b>-1,43</b>	<b>VII.C</b>	<b>copper homeostasis protein (27.7 kDa)</b>
<b>XF2148</b>	<b>KSGA OR RSMA</b>	<b>1,35</b>	<b>VII.C</b>	<b>dimethyladenosine transferase (32.0 kDa)</b>
<b>XF2232</b>	<b>cpeB</b>	<b>1,52</b>	<b>VII.C</b>	<b>catalase/peroxidase (86.9 kDa)</b>
<b>XF1038</b>	<b>St3F7.11</b>	<b>1,55</b>	<b>VII.C</b>	<b>peptide synthase (54.9 kDa)</b>
<b>XF1621</b>	<b>pbp</b>	<b>2,26</b>	<b>VII.C</b>	<b>beta-lactamase-like protein (49.5 kDa)</b>
<b>XF0668</b>	<b>FRPC</b>	<b>-3,48</b>	<b>VII.C IV.A.2</b>	<b>hemolysin-type calcium binding protein (128.4 kDa)</b>
<b>XF2083</b>	<b>CZCA</b>	<b>-1,49</b>	<b>VII.C, V.A.7</b>	<b>cation efflux system protein (111.5 kDa)</b>
<b>XF2586</b>	<b>TOLC OR MTCB OR MUKA OR REFI</b>	<b>-1,48</b>	<b>VII.C,V.A.6</b>	<b>outer membrane export factor (49.5 kDa)</b>
<b>XF2366</b>	<b>gumE</b>	<b>-1,37</b>	<b>VII.E, III.D.1</b>	<b>GumE protein (47.7 kDa)</b>
<b>XF1516</b>	<b>uspA1</b>	<b>1,59</b>	<b>VII.F, IV.A.2</b>	<b>surface-exposed outer membrane protein (98.3 kDa)</b>
<b>XF2682</b>	<b>MDOG</b>	<b>-1,51</b>	<b>VII.G</b>	<b>periplasmic glucan biosynthesis protein (61.6 kDa)</b>
<b>XF1623</b>	<b>MDOH</b>	<b>1,55</b>	<b>VII.G</b>	<b>periplasmic glucan biosynthesis protein (67.9 kDa)</b>
<b>XF0285</b>	<b>HTRA OR DEGP OR PTD</b>	<b>-1,72</b>	<b>VII.G, III.C.3</b>	<b>heat shock protein (50.5 kDa)</b>
<b>XFa0052</b>	<b>vapD</b>	<b>-1,63</b>	<b>VII.H</b>	<b>virulence-associated protein D (17.6 kDa)</b>
<b>XF1114</b>	<b>RPFC</b>	<b>-1,59</b>	<b>VII.H</b>	<b>regulator of pathogenicity factors (73.1 kDa)</b>
<b>XF1424</b>	<b>chi</b>	<b>-1,47</b>	<b>VII.H</b>	<b>chitinase (28.5 kDa)</b>
<b>XF1519</b>	<b>XPSG OR PEFG</b>	<b>-1,62</b>	<b>VII.H ,V.A.6</b>	<b>general secretory pathway protein G precursor (17.5 kDa)</b>
<b>XF1518</b>	<b>xpsF</b>	<b>-1,47</b>	<b>VII.H ,V.A.6</b>	<b>general secretory pathway protein F (44.0 kDa)</b>
XF0472	<i>YGDH</i>	-2,25	VIII.A	conserved hypothetical protein (49.6 kDa)
XF1405	<i>YHBJ</i>	-2,15	VIII.A	conserved hypothetical protein (33.3 kDa)
XF1295	<i>YFCN</i>	-1,56	VIII.A	conserved hypothetical protein (20.1 kDa)
XF1012	<i>YFHC</i>	-1,55	VIII.A	conserved hypothetical protein (18.4 kDa)
XF1901	<i>YBGC</i>	-1,54	VIII.A	conserved hypothetical protein (17.2 kDa)
XF1442	<i>YLJA</i>	-1,48	VIII.A	conserved hypothetical protein (12.0 kDa)

				kDa)
XF0849	YEAA	-1,48	VIII.A	conserved hypothetical protein (17.5 kDa)
XF1469	<i>shf</i>	-1,40	VIII.A	conserved hypothetical protein (32.3 kDa)
XF1649	<i>b2360</i>	-1,34	VIII.A	conserved hypothetical protein (30.4 kDa)
XF0339	<i>BTUB OR BFE OR CER</i>	2,02	VIII.A	conserved hypothetical protein (97.9 kDa)
XF0460	<i>HI0366</i>	2,05	VIII.A	conserved hypothetical protein (27.6 kDa)
XF0115	<i>YFFB</i>	2,32	VIII.A	conserved hypothetical protein (14.0 kDa)
<b>XFa0032</b>	<b>SCJ21.16</b>	<b>2,37</b>	<b>VIII.A</b>	<b>conserved hypothetical protein (27.1 kDa)</b>
XF0593	<i>HI1008</i>	2,38	VIII.A	conserved hypothetical protein (12.0 kDa)
XF1293	<i>HI0672</i>	-5,99	VIII.A	conserved hypothetical protein
XF2575	<i>DR0386</i>	-5,76	VIII.A	conserved hypothetical protein (45.0 kDa)
XF0387	<i>YJBN</i>	-4,97	VIII.A	conserved hypothetical protein (37.9 kDa)
XF1243	<i>YRAM</i>	-3,25	VIII.A	conserved hypothetical protein (43.9 kDa)
XF2666	<i>YHGN</i>	-2,98	VIII.A	conserved hypothetical protein (21.6 kDa)
XF1272	<i>RV1827 OR MTCY1A11.16C</i>	-2,84	VIII.A	conserved hypothetical protein (29.4 kDa)
XF2562	<i>YDIC</i>	-2,56	VIII.A	conserved hypothetical protein (12.2 kDa)
XF2010		-2,39	VIII.A	conserved hypothetical protein (19.6 kDa)
XF0461	<i>YFGA</i>	-2,25	VIII.A	conserved hypothetical protein (23.1 kDa)
XF0758	<i>YJEE</i>	-2,07	VIII.A	conserved hypothetical protein (17.4 kDa)
XF1047	<i>YAEL</i>	-2,05	VIII.A	conserved hypothetical protein (47.2 kDa)
XF1840	<i>zm10orf9</i>	-2,04	VIII.A	conserved hypothetical protein (25.1 kDa)
XF0167	<i>RP407</i>	-2,01	VIII.A	conserved hypothetical protein (46.6 kDa)
XF0461	<i>YFGA</i>	-1,88	VIII.A	conserved hypothetical protein (23.1 kDa)
XF0596	<i>DR1793</i>	-1,86	VIII.A	conserved hypothetical protein (19.5 kDa)
XF2551	<i>At2g47390</i>	-1,77	VIII.A	conserved hypothetical protein (98.7 kDa)
XF0233	<i>HI1282</i>	-1,71	VIII.A	conserved hypothetical protein (23.8 kDa)
XF0433	<i>IporfX</i>	-1,66	VIII.A	conserved hypothetical protein (16.2 kDa)
XF1714	<i>YRFI</i>	-1,53	VIII.A	conserved hypothetical protein (19.7

