

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL EM
MUTANTES DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Elaine Costa Souza

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO- BRASIL

Julho de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL EM
MUTANTES DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Elaine Costa Souza

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

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

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Genética e Melhoramento de plantas)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2010

S729a	Souza, Elaine Costa Análise da expressão gênica global de mutantes de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> / Elaine Costa Souza. – – Jaboticabal, 2010 xvi, 128 f. ; i.l.; 28 cm Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010 Orientador: Jesus Aparecido Ferro Co-orientador: Marcelo Luiz de Laia Banca examinadora: Agda Paula Facincani, José Belasque Junior, Haroldo Alves Pereira Junior, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos Bibliografia 1. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>. 2. Mutantes. 3. Microarranjo. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. CDU 631.52:632.3
-------	---

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Elaine Costa Souza- Nascida em Ilha Solteira (SP), em 15 de outubro de 1979, com Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Três Lagoas em 2003. Concluiu o mestrado em Agronomia – Sistema de Produção pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP – Campus de Ilha Solteira (2006), com ênfase em trabalhos de pesquisa relacionados a fungos patogênicos de plantas e genética sob orientação do Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini. Durante o Doutorado desenvolveu as atividades científicas do projeto intitulado Análise da expressão gênica global em mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, sob orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia.

*Dedico aos meus pais Elpídio
Celestino de Souza e Agnésia Costa de
Souza pelo apoio, compreensão, carinho, se
não fossem eles eu não chegaria até aqui,
obrigada por tudo*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela orientação, e oportunidade e confiança em mim depositada para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia pela co-orientação, pelos ensinamentos durante esses anos e amizade.

A Prof^a. Maria Inês T. Ferro pela oportunidade concedida, ensinamentos e amizade

Ao grupo de pesquisa do LBM: Agda, André (Splinter), Andréia Fujimoto Daniele Jovino, Fabrício Edgar, Flávia, Flavinha, Gustavo, Júlio Bortolossi, Karina Dabbas, Mônica Cestari, Rafael Marini, Renata Tezza e Juliana Vantini pela amizade, apoio, carinho e compreensão.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Tecnologia da UNESP – Jaboticabal pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos Jean de Oliveira, Gislayne Bitencourt, Márcia Stech, Mariângela Alves (uma grande amiga que fiz logo que cheguei em Jaboticabal), Vanessa Sato, Juliana Rossi e Janaína Gonçalves.

As minhas amigas Claudia Mara, Márcia Helena, Walkiria e Renata Moura pela amizade, carinho e apoio.

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvi
CAPÍTULO 1 –CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Citricultura e o cancro cítrico	3
2.2. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	6
2.3. Interação Planta-patógeno.....	8
2.4. Mutagênese aleatória.....	12
2.5. Técnica de microarranjos.....	13
Referências.....	16
CAPÍTULO 2 – Análise da expressão gênica global in vivo do mutante do gene <i>xrvA</i> de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (Xac).....	22
RESUMO.....	22
SUMMARY.....	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	26
Inoculação da bactéria em planta hospedeira.....	26
Extração de RNA total de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	27
Síntese de cDNA marcado com fluoróforos Cy3 e Cy5.....	27
Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados.....	28
Análise das imagens e estatística dos dados.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	47

Sistema de secreção do tipo II (Degradação da parede celular).....	48
Gene <i>hrpX</i>	50
Genes envolvidos na regulação de fatores de patogenicidade (<i>rpf</i>).....	54
Genes do sistema de secreção do tipo IV.....	55
Transporte de Ferro.....	57
Transportadores ABC.....	58
Quimiotaxia e motilidade celular.....	59
Elementos genéticos móveis.....	63
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO 3 – Análise da expressão gênica global in vivo do mutante de uma histidina quinase de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (Xac).....	75
RESUMO.....	75
SUMMARY.....	76
INTRODUÇÃO.....	77
MATERIAL E MÉTODOS.....	80
Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	80
Inoculação da bactéria em planta hospedeira.....	80
Extração de RNA total de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	81
Síntese de cDNA marcado com fluoróforos Cy3 e Cy5.....	81
Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados.....	82
Análise das imagens e estatística dos dados.....	83
RESULTADOS.....	84
DISCUSSÃO.....	99
Sistemas de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS).....	101
Transportadores ABC.....	102
Quimiotaxia e motilidade celular.....	104
Elementos genéticos móveis.....	105
Sistema de secreção do tipo II (SST2).....	105
Sistema de secreção do tipo IV (SST4).....	107

Biossíntese de pequenas moléculas.....	109
CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
Validação do microarranjo.....	121
APÊNDICE.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AraC</i>	Ativador transcricional
<i>avr</i>	Gene de Avirulência
CVC	Clorose Variegada dos Citros
DO	Densidade Óptica,
DSF	("diffusible signal factor") Fator de sinalização difusível
EPS	polissacarídeo extracelular
g	grama(s)
h	hora(s)
HK	Histidina quinase
HR	Resposta de Hipersensibilidade
<i>hrp</i>	Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade
M	Molar,
<i>MarR</i>	"Multiple antibiotic resistance regulator"
mg/mL	miligramas por mililitros
min.	Minuto(s)
ORF	Fase ou Quadro Aberto de Leitura
pb	pares de bases,
Proteína PR	Proteína Relacionada à Patogênese
<i>R</i>	Gene de Resistência
<i>rpcF</i>	Fator de regulação de patogenicidade (<i>rpc</i> associado)
<i>rpcG</i>	Fator de regulação de patogenicidade (<i>rpc</i> associado)
<i>rpf</i>	Fatores de regulação de patogenicidade
RR	Regulador de resposta
SST2	Sistema de Secreção do Tipo Dois
SST4	Sistema de Secreção do Tipo Quatro
SSTT	Sistema de Secreção do Tipo Três
TCS	"Two-component signal"
<i>virB</i>	Genes de virulência

Xac	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xoc	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....

Figura 1. Sintomas de cancro cítrico causado por Xac em folhas, ramos e frutos (Fundecitrus).....6

CAPÍTULO 2 – Análise da expressão gênica global in vivo do mutante do gene *xrvA* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

Figura 1. Genes diferencialmente expressos da categoria VIII (Proteínas hipotéticas) distribuídos nas subcategorias (VIII.A: Proteínas hipotéticas; VIII.B: Proteínas hipotéticas (inclui “no hits” e “hits” com baixo escore) e VIII.C: Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas*).....31

Figura 2. Genes diferencialmente expressos da categoria I (Metabolismo intermediário) distribuídos nas subcategorias (I.A I: Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos, IB.10: Pool, multipurpose conversions, I.C.1: Respiração aeróbica, I.C.3: Transporte de elétrons, I.C.7: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), I.D.1: Sistemas de dois componentes, I.D.3: Quinases-Fosfatases).....32

Figura 3. Genes diferencialmente expressos da categoria VI. (Elementos genéticos móveis) distribuídos nas subcategorias (V.I.A: Funções relacionadas a fagos e profagos, V.I.B: Funções relacionadas à plasmídeos e V.I.C: Funções relacionadas à transposon e íntron).....33

Figura 4. Genes diferencialmente expressos da categoria V (Estruturas celulares) distribuídos nas subcategorias (V.A.1: Aminoácidos, aminos , V.A.2: Ânions, V.A.3: Carboidratos, ácidos orgânicos, álcoois, V.A.4: Cátions, V.A.7: Outros, V.B: Divisão celular, V.C.: Quimiotaxia e mobilidade, V.D. Adaptação osmótica).....33

Figura 5. Genes diferencialmente expressos da categoria III distribuídos nas subcategorias (III.A.1: Replicação, III.A.3: Recombinação, III.A.4.: Reparo III.A.5: Restrição, modificação, III.B.4.: Aminoacil tRNA sintetases, modificação de tRNA, III.C.1: Tradução e modificação, III.C.3: Degradação de proteína, III.D.1: Polissacarídeos, III.D.2: Fosfolipídeos).....34

