

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

**Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes *pthAs* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante**

**Tiago Rinaldi Jacob**  
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2009

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

**Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes *pthAs* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante**

**Tiago Rinaldi Jacob**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Inês Tiraboschi Ferro**

**Co-orientador: Prof. Dr Marcelo Luiz de Laia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2009

J15a Jacob, Tiago Rinaldi  
Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes *pthAs* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante / Tiago Rinaldi Jacob. — Jaboticabal, 2009  
xiii, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientador: Maria Inês Tiraboschi Ferro  
Banca examinadora: Marcelo Luiz de Laia, Leandro Marcio Moreira, Luiz Roberto Furlan  
Bibliografia

1. Cancro Citrico. 2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 3. Análise da Expressão Genica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.23:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Tiago Rinaldi Jacob** - Natural de Brodowski – SP, nascido aos 20 de dezembro de 1982. Concluiu o ensino médio em Janeiro de 2001 na Escola de Ensino Fundamental e Médio Carlos Chagas Filho - Anglo (Ribeirão Preto - SP). Em Janeiro de 2003, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), situada na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Desenvolveu projeto de iniciação científica junto à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia localizado no campus da UNESP de Jaboticabal. Atuou como professor de Biologia em curso pré-vestibular. Concluiu o curso de graduação em Janeiro de 2007. Atualmente, é aluno do curso de Mestrado, do programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), iniciado em março de 2007, e também atua como professor de Biologia e coordenador do Cursinho pré-vestibular “Ativo”.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Jesus Cristo, o maior de todos os profetas, por tudo que me proporcionou até hoje.

Aos meus incríveis e dedicados pais (Silvia Helena e José Jacob), familiares (Geny, Roberto, Aracy, Mário Sergio, etc) e minha prezada namorada (Tauana) pelo amor, atenção e carinho de todos os dias.

A professora Dra. Maria Inês T. Ferro (Orientadora) e ao professor Dr. Jesus Aparecido Ferro pelo apoio, ajuda e disponibilização das instalações do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Luiz de Laia pela excepcional e excelente co-orientação.

Ao amigo Julio Cesar Bortolossi por todo o coleguismo e apoio.

Aos demais companheiros do LBM (Flávia, André “Splinter”, Dr. Roberto Luiz Furlan, Rafael Marine, Fabricio, Dani, Renata, Karina, Elaine, Cristiano, Vanessa Morgam, Leonardo “Biela”, Arthur, Flavinha, Andréia, Joice, Rafael Heck, Agda, Gisele, Juliana Vantini, Gustavo “Gordo”, etc).

Aos demais amigos: Paulo Ramiro (Função), Umberto Baldan ( $\pi$ -niku), Jaqueline (Scopeta), Jaqueline (Lombada), Juliana (Lolita), Melina (Muskita), Adriana (Turka), Viviane (Vandinha), Fernanda (Ponta), Thaila (Pocahontas), Zeitoum, Luana (Rapunzel), Daniela (Mi-lambi), Gustavo (Urubu), Pedro Henrique (pH), Leonardo (piranã), Thiago (Bean), Rafael (Panguão), Fábio (Girafa), Diogo (Mormaço), Davi (Giló), Juliana (Gosminha), Renan (Bosta), Fernando (Abscesso), Walter (Bodinho), Eduardo (Pexe), Mariane, Dayuna, Erick (Samurai) e todos os demais que de alguma forma fizeram parte dos momentos de alegria e estudo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS. ....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO E O CANCRO CÍTRICO.....	3
2.2. SISTEMAS DE SECREÇÃO DE MACROMOLÉCULAS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE .....	7
2.3. AS INTERAÇÕES PLANTA-PATÓGENO .....	10
2.4. O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III (SSTT) .....	13
2.5. O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO IV (SSTQ).....	18
2.6. OS GENES <i>PTHAS</i> .....	20
2.7. A TÉCNICA DE QRT-PCR.....	22
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. ISOLADO BACTERIANO, MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	27
4.2. INOCULAÇÃO E EXTRAÇÃO DAS CÉLULAS BACTERIANAS DE FOLHAS DE LARANJEIRA.....	27
4.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE XCC .....	29
4.4. DESENHOS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	29
4.5. SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS E CONFECÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	31
4.6. SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE cDNA E REAÇÕES DE QRT-PCR .....	33
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>34</b>
5.1. EXTRAÇÕES DE RNA.....	34
5.2. ANÁLISES PARA DETERMINAÇÃO DOS GENES MAIS ESTÁVEIS .....	34
5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DO SSTT .....	38
5.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DO SSTQ.....	50
5.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ORFs HIPOTÉTICAS LOCALIZADAS .....	54
5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES <i>PTHAS</i> .....	57
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1 – Detalhes dos genes candidatos a melhores genes de referência e suas respectivas funções.....	32
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR, respectivas ORFs e o tamanho dos produtos amplificados.....	33

## LISTA DE FIGURAS

Página

<p>Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o flagelo polar de Xcc. Fonte: Elliot Watanabe Kitajima, NAP-NEPA-Esalq-USP.....</p> <p>Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de Xcc na superfície abaxial da folha (A). Folhas com lesões circundadas por anel clorótico (B). Microscopia eletrônica de varredura mostrando a erupção do mesófilo infectado (C). Crescimento da lesão resultando em aspecto corticoso em folhas (D). Fonte: www.fundecitrus.com.br. ....</p> <p>Figura 3: Lesões típicas de Cancro Cítrico em ramos (A) e frutos (B). Fonte: www.fundecitrus.com.br.....</p> <p>Figura 4: Principais sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas. Tipo I, exemplo de secreção de hemolisinas em <i>Escherichia coli</i>. Tipo V, montagem do P-pili em <i>E. coli</i>. Tipo II, secreção de pululanase por <i>Klebsiella axytoca</i>. Tipos III e IV, para a secreção de proteínas em Xcc. C: meio intracelular bacteriano. MI: membrana interna bacteriana. P: espaço periplasmático. ME: membrana externa. E: espaço extracelular bacteriano (REMAUT &amp; WAKSMAN 2004). ....</p> <p>Figura 5: Mapa gênico do agrupamento hrp de Xcc.....</p> <p>Figura 6: (a) Estrutura da proteína AvrBs3 de Xcv. Seu domínio central é composto por aproximadamente 17,5 repetições praticamente idênticas, cada uma com 102 pares de bases (codificando 34 aminoácidos). (b) Modelo proposto do mecanismo de virulência e avirulência da proteína AvrBs3 que é translocada para dentro da célula hospedeira através do SSTT.....</p> <p>Figura 7: Representação do aparato do sistema de secreção do tipo III. O complexo protéico atravessa a membrana e a parede do patógeno, formando um longo pilus bacteriano que projeta-se no espaço intercelular e penetra na célula hospedeira. Proteínas efetoras são translocadas para o citoplasma da célula vegetal por este aparato. Fonte da Figura: www.kegg.com, com modificações.....</p> <p>Figura 8: Representação do aparato do sistema de secreção do tipo IV. Fonte da Figura: www.kegg.com.....</p> <p>Figura 9: Inoculação de Xcc em folhas de laranjeira Pêra através da técnica de infiltração e recuperação das bactérias por exudação três dias após a inoculação.....</p> <p>Figura 10: Estabilidade de 10 genes candidatos a melhores genes de referência em experimentos com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> segundo o programa geNorm (geNorm Software). Os genes que sofrem a menor interferência experimental são aqueles com o menor valor M (eixo</p>	<p><b>3</b></p> <p><b>4</b></p> <p><b>5</b></p> <p><b>8</b></p> <p><b>11</b></p> <p><b>13</b></p> <p><b>15</b></p> <p><b>19</b></p> <p><b>29</b></p>
---	--

“y”.....	<b>35</b>
Figura 11: Estabilidade de 10 genes candidatos a melhores genes de referência em experimentos com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> segundo o programa NormFinder (NormFinder Software). Os genes que sofrem a menor interferência experimental são aqueles com o menor valor “variability” (eixo “y”).....	<b>36</b>
Figura 12: Expressão gênica relativa de genes do SSTT de <i>Xcc</i> cultivada em planta (folhas de laranja Pêra) e em meio de cultura (NA).....	<b>39</b>
Figura 13: Modelo da regulação gênica do agrupamento <i>hrp</i> em <i>Xcv</i> . Fonte da figura: Buttner e Bonas [17], com modificações.....	<b>41</b>
Figura 14: Expressão gênica relativa de genes do SSTT de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> cultivada em folhas de laranja pêra e em meio de cultura.....	<b>43</b>
Figura 15: Comparação da taxa de expressão do gene <i>hrpB4</i> no isolado 306 (selvagem) de <i>Xcc</i> cultivado em planta e meio de cultura, com sua taxa de expressão no mutante <i>hrpB4-</i> cultivado em meio indutor de patogenicidade (XVM2).....	<b>44</b>
Figura 16: Comparação da taxa de expressão do gene <i>hrpXct</i> no isolado 306 (selvagem) de <i>Xcc</i> cultivado em planta e meio de cultura, com sua taxa de expressão no mutante <i>hrpXct-</i> cultivado em meio indutor de patogenicidade (XVM2).....	<b>45</b>
Figura 17: Expressão gênica relativa de genes do SSTT de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.....	<b>47</b>
Figura 18: Localização, no mapa genômico, dos genes <i>vir</i> que compõem o SSTQ, localizados no cromossomo principal de <i>Xcc</i> .....	<b>50</b>
Figura 19: Localização, no mapa genômico, dos genes <i>vir</i> que compõem o SSTQ, localizados no plasmídeo pXac64 de <i>Xcc</i> .....	<b>50</b>
Figura 20: Expressão gênica relativa de genes do SSTQ de <i>Xcc</i> cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.....	<b>52</b>
Figura 21: Expressão gênica relativa de genes do SSTQ de <i>Xcc</i> cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.....	<b>53</b>
Figura 22: Localização, no mapa genômico, dos genes <i>vir</i> que compõem o SSTQ (cor vermelha) e das ORFs hipotéticas (cor verde), ambos localizados no cromossomo principal de <i>Xcc</i> .....	<b>54</b>
Figura 23: Expressão gênica relativa de ORFs hipotéticas localizadas no cromossomo principal de <i>Xcc</i> cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.....	<b>55</b>
Figura 24: Localização, no mapa genômico, dos genes <i>vir</i> que compõem o SSTQ (cor vermelha) e das ORFs hipotéticas (cor verde), analisadas neste experimento, ambos localizados no plasmídeo pXac64 de	

Xcc.....	<b>56</b>
Figura 25: Expressão gênica relativa de ORFs hipotéticas localizadas no plasmídeo pXac64 de Xcc cultivada em folhas de laranjeira Pêra e em meio de cultura.....	<b>57</b>
Figura 26: Expressão gênica relativa dos genes pthAs de Xcc cultivada em folhas de laranjeira Pêra e em meio de cultura.....	<b>58</b>

## **Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes *pthAs* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante**

**RESUMO** - A citricultura é uma atividade agro-industrial de suma importância para o Estado de São Paulo e para o Brasil. Com uma área plantada em torno de aproximadamente 1 milhão de hectares o país mantém a posição de maior produtor mundial de citros. Desse total, 77% encontram-se localizados na região Sudeste. O sistema citrícola representa 4,47% das exportações de produtos do agronegócio nacional, sendo que o suco de laranja concentrado representa 72% do valor dessas exportações. Entretanto, todo este potencial econômico vem sendo prejudicado por várias doenças dentre elas uma denominada Cancro Cítrico, a qual é causada por um fitopatógeno bacteriano denominado *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). Com o objetivo de analisar os feitos da interação entre essa bactéria e seu hospedeiro natural, utilizou-se a técnica de Análise da Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR) para quantificar a expressão dos genes que compõem o SSTT, SSTQ, algumas ORFs hipotéticas e as quatro cópias do gene *pthA*. Para tanto, realizou-se um estudo prévio com 10 genes candidatos visando identificar os mais adequados para serem usados como genes de referência no processo de normalização de dados em experimentos dessa natureza. O experimento contou com quatro replicatas biológicas e duas replicatas técnicas. Com base nos resultados, verificou-se que os genes *rpoB* e *rpoC* parecem ser os mais indicados para a normalização de dados em experimentos de expressão gênica por qRT-PCR que envolvam análises intergrupos. A maioria dos genes que compõem o SSTT se mostraram induzidos quando a bactéria esteve em contato com seu hospedeiro, com destaque para os genes *hrpXct* e *hrpB4*, o que sugere que este sistema tenha um importante papel na patogenicidade dessa bactéria. Por outro lado, os resultados e o estudo da expressão gênica evidenciaram que ao contrario do que ocorre em outros fitopatógenos, o SSTQ parece não ser essencial para

o processo de infecção por Xcc. Por fim, apesar de duas das quatro cópias dos genes *pthAs* terem tido a expressão estimulada pelo contato com o hospedeiro, ficou clara a importância de inativar cada uma dessas cópias no processo de infecção por Xcc.

**Palavras-chave:** Análise da Expressão Gênica, Cancro Cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, qRT-PCR.

**Gene expression analysis of Type III and Type IV secretory system and *pthAs* genes in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under infective and non infective conditions**

**SUMMARY** - The citrus is an agro-industrial activity of great importance for the State of São Paulo and Brazil. With a planted area around 1 million hectares the country maintains its position of world's leading producer of citrus. Of these, 77% are located in the Southeast. The citrus system represents 4.47% of national agribusiness exportation, being the orange juice concentrate responsible for 72% of the value of these exports. However, all this economic potential is being hampered by diseases among them one called citrus canker, which is caused by a phytopathogenic bacterium known as *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). With the aim of analyzing the achievements of the interaction between this bacterium and its natural host, we used the technique of Real-Time Reverse Transcription Analysis (qRT-PCR) to quantify the expression of genes that comprise the SSTT, SSTQ, some hypothetical ORFs and the four copies of the gene *pthA*. Thus, a preliminary study with 10 candidate genes were conducted to identify the most suitable ones for use as reference in the process of data standardization in such experiments. The experiment had four biological replicates and two technical replicates. Based on the results, it was found that the *rpoB* and *rpoC* genes seem to be the most suitable for the standardization of data in experiments of gene expression by qRT-PCR analysis involving intergroup. Most of the genes that comprise the SSTT was induced when the bacterium was in contact with its host, with emphasis on the genes *hrpXct* and *hrpB4*, suggesting that this system has an important

role in the pathogenicity of this bacterium. Results and the study of gene expression showed that contrary to what occurs in other pathogens, the SSTQ doesn't seem to be essential to the process of infection by Xcc. Finally, although two of the four copies of the genes pthAs had its expression stimulated by contact with the host, it was clear the importance to inactivate each of these copies in the process of infection by Xcc.

**Keywords:** Analysis of Gene Expression, Citrus Canker, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, qRT-PCR.

## I. INTRODUÇÃO

A história da citricultura brasileira tem seu início por volta dos anos 30 e 40 do século XVI quando os colonizadores portugueses introduziram as primeiras sementes de laranja doce no nordeste do país. Desde então o Brasil vem sendo reconhecido como local de produção de frutos de excelente qualidade. Entretanto, somente após os anos 30 do século passado é que a citricultura tornou-se um dos setores mais importantes de nossa economia (EMBRAPA 2008).

O suco é o produto mais apreciado e consumido da laranja, sendo que grande parte da safra nacional destina-se à produção de suco concentrado. Além de poder ser consumido diretamente pela população, ele também pode ser utilizado na fabricação de refrigerantes e refrescos em pó instantâneos. A casca da laranja contém uma essência oleosa e muito inflamável que pode ser utilizada na preparação de geleias e licores. O óleo das flores e folhas é utilizado na fabricação de perfumes, essências e chás, enquanto que o bagaço da laranja é empregado na produção de ração para o gado (COROL 2008).

Atualmente, o Brasil mantém a posição de maior produtor mundial de laranjas, com uma área cultivada de aproximadamente 1 milhão de hectares, 77% dos quais estão na região Sudeste. A laranja representa 49% de toda a produção brasileira de frutas e o agronegócio citrícola brasileiro movimentou capital ao redor de R\$ 5 bilhões por ano, gerando cerca de 400 mil empregos diretos e outros 3 milhões indiretamente (FUNDECITRUS 2008).

Entretanto, todo este potencial econômico da citricultura nacional vem sendo prejudicado por uma vasta gama de doenças que podem ser causadas por: fungos, como por exemplo no Estiolamento (“damping-off”), Gomose, Rubelose, Cancro do tronco do limão Tahiti, Verrugose, Melanose, Pinta preta, Estrelinha ou queda de frutos jovens; por vírus, como por exemplo na Leprose, Tristeza, Sorose, Exocorte, Cachexia (Xiloporose); e, também, por bactérias, como por exemplo no Amarelinho ou Clorose Variegada dos Citros (CVC), Greening e o Cancro Cítrico sendo esta última uma das

mais perversas doenças que atinge a citricultura nacional (EMBRAPA 2008).

Devido ao fato de ainda não existir uma maneira que combata o Cancro Cítrico de forma eficiente e economicamente viável, atualmente, várias metodologias que buscam a solução deste problema vem sendo desenvolvidas. Dentre as diversas ferramentas que podem ser usadas para este fim a genômica funcional passou a ser um instrumento de grande serventia. Com a publicação do sequenciamento completo do genoma do agente causador (*Xanthomas citri* subsp. *citri* - Xcc) desta doença no ano de 2002 (DA SILVA et al. 2002), tornou-se possível a utilização de diversas técnicas para o estudo da expressão gênica em Xcc. Neste sentido, fazendo-se o uso da Análise da Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR), este trabalho teve por objetivo analisar as taxas de expressão de diversos genes tidos como importantes para o processo de patogenicidade do agente causador do cancro cítrico.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Agente etiológico e o Cancro Cítrico

O cancro cítrico é causado por uma bactéria aeróbica, gram negativa, monotriquia, em forma de bastonete, medindo entre 0,2 e 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,8 e 2,9  $\mu\text{m}$  de comprimento (MOREIRA et al. 2005) (Figura 1) chamada *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), que forma colônias amarelas e mucoides em meios de cultura artificiais (WHITESIDE et al. 1988), resultado da produção de xantomadina (JENKINS & STARR 1985). Esta doença, com alto poder destrutivo em regiões citrícolas, ocorre em diversas regiões do mundo, como a América do Sul, Japão, África, Estados Unidos, dentre outras (GOTO et al. 1992), ocasionando inúmeros prejuízos e reduzindo drasticamente a produção (FUNDECITRUS 2008).

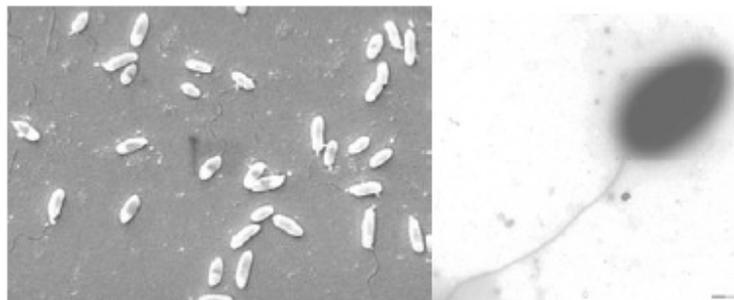


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o flagelo polar de Xcc. Fonte: Elliot Watanabe Kitajima, NAP-NEPA-Esalq-USP.

A bactéria causadora do cancro espalha-se de forma muito fácil, podendo ser levada de um lugar para o outro nos equipamentos de colheita, em veículos, máquinas, pelo vento, quando associado com chuvas e também através de mudas contaminadas. Xcc instala-se no espaço intercelular após adentrar no tecido vegetal por meio de estômatos, hidatódios ou ferimentos, lançando mão, na sequência, de seu arsenal de ataque (grupo específico de genes) à planta hospedeira, possibilitando o seu estabelecimento e consequente doença, levando a indução dos sintomas. A

temperatura ótima para infecção varia entre 20°C e 30°C (KOIZUMI 1977). Estando no mesófilo foliar do hospedeiro, Xcc multiplica-se nos espaços intercelulares e produz abundante polissacarídeo extracelular, principalmente goma xantana. Sob condições favoráveis, as células podem emergir das aberturas dos estômatos em menos de cinco dias após a infecção (Figura 2A). A diminuição dos espaços intercelulares e o acúmulo de goma resultam em um aspecto de encharcamento no tecido infectado. A água do xilema é aprisionada devido ao alto potencial higroscópico da goma, pequenas bolhas amarelas salientes aparecem devido à hiperplasia induzida no vegetal, tipicamente visíveis em ambos os lados das folhas, sintoma este exclusivo do cancro cítrico e que ajuda na identificação da doença. À medida que as lesões envelhecem, tornam-se escuras, adquirindo uma tonalidade marrom. O sintoma de encharcamento aparece frequentemente circundado por um halo clorótico (Figura 2B) devido ao decréscimo da produção das clorofilas a e b, caroteno e xantofila nessas regiões (PADMANABHAN et al. 1974). Esse sintoma desaparece com o envelhecimento da lesão, cujo centro torna-se elevado com aspecto esponjoso ou corticoso (Figuras 2C e 2D) proporcionando um inóculo para a transmissão futura da bactéria em outros tecidos e plantas. A cancriose também pode ser observada em ramos e frutos (AMARAL 2003), que, quando da incidência da doença, se desprendem da planta antes do amadurecimento.

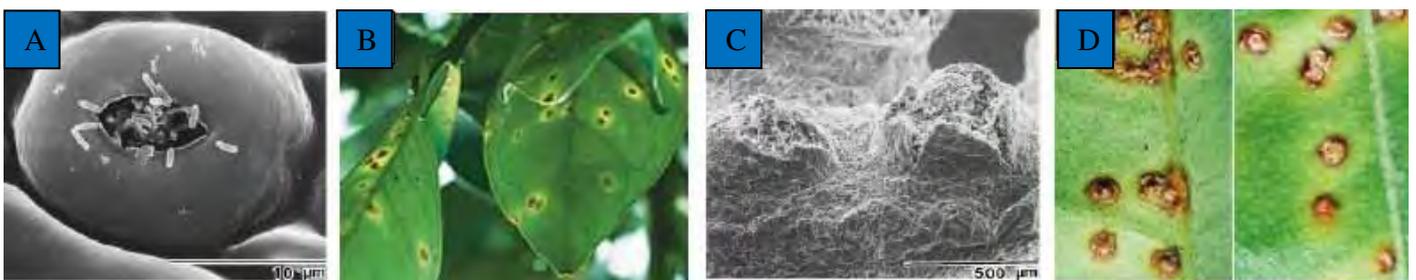


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de Xcc na superfície abaxial da folha (A). Folhas com lesões circundadas por anel clorótico (B). Microscopia eletrônica de varredura mostrando a erupção do mesófilo infectado (C). Crescimento da lesão resultando em aspecto corticoso em folhas (D). Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br).