				kDa)
XF1571/XF1676	<i>HI1409</i>	-1,47	VIII.A	conserved hypothetical protein (52.4 kDa)
XF1126		1,34	VIII.A	conserved hypothetical protein (134.7 kDa)
XF1504	<i>YICC</i>	1,35	VIII.A	conserved hypothetical protein (34.1 kDa)
XF2669	<i>YDHD</i>	1,42	VIII.A	conserved hypothetical protein (11.7 kDa)
XF1384	<i>pqaA</i>	1,43	VIII.A	conserved hypothetical protein (58.2 kDa)
XF0556	<i>SC1A9.13</i>	1,45	VIII.A	conserved hypothetical protein (37.4 kDa)
XFa0050	<i>orfB</i>	1,52	VIII.A	conserved hypothetical protein (26.4 kDa)
XF1708		1,55	VIII.A	conserved hypothetical protein (42.5 kDa)
XF1454	<i>aq_449</i>	1,56	VIII.A	conserved hypothetical protein (19.8 kDa)
XF2573		1,57	VIII.A	hypothetical protein (33.8 kDa)
XF2010		1,58	VIII.A	conserved hypothetical protein (19.6 kDa)
XF0240	<i>SC1F2.10</i>	1,59	VIII.A	conserved hypothetical protein (15.9 kDa)
XF0842	<i>SCM11.14c</i>	1,84	VIII.A	conserved hypothetical protein (87.1 kDa)
XF1829	<i>RP471</i>	1,90	VIII.A	conserved hypothetical protein (24.5 kDa)
XF1895	<i>YBGF</i>	1,93	VIII.A	conserved hypothetical protein (30.2 kDa)
XF0497	<i>Rv2514c</i>	2,50	VIII.A	conserved hypothetical protein (17.8 kDa)
XF2616		-2,23	VIII.B	hypothetical protein (15.0 kDa)
XF1033		-1,85	VIII.B	hypothetical protein (6.8 kDa)
XF1969		-1,85	VIII.B	hypothetical protein (6.1 kDa)
XF2316		-1,84	VIII.B	hypothetical protein (15.6 kDa)
XF0301		-1,83	VIII.B	hypothetical protein (10.7 kDa)
XF0981		-1,75	VIII.B	hypothetical protein (16.8 kDa)
XF0540		-1,74	VIII.B	hypothetical protein (13.8 kDa)
XF0559		-1,74	VIII.B	hypothetical protein (6.7 kDa)
XF0021		-1,74	VIII.B	hypothetical protein (10.8 kDa)
XF0850		-1,73	VIII.B	hypothetical protein (7.5 kDa)
XF0079		-1,70	VIII.B	hypothetical protein (9.1 kDa)
XF0330		-1,61	VIII.B	hypothetical protein (21.6 kDa)
XF2463		-1,59	VIII.B	hypothetical protein (23.7 kDa)
XF2454		-1,57	VIII.B	hypothetical protein (15.6 kDa)
XF0022		-1,57	VIII.B	hypothetical protein (8.2 kDa)
XF1986		-1,56	VIII.B	hypothetical protein (11.0 kDa)
XF2549		-1,54	VIII.B	hypothetical protein (16.2 kDa)



XF0885		-1,54	VIII.B	hypothetical protein (49.3 kDa)
XF1712		-1,50	VIII.B	hypothetical protein (33.8 kDa)
XF2675		-1,50	VIII.B	hypothetical protein (33.8 kDa)
XF0161	<i>yydD</i>	-1,50	VIII.B	hypothetical protein (37.9 kDa)
XF1725		-1,49	VIII.B	hypothetical protein (9.0 kDa)
XF1117		-1,49	VIII.B	hypothetical protein (53.4 kDa)
XF0827		-1,48	VIII.B	hypothetical protein (28.1 kDa)
XF0561		-1,46	VIII.B	hypothetical protein (41.0 kDa)
XF0602		-1,45	VIII.B	hypothetical protein (8.7 kDa)
XF0964		-1,42	VIII.B	hypothetical protein (19.0 kDa)
XF1751		1,47	VIII.B	hypothetical protein (17.8 kDa)
XF2098		1,49	VIII.B	hypothetical protein (7.3 kDa)
XF2283		1,49	VIII.B	hypothetical protein (34.3 kDa)
XF1845		1,50	VIII.B	hypothetical protein (18.0 kDa)
XF0885		1,51	VIII.B	hypothetical protein (49.3 kDa)
XF1290		1,51	VIII.B	hypothetical protein (6.4 kDa)
XF1060		1,51	VIII.B	hypothetical protein (8.4 kDa)
XF0970		1,54	VIII.B	hypothetical protein (8.1 kDa)
XF1584/XF1689		1,61	VIII.B	hypothetical protein (15.7 kDa)
XF1218		1,65	VIII.B	hypothetical protein (10.5 kDa)
XF0606		2,02	VIII.B	hypothetical protein (6.5 kDa)
XF0027		2,03	VIII.B	hypothetical protein (7.3 kDa)
XF1036		2,03	VIII.B	hypothetical protein (111.1 kDa)
XF0770		2,18	VIII.B	hypothetical protein (14.9 kDa)
XF1779		2,21	VIII.B	hypothetical protein (19.9 kDa)
XF2445		2,23	VIII.B	hypothetical protein (118.5 kDa)
XF1592		3,13	VIII.B	hypothetical protein (12.1 kDa)
XF0137		-5,30	VIII.B	hypothetical protein (17.6 kDa)
XF1515		-5,29	VIII.B	hypothetical protein (7.1 kDa)
XF0386		-5,10	VIII.B	hypothetical protein (5.2 kDa)
XF0829		-4,09	VIII.B	hypothetical protein (8.3 kDa)
XF1922		-3,70	VIII.B	hypothetical protein (4.5 kDa)
XF0272		-3,66	VIII.B	hypothetical protein (21.1 kDa)
XF2445		-3,57	VIII.B	hypothetical protein (118.5 kDa)
XFa0035		-3,45	VIII.B	hypothetical protein (5.4 kDa)
XF1444		-3,44	VIII.B	hypothetical protein (7.9 kDa)
XF2191		-3,42	VIII.B	hypothetical protein (5.7 kDa)
XF2111		-3,32	VIII.B	hypothetical protein (10.4 kDa)
XF1104		-3,20	VIII.B	hypothetical protein (12.7 kDa)
XF0638		-3,04	VIII.B	hypothetical protein (21.3 kDa)
XF2758		-2,94	VIII.B	hypothetical protein (19.5 kDa)
XF0898		-2,88	VIII.B	hypothetical protein (13.0 kDa)
XF2583		-2,73	VIII.B	hypothetical protein (5.1 kDa)
XF1083		-2,67	VIII.B	hypothetical protein (6.6 kDa)
XF0471		-2,48	VIII.B	hypothetical protein (4.7 kDa)

XF2743		-2,44	VIII.B	hypothetical protein (5.6 kDa)
XF1757		-2,40	VIII.B	hypothetical protein (9.7 kDa)
XF0542		-2,36	VIII.B	hypothetical protein (6.7 kDa)
XF2277		-2,31	VIII.B	hypothetical protein (12.4 kDa)
XF0638		-2,25	VIII.B	hypothetical protein (21.3 kDa)
XF1324		-2,22	VIII.B	hypothetical protein (44.0 kDa)
XFa0017		-2,20	VIII.B	hypothetical protein (85.1 kDa)
XF2758		-2,18	VIII.B	hypothetical protein (19.5 kDa)
XF0410		-2,17	VIII.B	hypothetical protein (6.0 kDa)
XF2039		-2,15	VIII.B	hypothetical protein (32.4 kDa)
XF1135		-2,13	VIII.B	hypothetical protein (5.3 kDa)
XF2667		-2,09	VIII.B	hypothetical protein (8.8 kDa)
XF2065		-2,04	VIII.B	hypothetical protein (10.0 kDa)
XF2035		-2,02	VIII.B	hypothetical protein (10.9 kDa)
XF2001		-1,96	VIII.B	hypothetical protein (15.3 kDa)
XF2120		-1,94	VIII.B	hypothetical protein (41.7 kDa)
XF0394		-1,91	VIII.B	hypothetical protein (7.8 kDa)
XF0469		-1,89	VIII.B	hypothetical protein (9.8 kDa)
XF1661		-1,84	VIII.B	hypothetical protein (9.3 kDa)
XF1758		-1,83	VIII.B	hypothetical protein (15.2 kDa)
XF1194		-1,82	VIII.B	hypothetical protein (8.0 kDa)
XF0897		-1,80	VIII.B	hypothetical protein (29.5 kDa)
XF1874		-1,76	VIII.B	hypothetical protein (11.6 kDa)
XF2138		-1,73	VIII.B	hypothetical protein (6.1 kDa)
XF0992		-1,71	VIII.B	hypothetical protein (35.6 kDa)
XF2359		-1,67	VIII.B	hypothetical protein (26.1 kDa)
XF0850		-1,64	VIII.B	hypothetical protein (7.5 kDa)
XF0860		-1,64	VIII.B	hypothetical protein (27.2 kDa)
XF2271		-1,64	VIII.B	hypothetical protein (15.2 kDa)
XF0588		-1,62	VIII.B	hypothetical protein (42.0 kDa)
XF1820		-1,60	VIII.B	hypothetical protein (9.1 kDa)
XF1880		-1,59	VIII.B	hypothetical protein (11.2 kDa)
XF0545		-1,59	VIII.B	hypothetical protein (6.6 kDa)
XF1075		-1,59	VIII.B	hypothetical protein (14.3 kDa)
XF2067		-1,55	VIII.B	hypothetical protein (10.1 kDa)
XF1330		-1,52	VIII.B	hypothetical protein (132.0 kDa)
XF0516		-1,51	VIII.B	hypothetical protein (11.6 kDa)
XF1989		-1,51	VIII.B	hypothetical protein (45.8 kDa)
XF2064		-1,48	VIII.B	hypothetical protein (7.9 kDa)
XF0351		-1,48	VIII.B	hypothetical protein (8.7 kDa)
XF0836		-1,47	VIII.B	hypothetical protein (9.8 kDa)
XFa0031		-1,44	VIII.B	hypothetical protein (38.0 kDa)
XF2169		-1,43	VIII.B	hypothetical protein (77.6 kDa)
XF1239		-1,40	VIII.B	hypothetical protein (15.6 kDa)
XF0473		-1,40	VIII.B	hypothetical protein (18.2 kDa)