Figura 6. Genes diferencialmente expressos da categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) distribuídos nas subcategorias (VII.B.: Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade, VII.C: Produção de toxina e detoxificação, VII.G: Adaptação, condições atípicas, VII.H.:Outras).....35

Figura 7. Genes diferencialmente expressos da categoria II (Biossíntese de pequenas moléculas) distribuídos nas subcategorias (II.A: Biossíntese de aminoácidos, II.A.2: Família do aspartato, família do piruvato, II.A.5: Histidina, II.B.2: Ribonucleotídeos de pirimidina, II.D.2: Ácido fólico, II.D.4: Molibdopterina, II.D.6: Piridoxina, II.D.8: Tiamina, II.F: Biossíntese de poliaminas).....35

Figura 8. Genes diferencialmente expressos da categoria IV (Estrutura Celular) distribuídos nas subcategorias (IV.A.1 Membrana interna:, IV.A.2: Constituintes da membrana externa, IV.B: Rede de mureína, peptidoglicano, IV.C: Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos).....36

Figura 9. Genes diferencialmente expressos na categoria IX (Outros).....36

Figura 10. Representação esquemática do domínio presente na proteína codificada pela ORF XAC1495 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A proteína contém 134 resíduos de aminoácidos e um domínio H-NS.....47

Figura 11. Esquema do sistema de secreção do tipo II. (Fonte: Homem, 2008)
A seta vermelha indica o produto do gene *xcsI* que foi menos expresso no mutante 8B7.....50

Figura 12. Agrupamento gênico *hrp* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* constituído por 25 ORFs (Fonte: Carvalho, 2006). *hpa2* corresponde à ORF XAC0417 e *hpaF* corresponde a ORF XAC0393. *hrpX* não pertence ao cluster *hrp* e corresponde a ORF XAC1994, a qual está separada de *hpa2* por 1.836.622 bases do genoma da Xac.....52

Figura 13. Esquema das vias regulatórias que controlam a expressão de genes de virulência em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). RpfF está envolvido na síntese de DSF, o qual se acumula no meio extracelular no início da fase estacionária de crescimento. DSF ativa o sistema de dois componentes RpfC/RpfG, o qual atua na hidrólise do di-GMP cíclico. Um segundo sistema de dois componentes que contribui para a hidrólise do di-GMP cíclico é constituído pelo sensor quinase RavS e pelo regulador de resposta RavR. RavS contém dois domínios PAS que permite sua ativação por baixos níveis de oxigênio. Altos níveis e di-GMP cíclico promove a formação de biofilme e reprime a ligação do regulador transcricional Clp aos promotores de seus genes alvos. Clp induz a síntese de enzimas extracelulares e ativa a expressão dos genes regulatórios *fhrR* e *zur*. O ativador transcricional Zur e o regulador de resposta HrpG induzem a expressão de *hrpX*, o qual codifica um ativador transcricional tipo-AraC e é crucial para a expressão de genes *hrp*. A expressão dos operons *hrpE* e *hrpC* de Xcc é também controlada pelo sistema de dois componentes ColS/ColR. Além disso, a expressão de genes *hrp* é reprimida por FhrR. HrpX regula a expressão de genes adicionais

incluindo *hpaR*, o qual codifica um regulador transcricional do tipo MarR. (BÜTTNER & BONAS, 2010).....52

Figura 14. Representação esquemática do sistema flagelar em bactéria, onde o corpo basal é composto pelas proteínas FliG, FliM e FliN. Múltiplas cópias da proteína FlgI forma o Anel P, o qual, juntamente com o anel L forma uma estrutura cilíndrica rígida que segura a rotação da haste. (<http://www.genome.jp/kegg/>).....61

Figura 15. Representação do esquema de quimiotaxia em bactérias, na qual os receptores de sinal extracelular endereçam para o sistema de tradução de sinais, onde a proteína CheA recebe o sinal da MCP fosforilando CheY, que se liga ao corpo basal (complexo de proteínas FliG, FliM e FliN) e assim inicia o movimento rotacional dos flagelos. Este sistema para quando MCP sofre modificação pela ação das proteínas CheC e CheD, alterando a sensibilidade na percepção do sinal. (<http://www.genome.jp/kegg/>).....63

CAPITULO 3 – Análise da expressão gênica global in vivo do mutante de uma histidina quinase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

Figura 1. Genes diferencialmente expressos da categoria VIII (Proteínas hipotéticas) distribuídos na subcategorias (VIII.A: Proteínas hipotéticas, VIII.B: Proteínas hipotéticas (inclui “no hits” e “hits” com baixo escore) e VIII.C: Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas*).....85

Figura 2. Genes diferencialmente expressos da categoria I (Metabolismo intermediário) distribuídos nas subcategorias (I.A I: Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos, I.A.2: Degradação de moléculas pequenas, IB.10: Pool, multipurpose conversions, I.C.2: Respiração anaeróbica e fermentação, I.C.3: Transporte de elétrons, I.C.7: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos, I.C.8: Interconversão da força motriz ATP-próton, I.D.1: Sistemas de dois componentes, I.D.2: Ativadores-Repressores I.D.3: Quinases-Fosfatases.....86

Figura 3. Genes diferencialmente expressos da categoria III distribuídos nas subcategorias (III.A.1: Replicação, III.A.3: Recombinação, III.A.5: Restrição, modificação, III.B.2: Proteínas Ribossomais, III.B.4.: Aminoacil tRNA sintetases, modificação de tRNA, III.C.1: Tradução e modificação, III.C.2: Chaperonas, III.C.3: Degradação de proteína, III.D.1: Polissacarídeos, III.D.2: Fosfolipídeos).....86

Figura 4. Genes diferencialmente expressos da categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação). distribuídos na subcategorias (VII.C: Produção de toxina e detoxificação, VII.D: Degradação da parede da célula hospedeira, VII.F: Proteínas de superfície VII.G: Adaptação, condições atípicas, VII.H.:Outras).....87

Figura 5. Genes diferencialmente expressos da categoria VI.(Elementos genéticos móveis) distribuídos na subcategorias (V.I.A: Funções relacionadas a fagos e

profagos, V.I.B: Funções relacionadas a plasmídeos e V.I.C: Funções relacionadas a transposon e íntron).....88

Figura 6. Genes diferencialmente expressos da categoria II (Biossíntese de pequenas moléculas). distribuídos na subcategorias (II.A.2: Família do aspartato, família do piruvato, II.A.4: Família dos aminoácidos aromáticos, II.A.5: Histidina, II.D.1: Biotina, II.D.6: Piridoxina, II.D.11 Menaquinona, ubiquinona: II.D.14: Cobalamina).....88

Figura 7. Genes diferencialmente expressos da categoria IV (Estrutura Celular) distribuídos nas subcategorias (IV.A.1 Membrana interna:, IV.A.2: Constituintes da membrana externa, IV.B: Rede de mureína, peptidoglicano, IV.C: Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos, IV.D: Estruturas de superfície).....89

Figura 8. Genes diferencialmente expressos da categoria V (Estruturas celulares) distribuídos nas subcategorias (V.A.1: Aminoácidos, aminas , V.A.4: Cátions, V.A.7: Outros, V.B: Divisão celular, V.C.: Quimiotaxia e mobilidade).....90

Figura 9. Genes diferencialmente expressos da categoria IX (Outros).....90

Figura 10- Sistema osmorregulatório de *E. coli*. Neste sistema ocorre um único evento de transferência de grupo fosforil entre a proteína histidina quinase (HK) EnvZ e a sua proteína reguladora de resposta (RR) OmpR.....100

Figura 11- Representação esquemática dos domínios presentes na proteína codificada pela ORF XAC3673 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A proteína contém 579 resíduos de aminoácidos e três domínios: domínio fosforeceptor histidina quinase A (HisKA) próximo ao N-terminal; domínio ATPase histidina quinase (HATPase) e domínio regulador sensor (REC) receptor de fosfato presente no C-terminal. O local de inserção do Transposon no mutante 18D6 ocorreu no domínio REC logo após o resíduo 533 (indicado pela ponta de seta).....100