Dentre os agentes propagadores do cancro cítrico, a larva minadora dos citros,

*Phyllocnistis citrella*, após eclodir do ovo depositado sobre a folha, ao iniciar sua alimentação, forma galerias nas superfícies das folhas, potencializando a incidência dessa doença, bem como a disseminação do patógeno (FUNDECITRUS 2008).

Os sintomas do cancro em si não constituem o maior problema ocasionado pela doença, pois raramente mata a planta. Todavia, devido ao estresse biótico, a planta responde produzindo diversas substâncias, dentre elas o etileno, que ocasiona um desequilíbrio hormonal (CROZIER et al. 2001) no vegetal. Desta forma, além dos sintomas típicos da cancrose, o excesso desse hormônio induz a queda prematura de frutos, que por não estarem suficientemente maduros, tornam-se inaproveitáveis para a produção de suco, para o consumo *in natura* e para todos os demais usos comerciais realizados com a laranja (BROWN 2001).

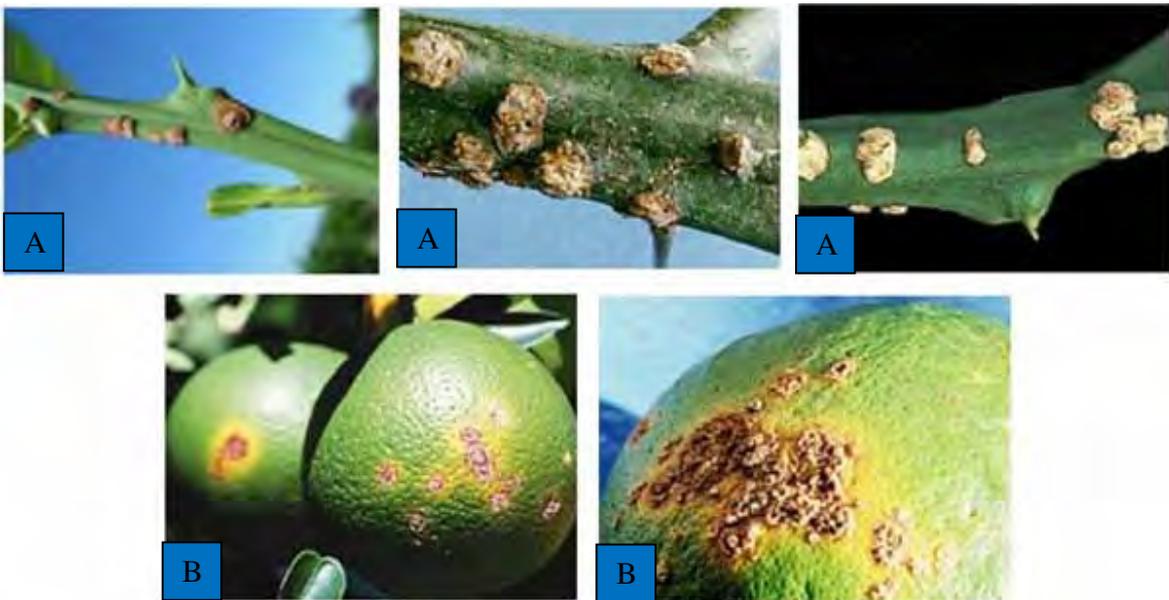


Figura 3: Lesões típicas de Cancro Cítrico em ramos (A) e frutos (B). Fonte: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br).

Na tentativa de controlar a incidência da doença, anualmente são realizadas inspeções urbanas e rurais, que tem como finalidade a detecção e eliminação de

possíveis plantas contaminadas. No ano de 2008, mais de 100 mil talhões e pomares não comerciais foram erradicados, sendo registrados mais de 100 novos casos e aproximadamente 300 ressurgências de cancrose cítrica na zona rural do estado de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro. Já a chamada inspeção urbana, que tem por finalidade a verificação de cancrose em plantas situadas nas áreas urbanas, registrou 4.327 plantas contaminadas e promoveu a erradicação de mais de 10.000 plantas (FUNDECITRUS 2008). Portanto, o cancro cítrico é uma importante doença, não só devido ao seu poder devastador, mas, também, devido à falta de um método que o controle de maneira eficaz e economicamente viável.

Devido aos vultuosos prejuízos causados pelo agente etiológico do Cancro Cítrico, várias foram as tentativas de se descobrir maneiras ou métodos eficazes para o controle da doença. Um marco importante na busca por soluções foi o sequenciamento completo do genoma de Xcc (DA SILVA et al. 2002) que trouxe possibilidades de se implementar estratégias de análise genômica funcional, o que desencadeou a busca por genes alvos que proporcionem o conhecimento do conjunto gênico utilizado por essa fitobactéria para causar a doença Cancro Cítrico.

Após o sequenciamento do genoma, descobriu-se que Xcc possui um cromossomo circular de 5,1 Mb e dois plasmídeos, pXac64 (64Kb) e pXac33 (33Kb). Foram identificados 4.318 possíveis regiões codificantes (“open reading frames”, ORFs), das quais, 2.710 ORFs possuem homologia com proteínas já conhecidas, 1.272 apresentaram homologias com proteínas de função desconhecida (proteínas conservadas hipotéticas) e 331 não apresentaram nenhuma homologia com as proteínas existentes nos bancos de dados públicos.

Comparações, em escala genômica, de patógenos de animais e plantas identificaram a presença de sistemas conservados para a exportação de proteínas de virulência (como os genes *hrp* - “hypersensitive response and pathogenicity”), mecanismos associados à virulência para a obtenção de ferro e estratégias de patogênese. Das proteínas de Xcc, muitas estão associadas à patogenicidade, virulência e adaptação, tais como: proteínas de virulência AvrBs3, que estão relacionadas ao Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) e a resposta de

hipersensibilidade (HpaA, Hrp e Hrc); as proteínas relacionadas ao Sistema de Secreção do Tipo IV; proteínas associadas à degradação da parede celular do hospedeiro; enzimas envolvidas na síntese de exopolissacarídeos; mais de cem proteínas possivelmente envolvidas na produção de toxinas e destoxificação; proteínas de superfície de membrana; proteínas envolvidas em mecanismos de adaptação à condições atípicas (como as proteínas de choque térmico e vias de transdução de sinais); além de duas cópias de genes que codificam para proteínas do Sistema de Secreção do Tipo II e proteínas envolvidas na secreção de enzimas extracelulares.

## **2.2. Sistemas de secreção de macromoléculas envolvidos na patogênese**

Os fitopatógenos Gram-negativos podem realizar a colonização de seus hospedeiros através de vários sistemas. Enquanto alguns fitopatógenos secretam enzimas para que ocorra a maceração e a necrose do tecido vegetal hospedeiro, como por exemplo, *Erwinia carotovora* (patógeno de batata e tabaco) e *Erwinia amylovora* (patógeno de Rosáceas, maçã e pera), há outros fitopatógenos que utilizam a secreção de macromoléculas, principalmente proteínas (por exemplo, *Pseudomonas*) e em alguns casos, complexos núcleo-proteicos para dentro da célula hospedeira (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens*).

Em se tratando da secreção de proteínas, é necessário que estas atravessem as duas membranas bacterianas até atingir a célula hospedeira. Os sistemas, mais conhecidos, que as bactérias usam para realizar esta tarefa, podem ser divididos em cinco grupos (Tipos I a V), que podem ser agrupados em Sec-dependentes (Tipos II e V), Sec-independentes (Tipos I e III), ou ainda conter vias que podem ser Sec-dependentes ou independentes (Tipo IV) (Figura 4).

Os sistemas Sec-dependentes envolvem um complexo de proteínas Sec que catalisa a translocação de proteínas através da membrana interna para o espaço periplasmático através do reconhecimento de um peptídeo de sinalização localizado na porção N-terminal. Por outro lado, nos Sec-independentes, os próprios constituintes do

complexo de secreção encaminham os substratos para o meio externo (DUONG & WICKNER 1997; REMAUT & WAKSMAN 2004).

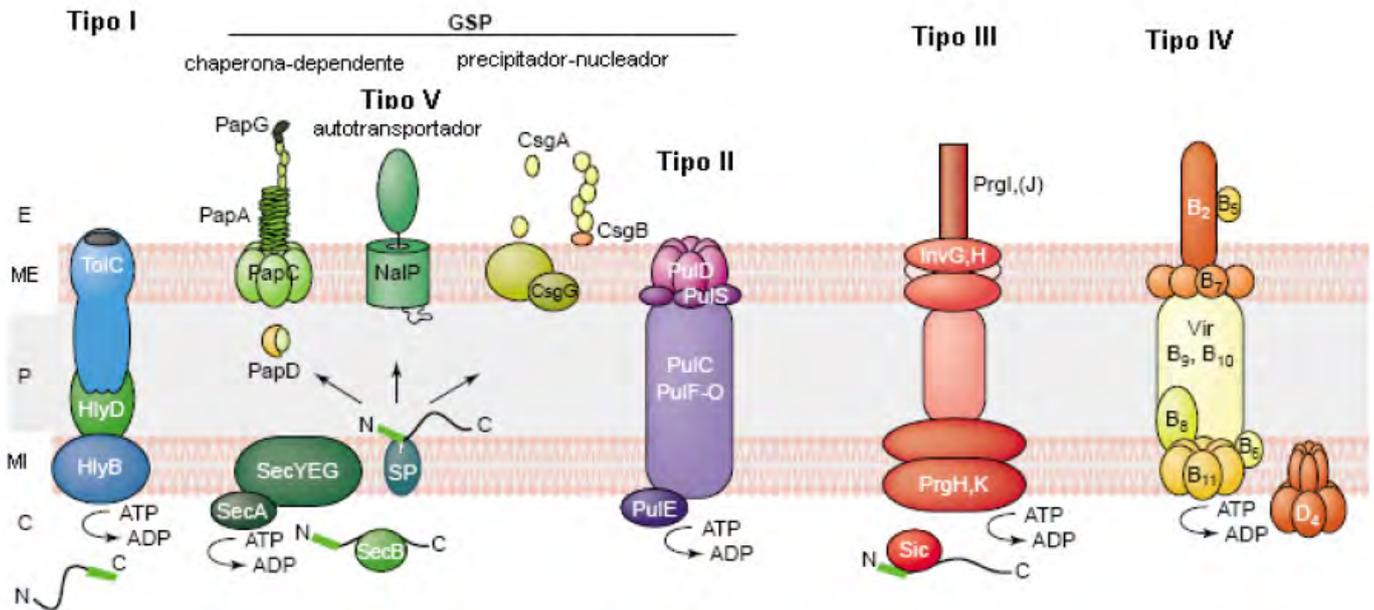


Figura 4: Principais sistemas de secreção de bactérias Gram-negativas. Tipo I, exemplo de secreção de hemolisinas em *Escherichia coli*. Tipo V, montagem do P-pili em *E. coli*. Tipo II, secreção de pululanase por *Klebsiella axytoca*. Tipos III e IV, para a secreção de proteínas em *Xcc*. C: meio intracelular bacteriano. MI: membrana interna bacteriana. P: espaço periplasmático. ME: membrana externa. E: espaço extracelular bacteriano (REMAUT & WAKSMAN 2004).

O Sistema de secreção do tipo I, constituído pelas proteínas HlyD, HlyB e TolC, é conhecido por secretar toxinas, proteases e lipases, sendo responsável pelo transporte de proteínas diretamente do citoplasma para o meio extracelular. O principal exemplo é o sistema de secreção de  $\alpha$ -hemolisina por *E. coli* (HUECK 1998). Seguido dos sistemas de leucotoxina por *Pasteurella haemolytica* e de protease por *P. aeruginosa* e *Erwinia chrysanthemi*. Este sistema de secreção possui três componentes estruturais: uma ATPase localizada na membrana interna, que fornece energia para o sistema e é responsável pela passagem pela membrana interna; uma proteína de membrana externa, que forma o poro externo de passagem; e, finalmente, uma proteína de fusão

de membrana, que é ancorada na membrana interna e faz ligação entre as proteínas da membrana interna e externa. Apesar do processo de secreção ser independente de Sec, a montagem do aparato secretor não é, pois a proteína externa é transportada através da membrana interna pelo sistema Sec. As proteínas secretadas por este sistema não possuem sequência na extremidade aminoterminal clivável, mas elas possuem uma sequência sinal carboxiterminal de aproximadamente 60 aminoácidos, que não é submetida à clivagem proteolítica. O sinal parece estar relacionado com a conformação secundária da região carboxiterminal. Este sinal de secreção parece ser específico para as subfamílias do sistema de secreção do tipo I (HUECK 1998; REMAUT & WAKSMAN 2004).

O sistema de secreção do tipo II é responsável pela secreção de exoenzimas, incluindo pectatoliase, poligalacturonase e celulases geralmente associadas à degradação de tecidos do hospedeiro (SALMOND & REEVES 1993). Em Xcc, os genes que codificam para este sistema estão presentes em duas cópias (DA SILVA et al. 2002). O mecanismo de secreção por esta via ocorre em duas etapas. Primeiramente, a maquinaria Sec exporta o produto a ser secretado, com o peptídeo de sinalização, através da membrana interna para o espaço periplasmático e, posteriormente, os componentes do sistema de secreção do tipo II secretam o produto através da membrana externa (PUGSLEY 1993).

O sistema de secreção do tipo V, também chamado de autotransportador, utiliza o sistema Sec para exportação da proteína para o periplasma. O domínio  $\beta$ , localizado na porção C-terminal do autotransportador, associa-se a membrana externa formando um poro por onde a porção N-terminal da proteína passa e, através de auto-proteólise, é liberada no meio extracelular (THANASSI et al. 1998).

Todavia, durante o processo infeccioso, uma grande variedade de bactérias patogênicas Gram-negativas de animais e plantas, além de secretar proteínas para o meio externo, são capazes de injetar os fatores patogênicos, diretamente, dentro das células. Os dois principais sistemas de secreção deste tipo são denominados de Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) e de Sistema de Secreção do Tipo IV (SSTQ). O genoma de Xcc codifica para um SSTT e para dois SSTQ.

### 2.3. As interações Planta-Patógeno

A infecção de uma planta por um fitopatógeno pode ocasionar a chamada reação de hipersensibilidade ou, então, ao desenvolvimento da doença em si. A ocorrência de um processo ou de outro depende da presença de pares de genes combinantes: de resistência na planta e de avirulência no patógeno. Isto gerou uma hipótese que passou a ser conhecida de “gene-a-gene”, que diz que o gene de resistência da planta (*R*) codifica um receptor para a proteína de avirulência (*Avr*) da bactéria, sinalizando o início de uma cascata de eventos que irá resultar na reação de hipersensibilidade [8]. A reação de hipersensibilidade ou HR é caracterizada por necrose tecidual e pela formação de compostos fenólicos e agentes antimicrobianos no local de contato com o patógeno, prevenindo a disseminação deste nas plantas resistentes (HUECK 1998; MUDGETT & STASKAWICZ 1998).

Sugere-se que as proteínas R atuam acelerando, em geral, as respostas de defesa do hospedeiro. Já foi demonstrado que em plantas hospedeiras suscetíveis a doença se manifesta após alguns dias, enquanto que em plantas resistentes a reação de hipersensibilidade pode ser observada após 24 horas (HUECK 1998; CHANG 2004; ALFANO, & COLLMER 1997; GALÁN & COLLMER 1999). Qualquer que seja a resposta na interação bactéria-planta, o SSTT parece ser essencial para desencadear a resposta à interação. Os genes necessários para o desenvolvimento de doenças em plantas suscetíveis ou para o desencadeamento de reações de hipersensibilidade em plantas resistentes (que são proteínas formadoras do SSTT e proteínas secretadas) foram denominados de *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”). Esta denominação é mantida como padrão para o SSTT em fitopatógenos (HUECK 1998). As proteínas secretadas pelo sistema *hrp* incluem fatores essenciais para a patogenicidade, proteínas de avirulência e outros fatores não específicos. Um fato interessante é que as proteínas secretadas por este sistema não possuem nenhum tipo de peptídeo sinal (KIM, 2003 & CORNELIS, 2000).

As primeiras proteínas identificadas, cuja secreção ocorre por este sistema, foram as “harpins” (WEI, 1992). Estas proteínas apresentam em comum o fato de serem estáveis ao calor, ácidas, ricas em glicina e não possuem cisteínas. O papel

destas proteínas não é completamente compreendido. Entretanto, análises de mutação revelaram que a maioria das “harpins” não possui um controle direto da especificidade ou promoção da reação de hipersensibilidade (BÜTTNER, 2002; VIVIAN, 1997).

Outro grupo de proteínas secretadas por este sistema não possui a capacidade de desencadear a reação de hipersensibilidade. Como exemplos há as proteínas DspA/E de *Erwinia amylovora* e PopB e PopC de *Ralstonia solanacearum*, que são necessárias para a virulência destes microrganismos (CORNELIS, 2000).

Na terceira classe de proteínas secretadas pelo SSTT se encontram as proteínas de avirulência (Avr). Sabe-se que elas são peças-chave na interação planta-patógeno, sendo responsáveis pela especificidade da interação. Estas proteínas são espécie-específicas e limitam a amplitude de hospedeiros para o patógeno (CORNELIS, 2000; BÜTTNER, 2002 & VIVIAN, 1997). Para que a interação das proteínas Avr com a planta seja funcional é necessária a presença de um sistema de secreção Hrp ativo. A maioria dos “Agrupamentos gênicos *hrp*” conhecidos estão localizados em regiões cromossômicas de aproximadamente 25 kb. Em alguns casos, a transferência dos genes presentes no “grupamento *hrp*” de bactérias patogênicas para não patogênicas, são suficientes para causar a reações de hipersensibilidade, porém não a doença (ALFANO, 1997). Na Figura 5 está representado o sistema *hrp* de Xcc, a exceção dos genes *hrpX* e *hrpG* (mostrados posteriormente) que agem como ativadores transcricionais dos genes *hrp*.

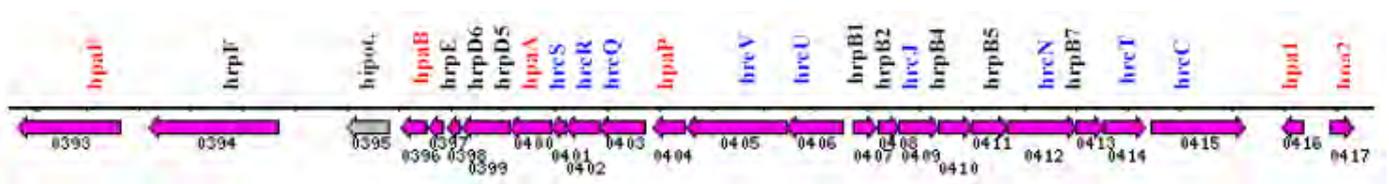


Figura 5: Mapa gênico do agrupamento *hrp* de Xcc.

Semelhante às proteínas efetoras Yops de *Yersinia* spp., a maioria das proteínas Avr não possui segmentos transmembrana ou peptídeos sinal e, quando

aplicados em células de planta ou infiltrados, não apresentam efeito. Desta forma, a ação destas proteínas parece ser dependente do sistema *hrp* e seu sítio de ação é intracelular (ALFANO, 1997 & CORNELIS, 2000). Existem, até mesmo, evidências de que a proteína *AvrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) atue como um fator de transcrição no núcleo de suas células hospedeiras (GALÁN, 1999 & BÜTTNER, 2002). Membros da família *avrBs3* foram identificados por sua capacidade de induzir HR em hospedeiros resistentes. Eles são responsáveis por aumentar o processo de encharcamento e induzir sintomas virulentos de cancrose. As diferenças entre os membros *avrBs3* estão quase que exclusivamente confinadas ao domínio central, composto por um número variável de aproximadamente 17,5 repetições idênticas, cada uma com 102 pares de bases, codificando 34 aminoácidos (Figura 6a). Outras características marcantes das proteínas *AvrBs3* são a presença dos chamados Sinais de Localização Nuclear (NLSs) e dos Domínios Ácidos de Ativação Transcricionais (AAD) na sua porção C-terminal. Estudos com duplo-híbridos usando a proteína *AvrBs3* revelaram que os motivos NLS interagem especificamente com a  $\alpha$ -importina de pimenteiro (*Capsicum annuum*) que junto com a  $\beta$ -importina, mediam a passagem de proteínas para o núcleo celular. A interação entre *AvrBs3* e a  $\alpha$ -importina sugere que a proteína procariótica é direcionada ao núcleo da célula hospedeira e modula seu processo de transcrição (Figura 6b). Dependendo da variação que ocorra na porção NLS também podem ser observadas reações de HR em pimenteiros ou em tomateiros como mostrado na Figura 6b. Em *Xcc* há quatro cópias do gene *pthA* que possuem 97% de similaridade com os genes *avrBs3* de *Xcv* e estas características serão discutidas a seguir na seção 2.6.

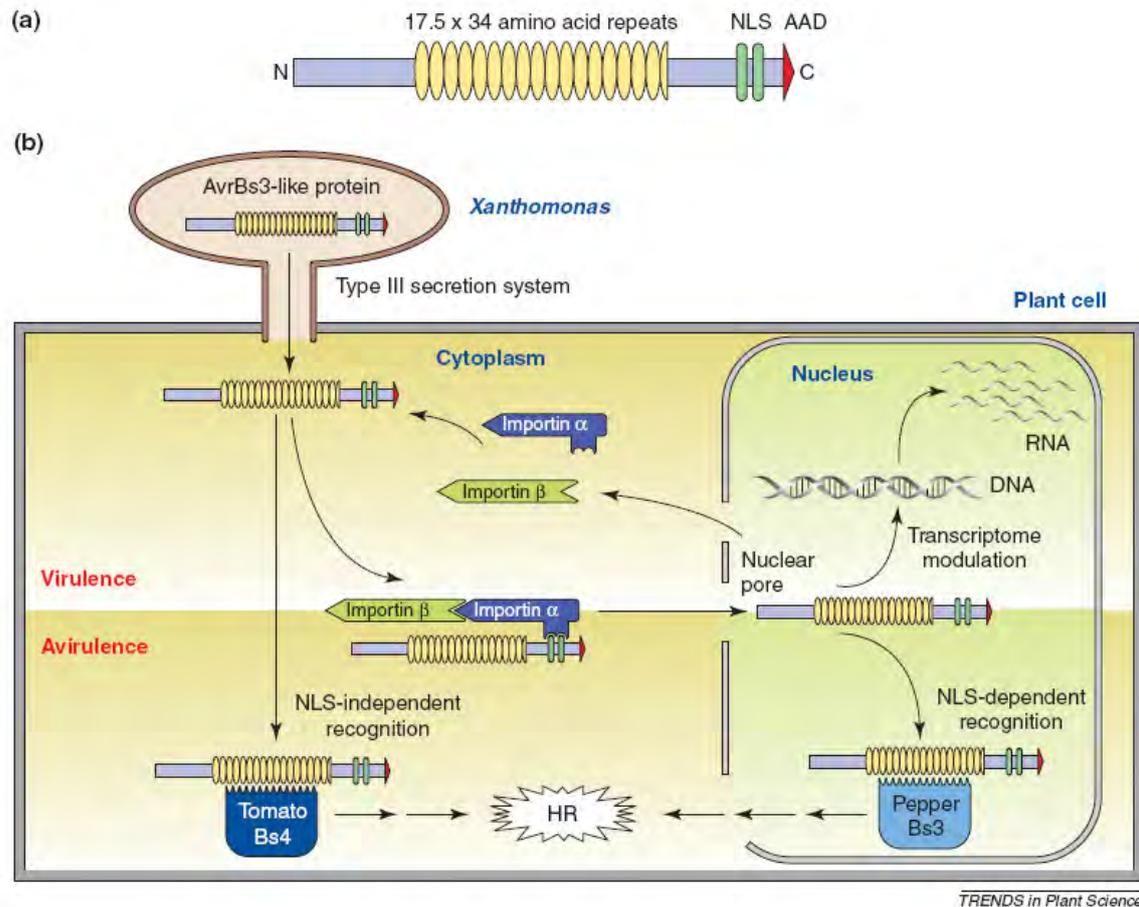


Figura 6: (a) Estrutura da proteína AvrBs3 de Xcv. Seu domínio central é composto por aproximadamente 17,5 repetições praticamente idênticas, cada uma com 102 pares de bases (codificando 34 aminoácidos). (b) Modelo proposto do mecanismo de virulência e avirulência da proteína AvrBs3 que é translocada para dentro da célula hospedeira através do SSTT.