XF2004		-1,39	VIII.B	hypothetical protein (23.5 kDa)
XF2377		-1,36	VIII.B	hypothetical protein (6.6 kDa)
XF0283		1,37	VIII.B	hypothetical protein (15.9 kDa)
XF2662		1,38	VIII.B	hypothetical protein (13.7 kDa)
XF2182		1,38	VIII.B	hypothetical protein (6.5 kDa)
XF0643		1,39	VIII.B	hypothetical protein (6.9 kDa)
XF0519		1,41	VIII.B	hypothetical protein (15.9 kDa)
XF1696		1,42	VIII.B	hypothetical protein (11.5 kDa)
XF2406		1,44	VIII.B	hypothetical protein (23.3 kDa)
XF1701		1,47	VIII.B	hypothetical protein (13.5 kDa)
XF2189		1,50	VIII.B	hypothetical protein (11.8 kDa)
XF1579/XF1684		1,54	VIII.B	hypothetical protein (13.5 kDa)
XF1588		1,56	VIII.B	hypothetical protein (12.4 kDa)
XF1712		1,56	VIII.B	hypothetical protein (33.8 kDa)
XFa0053		1,59	VIII.B	hypothetical protein (21.6 kDa)
XF2711		1,59	VIII.B	hypothetical protein (11.3 kDa)
XF1277		1,67	VIII.B	hypothetical protein (7.2 kDa)
XF1386		1,69	VIII.B	hypothetical protein (5.3 kDa)
XF1394		1,71	VIII.B	hypothetical protein (5.3 kDa)
XF1095		1,73	VIII.B	hypothetical protein (5.9 kDa)
XF0646		1,74	VIII.B	hypothetical protein (15.9 kDa)
XF2382		1,80	VIII.B	hypothetical protein (8.3 kDa)
XF1704		1,83	VIII.B	hypothetical protein (42.5 kDa)
XF0293		1,89	VIII.B	hypothetical protein (6.2 kDa)
XF2441		1,90	VIII.B	hypothetical protein (12.0 kDa)
XF0477		1,96	VIII.B	hypothetical protein (6.3 kDa)
XF0201		2,01	VIII.B	hypothetical protein (22.7 kDa)
XF1109		2,01	VIII.B	hypothetical protein (32.2 kDa)
XFa0030		2,07	VIII.B	hypothetical protein (13.1 kDa)
XF1772		2,08	VIII.B	hypothetical protein (15.0 kDa)
XF1941		2,13	VIII.B	hypothetical protein (18.4 kDa)
XF1794		2,14	VIII.B	hypothetical protein (22.6 kDa)
XF1508		2,25	VIII.B	hypothetical protein (92.6 kDa)
XF1478		2,43	VIII.B	hypothetical protein (15.6 kDa)

**Descrição das categorias de genes de *X. fastidiosa*** (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>) apresentadas na Tabela 1. No primeiro parentese pode-se observar o número total de genes da categoria ou subcategoria identificada no genoma da *X. fastidiosa*. No segundo e terceiro parêntese, indica-se o número de genes diferencialmente expressos na variedade Pera e na Navelina, respectivamente. Encontram-se marcadas em violeta aquelas que possuem um maior número de genes de expressão diferencial na Pera e em azul na Navelina.

- I. **Intermediary metabolism (251) (25) (16)**
  - A. **Degradation (33) (6) (1)**
    - 1. Degradation of polysaccharides (0)
    - 2. Degradation of small molecules (33)
  - B. **Central intermediary metabolism (58) (4) (3)**
    - 1. Amino sugars (4)
    - 2. Entner-Douderoff (2)
    - 3. Gluconeogenesis (7)
    - 4. Glyoxylate bypass (0)
    - 5. Miscellaneous glucose metabolism (0)
    - 6. Non-oxidative branch, pentose pathway (3)
    - 7. Nucleotide hydrolysis (0)
    - 8. Nucleotide interconversions (2)
    - 9. Phosphorus compounds (4)
    - 10. Pool, multipurpose conversions (18)
    - 11. Sugar-nucleotide biosynthesis, conversions (12)
    - 12. Sulfur metabolism (6)
  - C. **Energy metabolism, carbon (92) (5) (6)**
    - 1. Aerobic respiration (17)
    - 2. Anaerobic respiration and fermentation (6)
    - 3. Electron transport (29)
    - 4. Glycolysis (9)
    - 5. Oxidative branch, pentose pathway (2)
    - 6. Pyruvate dehydrogenase (4)
    - 7. TCA cycle (19)
    - 8. ATP-proton motive force interconversion (8)
  - D. **Regulatory functions (77) (10) (6)**
- II. **Biosynthesis of small molecules (226) (22) (11)**
  - A. **Amino acids biosynthesis (83) (9) (5)**
    - 1. Glutamate family, nitrogen assimilation (16)
    - 2. Aspartate family, pyruvate family (30)
    - 3. Glycine-serine family|sulfur metabolism (6)
    - 4. Aromatic amino acid family (23)
    - 5. Histidine (8)
  - B. **Nucleotides biosynthesis (41) (2) (1)**
    - 1. Purine ribonucleotides (19)
    - 2. Pyrimidine ribonucleotides (8)
    - 3. 2'-Deoxyribonucleotides (6)
    - 4. Salvage of nucleosides and nucleotides (8)