Figura 12. Representação esquemática de uma proteína transportadora ABC na sua forma ativada pela hidrólise de uma molécula de ATP. Uma proteína específica periplasmática carrega a substância a ser transportada pelo transportador de membrana.....103

Figura 13. Representação do esquema de quimiotaxia em bactérias, na qual os receptores de sinal extracelular endereçam para o sistema de tradução de sinais, onde a proteína CheA recebe o sinal da MCP fosforilando CheY, que se liga ao corpo basal (complexo de proteínas FliG, FliM e FliN) e assim inicia o movimento rotacional dos flagelos. Este sistema para quando MCP sofre modificação pela ação das proteínas CheC e CheD, alterando a sensibilidade na recepção do

sinal. (<http://www.genome.jp/kegg/>).....105

Figura 14. Representação esquemática do sistema de secreção do tipo II (SST2).
Fonte: HOMEM, 2008. A seta vermelha indica o produto do gene *xcsI* que foi
menos expresso no mutante 18D6.....107

CAPÍTULO 4 – Considerações Gerais

Figura 1.– Diagrama de Venn mostrando o número total de genes diferencialmente
expressos comuns aos dois mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o número
de genes diferencialmente expressos e exclusivos para cada um
deles.....117

Figura 2. Diagrama de Venn mostrando o número de genes da categoria VIII
diferencialmente expressos comuns aos dois mutantes de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* e o número de genes diferencialmente expressos exclusivos para cada
um deles.....117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Análise da expressão gênica global in vivo do mutante do gene *xrvA* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos no mutante 8B7 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranjeira Pêra e sua distribuição pelas grandes categorias funcionais.....31

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos no mutante 8B7 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranja Pêra e sua distribuição pelas categorias funcionais.....37

CAPÍTULO 3 – Análise da expressão gênica global in vivo do mutante de uma histidina quinase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos no mutante 18D6 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranjeira Pêra e sua distribuição pelas grandes categorias funcionais..... 85

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos no mutante 18D6 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranja Pera e sua distribuição pelas categorias funcionais.....91

CAPÍTULO 4. Considerações gerais.....

Tabela 1. Tabela comparativa de alguns dos genes diferencialmente expressos que apareceram no mutante 8B7 e 18D6.....117

Tabela 2. Sequências gênicas (ORFs) presentes mais de uma vez (na forma de pares) no microarranjo e que se mostraram diferencialmente expressas no mutante 8B7.....123

Tabela 3. Sequências gênicas (ORFs) presentes mais de uma vez (na forma de pares) no microarranjo e que se mostraram diferencialmente expressas no mutante 18D6.....123

Apêndice

Tabela Suplementar I. Categorias de genes da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) utilizadas para anotação do genoma (SILVA *et al.*, 2002).....126

Análise da expressão gênica global em mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO - O cancro cítrico é uma das principais doenças da cultura do citros, provocando lesões nas folhas, ramos e frutos, tendo como consequência a queda dos frutos e folhas, o que leva à perdas significativas na produção. A partir do sequenciamento completo do genoma da bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), agente causal do cancro cítrico, abriu-se a possibilidade da utilização de estratégias de análise genômica funcional no estudo da função de genes da bactéria relacionados com a infecção na planta e com o desenvolvimento da doença. Uma das estratégias utilizadas foi a obtenção de mutantes de Xac contendo genes relacionados à patogenicidade e virulência interrompidos pelo método de mutagênese insercional aleatória utilizando o transposon *Tn5* (LAIA *et al.*, 2009). No presente trabalho a técnica de microarranjos de DNA foi utilizada para avaliar a expressão global de genes de dois mutantes de Xac 72 h após a infecção *in planta*. Em um dos mutantes (8B7) o gene interrompido foi o *xrvA*, um regulador de virulência, e no outro mutante (18D6) o gene interrompido codifica uma histidina quinase híbrida sensora que faz parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes. Os resultados das hibridizações revelaram um total de 553 genes diferencialmente expressos para os dois mutantes estudados quando comparado com o genótipo selvagem (Xac 306), sendo 323 no mutante 8B7 e 230 no mutante 18D6. Esses genes foram divididos em diferentes categorias funcionais e uma análise funcional comparativa revelou que eles podem desempenhar um papel importante no processo de patogenicidade.

Palavras-chaves: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, RNA, microarranjo, patogenicidade, gene *xrvA*, histidina quinase

Analysis of global gene expression in mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

SUMMARY – Citrus canker is a major disease affecting citrus crops worldwide, causing lesions on leaves, branches and fruits that results in the falling of fruit and leaves, leading to significant losses in orange production. The complete genome sequencing of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), a Gram-negative bacteria and the causal agent of citrus canker, allowed the possibility of using functional genomic strategies to study the function of genes related to plant infection and disease development in this bacteria. One strategy was to produce mutants for pathogenicity and virulence genes by random insertional mutagenesis using Tn5 Transposon (LAIA *et al.*, 2009). In the present work DNA microarray analysis was used to evaluate the global gene expression profile of two Xac mutants after 72 hours of plant infection. One mutant (8B7) carry a mutation in the *xrvA* gene (XAC1495), a virulence regulator, and the other (18D6) carry a mutation in a hybrid histidine kinase sensor of a two-component signal transduction system. The results revealed a total of 553 differentially expressed genes for the two mutant strains compared with Xac wild type, with 323 in the mutant 8B7, and 230 in the mutant 18D6. These genes were allocated into several functional categories and a comparative functional analysis showed that they can play an important role in the pathogenicity and virulence of Xac.

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, RNA, microarray, pathogenicity, *xrvA* gene and histidine kinase

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 80 que o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de laranja. Com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, onde a maior parte da produção destina-se à indústria do suco, produz em média 1,7 milhões de toneladas e arrecadou aproximadamente 3,5 bilhões de reais em 2003. No Estado de São Paulo, na safra 2008/2009, a produção de laranja foi de 352,57 milhões de caixas (IEA). Portanto, a citricultura é muito importante para o país e para o estado de São Paulo, em particular.

O cancro cítrico é uma doença altamente destrutiva da cultura de citros, pois ocorre mundialmente e afeta a maioria das variedades comerciais de citros. Esta doença é causada pelos fitopatógenos *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. fuscan* subsp. *aurantifolli* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (SCHAAD, *et al.*, 2006). No Brasil, a forma asiática do fitopatógeno (*X. citri* subsp. *citri* - Xac) é a mais severa, atacando todas as variedades de citros. (WHITESIDE *et al.*, 1988).

Semelhante à maioria das bacterioses, o cancro cítrico não possui controle curativo eficiente, sendo que a única maneira de eliminar a doença de um pomar é por meio da erradicação do material doente, processo que encarece substancialmente a produção, pois, no Estado de São Paulo, maior produtor, há a necessidade de eliminação de todas as plantas ao redor do foco em um raio de 30 metros, sendo proibido o cultivo de citros no local pelos próximos dois anos sem que o citricultor tenha direito a nenhuma indenização. Contudo, a erradicação das árvores contaminadas não garante a eliminação total da bactéria causadora do cancro cítrico (FUNDECITRUS). Além disso, Xac é praga quarentenária no Brasil (BRASIL, 1999) e em vários países produtores e consumidores, o que torna a presença dessa bactéria uma das principais barreiras fitossanitárias ao livre comércio de frutas frescas, limitando tanto o comércio internacional quanto o regional.

A erradicação continua a ser utilizada porque o controle químico não é eficaz em barrar adequadamente o desenvolvimento da doença. Muito pelo contrário, seu uso pode ocasionar o surgimento de isolados altamente resistentes. Assim, a erradicação é um método adotado em todas as regiões produtoras. No entanto, novos métodos de controle devem ser buscados. Consonante com esse pensamento, o estudo das vias metabólicas utilizadas por Xac durante o processo infeccioso pode revelar novos alvos para o desenvolvimento de drogas que possam eliminar ou controlar o patógeno ou, até mesmo que possam ser utilizados para o desenvolvimento de tecnologia de controle baseado na transgenia.