## 2.4. O Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT)

O processo de interação planta-bactéria, embora bastante complexo e variável para cada organismo, parece envolver algumas etapas em comum. Aparentemente, muitas bactérias que interagem com hospedeiros eucarióticos possuem um tipo de sistema de secreção classificado como tipo III (HE, 2004). Este sistema exporta uma série de fatores proteicos, diretamente no citoplasma da célula eucariótica, a fim de modular respostas celulares do hospedeiro e permitir a interação. Caracterizado

primeiramente em bactérias patogênicas, o SSTT também foi encontrado em simbioses, como *Rhizobium* sp. e em associativos, como *Pseudomonas fluorescens* (VIPREY, 1998 & PRESTON, 2001).

A secreção protéica é definida como qualquer processo em que uma proteína atravesse a membrana externa da célula, incluindo saída de proteínas que permanecem ligadas à superfície da célula, ou que vão fazer parte de estruturas especiais montadas na superfície celular (THANASSI, 2000 & HUECK, 1998). Este processo é necessário em vários aspectos no ciclo de vida de uma bactéria, incluindo biogênese de flagelo, aquisição de nutrientes e expressão de fatores de virulência. Para isso as bactérias Gram-negativas enfrentam um desafio maior, pois as proteínas para serem secretadas necessitam atravessar o periplasma e a membrana externa, além do citoplasma e a membrana interna (THANASSI, 2000 & PUGSLEY 1993).

Existem alguns fatores que devem ser superados para que uma proteína atravesse a membrana externa. Primeiro as proteínas adquirem sua conformação já no periplasma, incluindo a formação de pontes dissulfeto e, depois, adquirem sua conformação completa antes de atravessar a membrana externa. Considerando que a presença de ATP ou de qualquer outra fonte de energia seja praticamente inexistente na membrana externa, para que haja a secreção de proteínas os sistemas de transporte devem possuir um mecanismo especial para que seja gerado energia na porção externa do sistema ou possuir algum mecanismo que preserve e transfira a energia para a membrana externa (THANASSI, 2000).

Os tipos I e III, como também já citados, são independentes de Sec e podem transportar as proteínas diretamente do citoplasma para o exterior da bactéria. O SSTT, possui um mecanismo de secreção semelhante a sistemas de biogênese de organelas e um dos mecanismos se dedica à montagem de estruturas de superfície (THANASSI, 2000). No caso dos sistemas de secreção dos tipos I e III, que são independentes de Sec, a secreção de proteínas acontece de maneira contínua, sem a presença de intermediários periplasmáticos (HUECK, 1998).

Em fitobactérias, o SSTT é codificado por um grupo de aproximadamente 25 genes, cujas proteínas formam um complexo que atravessa as membranas interna e

externa da célula bacteriana. Também fazem parte do sistema uma proteína formadora do poro na membrana externa e uma ATPase citoplasmática, provavelmente ancorada à membrana interna (THANASSI, 2000 & HUECK, 1998). Essas proteínas associam-se numa estrutura supramolecular que lembra uma seringa com uma agulha, sendo que o corpo da seringa está presente na membrana interna e a agulha atravessa a membrana externa, fazendo o contato com a célula hospedeira (Figura 7) (ANDERSON, 1999; BÜTTNER, 2002 & ALFANO, 1996).

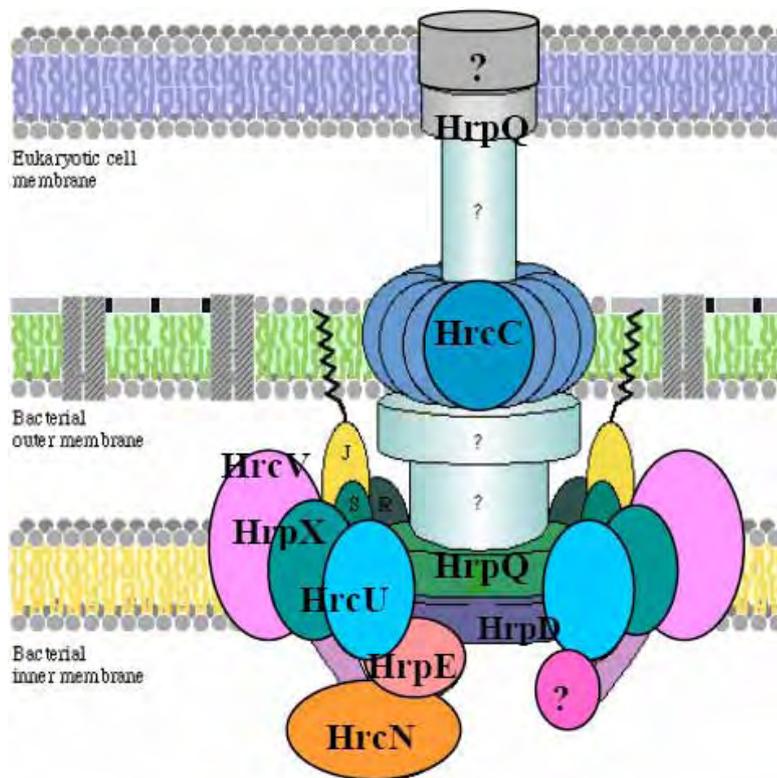


Figura 7: Representação do aparato do sistema de secreção do tipo III. O complexo protéico atravessa a membrana e a parede do patógeno, formando um longo *pilus* bacteriano que projeta-se no espaço intercelular e penetra na célula hospedeira. Proteínas efetoras são translocadas para o citoplasma da célula vegetal por este aparato. Fonte da Figura: [www.kegg.com](http://www.kegg.com), com modificações.

Inicialmente este aparato foi verificado em patógenos animais como *Salmonella typhimurium* e *E. coli* (HUECK, 1998; GALÁN, 1999 & THANASSI, 2000), mas posteriormente ele foi identificado em fitopatógenos e recebeu o nome de pili Hrp (LI, 2002 & BÜTTNER, 2002).

O *pilus Hrp* atravessa ambas as membranas, interna e externa. A subunidade formadora do *pilus* é uma pequena proteína em  $\alpha$ -hélice, não conservada entre patógenos animais e fitopatógenos (EBEL, 1998 & DELAHAY, 1999). Esse *Hrp pilus* é formado por subunidades secretadas via SSTT e montado na superfície da bactéria decorrente de contato com as células do organismo hospedeiro (LI, 2002). Sugere-se que este *pilus*, filamento ou agulha forme um canal entre a bactéria e as células eucarióticas proporcionando um contato físico entre o patógeno e o hospedeiro (HUECK, 1998; THANASSI, 2000; GALÁN, 1999 & LI, 2002).

O *pilus Hrp* presente em patógenos animais possui um diâmetro maior que o encontrado em fitopatógenos, porém o último é consideravelmente maior em comprimento, podendo se estender por alguns micrômetros (LI, 2002 & BÜTTNER, 2002).

O SSTT exporta proteínas bacterianas efetoras para a célula hospedeira, a qual acaba por ter seu metabolismo modificado. Embora similaridade seja encontrada nas proteínas estruturais para o sistema, as proteínas secretadas dependem de cada bactéria, não havendo um consenso evidente. As proteínas secretadas por esse sistema variam muito de tamanho, estrutura e função (HUECK, 1998; GALÁN, 1999 & ANDERSON, 1999). Em muitos casos, os genes que as codificam localizam-se fora do agrupamento que codifica o sistema de secreção, porém geralmente ambos parecem ser corregulados (HUECK, 1998; ANDERSON, 1999 & ANDERSON, 1997). As proteínas secretadas já identificadas não possuem peptídeo sinal na porção amino-terminal e, análises de mutações de algumas destas mostraram um alto grau de tolerância para as alterações da porção amino-terminal, sem que haja a interrupção de sua secreção (ANDERSON, 1997).

Nove genes do SSTT são conservados entre os principais gêneros de fitopatógenos e entre os patógenos animais. Para estes genes utilizou-se a

denominação *hrc* (*hrp* conservada) e a última letra conforme a homologia com as proteínas Ysc de *Yersinia* spp. O restante dos genes do sistema são denominados *hrp* e a última letra é utilizada em ordem alfabética conforme a ordem de descobrimento. A escolha dos genes *ysc* de *Yersinia* como padrão para a nomenclatura dos genes *hrc* é devido a uma maior similaridade com os respectivos genes de fitopatógenos (HUECK, 1998 & BOGDANOVE, 1996).

Estudos mostram que a expressão dos genes *hrp* é controlada por sinais oriundos da planta (hospedeiro) e por múltiplos fatores fisiológicos e ambientais, como pH, força osmótica e repressão catabólica (RAHME, 1992 & XIAO, 1992). A indução dos genes do agrupamento é observada em meios com o mínimo de sais, enquanto que fontes complexas de nitrogênio, alto pH, alta osmolaridade e algumas fontes de carbono, reprimem sua expressão em alguns microrganismos. Sugere-se que as condições nutricionais durante o estágio de indução da resposta de hipersensibilidade afetem a expressão dos genes *hrp*. Não existe um consenso de condições ideais para a expressão destes genes, cada bactéria responde diferentemente quando submetidas a diferentes fatores e condições (HUECK, 1998; RAHME, 1992; XIAO, 1992 & LINDGREN, 1997).

Estudos com fitobactérias têm revelado que o SSTT envolve uma variedade de fatores, tais como *pili*, fatores de sinalização bacteriana, receptores externos e fatores derivados da planta, proteínas envolvidas na transdução de sinais, fatores de transcrição especializados e fatores sigma substitutos, dentre outros. No entanto, somente uma pequena quantidade desses processos é conhecida em detalhes ao nível molecular, sobretudo no que diz respeito às características particulares da interação entre patógeno e hospedeiro. Adicionalmente, pouco se conhece sobre a importância dos genes do SSTT para a patogenicidade/virulência de Xcc.

No isolado 306 de Xcc foram identificados 25 ORFs *hrp*, localizadas em um agrupamento de aproximadamente 23.573 pares de bases. No entanto, não se sabe se todas são funcionais, nem em quais condições elas são utilizadas.

## 2.5. O Sistema de Secreção do Tipo IV (SSTQ)

O SSTQ possui grande importância dentre os demais sistemas de secreção, pois, além de estar envolvido na secreção de proteínas patogênicas em algumas bactérias, também desenvolve a função de conjugação em muitas outras (CHRISTIE, 2004). No processo de conjugação, um complexo proteína-ácido nucleico é transferido de uma bactéria para outra através de uma estrutura que forma um canal secretório e uma ponte (*pilus*) entre a célula doadora e a receptora. O SSTQ é mais bem compreendido em *A. tumefaciens*, um fitopatógeno que causa tumores do tipo galha da coroa, onde é codificado pelo operon *virB*, localizado no plasmídeo Ti (indutor de tumor) e requerido para a transferência do T-DNA, juntamente com um complexo proteico, diretamente para o citoplasma da planta. Este DNA bacteriano é posteriormente incorporado no cromossomo do hospedeiro (CHRISTIE, 2000). Nessa bactéria, o SSTQ é formado por 11 proteínas VirB e por uma proteína VirD sendo que há três ATPases (VirB4, VirB11 e VirD4) que ficam associadas à membrana interna e possivelmente proveem energia determinante para o funcionamento deste sistema de secreção (CASCALES, 2005 & SCHRODER, 2005) (Figura 8). As proteínas VirB8, VirB9 e VirB10 formam o complexo do canal secretor. VirB8 é o centro periplasmático para a montagem do complexo. VirB10 percebe o estado energético de VirB11 e VirD4 e responde a essas mudanças abrindo ou fechando o canal para VirB9, a qual ancora o canal na membrana externa, juntamente com VirB7 (SCHRODER, 2005). Através de sua atividade transglicosilásica, VirB1 auxilia na formação de poros na camada peptidoglicana que irá permitir a formação do *pilus* de secreção (CHRISTIE, 2005). VirB6 controla a formação do canal e o modula para a secreção de diferentes substratos. A lipoproteína VirB7 conecta o complexo ao *pilus* extracelular, formado por VirB2 e VirB5 onde VirB2 é seu principal constituinte (SCHRODER, 2005).



plasmídeo, por exemplo, as proteínas VirB1 respectivas apresentam 51% de similaridade, as VirB11 apresentam 34%, VirB10 e VirB4 apresentam 27%, as VirB9 22% e as demais não possuem similaridade significativa. O que se observa é que enquanto o cluster *virB* do plasmídeo possui grande similaridade com o plasmídeo pWWO de *Pseudomonas putita*, as proteínas codificadas pelo cluster *virB* do cromossomo possuem similaridade (em torno de 40%) com os componentes dos SSTQ codificados pelos plasmídeos pSB105 e pIPO2 isolados de comunidades microbianas de rizosferas de alfafa e trigo, respectivamente (SCHNEIKER et al., 2001 & TAUCH et al., 2002). Tanto o plasmídeo pSB105 quanto o pIPO2 possuem uma organização gênica similar ao plasmídeo pXF51 do fitopatógeno *Xylella fastidiosa* (SIMPSON et al. 2000).

Alegria e colaboradores (2005) identificaram interações com a proteína VirD4, presente no *locus vir* cromossomal, com um grupo de 12 proteínas, incluindo a proteína hipotética XAC2609 que também encontra-se dentro do *locus vir* cromossomal. Denominaram essas proteínas de VIPs (“VirD interacting proteins”) por possuírem um domínio comum na região C-terminal. Qian e colaboradores (QIAN et al., 2005), utilizaram o método de mutação gênica por elementos de transposição (EZ::TN transposon) e constataram que a mutação do gene *virB8*, que codifica uma das proteínas formadoras do canal periplasmático, suprimiu os sintomas de podridão negra em repolho (*Brassica oleraceae* cv Jingfeng) causada por Xcv. Portanto, o SSTQ, além de ser importante para a fitopatogenicidade de *A. tumefaciens*, também pode ser importante para o processo de fitopatogenicidade de outros fitopatógenos.

## **2.6. Os genes *pthAs***

Além dos genes discutidos anteriormente, Xcc (isolado 306) possui quatro cópias do gene *pthA*, sendo duas cópias em cada plasmídeo. Os genes *pthAs* de Xcc possuem 97% de homologia com os genes de avirulência *avrBs3* de Xcv (BONAS et al., 1989). Uma característica importante desta família é a presença de aproximadamente 17,5 repetições em tandem praticamente idênticas, cada uma com 102 pares de bases

(codificando 34 aminoácidos), na região central desses genes, as quais definem precisamente os limites de homologia entre os componentes do grupo. Além deste domínio central, *pthA* contém uma região N-terminal e um domínio C-terminal ácido (AAD), característico de fatores de transcrição (SWARUP et al., 1991).

Por meio de experimentos de imunocitoquímica Szureck e colaboradores (SZUREK et al., 2002) verificaram a translocação da proteína AvrBs3 pelo SSTT. Anticorpos específicos contra AvrBs3 detectaram a proteína no núcleo das plantas suscetíveis e resistentes após a infecção por Xcv. Demonstraram também que a região N-terminal é essencial para essa translocação embora não seja necessária para sua atividade na célula hospedeira.

Em Xcv, o gene *pthA* foi um dos primeiros genes de avirulência da família AvrBs3 para o qual se demonstrou um fenótipo no hospedeiro. Kanamori e colaboradores (1998) ao expressar o gene *pthA* em *E. coli*, bactéria que também possui o SSTT, verificaram o surgimento de lesões do tipo cancro em algumas espécies de *Citrus*. Isso indicou que a proteína PthA é um importante fator de indução de hipertrofia celular e hiperplasia.

As ORFs XACa0022-(*pthA1*) (1127 aminoácidos) e XACa0039-(*pthA2*) (1097 aminoácidos) estão localizadas no plasmídeo menor, pXAC33, e contém 16,5 e 15,5 repetições, respectivamente. As ORFs XACb0015-(*ptha3*) (1097 aminoácidos) e XACb0065-(*pthA4*) (1164 aminoácidos) estão localizadas no plasmídeo maior, pXAC64, e apresentam 15,5 e 15,7 repetições, respectivamente (LI et al., 2002).

Segundo Swarup e colaboradores (1991), os produtos da expressão dos genes *pthAs* de Xcc são necessários para provocar os sintomas do Cancro Cítrico em plantas cítricas. Quando Duan e colaboradores (1999) introduziram um gene *pthA* numa cepa de *Xanthomonas* não patogênica para os citros, ela passou a causar os sintomas do cancro. A proteína PthA é secretada pelo SSTT, possui três motivos de localização nuclear e um domínio de ativação transcricional, que são fundamentais para o desenvolvimento da doença (YANG et al., 1994).

Entretanto, mutações no gene *pthA* de Xcc, na região de repetição, resultaram em alteração na indução de hiperplasia no hospedeiro (SWARUP et al., 1991), mas Xcc

continuou causando doença. Do mesmo modo, estudos onde foi realizada mutação gênica em uma cópia do gene *pthA* de Xcc isolado 306 não se observou alteração na virulência do patógeno (D'AVILA, 2004). Em outro estudo, Laia (2007) verificou que um mutante para o gene *pthA* de Xcc isolado 306 apresentou uma pequena diminuição na virulência. Mas, devido a grande similaridade entre as cópias do gene *pthA* de Xcc isolado 306 não foi possível precisar, neste último estudo, qual das 4 ORFs foi mutada.

Desse modo, pode-se supor que o gene *pthA* desempenhou papel fundamental para a virulência em alguns isolados, como demonstrado por Brunings e Gabriel (2003) e papel secundário, como detectado por Yang et al., 1994; Laia, 2007 & D'Avila, 2004. Mas tanto Laia (2007) quanto D'Avila (2004) analisaram mutantes para uma única cópia do gene *pthA*, sendo que as outras 3 estavam intactas e provavelmente funcionais.

Assim sendo, outros estudos utilizando outras abordagens poderão gerar subsídios que permitam identificar, com precisão, qual, ou quais são as cópias funcionais desse gene em Xcc isolado 306 para, em seguida, determinar a sua contribuição para a virulência nesse microrganismo.

## **2.7. A técnica de qRT-PCR**

Os estudos sobre a função gênica, basicamente, podem ser executados por meio de técnicas simples, como "Northern blot", ou altamente sofisticadas, como bibliotecas genômicas, bibliotecas subtrativas de cDNA, microarranjos de DNA, inserção de elementos transponíveis (transposons) para obtenção de mutantes e análise da transcrição reversa em tempo real por PCR (qRT-PCR), dentre outras. No primeiro caso há a possibilidade de caracterizar a função de poucos genes e, no segundo pode-se caracterizar todos os genes ativados em um dado sistema, como por exemplo, identificar quais genes são necessários ao patógeno durante o processo de colonização do hospedeiro em dado momento (BIOTECHBRASIL, 2008).

Dessa forma, a genômica funcional em larga escala tornou-se uma importante ferramenta para o estudo e o entendimento da patogênese bacteriana, possibilitando a identificação de quais genes são necessários ao patógeno para se estabelecer no

interior do hospedeiro, em quais momentos eles são requeridos e em que quantidade são necessários (DA SILVA et al., 2002).

Dentre as técnicas citadas acima, o uso da análise da transcrição reversa em tempo real por PCR (qRT-PCR) é uma metodologia que vem ganhando espaço nos diferentes tipos de diagnósticos da expressão gênica pelo fato de apresentar resultados quantitativos, não apenas qualitativos, como a maioria das demais técnicas (VITZHUM et al., 1999), além de ser uma técnica altamente sensível.

Essa técnica permite a quantificação da expressão gênica de modo exato e reprodutível, baseada na emissão de fluorescência por fluoróforos. Dentre os compostos fluorescentes mais utilizados destacam-se o sistema “SYBR<sup>®</sup> Green” e o “TaqMan<sup>®</sup>” (BIOTECHBRASIL, 2008).

O sistema “SYBR<sup>®</sup> Green” tem como vantagem frente ao sistema “TaqMan<sup>®</sup>” o menor custo e a facilidade na manipulação. Como desvantagem apresenta menor especificidade ao se ligar na molécula de DNA, podendo proporcionar resultados enviesados. Mas isso é raro e há como prever, contornar e eliminar os erros (NEIL, 2006).

Já o sistema “TaqMan<sup>®</sup>” possui, além do par de oligonucleotídeos iniciadores, mais uma sequência de nucleotídeos, chamada de sonda. Desse modo, uma molécula de DNA somente será contabilizada se os oligonucleotídeos e sonda, se ligarem a ela, tornando esse sistema muito mais específico que o primeiro, “SYBR<sup>®</sup> Green”. Todavia, o sistema “TaqMan<sup>®</sup>” apresenta um custo muito maior quando comparado à metodologia “SYBR<sup>®</sup> Green” (HEID, 1996).

Dada a sua alta especificidade e sensibilidade, qRT-PCR permite realizar uma quantificação absoluta, onde é determinado o número exato de moléculas produzidas, ou então, uma quantificação relativa, onde a expressão gênica pode ser comparada entres genes e/ou situações diferentes. A quantificação absoluta possibilita uma fácil interpretação dos resultados, porém oferece maior dificuldade em se desenvolver os padrões experimentais, enquanto que a quantificação relativa proporciona baixa dificuldade em se desenvolver os padrões experimentais, porém exige uma criteriosa análise dos dados obtidos (BIOTECHBRASIL, 2008).