- C. Sugars and sugar nucleotides biosynthesis (2)
- D. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis (79) (9) (4)
  - 1. Biotin (8)
  - 2. Folic acid (8)
  - 3. Lipoate (2)
  - 4. Molybdopterin (2)
  - 5. Pantothenate (3)
  - 6. Pyridoxine (3)
  - 7. Pyridine nucleotides (5)
  - 8. Thiamin (8)
  - 9. Riboflavin (7)
  - 10. Thioredoxin, glutaredoxin, glutathione (8)
  - 11. Menquinone, ubiquinone (8)
  - 12. Heme, porphyrin (12)
  - 13. Biotin carboxyl carrier protein (BCCP) (0)
  - 14. Cobalamin (1)
  - 15. Enterochelin (0)
  - 16. Biopterin (3)
  - 17. Others (1)
- E. Fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis (22) (2) (0)
- F. Polyamines biosynthesis (3) (0) (1)
- III. Macromolecule metabolism (392) (27) (23)
  - A. DNA metabolism (111) (18) (7)
    - 1. Replication (31) (1) (2)
    - 2. Structural DNA binding proteins (10) (2) (0)
    - 3. Recombination (18) (1) (0)
    - 4. Repair (37) (9) (4)
    - 5. Restriction, modification (23) (5) (1)
  - B. RNA metabolism (183) (5) (10)
    - 1. Ribosomal and stable RNAs (56)
    - 2. Ribosomal proteins (54) (2) (3)
    - 3. Ribosomes - maturation and modification (13)
    - 4. Aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification (35) (2) (4)
    - 5. RNA synthesis, modification, DNA transcription (16) (1) (1)
    - 6. RNA degradation (8) (0) (1)
  - C. Protein metabolism (85) (5) (5)
    - 1. Translation and modification (40) (2) (1)
    - 2. Chaperones (11) (0) (4)
    - 3. Protein degradation (34) (2) (0)
  - D. Other macromolecules metabolism (17)
    - 1. Polysaccharides (15)
    - 2. Phospholipids (2)
- IV. Cell structure (145) (13) (7)
  - A. Membrane components (55) (7) (1)

- 1. Inner membrane (25)
  - 2. Outer membrane constituents (23)
- B. Murein sacculus, peptidoglycan (26) (3) (2)
- C. Surface polysaccharides, lipopolysaccharides, and antigens (30) (2) (1)
- D. Surface structures (34) (2) (1)
- V. Cellular processes (167) (11) (7)
  - A. Transport (141) (9) (5)
    - 1. Amino acids, amines (7)
    - 2. Anions (11)
    - 3. Carbohydrates, organic acids, alcohols (17)
    - 4. Cations (24)
    - 5. Nucleosides, purines, pyrimidines (0)
    - 6. Protein, peptide secretion (29)
    - 7. Other (53)
  - B. Cell division (25) (2) (1)
  - C. Chemotaxis and mobility (3) (0) (1)
  - D. Osmotic adaptation (0)
  - E. Cell killing (0)
- VI. Mobile genetic elements (144) (17) (8)
  - A. Phage-related functions and prophages (83) (10) (6)
  - B. Plasmid-related functions (52) (5) (1)
  - C. Transposon- and intron-related functions (9) (1) (1)
- VII. Pathogenicity, virulence, and adaptation (147) (17) (6)
  - A. Avirulence (0)
  - B. Hypersensitive response and pathogenicity (1)
  - C. Toxin production and detoxification (70) (5) (4)
  - D. Host cell wall degradation (6)
  - E. Exopolysaccharides (9) (0) (1)
  - F. Surface proteins (7) (0) (1)
  - G. Adaptation, atypical conditions (28) (2) (1)
  - H. Other (29) (5) (0)
- VIII. Hypothetical (1534) (117) (73)
  - A. Conserved hypothetical proteins (318) (29) (20)
  - B. Hypothetical proteins (includes no hits/only low score hits) (1216) (88) (53)
- IX. ORFs with undefined category (24)

Anotações no Banco de dados do Genoma da *X. fastidiosa* dos genes diferencialmente expressos mais discutidos (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>)

<p><b>Pil M:</b> Strongest similarity (e-110) to (gi 895925) (L28837) membrane protein [<i>Pseudomonas syringae</i>]</p>
<p><b>PilU:</b> Strongest similarity (7e-132) to <i>P. aeruginosa</i> twitching motility protein. Also similar (e-131) to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pilU protein (gi 2120641), which is required for twitching motility (but not phage sensitivity). This is a type 4 fimbriae (or pilli)</p>
<p><b>ChpA:</b> Strong similarity to several spp. chemotaxis-related protein kinase. Strongest similarity (e-164) to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ChpA, which is described as a chemotactic transduction gene (gi 3241969). Only the <i>P.aeruginosa</i> has a compatible size, but the similarity is restricted to the N-half of the molecules (<i>X.fastidiosa</i> and <i>P.aeruginosa</i>). Interestingly, the C-terminal portion of the <i>Xylella</i> orf is similar (4e-33) to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PilL protein (gi 3241968), also a chemotactic transduction gene.</p>
<p><b>vapD:</b> Similar to several spp. of cys regulon transcriptional activator (cysB). Strong similarity (3e-55) to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (gi 2072311) cysB and to <i>Haemophilus influenzae</i> (sp P45105) CYS REGULON TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR (3e-55). The comments to <i>Haemophilus influenzae</i> are: "[FUNCTION] THIS PROTEIN IS A POSITIVE REGULATOR OF GENE EXPRESSION FOR THE CYSTEINE REGULON. THE INDUCER FOR CYSB IS N-ACETYL SERINE (BY SIMILARITY). [SUBUNIT] HOMOTETRAMER (BY SIMILARITY). [SUBCELLULAR LOCATION] CYTOPLASMIC (BY SIMILARITY). [SIMILARITY] BELONGS TO THE LYSR FAMILY OF TRANSCRIPTIONAL REGULATORS."</p>
<p><b>RPFC:</b> Strongest similarity (0.0) to (sp P49246 RPFC_XANCP) SENSORY/REGULATORY PROTEIN RPFC of <i>Xanthomonas campestris</i> and to (emb CAA66459  (X97865) rpfC of <i>Xanthomonas oryzae</i>. This gene is one of a cluster of genes in <i>Xanthomonas campestris</i> involved in the regulation of exopolysaccharide and extracellular enzyme synthesis. Shows similarity to domains of sensor and regulator proteins of two-component regulatory systems (MEDLINE 91246116). Mutations in the <i>X. oryzae</i> protein result in reduction of exopolysaccharide synthesis only (MEDLINE PMID: 8810082, UI: 96405957)</p>
<p><b>ALGR:</b> Similar to many spp. alginate biosynthesis regulatory protein. Most similar (1e-45) to <i>Pseudomonas syringae</i> alginate biosynthesis regulatory protein AlgR1 (gi 4884829). In <i>Azotobacter vinelandii</i> this protein is essential for cyst formation (medline= 99084950). The <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (sp P26275, 3e-45) comments are: '[FUNCTION] POSITIVE REGULATOR OF THE ALGD GENE, WHICH CODES FOR A GDP-MANNOSE DEHYDROGENASE, A KEY STEP ENZYME IN THE ALGINATE BIOSYNTHESIS PATHWAY.[SIMILARITY] THE N-TERMINAL REGION IS SIMILAR TO THAT OF OTHER REGULATORY COMPONENTS OF SENSORY TRANSDUCTION SYSTEMS.'</p>
<p><b>ALGZ:</b> Similar to several sensor proteins from bacterial two-component regulatory systems . Most similar (2e-29) to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AlgZ (gi 1542971) which is involved in the (negative) control of alginate production</p>
<p><b>ColS:</b> All the BLASTp hits are partial matches. Strongest similarity (5e-40) to (gi 1729784 emb CAA70932  (Y09798)) <i>Pseudomonas fluorescens</i> ColS which is described as a sensor kinase of an OmpR-PhoB subclass two-component system (MEDLINE 98086878). There</p>

are BLAST hits to several two-component regulatory system sensor proteins. The COGnitor analysis included the translational product of this ORF in COG0642 (13) - Sensory transduction histidine kinases. The Pfam analysis determined a Histidine kinase motif (6.9e-33) from aa 256 to 454 and a Domain found in bacterial signal proteins (0.45) from aa 171 to 242 of the translational product of this ORF

**ColR:** Strongest similarity (2e-72) to *Pseudomonas fluorescens* ColR (gi|1729783|emb|CAA70931|Y09798)), which is described as a response regulator of an OmpR-PhoB two-component system (MEDLINE 98086878). The ColS/ColR two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* (MEDLINE 98086878). There are BLASTp hits to several two-component regulatory system response regulators. The COGnitor analysis included the translational product of this ORF in COG0745 (8) - Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a HTH DNA-binding domain. The Pfam analysis determined a Response regulator receiver domain (2.1e-35) from aa 5 to 117 and a Transcriptional regulatory protein, C terminal motif (7.3e-12) from aa 151 to 221 of the translational product of this ORF