Considerando a importância mundial da doença, especialmente no Brasil, pesquisadores brasileiros, financiados pela FAPESP, sequenciaram o genoma completo de Xac (isolado 306), agente causal da cancrose A, e o da *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc), agente causal da podridão negra em crucíferas (SILVA *et al.*, 2002). A Xac isolado 306 apresentou 4.313 ORFs, das quais 62,8% estavam associadas a funções putativas quando da anotação do genoma. Dentre os demais genes, 29,5% mostraram-se conservados entre as duas bactérias e 331 (7,7%) são exclusivos de Xac. Em adição, Xac possui dois plasmídeos com 115 genes, sendo que a 55 deles não foi possível atribuir nenhuma função no processo de anotação.

Mas, para se avançar no conhecimento dos processos e mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da doença, há a necessidade da execução de diversos estudos em nível de genômica funcional, os quais deverão elucidar quais genes são estritamente necessários ao processo de patogenicidade e virulência para essa bactéria. Com esse intuito, o grupo de pesquisa liderado pelo Professor Jesus Aparecido Ferro vem utilizando técnicas de mutagênese e de análise da expressão global de genes, ambos em larga escala, a fim de entender os mecanismos pelos quais Xac consegue infectar, se multiplicar, se manter e desencadear cancro em citros. O primeiro passo nesse caminho se deu com a produção e análise *in planta* de uma biblioteca de mutantes de Xac, por meio de

inserção aleatória de Transposon, quando foram identificados diversos genes implicados no processo de patogênese e virulência nessa fitobactéria (LAIA *et al.*, 2009). Dentre esses mutantes, oito se mostraram avirulentos (ausência de sintoma) quando inoculados em folhas de limão cravo.

Apesar desses resultados serem altamente relevantes, a interferência desses genes no processo global de expressão gênica, modulando outros genes importantes, continua desconhecido. Esse conhecimento é de suma importância para a tomada de decisão em utilizar tais genes como possíveis alvos de controle. Portanto, o uso de outras abordagens, como a técnica de microarranjo de DNA, se presta à análise genômica funcional visando à elucidação de vias de transdução de sinais, permitindo identificar como se dá a modulação gênica durante o processo infeccioso. Desta maneira, não somente os genes, mas as vias envolvidas no processo assim determinadas poderão ajudar futuramente no desenvolvimento de drogas para o controle curativo da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Citricultura e o cancro cítrico

A citricultura brasileira é um dos setores mais competitivos do agronegócio mundial. O Brasil detém 40% da produção mundial de laranja e 60% da produção de suco de laranja, movimentando 9 bilhões por ano (CANAL RURAL, 2008). Desde a década de 80 o Brasil é o maior produtor mundial de laranja. No Estado de São Paulo, na safra 2008/2009, a produção de laranja foi de 352,57 milhões de caixas (IEA).

Apesar do grande potencial produtivo dos citros, que pode chegar a mais de 40 t de frutos por hectare (DONADIO, 1988), esses são suscetíveis a um grande número de doenças, dentre as quais algumas com alto potencial de destruição, como a tristeza (CTV) causada pelo vírus *Citrus tristeza virus*, a clorose variegada dos citros (CVC) causada pela bactéria *Xyllela fastidiosa* (LARANJEIRA e

PALAZZO, 1999), o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (NAMEKATA *et al.*, 1996) e, mais recentemente, o Huanglongbing (HLB) ou Greening, causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

O cancro cítrico foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1957, inicialmente na região de Presidente Prudente, SP, introduzido a partir de mudas importadas por imigrantes japoneses e se disseminou rapidamente para outros Estados. A doença foi posteriormente constatada em regiões do Estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (NAMEKATA *et al.*, 1996). Desde que o primeiro relato da doença foi constatado no Brasil, diversas medidas de controle vem sendo empregadas no intuito de reduzir os prejuízos causados por esta doença. No entanto nenhum controle curativo é eficaz, sendo que a única maneira de eliminar a doença do pomar é a exclusão ou erradicação da planta doente, processo que encarece substancialmente a produção, pois há a necessidade de eliminação de todas as plantas ao redor do foco em um raio de 30 m, sendo proibido o cultivo de citros no local pelos próximos dois anos sem que o citricultor tenha direito a qualquer indenização. Contudo, a erradicação das árvores contaminadas não garante a eliminação total da bactéria causadora do cancro (FUNDECITRUS). Além disso, Xac é praga quarentenária no Brasil (BRASIL, 1999) e em vários países produtores e consumidores, o que torna a presença dessa bactéria uma das principais barreiras fitossanitárias ao livre comércio de frutas frescas, limitando tanto o comércio internacional como o regional.

Além da erradicação outros métodos de controle do cancro cítrico são utilizados, como localização dos viveiros de mudas em áreas livres de cancro cítrico, estabelecimento de “quebra ventos” nas áreas de produção e uso de pulverizações de cobres e de controle da larva minadora dos citros (ROBERTS, 2002).

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), um procarioto em forma de bastonete,

uniflagelado e aeróbico obrigatório, que forma colônias amarelas e mucóides em meios de cultura artificiais. Na literatura são descritos três tipos de cancro cítrico: tipos A, B e C (MOREIRA *et al.*, 2010). O tipo A, que causa mais dano econômico para a citricultura, é originário da Ásia e é causado pela Xac, a qual é encontrada praticamente em todas as regiões onde já foi detectado o cancro cítrico (FEICHTENBERGER, 1998) e ataca todos os citros. Os tipos B e C são encontrados apenas na América do Sul. A cancrose B, presente na Argentina, Paraguai e Uruguai, tem como agente causal a *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* type B, a qual infecta *Citrus limon* mas também é encontrada em *C. sinensis* e *C. paradisi*. A cancrose C, presente no Estado de São Paulo, é causada pela *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* type C, a qual ataca apenas *C. aurantifolia* (limão galego).

A disseminação de Xac em plantas de citros ocorre através das chuvas, restos de colheita, pessoas ou veículos transitando pela lavoura (PALAZZO *et al.*, 1984).

Os sintomas característicos de cancro cítrico envolvem a formação de lesões corticosas e salientes em toda a parte aérea da planta, incluindo folhas, ramos e frutos, que se manifestam de uma semana a dois meses após a infecção (AMORIM & FILHO, 1999). A indução da formação de tecido hiperplástico (divisões mitóticas excessivas calogênicas), que resulta em lesões do tipo cancro, é a sintomatologia característica e essencial para o diagnóstico desta doença (Figura 1).

SILVA *et al.* (2002) publicaram o sequenciamento e a anotação do genoma completo da Xac, o que permitiu o início de abordagens de genômica funcional no estudo dos genes envolvidos na virulência e patogenicidade desta bactéria.



Figura 1. Sintomas de cancro cítrico causado por Xac em folhas, ramos e frutos (Fonte: Fundecitrus)

2.2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O gênero *Xanthomonas* contém uma ampla variedade de espécies, linhagens e hospedeiros (124 monocotiledôneas e 286 dicotiledôneas) (LEYNS *et al.*, 1984) e representa o maior grupo de bactérias fitopatogênicas, com uma grande diversidade patogênica e importância econômica (VAUTERIN *et al.*, 2000; VICENTE *et al.*; 2001). Além disso, o agente causal do cancro cítrico está entre as *Xanthomonas* como a bactéria que causa maior impacto na agricultura mundial (SCHUBERT *et al.*, 2001).

Existem duas características morfológicas comumente encontradas no gênero *Xanthomonas*: 1) a produção de goma xantana (exopolissacarídeo que auxilia na dispersão e sobrevivência do patógeno, além de ser uma importante fonte de matéria prima para as indústrias de alimentos e petrolífera), que faz com que suas colônias apresentem aspecto mucóide e 2) a característica cor amarelada, que é devida à produção de pigmentos, principalmente xantomonadina, quando cultivadas em meio nutriente Ágar, após dois ou três dias incubadas a 28°C (BEBENDO, 1995, VAUTERIN *et al.*, 1996).