Entretanto, para se obter resultados confiáveis com o uso de qRT-PCR, determinadas exigências são necessárias. Dentre elas estão a obtenção de RNA de interesse, um conjunto de oligonucleotídeos com alta qualidade e especificidade, uma reação de PCR com alta eficiência e, principalmente, a escolha de apropriados genes de referência para a normalização dos dados (NOLAN et al., 2006).

Segundo Robinson e colaboradores (ROBINSON et al., 2007), os genes de referência devem ser aqueles genes que manifestam o mesmo padrão de expressão entre diferentes tecidos ou células sob investigação, oriundas de diferentes tratamentos. Apesar de haver uma ampla gama de genes de referência para normalização da expressão gênica obtida por meio de qRT-PCR (NICOT et al., 2005), descrita na literatura, a maioria desses genes é específica para estudos em tecidos humanos (Radonic et al., 2007). Além disso, recomenda-se que para cada espécie seja estabelecido um grupo de genes de referência e que para cada tipo de experimento seja realizado um teste para se certificar da estabilidade dos mesmos naquela situação particular. Mesmo com tal evidência, muitos são os trabalhos que, ainda, realizam análises de expressão gênica, fazendo uso da técnica de qRT-PCR, sem uma prévia escolha de quais são os melhores genes de referência a serem utilizados como normalizadores de dados. Isto se deve ao fato de grande parte dos trabalhos publicados atualmente fazerem uso de genes considerados bons normalizadores, como por exemplo, rRNA, GAPDH e  $\beta$ -ACTINA (NICOT et al., 2005; VANDESOMPELE et al., 2002 & GOOSSENS et al., 2005).

Kok e colaboradores (2005) demonstraram que o uso de genes de referência, sem uma análise prévia de sua estabilidade, vem proporcionando equivocadas conclusões quanto aos níveis de expressão gênica estudados. Além disso, tem-se verificado que são raros os desenhos experimentais onde um único gene de referência seja suficiente (VANDESOMPELE et al., 2002). Assim, a não utilização dos mais adequados genes de referência certamente interfere, de forma negativa, na interpretação dos resultados (Ohl et al., 2006). Desse modo, pesquisadores têm desenvolvido técnicas e métodos computacionais para a identificação de quais são os melhores genes de referência dentre um grupo de candidatos (geNorm Software &

NormFinder Software).

Tomando-se os devidos cuidados necessários, diversos estudos tem empregado a técnica de qRT-PCR para verificar a expressão gênica em bactérias, tais como Kundinger e colaboradores (KUNDINGER et al., 2008), que estudaram a expressão diferencial do gene *hilA*, que é muito importante no processo patogênico de *Salmonella typhimurium*, Pecharki e colaboradores (PECHARKI et al., 2008), que analisaram a expressão de fatores de virulência em estirpes mutantes de *Streptococcus intermedius*, e Lim e colaboradores (2007), que investigaram os efeitos da radiação gama na expressão de genes de virulência de *Salmonella typhimurium* e de *Vibrio* spp. Nesta mesma linha, utilizou-se a técnica de qRT-PCR para a análise da expressão de genes importantes para o processo de patogenicidade de Xcc durante o processo infeccioso da doença Cancro Cítrico.

### III. Objetivos

O objetivo principal do projeto foi verificar quais genes, de um grupo pré-definido, são necessários durante o processo infeccioso de Xcc em folhas de laranja Pêra.

Esse objetivo principal foi dividido em três fases, como segue:

a) Selecionar os melhores genes endógenos dentro de um grupo de dez candidatos;

b) Analisar a expressão dos genes que compõem o SSTT, SSTQ e algumas ORFs hipotéticas localizadas próximas aos *loci vir* do SSTQ;

c) Analisar a expressão dos genes *pthAs*.

Fazer uma seleção prévia de quais seriam os melhores genes endógenos a serem usados como normalizadores de dados de Xcc em experimentos que utilizem a técnica de qRT-PCR e analisar, com o uso da técnica de qRT-PCR, as diferenças de expressão dos genes que compõem o SSTT, SSTQ, algumas ORFs hipotéticas localizadas próximas aos *locus vir* do SSTQ e também dos genes *pthAs* de Xcc isolado 306 nas condições infectante (bactéria cultivada em folhas de laranjeira Pêra) e não infectante (bactéria cultivada em meio de cultura).

## **IV. Material e Métodos**

Neste experimento foi verificada a expressão diferencial de genes de Xcc quando a bactéria foi cultivada em folhas de *Citros sinensis*. Para isso, a expressão de um dado gene *in planta* foi comparada com a expressão do mesmo gene quando as células bacterianas foram cultivadas em meio de cultura. Quando houve indução na expressão de um dado gene, concluiu-se que o gene em questão é importante para a virulência de Xcc.

A fim de minimizar possíveis erros, o experimento contou com 4 repetições biológicas (4 amostras de cDNA das células cultivadas em folhas de diferentes plantas e 4 amostras de cDNA de células cultivadas em diferentes Erlenmeyers contendo o mesmo meio de cultura) para a análise da expressão dos genes pertencentes ao SSTT, SSTQ, ORFs hipotéticas, genes *pthAs* e dos genes candidatos a melhores normalizadores de dados, além de 2 repetições técnicas para todas as situações avaliadas.

### **4.1. Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo**

Xcc, isolado 306, foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura NA (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de ágar e água destilada suficiente para 1 L), a 28° C. Após 24 h de cultivo, uma colônia isolada foi transferida para outra placa de Petri contendo meio de cultura NA e incubada por 12 h nas mesmas condições anteriores. Este foi o pré-inóculo para todos os demais passos experimentais.

### **4.2. Inoculação e extração das células bacterianas de folhas de laranjeira**

Para a obtenção de RNA total, folhas de laranjeira Pêra cultivadas em vasos de 20 litros de capacidade foram infiltradas (Figura 9) com uma solução de células de Xcc, isolado 306, a uma DO igual a 0,3 a 600nm, obtidas de colônias de bactérias com 24h de incubação em meio de cultura NA. As plantas inoculadas foram mantidas por 72 h

em laboratório a 28° C. Foram empregadas quatro plantas para o mesmo período de inoculação.

Decorrido o período de multiplicação, as folhas inoculadas foram coletadas e imediatamente fracionadas em tiras bem finas e colocadas em um becker esterilizado contendo água destilada, o qual foi mantido em banho de gelo. Para cada planta foi utilizado um becker diferente. Para facilitar o processo de exudação, o banho de gelo foi mantido sob agitação suave por 5 min. Em seguida, os restos foliares foram separados por filtração em gaze e as células recuperadas por centrifugação a 5.000 g por 5 min a 4° C. A extração do RNA total deu-se logo em seguida, conforme descrito adiante.

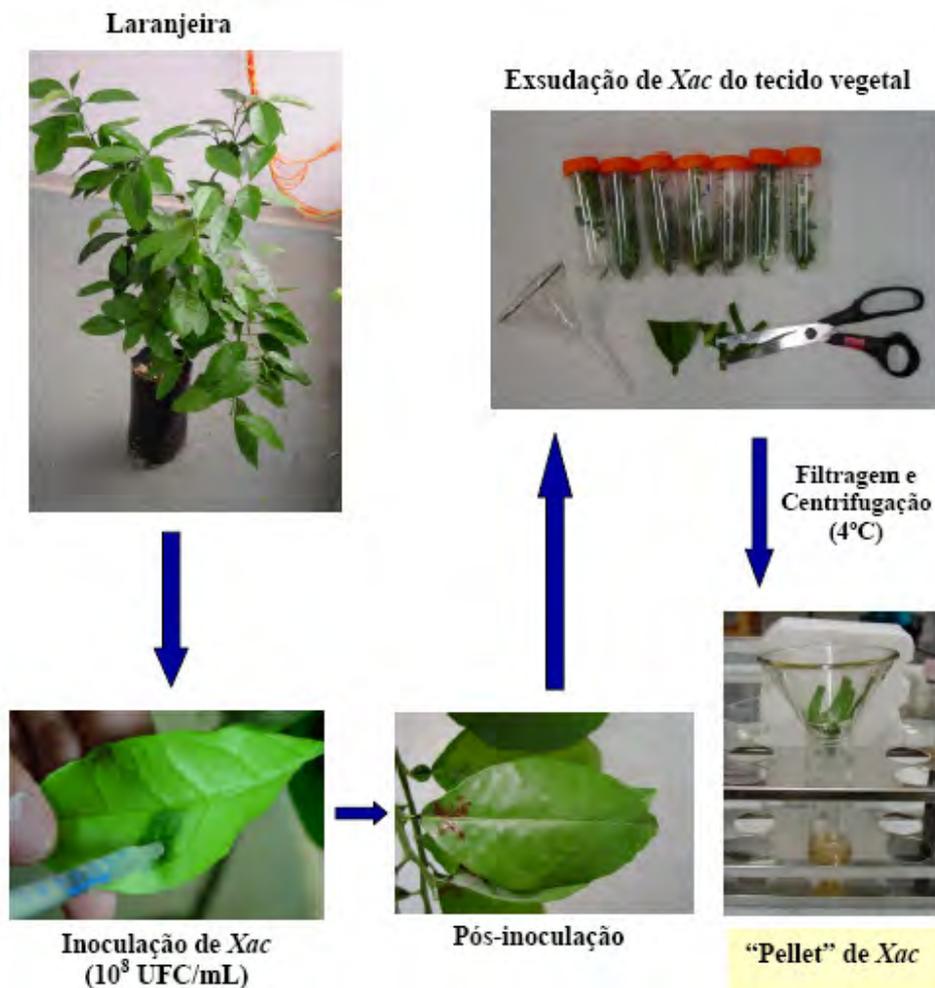


Figura 9: Inoculação de Xcc em folhas de laranjeira Pêra através da técnica de infiltração e recuperação das bactérias por exudação três dias após a inoculação.

### 4.3. Extração de RNA total de Xcc

A partir do pré-inóculo em placa de Petri foi produzida uma suspensão de células a uma DO 0,3 a 600nm e 1 mL dessa suspensão foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura NA líquido. As células foram submetidas à multiplicação por 24h a 28 °C sob agitação constante a 200 RPM. Após esse período as células foram coletadas por centrifugação e submetidas à extração de RNA com o conjunto de reagentes para purificação de RNA total “Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit” (Amersham Biosciences), segundo as instruções sugeridas pelo fabricante.

As amostras obtidas foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose 1% em tampão TAE, para verificar a qualidade do RNA extraído. O RNA das amostras foi quantificado em um aparelho “NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer” e as amostras armazenadas a -80° C para serem usadas posteriormente. Esse procedimento também foi utilizado para as amostras provenientes de folhas.

### 4.4. Desenhos dos oligonucleotídeos

Para a análise de genes do SSTT, do SSTQ, das ORFs hipotéticas e dos genes candidatos a melhores genes de referência, foi empregada a metodologia de qRT-PCR que utiliza a química “SyBR<sup>®</sup> Green”, uma vez que essa metodologia tem alto poder de discriminação e resolução quando há suficiente polimorfismo entre os alvos, além de possuir menor custo. Já para a discriminação de quais das cópias do gene *pthA* são funcionais, foi empregada a metodologia de qRT-PCR que utiliza a química “TaqMan<sup>®</sup>” com sondas MGB. Esse tipo de técnica permite discriminar Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP), segundo o fabricante<sup>1</sup>.

A confecção dos oligonucleotídeos e das sondas a serem utilizados no sistema “SYBR<sup>®</sup> Green” e “TaqMan<sup>®</sup>” foi feita com o programa Primer Express v.3 (Applied Biosystems), seguindo todas as recomendações do fabricante. Estes oligonucleotídeos

são parecidos com os de uma PCR comum, podendo diferir no tamanho do “amplicon” a ser amplificado, entre 80 e 250 pb, no “*T<sub>m</sub>*”, que pode variar de 58 a 62°C, além do conteúdo de GC. Logo, se por acaso algum oligonucleotídeo não se apresentar satisfatório, é possível produzir outro sem onerar o projeto. No total, 148 oligonucleotídeos foram produzidos sendo 20 oligonucleotídeos correspondentes aos 10 genes candidatos a controle endógeno (vide próxima seção), 58 oligonucleotídeos correspondentes aos 29 genes do SSTT, 32 oligonucleotídeos correspondentes aos 16 genes do SSTQ e 18 oligonucleotídeos correspondentes aos 9 genes hipotéticos.

Para a análise dos genes *pthAs*, inicialmente, as 4 cópias desse gene foram alinhadas de modo a poder identificar os possíveis polimorfismos entre elas. A partir da identificação dessas regiões polimórficas, procurou-se ancorar a sonda MGB exatamente no local onde ocorre o polimorfismo, de modo a garantir o pareamento da sonda apenas com a sequência desejada. A partir daí, com base nos critérios definidos pelo fabricante<sup>2</sup>, produziram-se os dois oligonucleotídeos, mais a sonda, para cada uma das 4 cópias. Esse processo foi realizado no programa Primer Express v.3 (Applied Biosystems). Abaixo estão identificados os locais exatos onde foram ancorados os oligonucleotídeos e as sondas em cada uma das cópias do gene *pthA*.

```

XCCb0015      CCCGATGGGGTTTCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGGCCCCCTG 120
XCCa0039      CCCGATGGGGTTTCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGGCCCCCTG 120
XCCb0065      CCCGATGGGGTTTCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGGCCCCCTG 120
XCCa0022      CCCGATGGGGTTTCAGCCGACTGCAGATCGTGGGGTGTCTCCGCCTGCCGGCGGCCCCCTG 120
*****

XCCb0015      GATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATCTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCCCTGCCCCC 180
XCCa0039      GATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCCCTGCCCCC 180
XCCb0065      GATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCCCTGCCCCC 180
XCCa0022      GATGGCTTGCCCGCTCGGCGGACGATGTCCCGGACCCGGCTGCCATCTCCCCCTGCCCCC 180
*****

XCCb0015      CTCAAGATTGCAAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAAT 840
XCCa0039      CTCAAGATTGCAAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAAT 840
XCCb0065      CTCAAGATTGCAAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAAT 840
XCCa0022      CTC AAGATTGCAAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAAT 840
*****

XCCb0015      GCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT 900
XCCa0039      GCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT 900
XCCb0065      GCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT 900
XCCa0022      GCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT 900
*****

```

```

XCCb0015      CTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGT 1620
XCCa0039      CTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGT 1620
XCCb0065      CTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGT 1617
XCCa0022      CTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGG- 1613
                ***** * *****

XCCb0015      GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGC 1680
XCCa0039      GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGC 1680
XCCb0065      GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGC 1677
XCCa0022      --CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCATGGC 1671
                *****

XCCb0015      CTGTTGCCGGTGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC 2220
XCCa0039      CTGTTGCCGGTGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC 2220
XCCb0065      CTGTTGCCGGTGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC 2217
XCCa0022      CTGTTGCCGGTGTGTGTGCCAGGCCCATGGCCTGACCCCGGACAGGTGGTGGCCATCGCC 2208
                *****

XCCb0015      AGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGTGC 2280
XCCa0039      AGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGTGC 2280
XCCb0065      AGCAATAGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGTGC 2277
XCCa0022      AGCAATATTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGTGC 2268
                ***** ** *****

```

Em azul estão identificados os oligonucleotídeos e em vermelho estão as sondas. Em verde estão identificados os nucleotídeos que conferiram especificidade a cada sonda. Existem outras regiões polimórficas entre as quatro cópias, sendo estas as escolhidas por propiciarem os melhores parâmetros, tanto para a sonda quanto para os respectivos oligonucleotídeos. Assim, uma vez que a sonda está em uma região polimórfica, mesmo que haja amplificação das outras sequências, somente aquela onde a sonda estiver perfeitamente pareada será contabilizada, já que, nesta técnica, a sonda é a responsável por produzir a energia contábil.

#### 4.5. Seleção dos genes candidatos e confecção dos oligonucleotídeos iniciadores

A escolha dos genes candidatos a melhores genes de referência foi baseada em dois parâmetros. O primeiro é o que considera a provável função do gene, isto é, escolheram-se genes cuja proteína codificada parecia ser essencial em qualquer estágio de desenvolvimento e em qualquer condição ambiental. O segundo parâmetro

foi baseado em seu usual emprego como gene normalizador de dados em experimentos que utilizem a técnica de qRT-PCR. Os genes selecionados como candidatos a melhores genes de referência foram: *gyrB*; *rpoB*; *rpoC*; *gyrA*; *atpD*; *ndh*; *tmRNA*; *NADH*; *NAD(P)H*; e, *16S rRNA*. Na Tabela 1 estão presentes informações sobre estes genes.

Tabela 1 – Detalhes dos genes candidatos a melhores genes de referência e suas respectivas funções.

ORF	Nome do Gene	Definição do Gene
Xac0004	<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B
Xac0965	<i>rpoB</i>	RNA polymerase subunit beta
Xac0966	<i>rpoC</i>	RNA polymerase subunit beta'
Xac1511	<i>tmRNA</i>	tmRNA
Xac1631	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A
Xac2172	<i>NADH</i>	NADH dehydrogenase I subunit 5
Xac2229	<i>NAD(P)H</i>	NAD(P)H dehydrogenase
Xac3649	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta
Xac3822	<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase
Xac3896	<i>16S</i>	16S ribosomal RNA

A confecção dos oligonucleotídeos foi feita com o programa Primer Express v.3 (Applied Biosystems), seguindo todas as recomendações do fabricante. Na Tabela 2 estão presente as respectivas ORFs dos genes, as sequências dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de qRT-PCR e os tamanhos dos produtos amplificados. As análises das expressões dos dez genes candidatos a melhores genes de referência, foram realizadas com o uso dos programas geNorm (geNorm Software) e NormFinder (NormFinder Software).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR, respectivas ORFs e o tamanho dos produtos amplificados.

ORF	Oligonucleotídeo Direto [5'→ 3']	Oligonucleotídeo Reverso [5'→ 3']	Amplicon
Xac0004	CGTCCC GG CATGTATATCG	ACCACCTCGAACACCATGTGA	67pb
Xac0965	GGATTCTATCGCGAATTCTT	TGTAGCTGGAAATCGGGAACA	103 pb
Xac0966	AGCGTGATGGCCTGTTCTG	CCGCACAGGCATTCGTAGT	63 pb
Xac1511	GCTGCCTGGGAACGAGATC	CACTCCATCCCCAGCACTACA	56 pb
Xac1631	GCGCATCTACATCGAAGTCAAG	GGGTCTGCTGATACAGGTTGTTG	70 pb
Xac2172	TGCAGGCAGGCAATCTGA	CGATGCTGGTGGCAATCC	53 pb
Xac2229	TCGGTGCCTCTGGCAA	CATCGCCGTGGCATAGC	52 pb
Xac3649	CGGCGCACCGTCGTAT	CCGGTTTCCAGCAATTCG	53 pb
Xac3822	CGTCGCCTGGTGGTTCTG	GCGGAAGCCGATCAAAAA	54 pb
Xac3896	AGCACGTAATGGTGGGAACTCT	CCCACCTTCCTCCGGTTT	54 pb

#### 4.6. Síntese da primeira fita de cDNA e reações de qRT-PCR

A síntese da primeira fita de cDNA, bem como todas as reações de qRT-PCR, foram realizadas com o uso do conjunto de reagentes “SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” da Invitrogen, de acordo com as especificações do fabricante, à exceção da quantidade de cDNA inicial nas reações, que foi de 2,0µL (20ng) por amostra. Todas as reações de PCR foram feitas com quatro replicatas biológicas e duas replicatas técnicas usando o aparelho Applied Biosystems 7500 real-time PCR. Os parâmetros para as reações da PCR foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Para a certificação de que os pares de oligonucleotídeos usados produziram um único produto, o protocolo de dissociação foi adicionado após o término dos ciclos para amplificação dos produtos de interesse, determinando a dissociação dos produtos da PCR de 60°C a 95°C.

As curvas de amplificação e dissociação geradas pelo sistema foram usadas para a análise. Em todos os casos, os controles negativos (água ao invés de cDNA) para a transcrição reversa foram incluídos.

## V. Resultados e Discussões

### 5.1. Extrações de RNA

As primeiras extrações de RNA foram feitas a partir de bactérias multiplicadas em meio de cultura líquido, após 24 horas da inoculação.

Posteriormente às obtenções do RNA oriundo de bactérias multiplicadas em meio de cultura, procedeu-se às extrações a partir de células bacterianas provenientes de laranjeira Pêra, previamente inoculadas. As plantas utilizadas para a inoculação estavam devidamente adubadas, livres de quaisquer contaminantes, irrigadas por tecnologia de gotejamento e acondicionadas em casa de vegetação, sob umidade e temperatura adequadas. Decorridas 72 horas após o momento da inoculação, as bactérias foram exsudadas das folhas, coletadas e utilizadas no processo de extração do RNA.

### 5.2. Análises para determinação dos genes mais estáveis

Os dez genes candidatos a melhores genes de referência tiveram suas taxas de expressão analisadas pelos programas geNorm (geNorm Software) e NormFinder (NormFinder Software).

O programa geNorm é uma poderosa ferramenta a ser usada na seleção dos melhores genes de referência usando o princípio de que a taxa de expressão de dois genes de referência deva ser a mesma entre todas as amostras testadas, independentemente das condições experimentais, isto é, não faz distinção entre situações intra e inter-grupos (Ohl et al., 2001).

De acordo com a análise feita pelo programa geNorm (geNorm Software) (Figura 10) os genes *gyrA* e *gyrB* mostraram maior estabilidade dentre os dez genes avaliados. Ambos codificam subunidades da enzima DNA girase. Uma topoisomerase do tipo II, dependente de ATP, que catalisa quebras nas moléculas de DNA, mas usa ligações covalentes entre elas para segurar as fitas que foram quebradas e realizar, na

sequência, novas ligações para recompor a dupla hélice e assim retirar as superespirais que se formam quando o DNA é aberto para que ocorra o processo de duplicação do material genético.