**SSPB:** Strongest similarity (8e-27) to *Escherichia coli* stringent starvation protein B (sp|P25663|SSPB\_ECOLI). The comments for the E.coli protein are: [FUNCTION] SEEMS TO ACT IN CONCERT WITH SSPA IN THE REGULATION OF SEVERAL PROTEINS DURING EXPONENTIAL AND STATIONARY-PHASE GROWTH.THE EXACT FUNCTION OF SSPB IS NOT YET KNOWN.[INDUCTION] BY AMINO ACID STARVATION

**DNAK:** Strongest similarity (0.0) to (gi|3688231) *Coxiella burneti* heat shock protein (Hsp70), dnaK gene. Also similar to DnaK protein from several other organisms

**DNAJ:** Strongest similarity (e-110) to (sp|Q60004|) DNAJ PROTEIN from *Salmonella typhimurium*. [FUNCTION] INTERACTS WITH DNAK, TO DISASSEMBLE A PROTEIN COMPLEX AT THE PHAGE LAMBDA ORIGIN OF REPLICATION. STIMULATES, JOINTLY WITH GRPE, THE ATPASE ACTIVITY OF DNAK. [SUBUNIT] HOMODIMER (BY SIMILARITY). [INDUCTION] BY HEAT SHOCK UNDER THE CONTROL OF THE HTPR REGULATORY PROTEIN (BY SIMILARITY). [SIMILARITY] TO OTHER PROKARYOTIC DNAJ, AND TO EUKARYOTIC DNAJ-LIKE PROTEINS

**HTPG:** Strongest similarity (0.0) to *Escherichia coli* HTPG high temperature protein G (sp|P10413). Also similar (0.0) to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* HTPG high temperature protein G (sp|P54649). The E. coli comments are: '[FUNCTION] MOLECULAR CHAPERONE. HAS ATPASE ACTIVITY. [SIMILARITY] BELONGS TO THE HEAT SHOCK PROTEIN 90 FAMILY.'

**YBIL:** Strongest (0.0) similarity to E.coli tonB-dependent receptor (sp|P75780). >gi|3915413|sp|P75780|YBIL\_ECOLI PROBABLE TONB-DEPENDENT RECEPTOR YBIL PRECURSOR >gi|1787024 (AE000182) putative outer membrane receptor for iron transport [*Escherichia coli*]. TC# 9.14

**ToIC:** Strong similarity (3e-57) to (sp|P02930|) E.coli outer membrane protein TOLC precursor (TOLC\_ECOLI). The E.coli comments are: '[FUNCTION] REQUIRED FOR PROPER EXPRESSION OF OUTER MEMBRANE PROTEIN GENES SUCH AS OMPF, NMPC, PROTEIN 2, HEMOLYSIN, COLICIN V, OR COLICIN E1. MAY BE SPECIALIZED FOR SIGNAL SEQUENCE INDEPENDENT, EXTRACELLULAR SECRETION IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA. [SUBCELLULAR LOCATION] OUTER MEMBRANE. [SIMILARITY] BELONGS TO THE PRTF FAMILY OF SECRETION PROTEINS.' TC# 9.17.1.1 The Outer Membrane Factor (OMF) Family Proteins of the OMF family function in conjunction with a primary cytoplasmic membrane transporter of the MFS (TC #2.A.1), the ABC superfamily (TC #3.A.1) or the RND family (TC #2.A.6) as well as



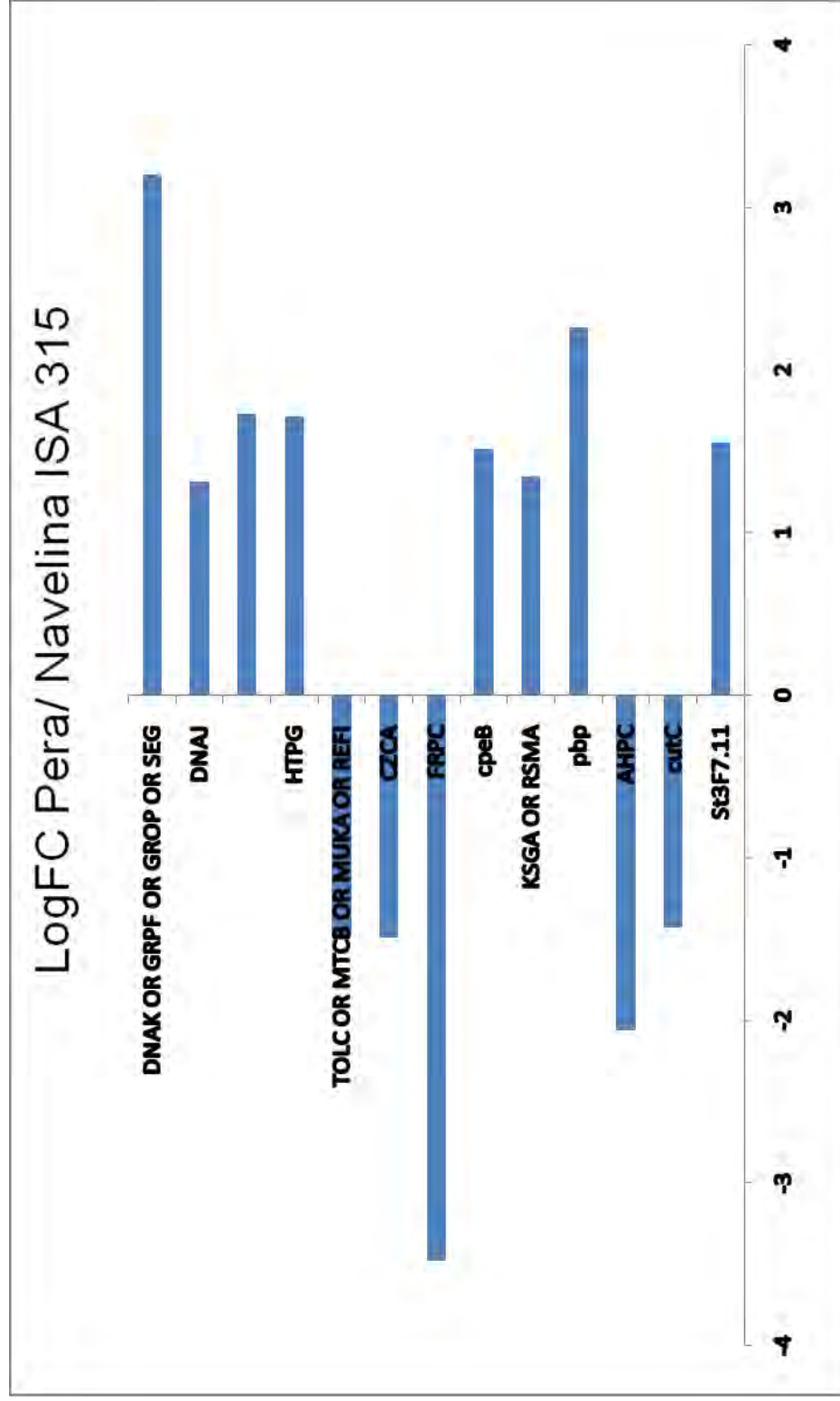
a membrane fusion protein (MFP; TC #98.1). The complex thus formed allows transport (export) of various solutes (heavy metal cations; drugs, oligosaccharides, proteins, etc.) across the two envelopes of the Gram-negative bacterial cell envelope in a single energy-coupled step