A reclassificação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas de citros foi realizada por estudos das análises de sequências de regiões ITS (“internal transcribed spacer”), por AFLP (“amplified fragment length polymorphism”), por testes de re-associação DNA-DNA e por características fenotípicas (SCHAAD *et al.*, 2006). Anteriormente todas pertenciam a uma mesma espécie bacteriana, *Xanthomonas axonopodis*, e eram separadas por patovares (citri, aurantifolli e citrumelonis) (VAUTERIN *et al.*, 1995). A recente classificação considera esses organismos como sendo pertencentes a três espécies diferentes: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (antes *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* - Xac), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (antes *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolli*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (antes *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelonis*) (SCHAAD *et al.*, 2006).

Xac apresenta respiração aeróbica, metabolismo oxidativo e nunca fermentativo, não é fixadora de nitrogênio, não forma esporos, apresenta morfologia de bastonetes, possui flagelo polar, está adaptada ao ambiente das plantas cítricas (crescimento endofítico), sendo raramente encontrada livre no solo (SWINGS & CIVEROLO, 1993; WELLS, 1987).

A penetração de Xac na planta hospedeira ocorre nos tecidos vegetais de citros através de aberturas naturais como os estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos (GOTTWALD & GRAHAM, 1992; GRAHAM *et al.*, 1992). Assim, para se desenvolver nos espaços intracelulares do parênquima vegetal, a bactéria tem que coordenar o seu processo de multiplicação e produzir polissacarídeos extracelulares, principalmente goma xantana. O acúmulo de goma xantana e a diminuição do espaço intracelular proporciona o aspecto de encharcamento no tecido infectado, ocorrendo o aprisionamento da água do xilema devido ao potencial higroscópico da goma (PADMANABHAM *et al.*, 1973)

2.3. Interação Planta-patógeno

O mecanismo de interação entre patógeno e planta é caracterizado por trocas de sinais que envolvem um sistema de “ataque e defesa contra o ataque” (STAHL & BISHOP, 2000). De um lado a planta tenta eliminar o patógeno no sítio de infecção, ocorrendo suicídio das células atacadas, e do outro, o patógeno tenta desativar o sistema de defesa da planta para sobreviver. Assim a presença do patógeno ativa na planta a produção de substâncias para evitar a instalação dos microrganismos. No entanto, se o patógeno conseguir se instalar no tecido vegetal, um segundo mecanismo de defesa da planta é ativado para impedir a proliferação do patógeno. Se o patógeno ganha a batalha, a doença se instala e diz-se que a planta é sensível; se a planta ganha a batalha, seu mecanismo de defesa é eficiente contra aquele patógeno e diz-se que a planta é resistente. A proteção das plantas contra a maioria dos patógenos é adquirida por meio de barreiras pré-formadas, tais como cutículas espessas e presença de compostos antimicrobianos (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000).

A defesa da planta é induzida por um caminho básico de reconhecimento e transdução de sinais para ativar as respostas de defesas, tais como: geração de espécies ativas de oxigênio (DIXON *et al.*, 1994; BOLWELL *et al.*, 1995), morte programada de células no sítio de infecção (resposta de hipersensibilidade - HR) (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996), deposição de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (CORBIN, *et al.*, 1987), lignificação da parede celular (GRAND *et al.*, 1987), síntese e acúmulo de fitoalexinas (GUSTINE *et al.*, 1990) e síntese de proteínas PR antimicrobianas.

Em mamíferos o sistema de defesa é baseado em células altamente especializadas que se distribuem por um sistema circulatório envolvendo o sistema imune. Em contraste, as células de plantas não se movem e as respostas de defesa são autônomas, de modo que cada célula possa detectar e responder ao ataque microbiano individualmente (BONAS & LAHAYE, 2002).

Muitas bactérias fitopatogênicas colonizam o espaço intercelular (apoplasto) de plantas hospedeiras. Este nicho é nutricionalmente pobre, carregado de substâncias antimicrobianas e acídicas. No entanto, a fim de garantir a sua sobrevivência, o patógeno necessita desenvolver estratégias para conseguir o máximo de nutrientes do hospedeiro para sua consequente colonização e multiplicação. O estabelecimento do patógeno bacteriano no hospedeiro e sua habilidade em causar doenças dependem de um processo complexo que requer a atividade coordenada de muitos genes bacterianos ligados à patogenicidade e virulência. Os produtos destes genes são, em última análise, os responsáveis pela virulência e patogenicidade do patógeno e, na grande maioria dos casos, a identidade e o seu modo de ação ainda são obscuros.

As interações entre planta e patógeno são denominadas como compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível, a bactéria é capaz de mascarar ou reprimir os mecanismos de defesa da planta hospedeira, desenvolvendo-se nos tecidos vegetais, manifestando a doença por meio de mecanismos que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta hospedeira (WHITE *et al.*, 2000).

Logo, a interação compatível implica na doença propriamente dita, na qual ocorre a invasão e colonização do patógeno na planta hospedeira, sem que esta consiga disparar seu arsenal de defesa o suficiente em intensidade e tempo para barrar o patógeno.

Na interação incompatível, ocorre uma restrição ao sítio de infecção, pois ocorre um rápido e intenso disparo dos mecanismos de defesa da planta em resposta ao reconhecimento específico entre uma molécula elicitora do patógeno e o receptor específico da planta.(CAMARGO, 1995). Este tipo de interação prediz que o gene de avirulência (*avr*) do patógeno codifica uma proteína elicitora (Avr) capaz de interagir especificamente com um receptor na planta (proteína R) codificada pelo gene de resistência *R* (GABRIEL *et al.*, 1993; KEEN, 1990; BUEL, 1999). A interação, direta ou indireta, entre o elicitor Avr do patógeno e o receptor

R da planta, leva a uma rápida ativação das vias de transdução de sinais que resulta na resposta de resistência, muitas vezes associada a uma necrose localizada também denominada reação de hipersensibilidade (HR, “Hypersensitivity Response”)

A resposta de hipersensibilidade é caracterizada por uma morte celular programada das células vegetais infectadas pelo patógeno e células adjacentes ao sítio de infecção, que leva ao bloqueio e eliminação deste sem que haja manifestação da doença (GOODMAN & NOVACKY, 1994; STASKAWICZ *et al.*, 1995). Os eventos fisiológicos associados à HR envolvem um aumento intracelular dos níveis de espécies ativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 e OH^-), perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, destruição de compartimentos e fortalecimento das paredes celulares e da cutícula vegetal, produção de agentes antimicrobianos (fitoalexinas) e indução da expressão de proteínas de defesa (conhecidas como proteínas PR, de “*pathogenesis related*”), que limitam a colonização de tecidos vegetais pelo agente invasor (HAMMOND-KOSAK & JONES, 1996). A clonagem e caracterização de diversos genes *avr* de origem bacteriana revelaram uma grande diversidade entre os produtos destes genes, o que impediu que fossem feitas generalizações sobre a estrutura de moléculas elicitóricas (VIVIAN & GIBBON, 1997).

Estudos com mutantes para os genes *avr* mostraram que a presença deles confere uma vantagem seletiva para o patógeno na ausência do gene *R* correspondente (LAUGE *et al.*, 1998; KJEMTRUP *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2000; STASKAWICZ *et al.*; 2001), o que explica sua manutenção na população do patógeno. Contudo, postula-se que os genes *avr* poderiam agir, primeiramente, como fatores de virulência que, durante a co-evolução do patossistema, se tornaram alvos dos genes R da planta (COLLMER, 1998). No entanto, apesar de importantes para o patógeno, os genes *avr* sofrem frequentes mutações, o que ocasiona o surgimento de novas raças virulentas do patógeno e a consequente quebra da resistência.

Além dos genes *avr*, um agrupamento gênico denominado *hrp* (“hypersensitivity response and pathogenicity”) foi evidenciado em estudos com mutantes de bactérias fitopatogênicas, para os quais tem se verificado um papel tanto na patogenicidade em plantas suscetíveis quanto na indução de hipersensibilidade (HR) em plantas contendo o gene de resistência (R) correspondente ou em planta não-hospedeiras (BONAS & VAN DEN ACKERVEKEN, 1997).