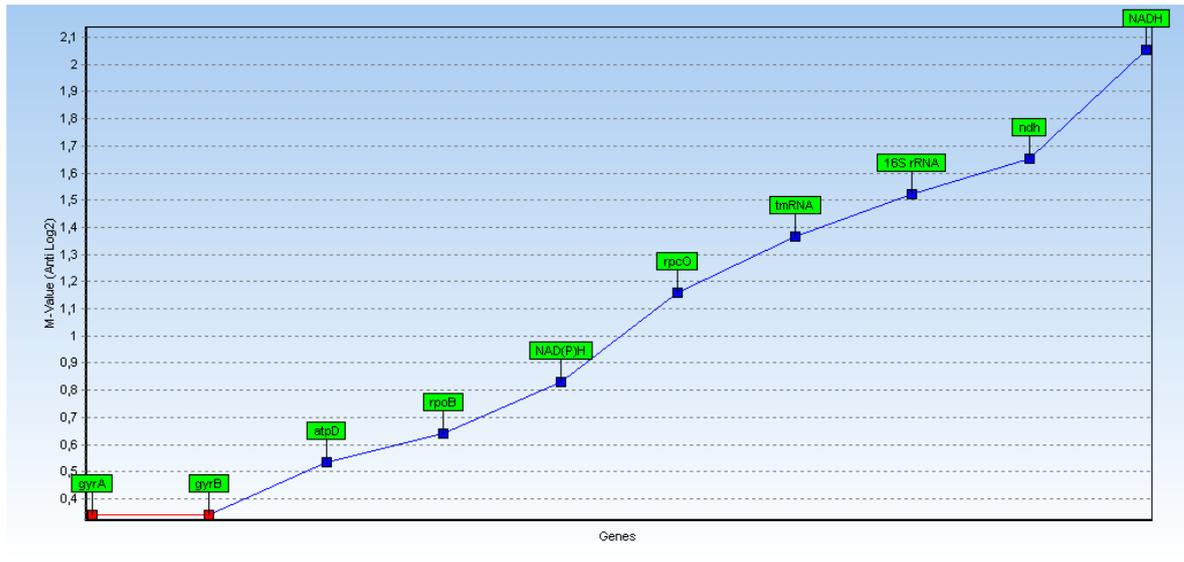


Figura 10: Estabilidade de 10 genes candidatos a melhores *genes de referência* em experimentos com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* segundo o programa geNorm (geNorm Software). Os genes que sofrem a menor interferência experimental são aqueles com o menor valor M (eixo “y”).

O programa NormFinder (NormFinder Software) é outra ferramenta usada para selecionar os genes de referência a serem usados como normalizadores. A determinação é feita baseada na variação da expressão inter e intra-grupos dos genes candidatos. Esta análise identificou os genes *rpoB* e *rpoC* como os mais estáveis (Figura 11). Estes genes são responsáveis pela confecção das subunidades beta e beta “linha” da enzima RNA polimerase, que está diretamente relacionada com os processos de transcrição do material genético das células.

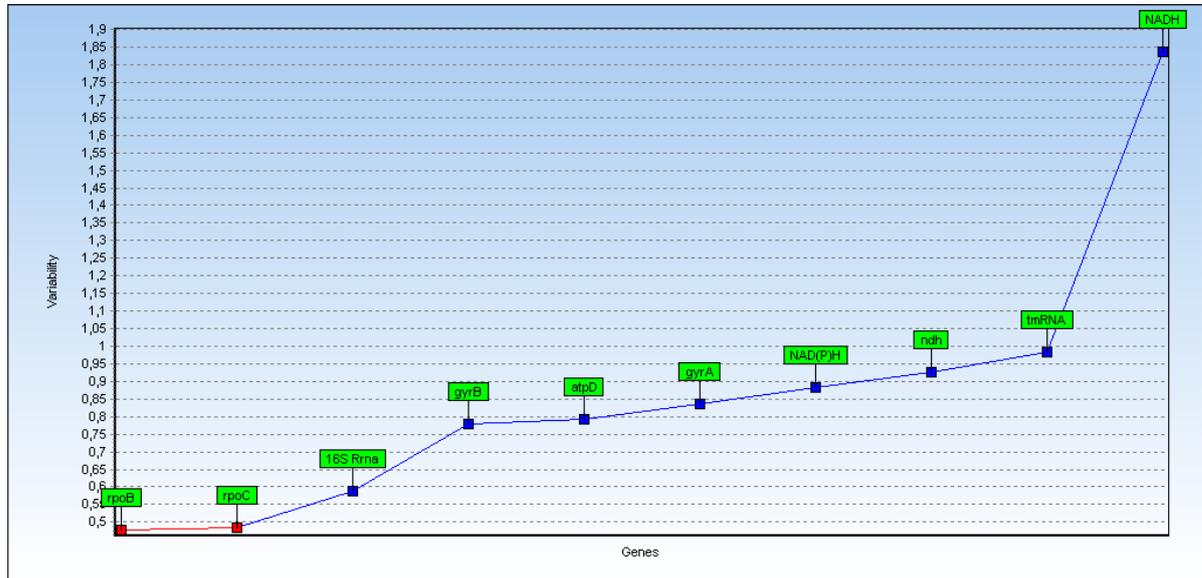


Figura 11: Estabilidade de 10 genes candidatos a melhores *genes de referência* em experimentos com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* segundo o programa NormFinder (NormFinder Software). Os genes que sofrem a menor interferência experimental são aqueles com o menor valor “variability” (eixo “y”).

Vandesompele e colaboradores (2002), definem como parâmetro para quantificar a estabilidade de genes candidatos a genes de referência um valor da média da estabilidade de expressão (M-value), onde um baixo valor de “M-value” é indicativo de uma expressão mais estável. Fazendo-se o uso do programa geNorm os dez genes candidatos a melhores genes de referência foram ranqueados de acordo com seus respectivos valores M.

Os resultados apresentados pelos programas não se mostram exatamente iguais. Entretanto, o programa geNorm avalia que a taxa de expressão de dois genes normalizadores deve ser a mesma em todas as amostras testadas, não fazendo distinção entre as situações inter-grupos (entre diferentes tecidos e células, por exemplo) e nem intra-grupos (entre indivíduos, por exemplo). Por outro lado, o princípio do programa NormFinder é baseado na escolha de dois genes que tenham a menor variação de expressão tanto nas situações inter como na intra-grupos.

Na literatura são encontradas publicações que mostram resultados idênticos

entre as análises feitas por estes programas, como mostrado por Balogh e colaboradores (2008) e Tang e colaboradores (2007) e, também, trabalhos, como o apresentado por Skovgaard e colaboradores (2007), que mostra pequenas discrepâncias entre os resultados obtidos por esses dois programas para um mesmo experimento. Mas, há publicações como a feita por Ahn e colaboradores (2008) que revela discordâncias entre os resultados apresentados pelos programas geNorm e NormFinder.

Ingerslev e colaboradores (2006) mostraram que o fato de haver, em um experimento, situações inter-grupos pode fazer com que a variação da expressão entre os genes candidatos a normalizadores varie e isto associado ao fato de apenas um dos programas levar em conta tal ocorrência, pode fazer com que os resultados apresentados por ambos os programas não sejam idênticos.

Um importante fato que pode ser observado é que tanto o programa geNorm quanto o programa NormFinder não apresentaram o gene *16S rRNA* como o mais indicado a ser usado como gene de referência e esta é mais uma evidência de que os genes ribossomais nem sempre são os melhores a serem usados para a normalização de dados. Observação esta já feita por Tang e colaboradores (2007) quando verificaram que este e outros genes rRNAs, tais como *18S rRNA*, *28S rRNA*, *30S rRNA*, *60S rRNA*, que têm sido usados sistematicamente como genes de referência (ALFÉREZ et al., 2008; KLOK et al., 2002; GONZALEZ et al., 2002 & Radonic et al., 2007) podem sofrer grande variação devido às condições experimentais. Além disso, há outros riscos de se usar genes rRNA, como genes de referência, uma vez que a transcrição da subunidade ribossomal pode ser afetada tanto por fatores biológicos como por determinados tipos de drogas (SPANAKIS et al., 1993), sem contar com o fato de que a quantidade de rRNA presente nas células ser muito maior do que a de mRNA, o que faz com que seja necessária a realização de diluições das amostras de cDNA antes das reações de qRT-PCR fazendo com que as chances de erros experimentais aumentem (NICOT et al., 2005).

Portanto, em condições experimentais similares às realizadas neste estudo (com situações inter-grupos) pode-se sugerir que os melhores genes a serem usados como

normalizadores de dados de Xcc em experimentos que utilizem a técnica de qRT-PCR são os genes *rpoB* e *rpoC*.

### **5.3. Análise da expressão de genes do SSTT**

O funcionamento deste sistema permite que o patógeno, uma vez aderido à superfície da célula hospedeira, realize o envio de proteínas de virulência da célula bacteriana diretamente para o citoplasma da célula hospedeira eucariota. De acordo com Van Gijsegem e colaboradores (VAN et al., 1993), esta intercomunicação ocorre em função de um aparato estrutural do tipo *pilus* (Figura 7), através do qual o patógeno pode injetar proteínas especializadas (efetoras) no hospedeiro, de modo a desorganizar o funcionamento das células atacadas, o que favorece a sobrevivência e multiplicação da bactéria no local invadido e leva à indução dos sintomas da doença no hospedeiro.

Acredita-se que a patogenicidade e a virulência da Xcc esteja relacionada com o funcionamento deste sistema, o qual é altamente conservado em bactérias Gram-negativas patogênicas às plantas (BÜTTNER et al., 2002). No presente trabalho, 29 ORFs que codificam proteínas relacionadas a este sistema tiveram suas taxas de expressão analisadas com o uso da técnica de qRT-PCR utilizando a metodologia “SyBR® Green”. As diferenças entre os níveis de cada gene expresso quando a bactéria foi cultivada em meio de cultura ou em laranjeira Pêra estão apresentadas nas Figuras 12, 14 e 17.

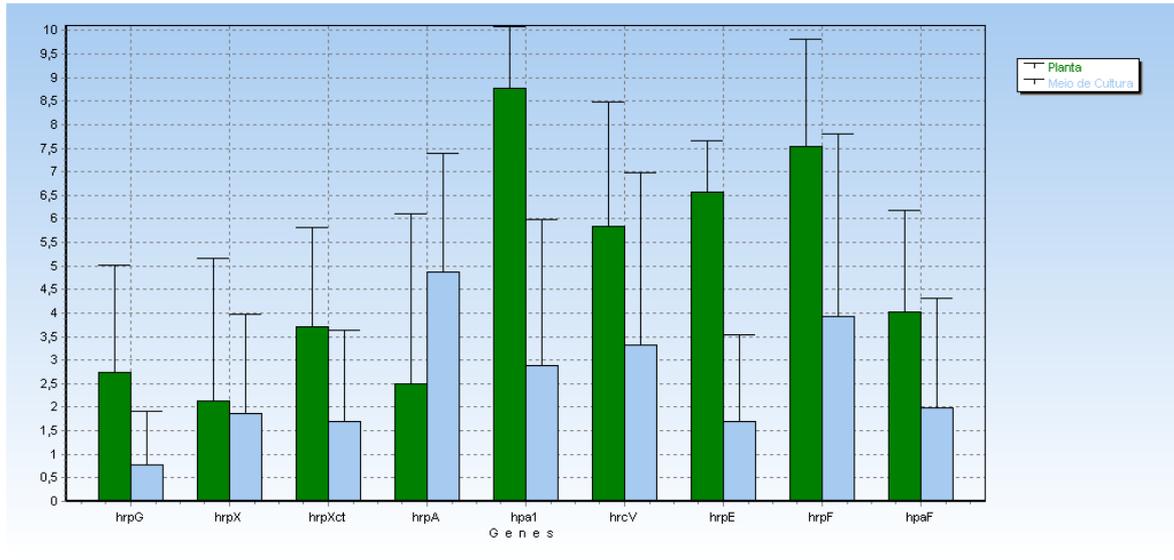


Figura 12: Expressão gênica relativa de genes do SSTT de *Xcc* cultivada em planta (folhas de laranja Pêra) e em meio de cultura (NA).

Dentre todos os genes pertencentes e/ou envolvidos com o funcionamento do SSTT analisados neste trabalho, o que apresentou a maior taxa de expressão foi o gene *hpa1* (Figura 12) que codifica uma proteína (Hpa1) citoplasmática que contém 138 aminoácidos e é rica em resíduos de glicina (característica que está presente em proteínas excretadas pelo SSTT). Hpa1 possui grande homologia com a proteína HpaG de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e com Hpa1 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Zhu e colaboradores (2000) estudaram a ação da proteína Hpa1 no patossistema *Xoo*::arroz e, em um experimento onde fora realizada mutagênese e deleção do gene *hpa1*, eles constataram que a perda deste gene resultou em uma drástica redução da patogenicidade na planta hospedeira. No ano de 2004, Furutani e colaboradores (2006) demonstraram, através de análises do sobrenadante de um meio indutor (XOM2), utilizado para cultivo de Xoo, que a proteína Hpa1 teve sua expressão regulada pela proteína HrpX, e que é secretada por meio da maquinaria de secreção do SSTT. O gene que codifica a proteína HrpX, como apresentado na Figura 12, também se mostrou induzido, quando *Xcc* estava em contato com a planta hospedeira, e isto

pode ser mais uma evidência de que HrpX regula a expressão de Hpa1.

O gene *hrpF* codifica a proteína HrpF que é um fator de patogenicidade essencial em *X. campestris* pv. vesicatoria (Xcv). Homólogos desta proteína estão presentes em diferentes *Xanthomonas*, rizóbios, *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato*. Dunger e colaboradores (2005) ao realizarem mutação neste gene e no operon *hrpB* e *hrpD* observaram que os mutantes não eram capazes de produzir cancro em *citrus*. Nesse mesmo estudo, os autores realizaram, por meio de conjugação, a complementação do gene *hrpF* sob o controle do seu próprio promotor, e verificaram que a virulência foi restabelecida por completo. No presente trabalho, as reações de qRT-PCR utilizando a tecnologia “SYBR<sup>®</sup> Green” também mostraram que a proteína HrpF é um fator importante na patogenicidade de Xcc, uma vez que o gene codificante desta proteína teve sua expressão consideravelmente aumentada (Figura 12) quando a bactéria foi colocada em contato com a planta hospedeira.

Os genes *hrp* formam um conjunto de genes implicados no processo patogênico. A cascata regulatória que controla a expressão destes genes varia nos diferentes patógenos de plantas. Em *Xanthomonas*, as proteínas que regulam a expressão do conjunto de genes *hrp* (agrupamento *hrp*) são as proteínas regulatórias HrpG e HrpX, codificadas numa região fora do agrupamento *hrp* (Figura 13) (NOEL et al., 2002 & WENGELNIK et al., 1996).

O gene *hrpG*, como pode ser observado na Figura 12, mostrou-se induzido no presente trabalho. Em *Ralstonia solanacearum* ele é responsável pela integração de diferentes sinais ambientais, sendo necessário para a ativação de *hrpB* na presença de sinais oriundos da planta e estímulos do estado metabólico (GENIN, 2005 & BRITO, 1999). Porém ainda não se conhece a proteína sensora quinase responsável pela sua ativação (GENIN, 2005). Já em Xcc foi identificado um candidato a sensor histidina quinase que interage com HrpG (ALEGRIA, 2004). Em Xcv, o gene *hrpG* é de extrema importância para a regulação da expressão do grupo *hrp* (Figura 13). O produto de sua expressão interfere tanto no controle da expressão de *hrpA*, como no controle de *hrpX*, o qual está diretamente relacionado com a expressão dos demais genes do grupo *hrp* (*hrpB* a *hrpF*).

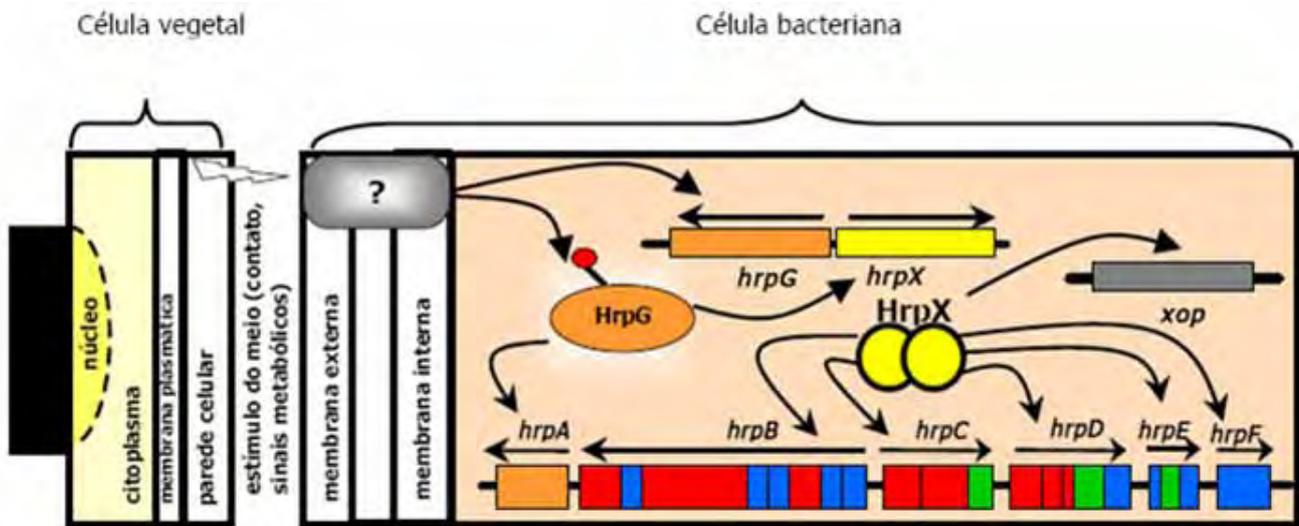


Figura 13: Modelo da regulação gênica do agrupamento *hrp* em *Xcv*. Fonte da figura: Buttner e Bonas [17], com modificações.

Wengelnik e Bonas (1996) demonstraram que em *Xcv* o gene *hrpX*, denominado *hrpXv*, age como um ativador transcricional para os genes do grupo *hrp*, sendo assim, este gene é necessário para a ativação da transcrição de cinco genes *hrp* dos loci *hrpB* até *hrpF* (Figura 13) o que é extremamente importante para o estabelecimento dos sintomas da doença. O gene *hrpXv* foi caracterizado e sua função foi determinada. A sequência de aminoácidos deduzidas indicam similaridade com proteínas da família AraC, que atuam na regulação da expressão gênica. Mutações neste gene impossibilitaram a bactéria de causar doença em pimenteiros e tomateiros, bem como de causar HR em plantas suscetíveis. A concentração de células bacterianas do mutante *hrpXv in planta* foi  $10^5$  vezes menor do que a concentração de *Xcv* selvagem também na situação *in planta*. Laia e colaboradores (2009) ao produzirem um mutante para o gene *hrpXct* de *Xcc* observaram a total ausência de sintomas do cancro. O que ocorreu provavelmente pela inabilidade da bactéria em levar até a célula hospedeira os fatores de virulência necessários ao seu desenvolvimento *in planta*. Nesta análise da expressão gênica de *Xcc*, o gene *hrpXct*, como mostrado na Figura 12, também teve

sua expressão induzida quando Xcc esteve em contato com a planta hospedeira (laranjeira Pêra), o que confirma o importante papel deste gene para a patogenicidade de Xcc.

Rossier e colaboradores (2000) demonstraram que mutantes para o gene *hrpB4* em Xcv não foram capazes de causar a doença e nem HR em plantas de pimenteiro que carregava o respectivo gene R compatível com o gene *avr* presente no isolado de Xcv utilizado no estudo. Foi também observado que estes mutantes *hrpB4* não foram capazes de excretar as proteínas AvrBs3 e nem HrpB2 em Xcv. Em um estudo utilizando elementos de transposição (transposon) para a construção de mutantes, Laia e colaboradores (2009) obtiveram um mutante para o gene *hrpB4*, no isolado 306 de Xcc, que não era capaz de causar os sintomas do cancro cítrico em *Citrus limonia*. Assim, o resultado obtido por Laia e colaboradores (2009) associado ao apresentado por Rossier e colaboradores [78], revela grande relação entre a inativação de *hrpB4* e o fato do mutante *hrpB4* deixar de ser patogênico, o que provavelmente ocorreu devido à incapacidade do mutante em levar até a célula do hospedeiro os fatores de virulência necessários ao seu desenvolvimento *in planta*. No presente trabalho, o gene *hrpB4* também se mostrou mais expresso quando Xcc foi cultivada em laranjeira Pêra do que quando cultivada em meio de cultura (Figura 14), o que fornece mais uma evidência de que este gene seja realmente muito importante para a patogenicidade de Xcc, assim como é para a de Xcv.

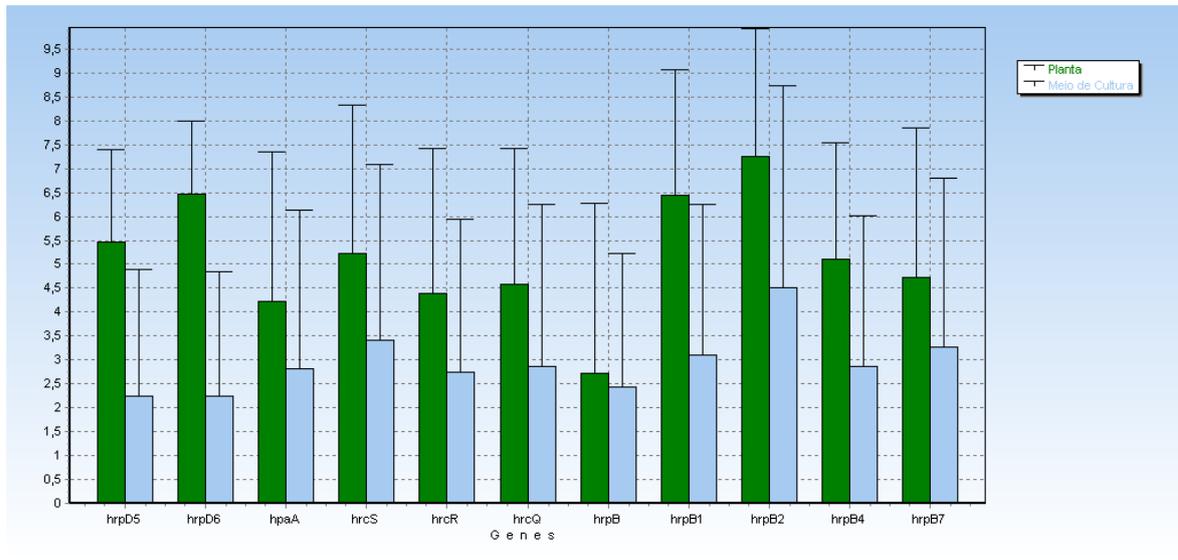


Figura 14: Expressão gênica relativa de genes do SSTT de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cultivada em folhas de laranja pêra e em meio de cultura.