**SCJ21.16:** Strongest similarity (6e-37) to (gi|5708249) Streptomyces coelicolor A3 hypothetical protein SCJ21.22. Also similar (8e-07) to (gi|3242722) Arabidopsis thaliana putative acetone-cyanohydrin lyase. The (sp|P52704) comments are:[FUNCTION] INVOLVED IN CYANOGENESIS, THE RELEASE OF HCN FROM INJURED TISSUES. DECOMPOSES A VARIETIES OF (R) OR (S) CYNOHYDRINS INTO HCN AND THE CORRESPONDING ALDEHYDES AND KETONES. THE NATURAL SUBSTRATE OF THIS ENZYME IS (S)-ACETONE CYANOHYDRIN.[CATALYTIC ACTIVITY] (S)-2-HYDROXYISOBUTYRONITRILE = CYANIDE + ACETONE.[SUBUNIT] HOMODIMER.[SIMILARITY] DISTANT RELATIONSHIP WITH TYPE-B CARBOXYLESTERASE/LIPASE FAMILY

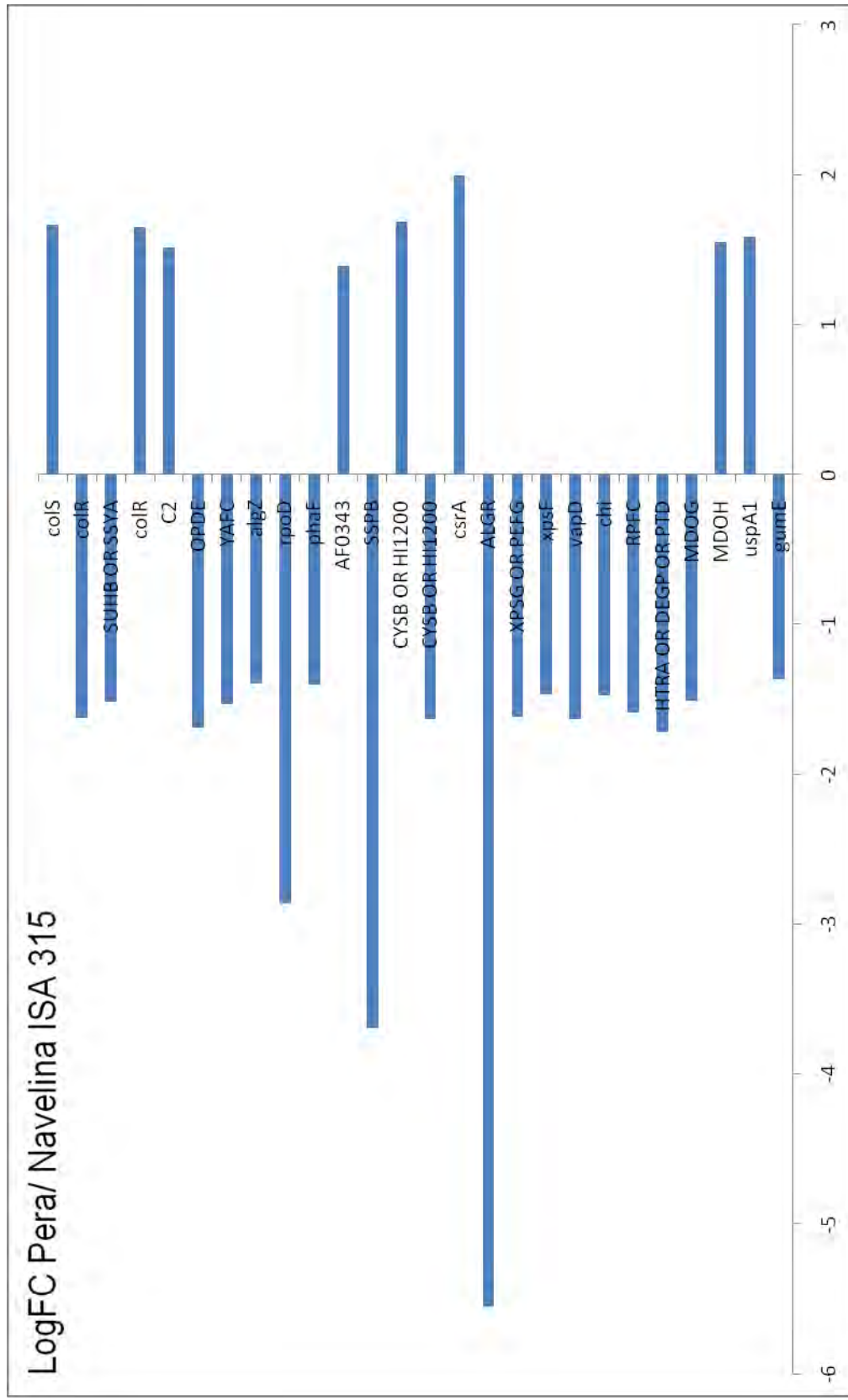
**MDOH:** Strongest similarity (e-107) to E.coli mdoH protein (sp|P33137), which is a osmoregulated periplasmic glucan biosynthesis protein (medline=95020533). The E.coli comments are:[FUNCTION] INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF PERIPLASMIC MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES (MDO). NECESSARY FOR NORMAL GLUCOSYL TRANSFERASE ACTIVITY. IT COULD BE A GLUCOSYL TRANSFERASE OR SIMPLY A SUBUNIT OF THIS ENZYME.[SUBCELLULAR LOCATION] INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN. INNER MEMBRANE.[SIMILARITY] STRONG, WITH P.SYRINGAE HRPM.'Also similar (e-107) to Pseudomonas syringae hrpM protein (sp|P20401) which is a transmembrane protein related to pathogenicity and whose comments are:[FUNCTION] PATHOGENICITY FACTOR. REQUIRED FOR BOTH THE EXPRESSION OF DISEASE SYMPTOMS ON HOST PLANTS AND THE DEVELOPMENT OF THE HYPERSENSITIVE REACTION ON NON-HOST PLANTS.[SIMILARITY] STRONG, WITH E.COLI MDOH

**MDOG:** Strongest similarity (2e-87) to (sp|P33136) E. coli PERIPLASMIC GLUCANS BIOSYNTHESIS PROTEIN MDOG PRECURSOR.[FUNCTION] INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF PERIPLASMIC MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES (MDO).[SUBCELLULAR LOCATION] PERIPLASMIC. [SIMILARITY] TO P.SYRINGAE HYPOTHETICAL 40 KD PROTEIN IN HRP LOCUS