Assim, a verificação de que os genes *hrp* são essenciais para a patogenicidade e indução de HR indica que a funcionalidade dos genes *avr* depende dos genes *hrp* (DANGL., 1994). Os genes *hrp* foram primeiramente identificados em *Pseudomonas* spp e em bactérias fitopatogênicas gram-negativas dos gêneros *Xanthomonas* spp., *Rasltonia solanocearum* e *Erwinia* spp. (ALFANO & COLLMER, 1997). Algumas proteínas destes agrupamentos de genes apresentaram homologia com vários componentes do sistema de secreção do tipo III (SSTT) de patógenos bacterianos de animais (*Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*), onde as proteínas codificadas por genes *hrp* formam uma estrutura tubular do tipo “pilus” capazes de conectar as células bacterianas e animal, permitindo a translocação de proteínas da bactéria relacionadas à virulência, através da membrana plasmática, diretamente para o citoplasma da célula hospedeira animal (VAN GIJSESEGEM *et al.*, 1993).

RAHME *et al.* (1992), em estudos de controle da expressão de genes *hrp*, mostrou que há uma complexidade inerente à função indispensável que eles exercem para o estabelecimento tanto de interações compatíveis como de interações incompatíveis, no confronto bactéria-planta. A regulação dos genes *hrp* é dirigida por sinais da planta, osmolariedade, pH e disponibilidade de nutrientes, evidenciando uma complexa gama de sinais aos quais a fitobactéria é confrontada nos diferentes estádios de seu desenvolvimento na região apoplástica do tecido vegetal.

Estudos baseados em sequenciamento e análise estrutural dos agrupamentos de genes *hrp* e de genes *avr* em *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas*

spp., *Ralstonia* spp. e *Ewinia* spp. permitiram evidenciar características peculiares a cada tipo de doença (ALFANO JR. & COMMERCER A., 1997). Portanto, estudos sobre o mecanismo capaz de mediar a injeção de proteínas secretadas por bactérias diretamente na célula vegetal vêm possibilitando uma melhor compreensão dos diversos aspectos que envolvem a indução de HR em plantas resistentes.

2.4. Mutagênese aleatória

O sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) e a anotação dos genes presentes nestes genomas permitiram a identificação de genes putativos envolvidos na patogenicidade e virulência destas fitobactérias (SILVA *et al.*, 2002). A disponibilidade da sequência do genoma de vários organismos levou ao surgimento de técnicas de análise de expressão gênica em larga escala, tais como os macro e microarranjos de DNA e o estudo do proteoma diferencial, as quais permitem uma análise global da expressão gênica em diferentes condições experimentais. Essas abordagens também estão sendo utilizadas nas pesquisas com bactérias patogênicas de plantas e devem revelar novos genes e mecanismos envolvidos na patogenicidade e virulência.

Uma outra abordagem que permite identificar em larga escala genes ligados a patogenicidade e virulência é a mutagênese aleatória por meio da inserção de transposon no genoma *in vivo*. Esta técnica tem sido amplamente utilizada com sucesso em vários microrganismos patogênicos e não patogênicos (BROWN & HOLDEN, 1998; FERREIRA *et al.*, 2001; HUDSON *et al.*, 2006). LAIA *et al.* (2009), utilizando esta técnica, obteve uma biblioteca de mutantes de Xac com aproximadamente 10.000 mutantes viáveis. A avaliação da virulência foi verificada por inoculação na planta hospedeira dos mutantes obtidos e observação de alterações dos sintomas típicos do desenvolvimento da doença, que podem ir desde alterações leves à ausência de patogenicidade. Dos 3.300 mutantes

inoculados em folhas de plantas de limoeiro cravo para confirmação da alteração da patogenicidade, 122 apresentaram algum tipo de alteração na capacidade de causar doença ou em elicitar sintomas característicos de cancro, sendo que em 8 deles houve ausência total de sintomas (LAIA *et al.*, 2009).

A utilização de mutantes para estudos de análise da expressão gênica em larga escala em comparação com as cepas selvagens irá revelar os genes diferencialmente expressos em cada caso, o que levará a uma maior compreensão do processo infeccioso na interação planta-patógeno.

2.5. Técnica de microarranjos

Com o sequenciamento completo do genoma humano e de outros organismos, surgiu um novo desafio que é compreender como esses genes atuam. A disponibilidade da estrutura de alguns genes abre caminhos para uma difícil tarefa que é a de atribuir funções biológicas a cada gene individualmente, sendo mais desafiante ainda explicar as redes altamente complexas de regulação dentro das células vivas, onde genes, proteínas e metabólitos se interagem. Técnicas tradicionais de estudos de expressão gênica como *Northern blotting* e *Diferencial display* permitem a análise de um ou alguns genes simultaneamente, oferecendo uma compreensão limitada dentro dos processos celulares. Todavia, a técnica de microarranjo (*microarray*) de DNA é uma ferramenta muito mais poderosa para estudos de expressão gênica em larga escala. Assim, essa disposição global da técnica de microarranjo de DNA permite elucidar um conjunto de genes e redes metabólicas.

O uso de microarranjo de DNA para estudos de expressão gênica gera um grande número de dados que são frequentemente difíceis de analisar e pode levar a hipóteses e conclusões desconcertantes, uma vez que a determinação de genes diferencialmente expressos envolve o uso de ferramentas estatísticas para estabelecer a probabilidade de que uma mudança nos níveis de expressão gênica reflete uma mudança “real”. Neste contexto, “real” significa que as alterações

observadas não são resultados de eventos aleatórios ou biológicos com variabilidade inerente à metodologia experimental utilizada (DHARMANDI *et al.*, 2004).

Apesar do primeiro artigo de análise de expressão gênica utilizando microarranjo de DNA ter sido publicado em 1995 (SCHENA *et.al*, 1995), o conceito miniaturizado de análise de hibridização foi desenvolvido em meados dos anos 80 (EKINS & CHU, 1999). Por exemplo, estudos imunoquímicos utilizando composto fluorescente foram descritos por Ekins em 1989, e o uso de hibridização com marcação fluorescente foi avaliado por concentração analítica de proteínas. Embora não seja exatamente equivalente, o uso de sondas fluorescentes para avaliar hibridização de ácidos nucleicos é o suporte principal de muitos estudos de arranjos e é o início de uma extensão lógica de estudos imunoquímicos.

O microarranjo tem sido utilizado em vários estudos de expressão gênica, e um exemplo de sua utilização é nos estudos de microrganismos patogênicos, tanto de plantas como em animais.

Por décadas pesquisadores tem utilizado uma ampla variedade de métodos para estudar tanto a interação de microrganismos patogênicos com seus hospedeiros como os mecanismos de defesa utilizados pelos hospedeiros. Estas informações são cruciais para um esboço seguro e efetivo de diagnóstico, terapêutica e vacinas (MAEDA *et al.*, 2001)

A técnica de microarranjo de DNA apresenta várias vantagens sobre outros sistemas utilizados anteriormente para estudos de patógenos e sua interação com o hospedeiro, os quais possibilitavam a análise da expressão de um número pequeno de genes em experimentos individuais. A maior vantagem da técnica de microarranjo é a capacidade de avaliar simultaneamente a presença de milhares sequências diferentes de ácidos nucleicos. E, deste modo, esta técnica permite a quantificação de genes específicos e seu padrão de expressão em diferentes situações. O microarranjo de DNA tem sido utilizado para estudos de polimorfismo genético, interação patógeno-hospedeiro, perfil de expressão de genes de patógenos e identificação de alvos para drogas (MAEDA *et al.*, 2001).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão gênica global *in planta*, por meio da técnica de microarranjo de DNA, de mutantes de *Xanthomonas citri* sbsp. *citri* (Xac) que apresentam patogenicidade alterada ou abolida quando comparados com a Xac selvagem, afim de elucidar a diferenciação na expressão de genes relacionados à patogenicidade e virulência no patossistema Xac-citros.