Além da análise de expressão dos genes *hrpB4* e *hrpXct* no isolado 306 (selvagem) de Xcc desenvolvido em meio de cultura e planta, como já descrito anteriormente, também foram realizadas as análises das expressões desses genes nos mutante *hrpB4* e *hrpXct* obtidos por Laia e colaboradores (2009). Os mutantes *hrpB4* e *hrpXct* foram multiplicados em quatro Erlenmeyers diferentes contendo o meio indutor de patogenicidade XVM2 (WENGELNIK & BONNAS 1996; WENGELNIK et al., 1996) por um período de 24 horas e, posteriormente, suas taxas de expressão foram analisadas (utilizando os mesmos parâmetros usados para a análise dos demais genes pertencentes ao SSTT) e comparadas com as taxas de expressão dos mesmos genes (*hrpB4* e *hrpXct*) porém do isolado selvagem (306) de Xcc cultivado em meios de cultura (NA) e inoculados em plantas (laranja Pêra). Os resultados obtidos revelam que a taxa de expressão dos genes *hrpB4* e *hrpXct* dos mutantes *hrpB4* e *hrpXct* cultivados em meio de cultura indutor de patogenicidade XVM2 (WENGELNIK & BONNAS 1996; WENGELNIK et al., 1996), foi praticamente nula como pode ser observado nas figuras 15 e 16. Desta forma, fica evidente que a mutação alterou profundamente a expressão dos genes *hrpB4* e *hrpXct* nos mutantes *hrpB4* e *hrpXct*,

respectivamente e isto pode ter redundado na incapacidade desses mutantes em causar os sintomas do Cancro Cítrico como apresentado por Laia e colaboradores (2009). Esta constatação indica que os genes *hrpB4* e *hrpXct* possuem papéis fundamentais no processo patogênico de Xcc e assim sendo, podem ser potenciais alvos para a produção de drogas que visam o combate desta doença.

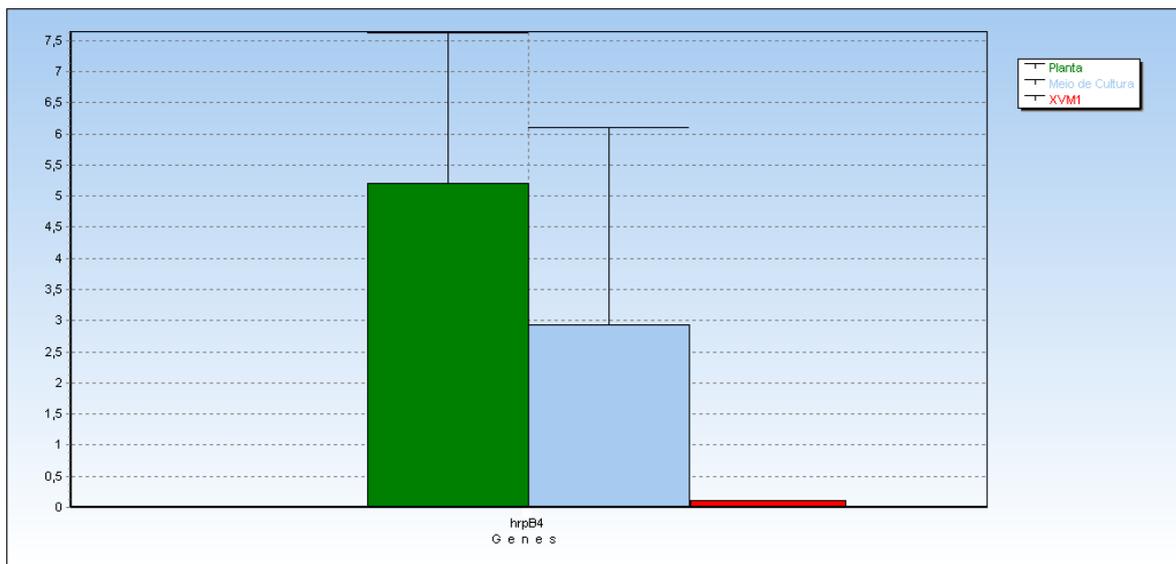


Figura 15: Comparação da taxa de expressão do gene *hrpB4* no isolado 306 (selvagem) de Xcc cultivado em planta e meio de cultura, com sua taxa de expressão no mutante *hrpB4*<sup>-</sup> cultivado em meio indutor de patogenicidade (XVM2).

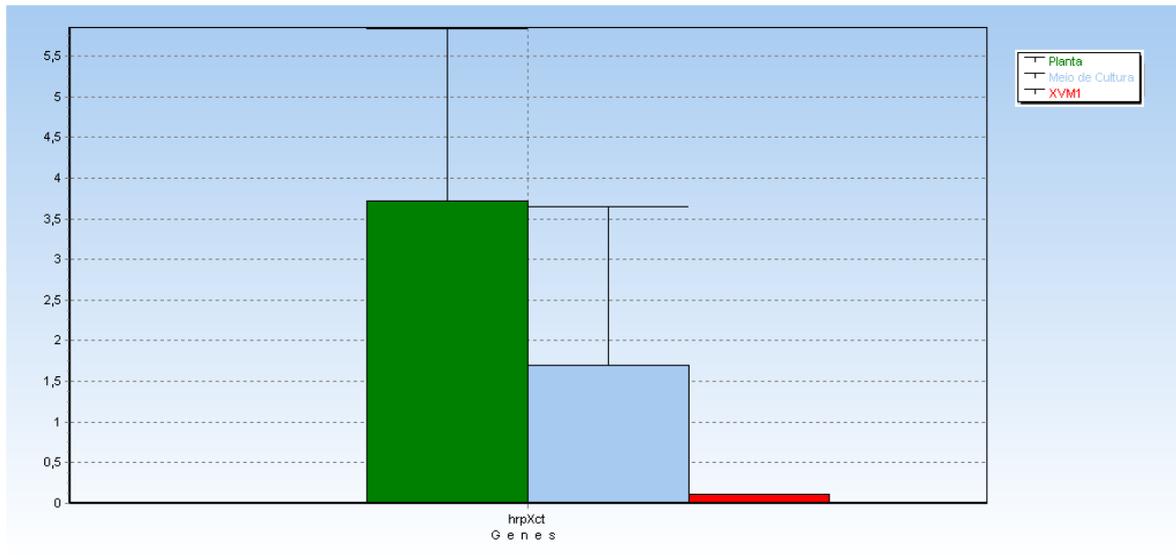


Figura 16: Comparação da taxa de expressão do gene *hrpXct* no isolado 306 (selvagem) de *Xcc* cultivado em planta e meio de cultura, com sua taxa de expressão no mutante *hrpXct* cultivado em meio indutor de patogenicidade (XVM2).

Na Figura 17 estão representadas as taxas de expressão de alguns dos genes que participam desta cascata regulatória que controla a expressão dos genes *hrp*.

As proteínas HrpD5 e HrpD6 são codificadas por genes que fazem parte de um “operon” do agrupamento *hrp*. HrpD6 é uma pequena proteína citoplasmática (81 aminoácidos) e HrpD5 (313 aminoácidos) é uma proteína de membrana interna com domínio citoplasmático. Os dois genes *hrpD5* e *hrpD6* possuem homólogos em *Xcv* e foram induzidos em *Xcc* quando a bactéria estava em contato com a planta hospedeira (Figura 14). De acordo com Huguet e colaboradores (1998), as respectivas proteínas, HrpD5 e HrpD6, fazem parte do sistema de secreção do tipo III e são essenciais para a interação de *Xcv* com a planta hospedeira. Além disso, informações depositadas no KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) demonstram que a proteína HrpD5 localiza-se na membrana interna da bactéria *Xcc* e é parte integrante do componente estrutural do sistema de secreção do tipo III. Alegria e colaboradores (2004) ao realizarem estudos utilizando o sistema de duplo-híbrido em *Xcc*, relataram a interação da proteína HrpD6 com a proteína HrpW que também teve sua expressão induzida neste trabalho (Figura 17). Embora este gene foi nomeado *hrpW*, o mesmo

não faz parte do agrupamento *hrp* em *Xcc*. O gene *hrpW* codifica uma proteína efetora (304 aminoácidos) translocada pelo SSTT (CHARKOWSKI et al., 1998). Estruturalmente trata-se de uma proteína contendo domínio “harpin”, com repetições ricas de glicina (predizendo sua translocação através da maquinaria de secreção do sistema tipo III) e possui um domínio homólogo à pectato liase (enzima pectinolítica). Alegria e colaboradores (2004) sugerem, a partir dos resultados de interação proteína-proteína (duplo-híbrido), que HrpD6 esteja envolvida no direcionamento de HrpW, assim como de outras proteínas efetoras, para o aparato de secreção do tipo III.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem uma regulação coordenada da expressão de *hrpD6* e *hrpW* quando a bactéria foi cultivada em laranjeira Pêra, sendo, assim, suportado pelos dados obtidos por duplo-híbrido. Outro dado a ser constatado é o fato da proteína HrpW estar envolvida, tanto, nos mecanismos de ação da proteína Hpa1 como na expressão do gene *hrpD6*, o que revela um papel fundamental desta proteína para a patogenicidade e virulência de *Xcc*.

Outro gene que se mostrou induzido no presente trabalho foi o gene *hpaA* (Figura 14). Estudos de mutagênese em *hpaA* de *Xcv* demonstraram que a proteína HpaA afeta a patogenicidade da bactéria em plantas suscetíveis, mas a proteína não é necessária para a indução de HR (resposta de hipersensibilidade) em interações não compatíveis. Portanto, em *Xcv*, HpaA é especificamente requerida para causar doença (HUGUET et al., 1998). Os mesmos autores também relataram que HpaA possui dois domínios funcionais de localização nuclear e propuseram que ela seja uma proteína efetora, sendo translocada para a célula vegetal através do sistema de secreção do tipo III. Alegria e colaboradores (2004) também relataram, através de ensaios de duplo-híbrido, que em *Xcc*, HpaA interage com as proteínas HpaB (Figura 17) e HrcV (Figura 12) de maneira a resultar no direcionamento de HpaA para a maquinaria de secreção do sistema tipo III e conseqüente translocação para o interior da célula hospedeira. Aqui, nessa análise, os genes *hpaB* e *hrcV* foram induzidos juntamente com o gene *hpaA*, o que corrobora com os dados apresentados por Alegria e seus colaboradores.

Em fitopatógenos a proteína HrcV se localiza na membrana interna, compondo o SSTT. HrcV é homóloga a LcrD, proteína do sistema de secreção do tipo III de *Yersinia*

spp., que é responsável pela formação do poro da membrana interna e juntamente com várias outras proteínas Hrp/Hrc compõe o núcleo interno do sistema (BÜTTNER & BONAS 2002; HUECK, 1998). A proteína HrcC está envolvida na formação do poro de membrana externa do sistema de secreção do tipo III. É uma proteína com alta similaridade com PulD, proteína que possui função semelhante dentro do sistema de secreção do tipo II. HrcC provavelmente forma um complexo multimérico em forma de anel na membrana externa (DENG & HUANG 1999).

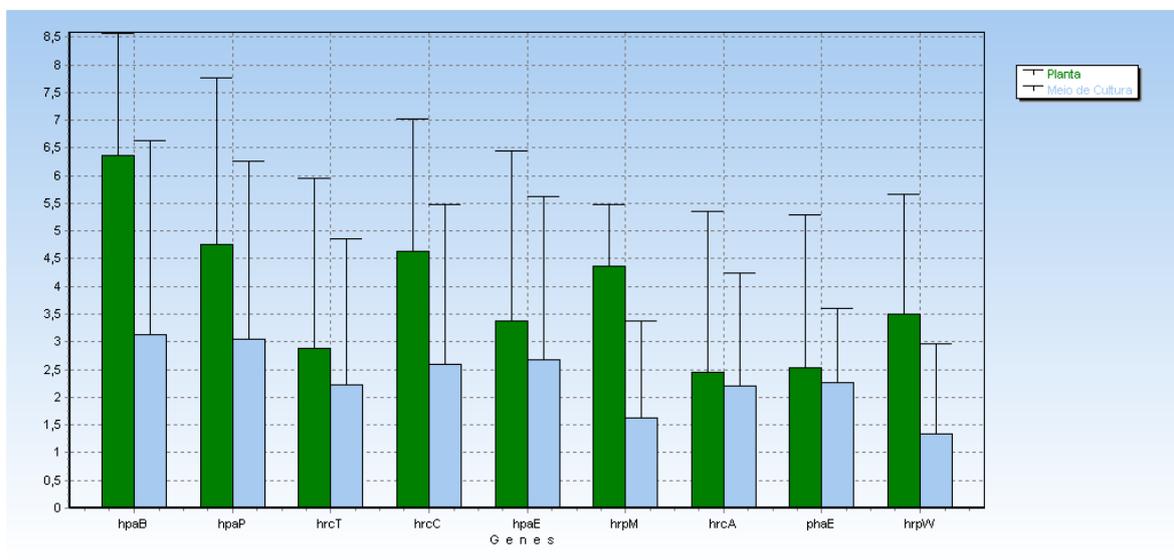


Figura 17: Expressão gênica relativa de genes do SSTT de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.

A proteína citoplasmática HpaP (205 aminoácidos) é codificada pelo gene *hpaP*, que também mostrou-se induzido em nosso experimento, porém, até o momento não foi determinada nenhuma função para esta ORF que faz parte do agrupamento *hrp*. Todavia, vários autores, a exemplo de (HUGUET et al., 1998; HUGUET et al., 2002; PETNICKI-OCWIEJA et al., 2002 & CUNNAC et al., 2004) em estudos de bioinformática associados a resultados experimentais de translocação de proteínas efetoras, deduziram alguns requisitos para que uma proteína seja considerada como efetora e

secretada pelo SSTT. A proteína HpaP de Xcc obedece às exigências relatadas pelos autores citados acima e, desta forma, pode-se supor que ela seja secretada pelo SSTT, embora ainda não existam evidências experimentais a este respeito.

O gene *hrpM* é codificador de uma proteína que está implicada no metabolismo da parede celular bacteriana. Especificamente na biossíntese de uma macromolécula complexa e majoritária denominada peptidoglicana (também chamada de mucopeptídeo ou mureína) que confere rigidez à parede celular resultando em proteção contra variações osmóticas, além de contribuir para a forma de célula. As bactérias Gram-positivas possuem grandes quantidades de peptidoglicanas, conferindo uma camada mais espessa à parede, assim como maior rigidez quando comparada com as bactérias Gram-negativas, que possuem uma fina camada de peptidoglicana em sua parede celular (PELCZAR et al., 1996).

Nas situações em que uma bactéria patogênica confronta-se com a célula hospedeira, todo um repertório de genes tem sua expressão alterada, com a conseqüente produção de proteínas necessárias ao seu desenvolvimento no ambiente em que se encontra, adaptando-se, assim, à situação de confronto à célula vegetal. Como é sabido, em espécies de *Xanthomonas*, assim como em outras bactérias patogênicas, existe a necessidade de ancoragem de proteínas na membrana da célula bacteriana, de modo a permitir a adesão e interação com as células do hospedeiro e conseqüente sucesso na indução da doença. No entanto, para que o patógeno esteja preparado para o ataque ao hospedeiro, é necessário uma rearquitetura da membrana bacteriana assim como da parede celular (LANG, 2000). Sendo o gene *hrpM*, como já dito anteriormente, codificador de uma proteína integral de membrana relacionada com a biossíntese de glucanas periplasmáticas, ele está diretamente relacionado com a síntese dos Glucanos Periplasmáticos Osmorregulados (GPOs), que são encontrados nos espaços periplasmáticos de bactérias Gram-negativas. Bohin (2000) afirma que a concentração destes glucanos aumenta em resposta ao decréscimo da osmolaridade do ambiente em que a bactéria se encontra. Esta condição de baixa osmolaridade, possivelmente, ocorre nos espaços intercelulares do vegetal durante o estabelecimento da bactéria (início da infecção), período este em que há pouca disponibilidade de

nutrientes para o fitopatógeno. Page e colaboradores (2001) relataram que mutantes para os genes relacionados à confecção dos GPOs em *Erwinia chrysanthemi* apresentaram-se não patogênicos em plantas hospedeiras e, interessante, também mostraram uma redução na síntese e secreção de pectato liase (enzima degradativa de componentes da parede celular do vegetal). Esta redução da produção de pectato liase está associada ao decréscimo de sua secreção através da parede bacteriana, sugerindo que os GPOs são constituintes essenciais da parede, uma vez que favorecem a funcionalidade de secreção de pectato liase através da mesma. Os GPOs também foram relatados como necessários para o desenvolvimento de sintomas induzidos por *P. syringae* pv. *syringae* em feijoeiro, bem como para a resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras (WINANS, 1992). Tais evidências associadas ao fato do gene *hrpM* ter se mostrado induzido quando Xcc estava em contato com seu hospedeiro (Figura 17), leva a crer que este gene também representa papel fundamental para o funcionamento do patossistema em questão.

Dentre os genes pertencentes ao SSTT e/ou implicados no seu funcionamento, analisados neste experimento, o único que não se mostrou induzido quando Xcc estava em contato com a planta hospedeira (laranjeira Pêra, neste caso) foi o gene *hrpA* (Figura 12), que codifica a proteína HrpA, composta por 1.373 aminoácidos e que mesmo estando implicado no funcionamento do SSTT não teve um alto nível de expressão, o que pode indicar sua menor importância para o funcionamento deste sistema de secreção quando a bactéria se encontra em contato com a planta hospedeira. Em contraste com o observado em Xcc, em *Pseudomonas syringae*, duas proteínas foram isoladas e caracterizadas como formadoras do *pilus* Hrp. Uma delas, identificada como HrpA, é uma proteína hidrofílica de 11 kDa, secretada sem processamento amino terminal e é necessária para a patogenicidade (HUECK, 1998 & CORNELIS, 2000). Uma proteína similar a HrpA está presente no grupamento *hrp* de *Erwinia amylovora* (HUECK, 1998 & CORNELIS, 2000). O *pilus* Hrp também pode ser encontrado em *Ralstonia solanacearum* e seu monômero formador foi denominado de HrpY (LI et al., 2002; HUECK, 1998 & CORNELIS, 2000).

#### 5.4. Análise da expressão de genes do SSTQ

No genoma de *Xcc*, alguns dos genes *vir* estão localizados no cromossomo (Figura 18) enquanto outros estão no plasmídeo pXac64 (Figura 19). Para fácil identificação destes genes nas figuras 20 e 21, foi feita a seguinte adaptação: aqueles que estão localizados no cromossomo estão representados com o nome do gene seguido pela letra 'C' (ex. *virB6* 'C') enquanto que aqueles que estão localizados no plasmídeo estão representados com o nome do gene seguido pela letra 'P' (ex. *virB6* 'P').

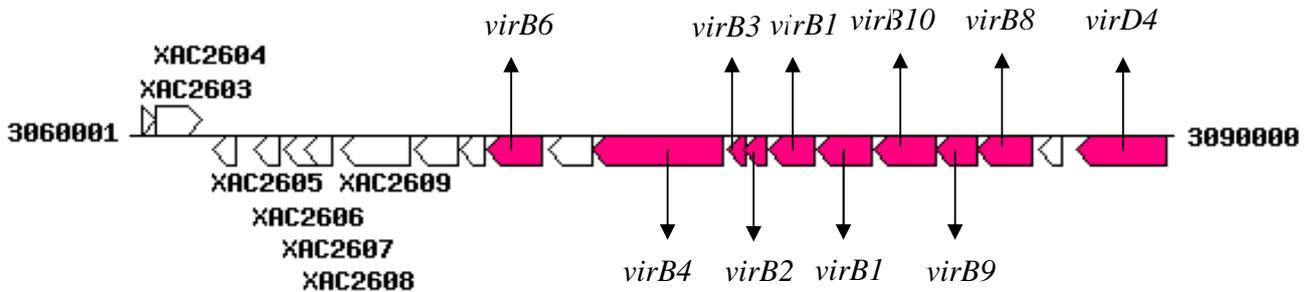


Figura 18: Localização, no mapa genômico, dos genes *vir* que compõem o SSTQ, localizados no cromossomo principal de *Xcc*.

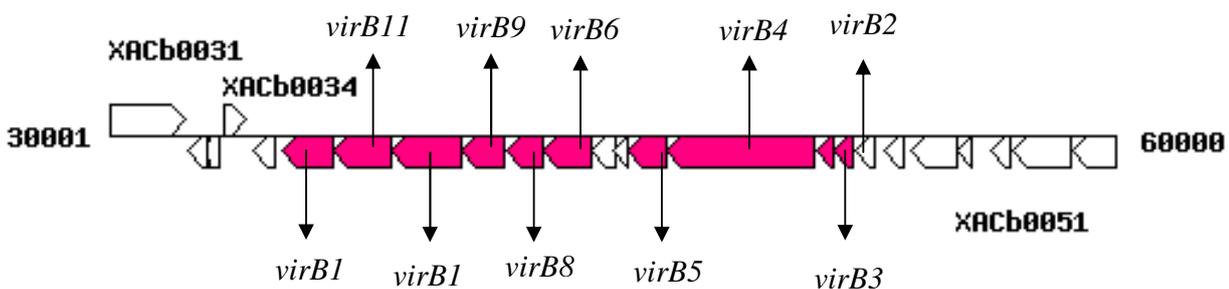


Figura 19: Localização, no mapa genômico, dos genes *vir* que compõem o SSTQ, localizados no plasmídeo pXac64 de *Xcc*.

Tendo em vista que o SSTQ possui como função primária a entrega de proteínas

requeridas para o processo de virulência (ALFANO & COLLMER 1997) no interior de células hospedeiras, assim como ocorre com a bactéria *A. tumefaciens* que causa a doença chamada de Galha-da-Coroa e tem seus genes *virB* induzidos, dentre outros fatores, pelos compostos fenólicos produzidos pela planta, era de se esperar que os genes que compõem este sistema em Xcc também tivessem sua expressão induzida quando a bactéria estivesse em contato com seu hospedeiro.

Entretanto, após a análise da expressão de 16 genes que fazem parte do SSTQ de Xcc foi constatado que dois genes, *virD4* 'C' e *virB11* 'C' (Figura 21), apresentaram a mesma taxa de expressão quando a bactéria estava em contato com a planta hospedeira (laranjeira Pêra) ou em meio de cultura. Três deles se mostraram induzidos quando a bactéria estava em contato com a planta hospedeira. Sendo que dois, dos genes induzidos, estão localizados no cromossomo, *virB6* 'C' (Figura 20) e *virB4* 'C' (Figura 20). Enquanto o outro está presente no plasmídeo pXac64, *virB2* 'P' (Figura 20). Os demais genes que compõem o SSTQ de Xcc e que foram analisados neste trabalho, tiveram sua expressão reprimida quando a bactéria estava em contato com a planta hospedeira (laranjeira Pêra), como pode ser visto nas Figuras 20 e 21.

Ao observar a representação do SSTQ na Figura 8, pode-se constatar que os três genes induzidos codificam proteínas muito importantes para o funcionamento deste sistema de secreção. A proteína VirB2 é aquela que forma uma espécie de “tubo”, por onde as proteínas ou fatores de virulência são transportados da células bacteriana para a hospedeira. VirB6 fica ancorada à membrana interna e dá sustentação para o “tubo” formado por VirB2. Enquanto que a proteína VirB4 está envolvida com os processos energéticos de quebra das moléculas de Adenosina Tri-Fosfato (ATP) e consequente captação da energia que é usada para o funcionamento de todo o SSTQ.