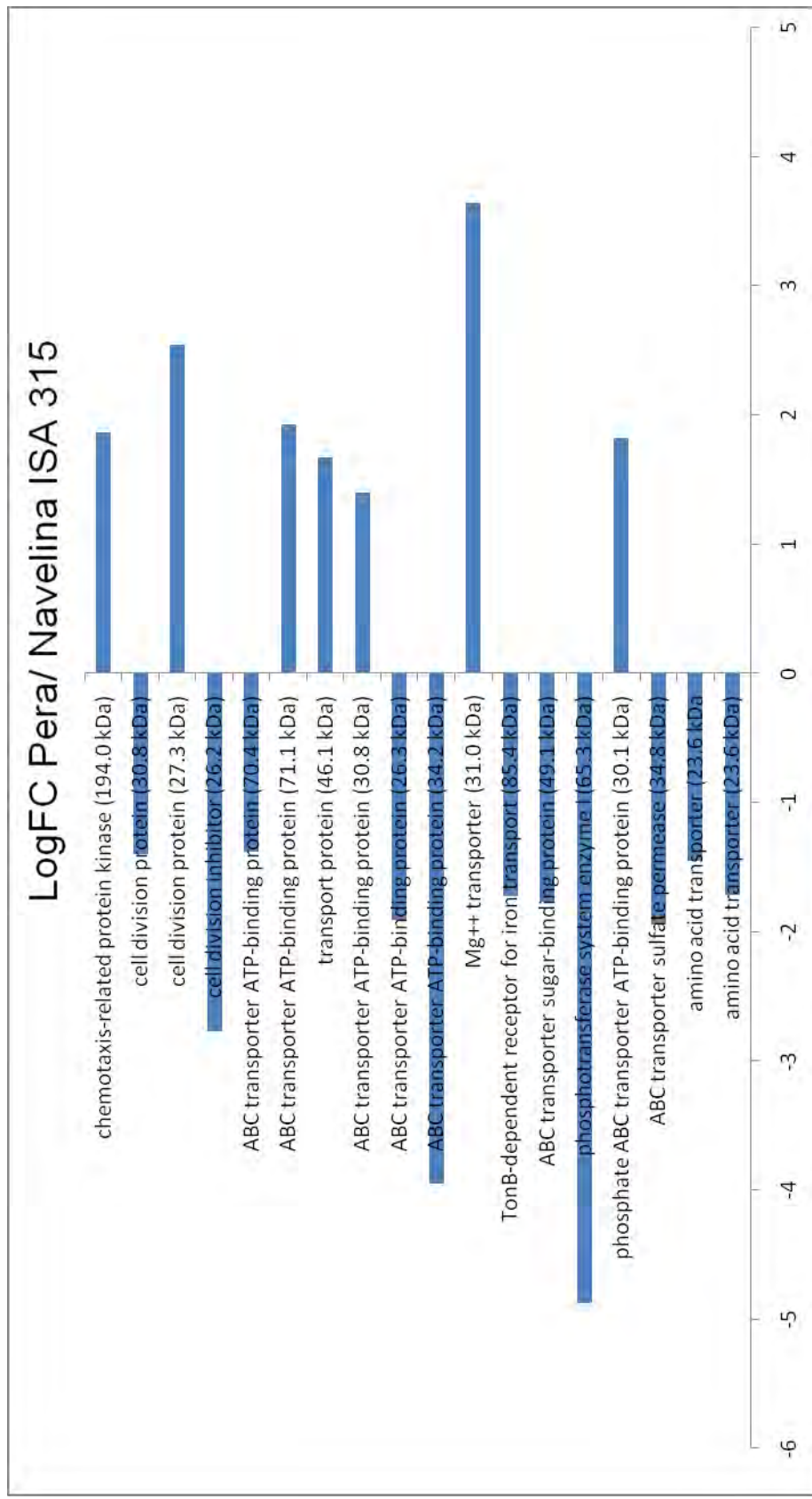
Gráficos apresentando a extensão de LogFC dos genes das distintas categorias nas variedades Pera (esquerda) e Navelina (direita)



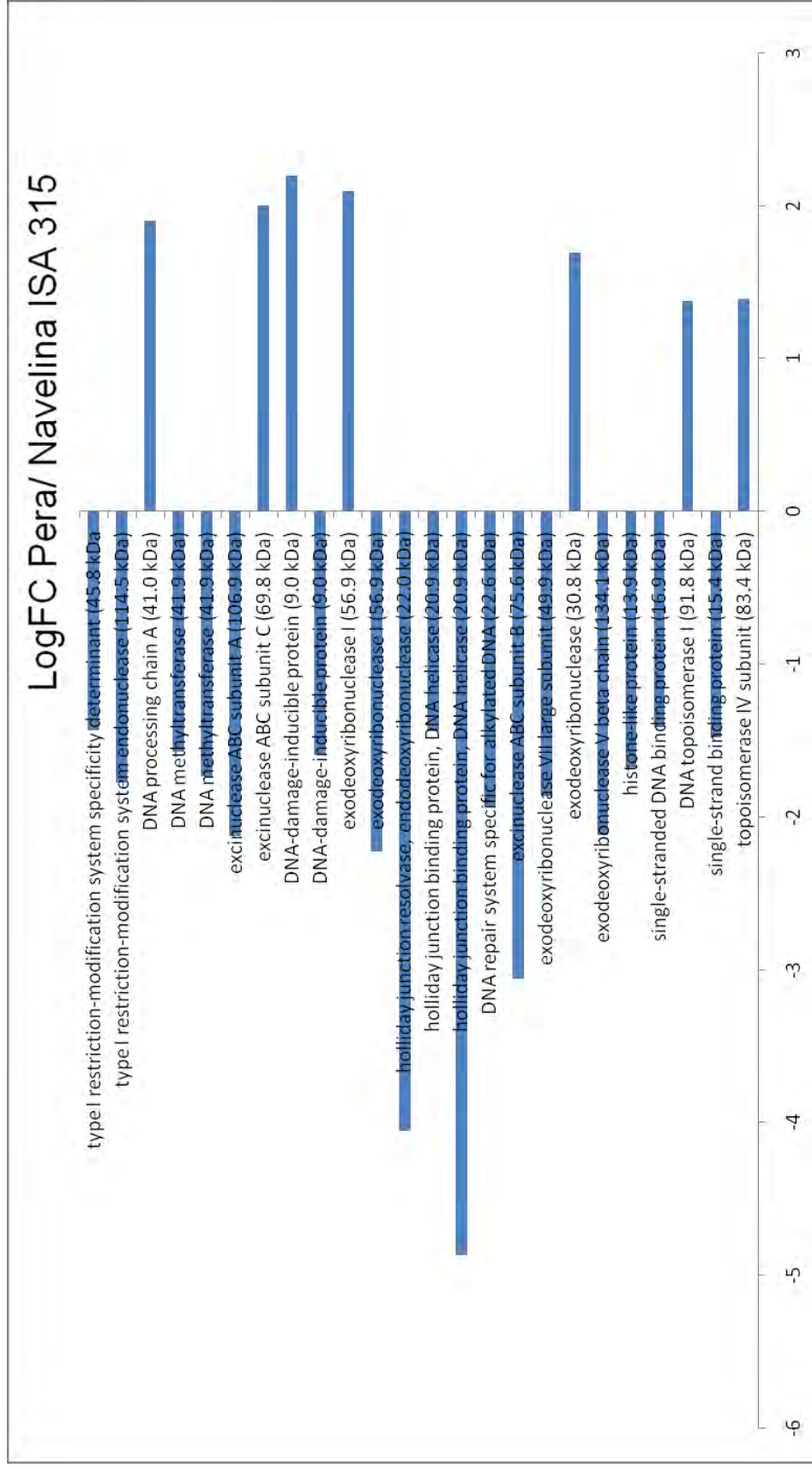
**Figura A1:** Extensão do Log FC dos genes (nome) das Categorias III.C.2: Metabolismo de macromoléculas/ metabolismo de proteínas/ Chaperonas; VII.C: Patogenicidade, virulência e adaptação/ produção de toxinas e detoxificação. Apresenta-se o nome dos genes no gráfico.