REFERÊNCIAS

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

AMORIM, L. e BERGAMIN FILHO, A. A epidemiologia do cancro cítrico. In: L. ZAMBOLIM e A. J. A. MONTEIRO (Ed.). 3º. Encontro de fitopatologia: **Doenças de fruteiras tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. A epidemiologia do cancro cítrico, p.1-17.

BEBENDO, I. P. **Manchas foliares**. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H.; Amorin, L. eds. Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e conceitos, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 848-858, 1995.

BOLWELL, G. P. *et al.* The origin of the oxidative burst in plants. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 23, n. 6, p. 517–532, 1995.

BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 1, p. 44–50, 2002.

BONAS, U.; & VAN DEN ACKERVEKEN, G. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? **The Plant Journal**, v. 12, n. 1, p.1-7, 1997.

BRASIL. Ministério da agricultura e do abastecimento –secretaria de defesa agropecuária. **Instrução Normativa-SDA nº38/1999** de 14 de outubro de 1999. Brasília - DF, 1999.

BROWN, J. S.; HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 1, n. 4, p. 390–394, 1998.

BUEL, C.R. Genes Involved in Plant-Pathogen Interactions. Induced Plant Defense Against Pathogens and Herbivores. 2nd. Ed. APS PRESS. **The American Phytopathological Society**, St. Pul Minnesota, 1999.

CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, v.1, p.470-492, 1995.

CANAL RURAL. Acesso em 2010. Disponível em < <http://www.canalrural.com.br/> >

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**, Washington, v.180, p.5211-5217, 1998.

CORBIN, D. R.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 7, n. 12, p. 4337–4344, 1987.

DANGL, J. L. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. **Current topics in microbiology and immunology**, Berlin, v.192, p.99-118, 1994.

DHARMANDI, Y and GONZALEZ, R. DNA Microarrays: Experimental Issues, Data Analysis, and Application to Bacterial Systems. **Biotechnology progress**, New York, v.20, n. 5, p. 1309-1324, 2004.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 479–501, 1994.

DONADIO, L. C. Produtividade dos citros em Israel. In: L. C. DONADIO (Ed.). **Produtividade de citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. Produtividade dos citros em Israel, p.47-62

EKINS, R. and CHU, F.W. Microarrays: their origins and applications. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v.17, p. 217-218, 1999.

FEICHTENBERGER, E. **Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no Brasil**. In: DONADIO, L. (Ed.). Anais do V Seminário Internacional de Citros – Tratos Culturais. Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p. 517.

FERREIRA, M. C. D. *et al.* Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. **Current Genetics**, New York, v. 40, n. 1, p. 27–39, 2001

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. 2010. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 02 Fev. 2010.

GABRIEL, D.W.; KINGSLEY, M.T.; YANG, Y.; CHEN, J.; e ROBERTS, P. Host-specific virulence genes of *Xanthomonas*. **Molecular mechanisms of bacterial virulence**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. p. 141-158. In C.I. Kado and J. Crosa (ed.), 1993.

GOODMAN, R. N.; NOVACKY, A. J. **The hypersensitive reaction in plants to**

pathogens: A resistance phenomenon. St. Paul: APS Press, 1994

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. **Compendium of Citrus Diseases** (eds TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H.), Am. Phytopathol. Soc., SP, 2000. p.5–7.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 1992

GRAND, C.; SARNI, F.; LAMB, C. J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 169, n. 1, p. 73–77, Nov 16 1987.

GUSTINE, D. L.; SHERWOOD, R.T.; LUKEZIC F. L.; MOYER B. G. AND DEVLIN W.S. Metabolites from *pseudomonas-corrugata* elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1427–1432, 1990

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

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

HUDSON, P. *et al.* Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (lpd), in *Mycoplasma gallisepticum* through in vivo screening of transposon mutants. **Infection and immunity**, Bethesda, , v. 74, n. 2, p. 931–939, 2006.

IEA. **Instituto de Economia Agrícola.** 2010. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1043>

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review.Genetic.** Palo Alto, v.24, p.447-463, 1990.

KJEMTRUP, S.; NIMCHUK, Z.; DANGL, J. L., Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. **Current Opinion Microbiology**, London, n.3, v.1, p.73-78, 2000.

LAIA, M.L.; MOREIRA, L.M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J.B.; FERREIRA, C.B.; FERRO, M.I.T.; SILVA, A.C.R.; OLIVEIRA, J.C.F.; FERRO, J.A. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by

a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, London, v.9, n.12, p.1-17, 2009.

LAUGE, R.; DE WIT, P. Fungal avirulence genes: Structure and possible functions. **Fungal Genet. Biol**, Orlando, n.24, v.3, p.285-297, 1998.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS J. G.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review**, New York, v.50, p.308-356, 1984.

MAEDA, K.M.; GAO, Q.; SMALL, P.M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.3, p. 1-8, 2001

Leandro M Moreira, Nalvo F Almeida Jr, Neha Potnis, Luciano A Digiampietri. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *Aurantifolii*. **BMC Genomics**, London, 11:238, 2010.

NAMEKATA, T., ROSSI, A. C. e CERAVOLO, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**, v.17, n.1, p.67-78. 1996.

PALAZZO, D. A., MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. e NOGUEIRA, E. M. C. Effect of some climatic factors on the index of infection of citrus canker caused of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on Valencia orange (*Citrus sinensis*) in Bataguassu, MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.2, p.283-290, 1984.

PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C.K.S.; Chances in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 26, p. 215-217, 1973.

ROBERTS, P. D. **Citrus Canker Management Strategies**. Indian river citrus seminar. Southwest Florida Research and Education Center. 2002.

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*. **Journal of. Bacteriology**, Washington, v.174, n.11, p.3499-3507, 1992.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER. A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG. P.E. Stromberg VK, Vidaver AK: Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.

SCHENA, M. I.;SHALON, D.;DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, New York, v.270, p. 467-470, 1995.

SCHUBERT, T.S.; RIZVI, S.A.;SUN, X.;GOTWALD, T.R.;GRAHAM, J.H.; DIXON, W.N.. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida Again. **Plant Disease**, St. Paul, v.5, p.340-356, 2001.

SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. In: . **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**. New York: Springer, 2005. p.397–420.

STAHL, E.A. & BISHOP, J.G. Molecular evidence for plant-patogen arms races. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, n.4, p. 299-304, 2000.

STASKAWICZ, B. J.,, MUDGETT, M.B.; DANGL J.L.; GALAN, J.E. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. **Science**, New York, n.292, v.5525, p.2285-2289, 2001.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES,. J.D.; Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, New York, v.268, p.661-667, 1995.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. Chapman and Hall, New York, NY, 1993.

SILVA, A. C. R. DA.; FERRO, J.A.; REINACH, F. C. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v.417, p.459-463, 2002.

TEIXEIRA, D.C., DANET, J.L., EVEILLARD, S., MARTINS E.C., CINTRA, W.C.J.; YAMAMOTTO, P.T., LOPES, S.A., BASSANEZZI, R.B., AYRES, A.J., COLETTE, S., BOVÉ, J. **Citrus huanglongbing** in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the Candidatus Liberibacter species associated with the disease. Molecular and Cellular Probes, Londres, v.19, n.3, p.173-179, 2005.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v.90, p.677-682, 2000.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of General Microbiology**, Reading, ondon, v.137, p.1307-16,1996.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; and SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.45,

n.3, p.472-489,1995.

VICENTE, J. G.; CONWAY, J.; ROBERTS, S, J.; TAYLOR, J. D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, p.492-499, 2001.

VIVIAN, A.; E GIBBON, M. J. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signal or weapons? **Microbiology**, Reading, Washington, v.143, p.693-704, 1997.

WELLS, J. *et al.* *Xylella fastidiosa* gen nov, sp nov Gram-negative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* ssp., **International Journal Of Systematic Bacteriology**, Reading, Ames, v.37, p.136-143, 1987.

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

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**, APS Press, Saint Paul, 1988. p.1-80.