Sabe-se, que no plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, está presente um agrupamento gênico de aproximadamente 25 genes, dentre eles os genes *vir* (*virB1* a *virB11*), os quais são induzidos por compostos fenólicos produzidos pela planta. Esta indução é potencializada por certos açúcares, principalmente monossacarídeos. O produto dos genes *vir* promove a transferência, para o núcleo da célula hospedeira, de um fragmento de DNA, também carregado pelo plasmídeo Ti, chamado de T-DNA. Este T-

DNA contém dois tipos de genes: uns que estão envolvidos com a biossíntese de hormônios da planta; e outros que codificam enzimas para a síntese de aminoácidos conjugados com açúcares chamados de opinas.

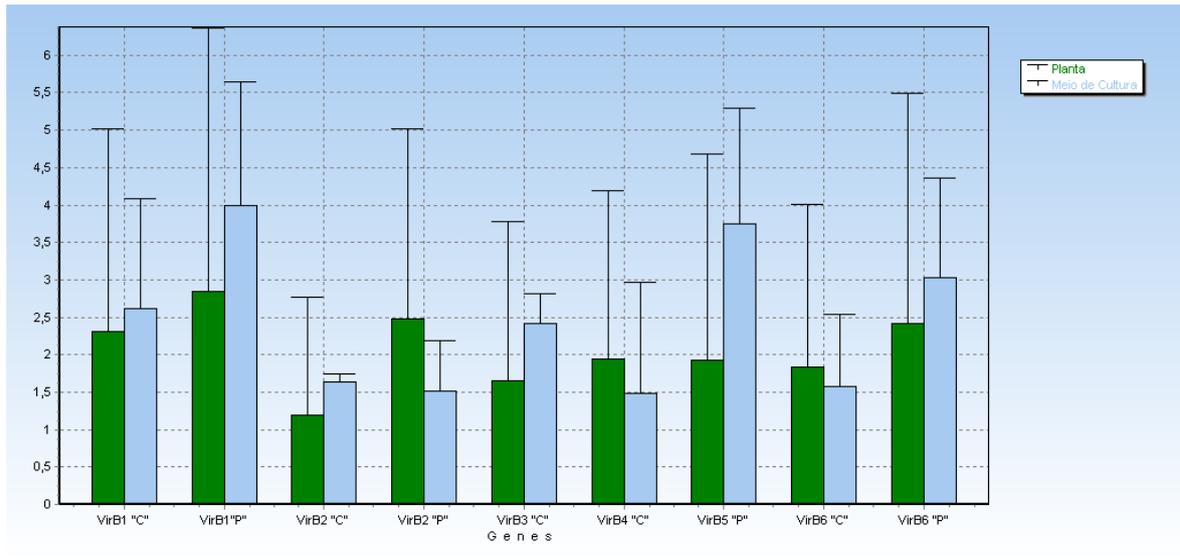


Figura 20: Expressão gênica relativa de genes do SSTQ de Xcc cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.

A produção de hormônios dirige a proliferação ilimitada de células vegetais formando os tumores característicos da doença Galha-da-Coroa, enquanto que a síntese de opinas é iniciada e vem a ser a fonte de carbono e nitrogênio utilizada pela bactéria para sua multiplicação no hospedeiro (WINANS, 1992; WINANS et al., 1994 & ZAMBRYSKI, 1992). A descoberta de que os genes *vir* são induzidos por compostos fenólicos produzidos pela planta, foi imediatamente acompanhada pela observação de que as condições ambientais como pH ácido e baixas temperaturas são também muito importantes para uma indução eficiente destes genes. Assim sendo, pode-se constatar que a indução dos genes *vir* está associada a quatro diferentes estímulos: produção de compostos fenólicos, açúcares, pH e temperatura (ZAMBRYSKI, 1992).

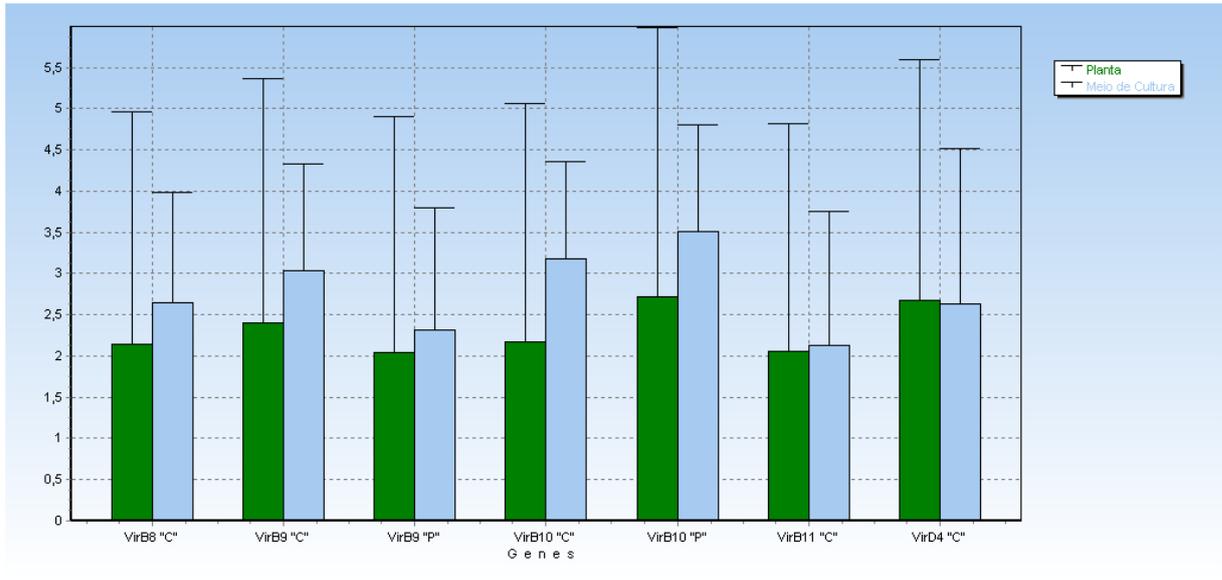


Figura 21: Expressão gênica relativa de genes do SSTQ de Xcc cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.

Desta forma, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta ocorrência. A primeira delas seria a de que os genes do SSTQ analisados neste estudo, realmente, não sejam muito utilizados por Xcc para se instalar no hospedeiro e causar os sintomas da doença. A segunda hipótese estaria baseada no fato de que o resultado encontrado deva ter ocorrido devido a análise da expressão gênica ter sido feita após 72 horas do contato de Xcc com a planta hospedeira e neste período os genes *vir* já podem estar sendo expressos em baixos níveis uma vez que eles são induzidos pela produção dos compostos fenólicos e estes serem produzidos nos estágios iniciais da infecção, geralmente devido a ocorrência de ferimentos na planta.

Em outro experimento de análise de expressão gênica, utilizando a técnica de microarranjos de DNA, Laia (2007) ao analisar a expressão dos genes *virB1* "P", *virB3* "P", *virB4* "P", *virB8* "P", *virB9* "P", *virB11* "P", *virB1* "C", *virB2* "C", *virB4* "C", *virB6* "C", *virB9* "C" e *virB11* "C", de Xcc quando a bactéria estava em contato com a planta hospedeira (laranja Pêra) por um período de até 120 horas, não detectou indução destes genes. O fato de Laia (2007) não ter observado a indução dos genes *virB4* "C" e

*virB6* “C” em seu experimento, em detrimento ao que ocorreu no presente trabalho pode ser explicado pela maior sensibilidade e acurácia da técnica de análise da transcrição reversa por PCR (qRT-PCR), usada neste estudo. Todavia, o perfil da expressão gênica dos demais genes *vir* aqui analisados corrobora com o perfil da expressão obtida por Laia (2007).

Em outro estudo Docena (2006), após realizar nocaute no gene *virD4* presente no cromossomo de Xcc, notou fenótipo de virulência alterado em apenas um de cinco mutantes infiltrados em folhas de laranjeira Pêra. No mesmo trabalho, um mutante para o gene *virB4* presente no plasmídeo de Xcc não apresentou alteração na virulência, quando infiltrado em folhas de laranjeira Pêra e limão Cravo. Tal ocorrência, corrobora com a hipótese de que o SSTQ de Xcc codificado pelos genes plasmidiais não esteja envolvido com a virulência, mas sim com processos conjugativos para troca de material genético, tal como se dá em outras bactérias.

### 5.5. Análise da expressão gênica de ORFs hipotéticas localizadas

Concomitantemente a análise dos genes que compõem o SSTQ, foram analisadas algumas ORFs hipotéticas que estão localizadas nas proximidades destes genes, tanto no cromossomo principal de Xcc como no plasmídeo pXac64. Na Figura 22 estão representadas, na cor vermelha, os genes *vir* que compõem o SSTQ e na cor verde as ORFs hipotéticas (analisadas neste experimento), todas presentes no cromossomo principal de Xcc.

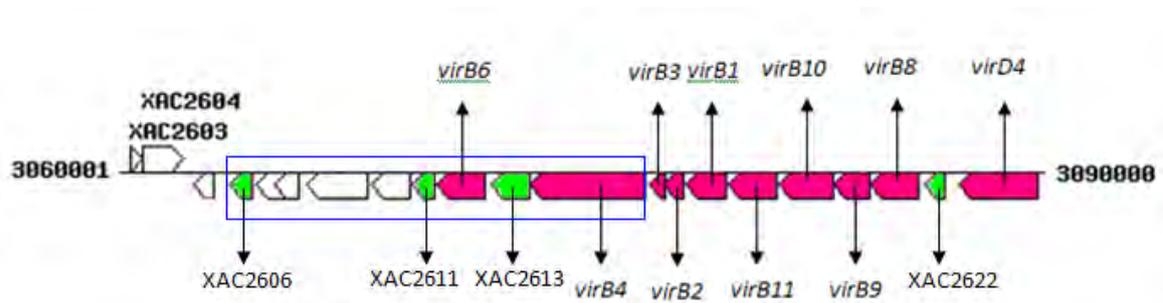


Figura 22: Localização, no mapa genômico, dos genes *vir* que compõem o SSTQ (cor vermelha) e das ORFs hipotéticas (cor verde), ambos localizados no cromossomo principal de Xcc.

As ORFs destacadas na Figura 22 e que estão dentro da região demarcada pelo quadrado azul são aquelas que foram induzidas quando a bactéria estava em contato com a planta. Na Figura 23 estão representadas as taxas de expressão de cada uma das ORFs hipotéticas analisadas neste experimento e localizadas no cromossomo principal de Xcc.

Como pode ser constatado, as ORFs XAC2606, XAC2611 e XAC2613 foram induzidas, juntamente com as ORFs XAC2612 (*virB6*) e XAC2614 (*virB4*) que fazem parte de SSTQ e codificam respectivamente as proteínas VirB6 e VirB4. A ORF hipotética XAC2622 mostrou-se reprimida, assim como as demais ORFs vizinhas que compõem o SSTQ. Pose-se observar na Figura 22 que, da ORF XAC2606 até a ORF XAC2614 (*virB4*), ocorreu indução das ORFs, sendo elas pertencentes ao grupamento *vir* ou ao conjunto de hipotéticas aqui analisadas. Da ORF XAC2615 (*virB3*) até a ORF XAC2623 (*virD4*), todas se mostraram reprimidas, sendo elas pertencentes ao grupamento *vir* ou ao conjunto das hipotéticas analisadas.

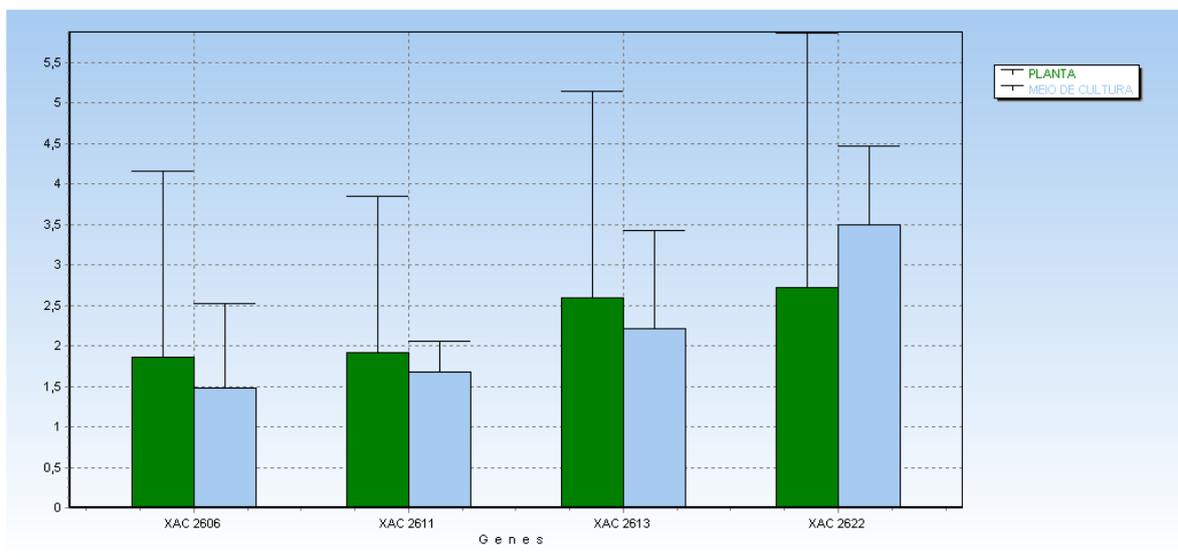


Figura 23: Expressão gênica relativa de ORFs hipotéticas localizadas no cromossomo principal de Xcc

cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.

Na Figura 24 estão representadas, na cor vermelha, os genes *vir* que compõem o SSTQ e na cor verde as ORFs hipotéticas (que tiveram sua taxa de expressão analisadas neste experimento), presentes no plasmídeo pXac64. As ORFs destacadas na Figura 24, que estão dentro das regiões demarcadas pelos quadrados azuis, são aquelas que foram induzidas quando a bactéria estava em contato com a planta.

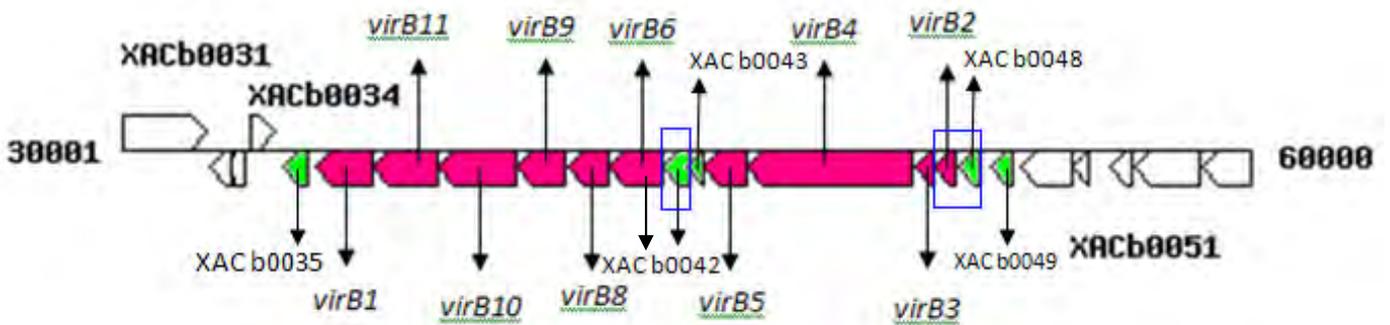


Figura 24: Localização, no mapa genômico, dos genes *vir* que compõem o SSTQ (cor vermelha) e das ORFs hipotéticas (cor verde), analisadas neste experimento, ambos localizados no plasmídeo pXac64 de Xcc.

Na Figura 25 estão representadas as taxas de expressão de cada uma das ORFs hipotéticas localizadas no plasmídeo pXac64 e analisadas neste experimento. Como pode ser constatado, as ORFs hipotéticas XACb0042 e XACb0048 foram induzidas, juntamente com a ORF XACb0047 (*virB2*) que faz parte do SSTQ e codifica a proteína VirB2 (já comentada anteriormente). As demais ORFs hipotéticas localizadas próximas as ORFs que compõem o SSTQ mostraram-se reprimidas assim como as outras ORFs que fazem parte do SSTQ de Xcc e que estão localizadas no plasmídeo pXac64.

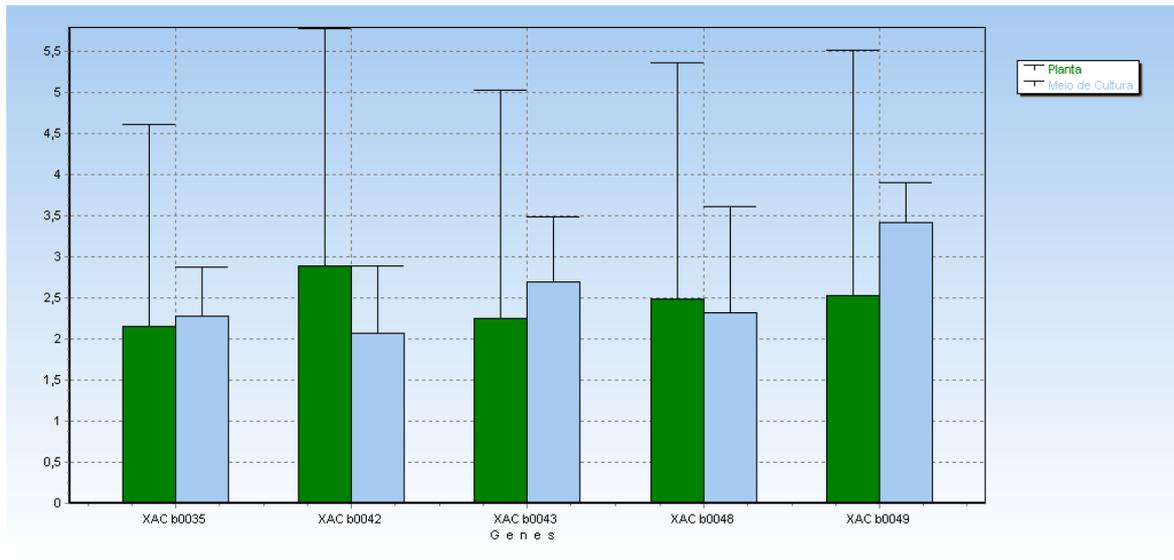


Figura 25: Expressão gênica relativa de ORFs hipotéticas localizadas no plasmídeo pXac64 de *Xcc* cultivada em folhas de laranja Pêra e em meio de cultura.

### 5.6. Análise da expressão gênica dos genes *pthA*s

Como já discutido, no genoma de *Xcc* estão presentes quatro cópias do gene *pthA* e segundo alguns estudos (SWARUP et al., 1991; ANDERSON & SCHNEEWIND 1997), o produto da expressão desse gene é necessário para provocar os sintomas do Cancro Cítrico em plantas cítricas. Duan e colaboradores (1999) comprovaram que a expressão constitutiva de *pthA* em células bacterianas se multiplicando em folhas de *Citrus* é suficiente para causar lesões, além de causar ruptura da epiderme, indicando que a proteína PthA é o fator principal de hipertrofia celular e hiperplasia. Os sintomas diretamente desencadeados pela expressão de *pthA* quando o fitopatógeno está em *Citrus* são *Citrus*-específicos, logo, a expressão de *pthA* em plantas não hospedeiras, como algodão, feijão e tabaco levam ao desencadeamento da resposta de hipersensibilidade (HR) (DUAN et al., 1999). Quando Swarup e colaboradores (1992) produziram mutantes para o gene *pthA* os sintomas de HR deixaram de ocorrer em feijoeiros mas continuaram ocorrendo em algodoeiros. A partir do momento em que o gene *pthA* foi re-introduzido no mutante os sintomas de HR voltaram a ocorrer em

pimenteiros (SWARUP et al., 1992).

A análise da transcrição reversa em tempo real por PCR (qRT-PCR) mostrou que todas as quatro cópias do gene *pthA* se mantêm funcionais quando a bactéria encontra-se na presença do hospedeiro. Entretanto, nem todas elas foram induzidas quando do contato da bactéria com a planta. A Figura 26 ilustra os diferentes níveis de expressão das quatro cópias do gene *pthA* no momento da infecção. É possível ser observado que as cópias *pthA2* e *pthA4* se mostraram induzidas, enquanto que *pthA1* e *pthA3* foram reprimidos. O gene *pthA2* está presente no plasmídeo pXac33 enquanto o gene *pthA4* se localiza no plasmídeo pXac64. As quatro cópias apresentam algumas características semelhantes e o fato de todas estarem funcionais mas, duas terem sido induzidas e outras duas reprimidas, demonstram que, para definir com segurança a função e a importância desse gene para Xcc se faz necessário obter um mutante nulo para as quatro cópias. Assim, cada uma das cópias do gene *pthA* de Xcc poderá ser complementada e a virulência poderá ser verificada em folha de laranjeira Pêra.

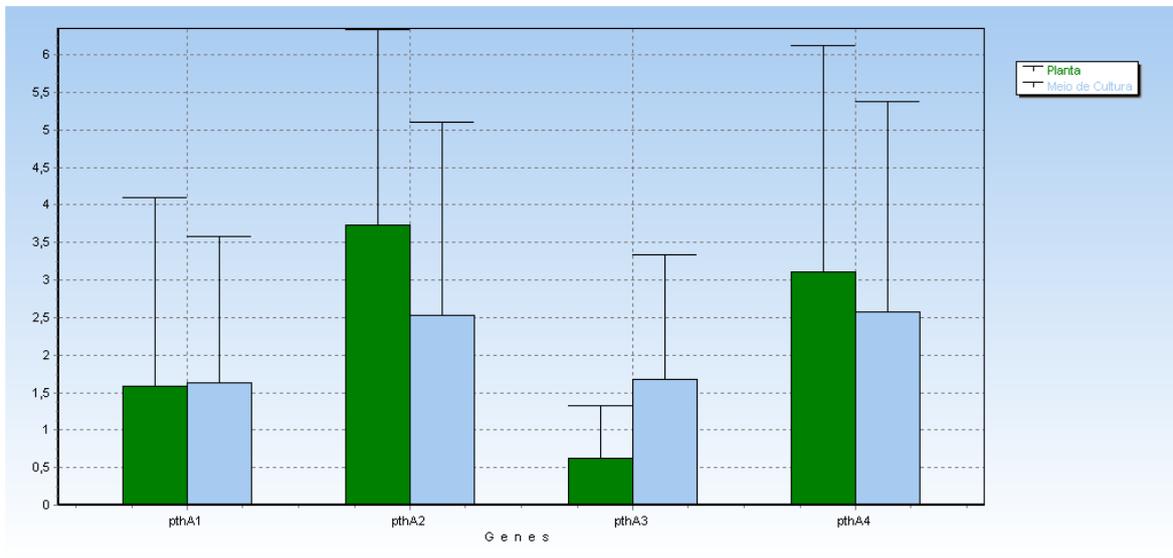


Figura 26: Expressão gênica relativa dos genes *pthAs* de Xcc cultivada em folhas de laranjeira Pêra e em meio de cultura.