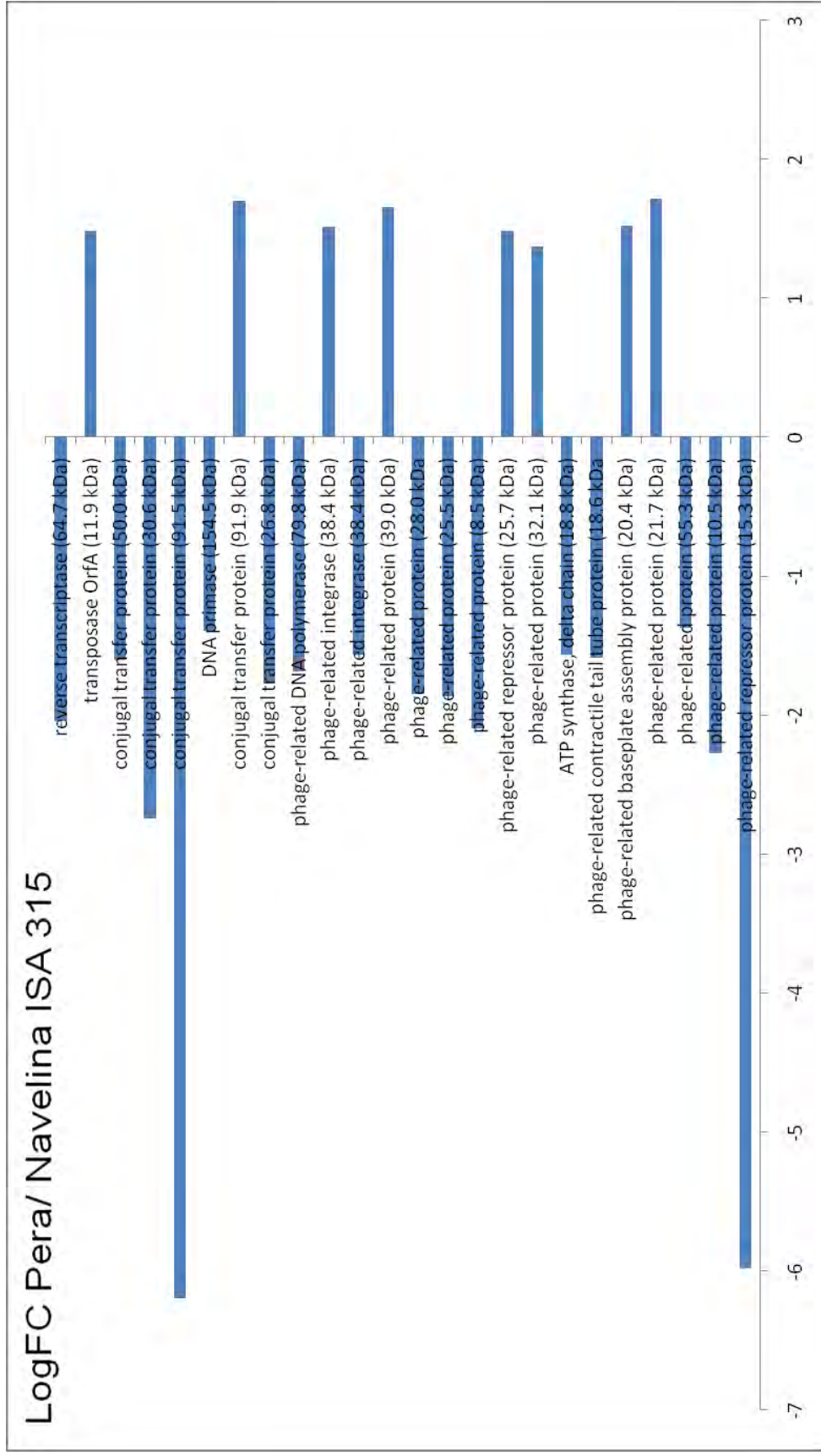
**Figura A2:** Extensão do Log FC dos genes das Categorias VII.E.F, G e H: Patogenicidade, virulência e adaptação/Exopolissacarídeos/Proteínas de superfície/Adaptação, condições atípicas/ Outros; I.D: Metabolismo Intermediário/ Funções regulatórias. Apresenta-se o nome dos genes no gráfico.



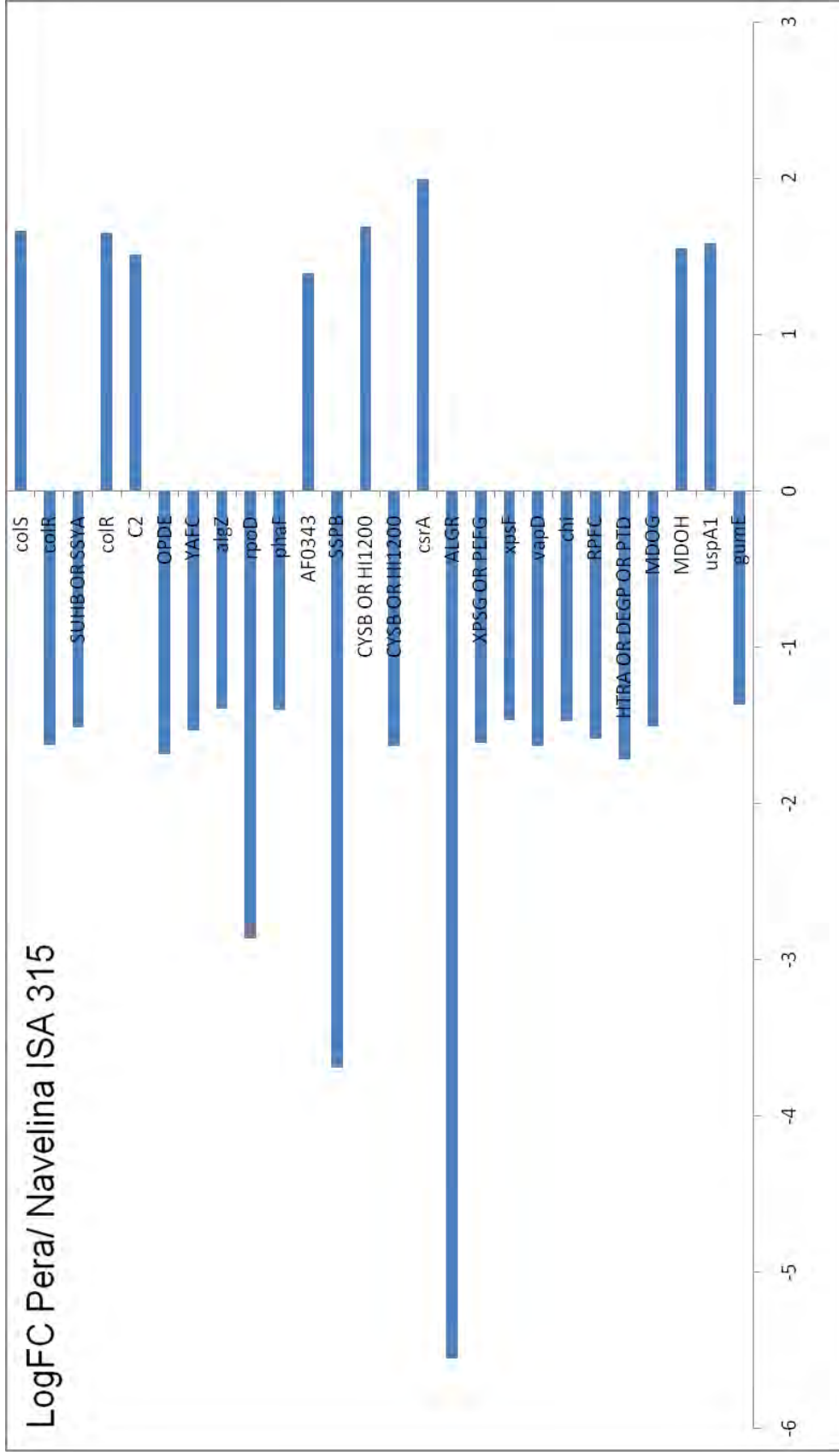
**Figura A3:** Extensão do Log FC dos genes das Categorias V.A: Processos celulares/ Transporte/ Divisão celular/ quimotáxis e mobilidade. Apresenta-se o nome do produto gênico no gráfico.



**Figura A4:** Extensão do Log FC dos genes das Categorias III. A1/A2/A4/A5: Metabolismo de Macromoléculas/ Metabolismo do DNA/ Replicação/Proteínas estruturais de união com o DNA/ Reparação/ Restrição, modificação. Apresenta-se o nome do produto gênico no gráfico.



**Figura A5:** Extensão do Log FC dos genes das Categorias VI.A/B/C: Elementos genéticos móveis / Funções relacionadas com fagos e profagos/ Funções relacionadas à plasmídeos/ Funções relacionadas com transposones e intrones. Apresenta-se o nome do produto gênico no gráfico.



**Figura A6:** Extensão do Log FC dos genes das Categorias I.A.2: Metabolismo intermediário/ Degradação de pequenas moléculas); III.C: Metabolismo de macromoléculas/ Proteínas/ Degradação; IV.A 1 e 2: Estrutura celular/ componentes de membrana/membrana interna/ externa; IV.B: Estrutura celular/ murein sacculus, peptidoglicano; IV.C: Estrutura celular/ polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos; IV.D: Estrutura celular/polissacarídeos de superfície; V.C: Processos celulares/ quemotaxis e mobilidade; IX: Outros. Apresenta-se o nome dos genes no gráfico.