## VI. Conclusões

Diante dos resultados encontrados pode-se concluir que:

–Com situações inter-grupos, a exemplo deste trabalho, o uso dos genes *rpoB* e *rpoC*, como normalizadores, proporciona uma análise de dados mais confiável;

–o uso de genes normalizadores com base apenas na literatura pode levar a resultados equivocados;

–os genes que fazem parte do SSTT, na sua maioria, possui papel muito importante no processo de patogenicidade de Xcc, uma vez que tiveram sua expressão induzida quando do contato da bactéria com a planta hospedeira;

–os genes *hrpXct* e *hrpB4* mostraram-se como bons alvos para a produção de drogas que visem o controle da doença Cancro Cítrico, uma vez que em situações onde a síntese de seus respectivos mRNAs foi interrompida os sintomas do Cancro Cítrico deixaram de ser observados;

–como a maioria dos genes analisados que codificam proteínas para a montagem do aparato de secreção do SSTQ não se mostraram induzidos, concluímos que, ao contrario do que se pensava, este sistema deva ser menos utilizado em Xcc, para a colonização do hospedeiro, do que em outros organismos patogênicos;

–em relação aos genes *pthAs*, como apenas duas das quatro cópias se mostraram induzidas e elas possuem uma semelhança muito grande entre si, concluímos que seja necessária a produção de um mutante nulo para que a virulência de cada um deles possa ser analisada em laranjeira Pêra e, assim, permitir que sejam

feitas conclusões mais concretas a respeito da importância de cada uma das cópias do gene *pthA* para o processo de patogenicidade de Xcc.

## VII. Referências

AHN K, JAE-WON HUH, SANG-JE PARK, DAE-SOO KIM, HONG-SEOK HA, YUN-JI KIM, JA-RANG LEE, KYU-TAE CHANG AND HEUI-SOO KIMET. Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. **BMC Molecular Biology**, Estados Unidos, v. 9(78), 2008.

ALEGRIA, M. C. **Identificação de interações proteína-proteína envolvendo os produtos dos loci hrp, vir e rpf do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. Tese de doutorado, IQ-USP, 2004.

ALEGRIA, M. C. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*. **J. Bacteriol**, Estados Unidos, v. 186, p. 6186-6197, 2004.

ALEGRIA, M. C., SOUZA, D. P., ANDRADE, M. O., DOCENA, C., KHATER, L., RAMOS, C. H., DA SILVA, A.C., FARAH, C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri, **J Bacteriol.**, Estados Unidos, v.187, p. 2315-2325, 2005.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **Plant Cell**, Estados Unidos, v. 8, p. 1683-1698, 1996.

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

ALFÉREZ S, MATEOS S, ALVARADO BR, SAR SM. Induction in tomato plants is not effective against root-knot nematode infection, **European Journal of Plant Pathology**, Holanda, v. 120(4), 2008.

AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado técnico 86**. Brasil, Brasília, DF. Novembro, 2003.

ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. A mRNA signal for the Type III Secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*, **Science**, Estados Unidos, v. 278, p. 1140-1143, 1997.

ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. **Curr. Opin. Microbiol.**, Inglaterra, v. 2, p. 18-24, 1999.

ASHA M. BRUNINGS AND DEAN W. GABRIEL. **Plant Molecular and Cell Biology Program**, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA, 2003.

BALOGH A, JR PG, JUHÁSZ A, KOBLING T, TOROCSIK D, MKÓ E, VARGA V, EMRI G, HORKAY I, SCHOLTZ B, REMENYIK E. Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Holanda , v. 93, p. 133-139, 2008.

BIOTECHBRASIL. **Genômica, genômica funcional, proteômica e suas aplicações na pesquisa agropecuária**. Disponível em: [www.biotechbrasil.bio.br](http://www.biotechbrasil.bio.br). Acesso em: 22 jan. 2008, 11:15:51.

BOGDANOVE, A. J. *et al.* Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 20, p. 681-683, 1996.

BOHIN, JP. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Holanda, v.186, p. 11-19, 2000.

BONAS, U., STALL, R.E., STASKAWICZ, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, **Mol Gnet**, Inglaterra, v. 218, p. 127-136, 1989.

BRITO, B. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. **EMBO J.**, Inglaterra, v. 31, p. 237-251, 1999.

BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, Estados Unidos, n. 292, p. 2275-2278, 2001.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Getting across – bacteria type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO J.**, Inglaterra, v. 21, p. 5313-5322, 2002.

CASCALES, E., ATMAKURI, K., LIU, Z., BINNS, A. N., CHRISTIE, P. J. Agrobacterium tumefaciens oncogenic suppressors inhibit T-DNA and VirE2 protein substrate binding to the VirD4 coupling protein, **Mol Microbiol.**, Estados Unidos, v.58, p.565-579, 2005.

CHANG, J. H. et al. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria, **Curr. Opin. Microbiol.**, Inglaterra, v. 7, p. 11-18, 2004.

CHARKOWSKI, A. O.; ALFANO, J. R.; PRESTON, G.; YUAN, J; HE, S. Y. & ALAN COLLMER, A. The *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v. 180, p. 5211-5217, 1998.

CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems, **Biochim Biophys Acta**, Holanda, v. 1694, p. 219-234, 2004.

CHRISTIE, P. J., ATMAKURI, K., KRISHNAMOORTHY, V., JAKUBOWSKI, S., CASCALES, E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems, **Annu Rev Microbiol.**, Estados Unidos, v.59, p. 451-485, 2005.

CHRISTIE, P. J., VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion systems adapted to deliver effector molecules to host cells, **Trends Microbiol**, v.8, p. 354-360, 2000.

COLLMER, A.; LINDEBERG, M.; PETNICK-OCWIEJA, T.; SCHENEIDER, D. J. & ALFANO, J. R. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospector, **TRENDS in Microbiology**, Holanda, v.10, p. 462-469, 2002.

CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of tipe III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 54, p. 735-774, 2000.

COROL - Cooperativa Agroindustrial. Disponível em: <http://www.corol.com.br>. Acesso em 02 fev. 2008.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Maryland USA: American Society of Plants Physiologists**, Estados Unidos, p. 850-829, 2001.

CUNNAC, S.; BOUCHER, C. & GENIN, S. Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of type III system and effectos genes in *Ralstonia solanacearum*, **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v. 186, p. 2309-2318, 2004.

D'AVILA, A. C. **Análise Funcional dos Genes pthA da Bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* por Nocaute Gênico**. Tese (Mestrado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV UNESP. Jaboticabal – SP, 2004.

DA SILVA, A.C.R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOSO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Inglaterra, v.417, p.459-463, 2002.

DELAHAY, R. M. et al. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Estados Unidos, v. 274, p. 35969-35974, 1999.

DENG, W. L.; HUANG, H. C. Cellular location of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. **J. Bacteriol.**, Estados Unidos, v. 181, p. 2298-2301, 1999.

DOCENA, C. **Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. USP, São Paulo-SP, 2006.

DUAN, Y. P., CASTANEDA, A. L., ZHAO, G., ERDOS, G., and GABRIEL, D. W. Expression of single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. **Mol Plant-Microbe Interact**. Estados Unidos, v.12, p. 556-560, 1999.

DUNGER, G. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant diseases, **Plant Pathology**, Estados Unidos, v.54, n. 6, p. 781-788, 2005.

DUONG F, WICKNER W. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling, **Embo J**, Inglaterra, v. 16, p. 4871-4879, 1997.

EBEL, F. et al. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 30, p. 147-161, 1998.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.embrapa.br>. Acesso em: 05 fev. 2008, 07:01:17.

FRÉDÉRIQUE VAN GIJSEGEM. In planta regulation of phytopathogenic bacteria virulence genes: relevance of plant-derived signals, **European Journal of Plant Pathology**, Holanda, v. 103, p. 291–301, 1997.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em:

<http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 07 fev. 2008.

FURUTANI, A., NAKAIAMA, T., OCHIAI, H., KAKU, H., KUBO, Y. & TSUGI, S. Identification of novel XrpXo regulons preceded by two cis-acting elements, a plant inducible promoter box and a -10-like sequence, from the genome data base of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, **FEMS Microbiology Letters**, Estados Unidos, v.259, p. 133-141, 2006.

GALÁN, J. E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**, Estados Unidos, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GENIN, S. Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. **FEBS Lett.**, Holanda, v. 579, p. 2077-2081, 2005.

**geNorm Software** [<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>].

GONZALEZ MC, ECHEVARRIA C, VIDAL J, CEJUDO FJ. Isolation and characterisation of a wheat phosphoenolpyruvate carboxylase gene. Modelling of the encoded protein, **Plant Science**, Holanda, v. 162, p. 233-238, 2002.

GOOSSENS K, VAN POUCKE, VAN SOOM MA, VANDESOMPELE J, VAN ZEVEREN A, PEELMAN LJ. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos, **BMC Dev. Biol.**, Estados Unidos, v. 5, p. 27, 2005.

GOTO, M. KUMAR, J; CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; and MUKHOPADHYAY, A. N. Plant diseases of international importance. **Citrus canker**, Inglaterra, v. 14, n.6, p.250-269. Abril. 1992.

GREATER, A., LAMBERTSEN, L., WILLIAMS, P.A., THOMAS, C. M. Complete

sequence of the IncP-9 TOL plasmid p WWO from *Pseudomonas putida*, **Environ Microbiol.**, Estados Unidos, v.4, p. 856-871, 2002.

GUTTMAN, D. S.; VINATIZER, B.A.; SARKAR, S. F.; RANALL, M. V.; KETTLER, G. & GREENBERG, J. T. A functional screen for the type III (Hrp) secretone of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*, **Science**, Estados Unidos, v. 295, p.1722-1726, 2002.

HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, p. 181-206, 2004.

HEID C A, J STEVENS, K J LIVAK AND P M WILLIAMS. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, Estados Unidos, v.6, p. 986-994, 1996.

HUECK, C. J. Microbiol. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Mol. Biol. Rev.**, Estados Unidos, v. 62, p. 379-433, 1998.

HUGUET, E.; HANH, H.; WENGELNIK & BONAS, U. hpAa mutants of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* are affected in pathogenic but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction, **Molecular Microbiology**, Estados Unidos, v. 29, p. 1379-1390, 1998.

INGERSLEV HC, PETTERSEN EF, JAKOBSEN RA, PETERSEN CB, WERGELAND HI. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), **Molecular Immunology**, Holanda, v. 43, p. 1194-1201, 2006.

JENKINS, C. L., STARR, M. P. Formation of halogenated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strains of *Xanthomonas maltophilia*, **Ann Pasteur Microbiol.**, Holanda, v. 136, p. 257-264, 1985.

KANAMORI H, TSUYUMU S. Comparison of nucleotide sequences of canker-forming and non-canker-forming *pthA* homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*, **Phytopathol Soc.**, Estados Unidos, v. 64, p. 462-470, 1998.

KIM, J. G. et al. Characterization of the *Xanthomonas axonodopsis* pv *glycines* Hrp pathogenicity island. **J. Bacteriol.**, Estados Unidos, v. 185, p. 3155-3166, 2003.

KLOK EJ, WILSON LW, WILSON D, CHAPMAN SC, EWIN RM, SOMERVILLE SC, PEACOCK WJ, DOLFERUS R, DENNIS ES. Expression profile analysis of the low oxygen response in Arabidopsis root cultures. **The Plant Cell**, Estados Unidos, v. 14, p.2481-2494, 2002.

KOIZUMI, M. Relation of temperature th the development of citrus canker lesions in the spring, **Proc. Intern. Soc. Citric**, Estados Unidos, v. 3, p. 924-928, 1977.

KOK DE BJ, RIAN WR, GIESENDORF BA, PENNINGS JL, WAAS ET, FEUTH T, SWINKELS DW, SPAN PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes, **Laboratory Investigation**, Estados Unidos, v. 85, p. 154-159, 2005.

KUNDINGER, M. M.; ZABALA-DIAZ, I. B.; CHALOVA, V. I.; RICKE, S. C. Effects of Maillard reaction products on hilA expression in Salmonella Typhimurium. **Journal of food science**, Estados Unidos, v. 73, p.32-35, 2008.

LAIA ML, MOREIRA LM, DEZAJACOMO J, BRIGATI JB, FERREIRA CB, FERRO MIT, SILVA ACR, FERRO JA, OLIVEIRA JCF. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library, **BMC Microbiology**, Estados Unidos, v. 9, n. 12, 2009.

LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de Xanthomonas axonopodis pv. citri**

**implicados na patogênese.** Tese (Doutorado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV UNESP. Jaboticabal – SP, 2007.

LANG, H. Outer membrane protein as surface display system. **International Journal of Medical Microbiology**, Holanda, v. 290, p. 579-585, 2000.

LI, C. M. *et al.* The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. **EMBO J.**, Inglaterra, v. 21, p. 1909-1915, 2002.

LIM, S.; JUNG, J.; KIM, D. The effect of gamma radiation on the expression of the virulence genes of *Salmonella typhimurium* and *Vibrio* spp. **Radiation physics and chemistry**, Holanda, v. 76, p. 1763-1766, 2007.

LINDGREN, P. B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.**, Estados Unidos, v. 35, p. 129-152, 1997.

MOREIRA, L. M., DE SOUZA, R. F., DIGIAMPIETRI, L. A., DA SILVA, A. C., SETUBAL, J. C. Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. **OMICS**, Estados Unidos, v. 9, p. 43-76, 2005.

MUDGETT, M. B.; STASKAWICZ, B. J. Protein signaling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, Inglaterra, v. 1, p. 109-114, 1998.

MUKHOPADHYAY, P.; WILLIAMS, J. & MILLS, M. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.170, p. 5470-5488, 1988.

NEIL J. GIBSON. *The use of real time PCR methods in DNA sequence variation analysis.* **Clinica Chimica Acta**, Estados Unidos, v. 363, p. 32-47, 2006.

NICOT N, HAUSMAN JF, HOFFMANN L, EVERS D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, **J. Exp. Bot.**, Estados Unidos, v. 56, p. 2907-2914, 2005.

NICOT N, HAUSMAN JF, HOFFMANN L, EVERS D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, **J. Exp. Bot.**, Estados Unidos, v. 56, p. 2907–2914, 2005.

NOEL, L.; THIEME, F.; NESSNTIEL, D & BONAS, U. Two novel type III system-secreted protein of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenic island. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v. 184, p. 1340-1348, 2002.

NOLAN T, HANDS RE, BUSTIN AS. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, Estados Unidos, v.1, p.1559-82, 2006.

**NormFinder Software** [<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>].

OHL F, JUNG M, RADONIÉ A, SACHS M, LOENING SA, JUNG K. Identification and Validation of Suitable Endogenous Reference Genes for Gene Expression Studies of Human Bladder Cancer, **J Urology**, Inglaterra, v. 175, p. 1915-1920, 2006.

PADMANABHAN, D., VIDHYASEKARAN, P., RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves, **Indian J. Phytopathol.**, India, v.26, p.215-217, 1974.

PAGE, F.; ALTABE, S.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; LACROIX, J. M. & BOHIN, J. P. Osmoregulated Periplasmic Glucan Synthesis is required for *Erwinia chrysantemi* pathogenicity, **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.183, p. 3134-3141, 2001.

PECHARKI D, PETERSEN FC, SCHEIE AA. LuxS and expression of virulence factors in *Streptococcus intermedius*, **ORAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY**, Estados Unidos, v. 23, p. 79-83, 2008.

PELCZAR, JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, 2ª edição, Ed. Makron Books, p. 556. 1996.

PETNICKI-OCWIEJA, T.; SCHNEIDER, D. J.; TAM, V. C.; CHANCEY, S. T.; SHAN, L.; JAMIR, Y.; SCHECHTER, L. M.; JANES, M. D.; BUELL, C. R.; TANG, X.; COLLMER, A. & ALFANO, J. R. Genowide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC 3000, **Proceedings of national Academy of science of The United States of America**, Estados Unidos, v. 99, p. 7652-7657, 2002.

PRESTON, G. M.; BERTRAND, N.; RAINEY, P. B. Type III secretion in plants growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 41, p. 999-1014, 2001.

PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, Estados Unidos, v. 57, p. 50-108, 1993.

QIAN W, JIA Y, REN SX, HE YQ, FENG JX, LU LF, SUN Q, YING G. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, **Genome Res.**, Estados Unidos, v.15, p. 757-767, 2005.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative realtime PCR, **Biochem Biotechnol**, Estados Unidos, v. 129, p. 856-862, 2007.

Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference

gene selection for quantitative realtime PC, **Biochem Biotechnol**, Estados Unidos, v. 29, n. 3, p. 856-862, 2007.

RAHME, L. G.; MINDRINOS, M. N.; PANOPOULOS, N. J. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **J. Bacteriol.**, Estados Unidos, v. 174, p. 3499-3507, 1992.

REMAUT H, WAKSMAN G. Structural biology of bacterial pathogenesis, **Curr Opin Struct Biol.**, Estados Unidos, v. 14, p. 161-170, 2004.

Robinson, TL, Sutherland IA, Sutherland J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Holanda, v. 115, p.160-165, 2007.

ROSSIER, O.; ACKERVEKEN, G. VAN DEN; BONAS, U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III secreted protein and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular Microbiology**, Estados Unidos, v. 38, n. 4, p. 828-838, 2000.

SALMOND GP, REEVES PJ. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria, **Trends Biochem Sci.**, Holanda, v. 18, p. 7-12, 1993.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. Immun.**, Estados Unidos, v. 69, p. 3523-3535, 2001.

SCHNEIKER, S., KELLER, M., DROGE, M., LANKA, E., PUHLER, A., SELBITSCHKA, W. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa, **Nucleic Acids Res**, Estados Unidos, v. 29, n. 24, p. 5169-5181, 2001.

SCHRODER, G., LANKA, E. The mating pair formation system of conjugative plasmids- A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA, **Plasmid**, Holanda, v.54, p.1, 2005.

SIMPSON et al. The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis, **Nature**, Inglaterra, v. 406, p.151-157, 2000.

SKOVGAARD K, MORTENSEN S, POULSEN KT, ANGEN O, HEEGAARD PMH. Validation of putative reference genes for qRT-PCR normalization in tissues and blood from pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Holanda, v. 118, p. 140-146, 2007.

SKOVGAARD K, MORTENSEN S, POULSEN KT, ANGEN O, HEEGAARD PMH. Validation of putative reference genes for qRT-PCR normalization in tissues and blood from pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Holanda, v. 118, p. 140-146, 2007.

SPANAKIS E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls, **Nucleic Acids Research**, Inglaterra, v. 21, p. 3809-3819, 1993.

SWARUP S., YANG Y., KINGSLEY MT AND GABRIEL DW. An *Xanthomonas citri* Pathogenicity Gene, *pthA*, Pleiotropically Encodes Gratuitous Avirulence on Nonhosts, **Molecular Plant-microbe interactions**, Estados Unidos, v. 5, p. 204-213, 1992.

SWARUP, S., DE FEYER, R., BRLANSKY, R. H., AND GABRIEL, D.W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerline lesions on citrus. **Phytopathology**, Estados Unidos, v.81, p.802-809, 1991.

SZUREK B, ROSSIER O, HAUSE G, BONAS U. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell, **Mol Microbiol.**, Estados Unidos, v. 46, p. 13-26, 2002.

TANG R, DODD A, LAI D, MCNABB WC, LOVE DR. Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Inglaterra, v. 39(5), p. 384-390, 2007.

TAUCH, A. SCHNEIKER, S., SELBITSCHKA, W., PUHLER, A., VAN, OVERBEEK, L. S. The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere, **Microbiology.**, Estados Unidos, v.148, p.1637-1653, 2002.

THANASSI DG, SAULINO ET, HULTGREN SJ. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway, **Curr Opin Microbiol.**, Estados Unidos, v. 1, p. 223-231. 1998.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Inglaterra, v. 12, p. 420-430, 2000.

VAN GIJSEGEM, F., GENIN, S. & BOUCHER, C.A. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria, **Trends Microbiology**, Holanda, v. 1, p. 175-180, 1993.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, **Genome Biol**, Estados Unidos, v. 3 (34), 2002.

VIPREY, V. et al. Symbiotic implications of Type III protein secretion machinery in

*Rhizobium*. **Mol. Microbiol.**, Estados Unidos, v. 28, p. 1381-1389, 1998.

VITZHUM, F., GEIGER, G., BISSWANGER, H., BRUNNER, H., BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard transilluminator gel imaging system. **Anal. Biochem**, Inglaterra, v. 276, p. 59-64, 1999.

VIVIAN, A.; GIBBON, M. J. Avirulence genes in plant pathogenic bacteria: signals or weapons? **Microbiology**, Estados Unidos, v. 143, p. 693-704, 1997.

WEI, Z. M. et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**, Estados Unidos, v. 257, p. 85-88, 1992.

WENGELNIK, K.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. & BONAS, U. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Estados Unidos, v. 9, p. 704-712, 1996.

WENGELNIK, K; BONAS, U. HrpX v, an arac-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. **J Bacteriol**, Estados Unidos, v. 178, n. 12, p. 3462-9, 1996.

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: APS Press, 1988. 80p.

WINANS SC, MANTIS NJ, CHEN C-Y, CHANG C-H AND HAN DC. Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*, **Res Microbiol**, Estados Unidos, v. 145, p. 461-473, 1994.

WINANS SC. Two-way chemical signalling in *Agrobacterium* plant interactions,

**Microbiol Rev**, Estados Unidos, v. 56, p. 12–31, 1992.

XIAO, Y.; LU, Y; HEU, S.; HUTCHESON, S. W. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. **J. Bacteriol.**, Estados Unidos, v. 174, p. 1734-1741, 1992.

YANG, Y., DE FEYER, R., and GABRIEL, D. W. Host – specific symptoms and increase release of *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas* pv. *Malvacearum* from leaves are determined by the 102 – bp Tandem Repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. **Mol. Plant-Microbe Interact**, Estados Unidos, v.7, p. 345-355. 1994.

ZAMBRYSKI PC. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, Estados Unidos, v. 43, p. 465–490, 1992.

ZHU, W.M.; MAGBANUA, M.M.; & WHITE F. F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in *hrp* gene cluster of *Xanthonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Journal Bacteriology**, Estados Unidos, v. 182, p. 1844-1853, 2000.