CAPÍTULO 2 – Análise da expressão gênica global *in vivo* do mutante do gene *xrvA* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

RESUMO – Em um trabalho recente do laboratório foi demonstrado que a interrupção do gene *xrvA* (XAC1495) de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), um regulador de virulência, fez com que a bactéria mutante (8B7) deixasse de apresentar alguns dos sintomas característicos do cancro cítrico, tais como encharcamento, necrose e hiperplasia. O gene *xrvA* codifica uma proteína contendo um domínio semelhante ao domínio H-NS (“*histone-like nucleoid structuring protein*”) e proteínas contendo domínio H-NS e H-NS-like são proteínas modulares associadas ao nucleóide bacteriano. Além disso, alguns estudos tem sugerido que a proteína codificada pelo gene *xrvA* pode estar envolvida em processos de replicação, recombinação e transposição. O objetivo do presente trabalho foi o de verificar, por meio da técnica de microarranjo de DNA, se a interrupção desse gene afeta a expressão de outros genes. Para isso, avaliou-se a expressão diferencial global de genes do mutante 8B7 após 72 h de infecção *in planta* comparado com Xac selvagem). Os resultados obtidos mostraram que 323 genes foram diferencialmente expressos, sendo 194 mais expressos e 129 menos expressos em comparação com Xac selvagem. Esses genes estão distribuídos em 56 categorias funcionais e, embora a grande maioria codifique proteínas hipotéticas, a mutação no gene *xrvA* levou a uma redução na expressão de genes relacionados a patogenicidade e virulência, incluindo *xcsI*, *hrpX* e *rpfC*. Além desses, genes do sistema de secreção do tipo IV (SST4), transportadores ABC, transportadores de ferro, genes relacionados a quimiotaxia e motilidade celular e elementos genéticos móveis também se mostraram diferencialmente expressos no mutante.

Palavras-Chaves: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, mutante, Microarranjo de DNA, genes diferencialmente expressos, gene *xrvA*.

CAPÍTULO 2 – *In vivo* Global gene expression analysis of a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) mutant carrying a *xrvA* knocked out gene

SUMMARY – Recently was demonstrated that mutation in the *xrvA* Xac gene (XAC1495), a virulence regulator, results in the abolishment or mildness of citrus canker symptoms in the mutant (8B7), such abolishment of moist spots and necrose and reduction of hyperplasia. The *xrvA* gene codes for a histone-like nucleoid-structuring (H-NS) protein that belongs to a family of bacterial proteins that play a role in the formation of nucleoid structure and affect gene expression under certain conditions. In the present work DNA microarray analysis was used to verify which other genes had their expression profile altered by the disruption of the *xrvA* gene. A global gene expression analysis was performed in the mutant 72 hours after plant infection in comparison with Xac wild type. The results showed that 323 genes were differentially expressed in the mutant, with 194 being more expressed and 129 being less expressed in relation to Xac wild type. These genes are distributed um 56 functional categories, and although the majority code for hypothetic proteins, genes coding for proteins related to virulence and pathogenicity showed a marked alteration in expression, including *xcsI*, *hrpX* and *rpfC*. Besides these genes, others genes also related to virulence and pathogenicity mechanisms also showed a differential expression in the mutant, including genes belonging to type IV secretion system (T4SS), ABC transporters, iron transporters, chemotaxis and cell motility related genes and mobile elements

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, mutant, DNA microarray, differentially expressed genes, *xrvA* gene.

INTRODUÇÃO

A metodologia de microarranjo de DNA vem sendo muito utilizada para detecção de alterações de expressão gênica em bactérias em respostas a diversas condições ambientais e de estresse (LUCCHINI *et al.*, 2001). Esta metodologia também tem sido utilizada em diversos estudos de análise comparativa de genomas de bactérias patogênicas e na obtenção do perfil de expressão destas bactérias em meios de cultura que simulam o microambiente do hospedeiro (SCHOOLNIK, 2002). O objetivo final dos estudos de expressão gênica em larga escala de bactérias fitopatogênicas é a identificação dos genes da bactéria que são regulados diferencialmente pelo hospedeiro, estando dentro desta classe de genes aqueles que são responsáveis pela adaptação do patógeno aos microambientes do hospedeiro ou que codificam determinantes de virulência (SCHOOLNIK, 2002).

SEIB *et al.* (2007) compararam dois isolados de *Neisseria gonorrhoeae*, agente causal da gonorréia, um selvagem e outro mutante, por meio da técnica de microarranjos de DNA. Os autores observaram no mutante para o gene *oxyR* a perda da atividade do gene *gor* e *prx* e um aumento na expressão do gene *katA*, que codifica uma catalase. HAN *et al.* (2006) verificaram diferenças metabólicas relacionadas ao tamanho de colônias em um modelo murino por meio dessa mesma técnica. Células mutantes para o gene *Tk* (timidina quinase) apresentaram dois tipos de fenótipos quanto ao crescimento, colônias pequenas e colônias grandes. As colônias maiores têm uma taxa de crescimento normal, enquanto os menores apresentam uma baixa taxa de crescimento. Essa diferença é relacionada a mutações pontuais ou cromossomais. A comparação por meio de microarranjos de DNA entre esses dois tipos de colônias possibilitou identificar genes relacionados, e possivelmente responsáveis, por aqueles fenótipos (HAN *et al.*, 2006). Igualmente, FADL *et al.* (2007) analisaram a expressão diferencial de genes em *Aeromonas hydrophila* selvagem *versus* um mutante para os genes *act* e *aopB*, um componente estrutural do sistema de secreção do tipo três e uma

enterotoxina citotóxica secretada do tipo II, respectivamente. Eles observaram que 434 genes tiveram a expressão alterada no modelo murino e 80 tiveram a expressão alterada em células epiteliais humanas.

O mutante 8B7 (XAC1495), com inserção do Transposon no gene *xrvA*, um regulador de virulência, apresentou ausência de encharcamento, leve hiperplasia e ausência de necrose. Sabe-se que o gene *xrvA* codifica uma proteína contendo um domínio semelhante ao domínio H-NS (“*histone-like nucleoid structuring protein*”) e que proteínas contendo domínio H-NS e H-NS-like são proteínas modulares associados ao nucleóide bacteriano. H-NS é uma das proteínas mais abundantes em DNA de enterobactérias. Além disso, tem sido sugerido um possível papel para H-NS em muitos processos biológicos como replicação, recombinação e transposição (USSERY *et al.*, 1994).

A proteína H-NS atua como um fator regulatório global em linhagens de *E. coli* não patogênicas e estudos de expressão gênica global em um mutante do gene *hns* em *E. coli* patogênica mostrou que a ausência do gene tem um grande impacto no padrão de expressão gênica da *E. coli* e que o mesmo regula também a expressão dos fatores de virulência clássicos (MÜLLER *et al.*, 2006). Vários trabalhos têm indicado que o gene *xrvA* é um regulador de virulência em várias bactérias patogênicas. Recentemente foi mostrado que uma linhagem de *Xylella fastidiosa* que causa a doença de Pierce (PD) em videira estimula a expressão do regulador de virulência *xrvA* quando crescida em xilema de um cultivar de videira susceptível, mas não quando crescida em xilema de citros, o qual não é seu hospedeiro (SHI *et al.*, 2010). Também recentemente foi mostrado que em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), bactéria que causa a murchidão do arroz, mutação no gene *xrvA* leva a uma redução significativa na virulência na planta hospedeira e um retardamento na resposta HR em planta não hospedeira (FENG *et al.*, 2009).

A análise gênica global utilizando microarranjo de DNA aliada à mutagênese insercional aleatória pode ajudar a entender quais genes tem sua expressão alterada quando da infecção *in planta*. O objetivo deste estudo foi

avaliar a expressão gênica global, por meio da técnica de microarranjo de DNA, do mutante do gene *xrvA* de Xac (8B7 - XAC1495), que apresenta fenótipo parcialmente avirulento, comparada com a da Xac 306 selvagem, após 72 horas de multiplicação *in planta*, afim de elucidar a diferenciação na expressão de genes relacionados à patogenicidade e virulência no patossistema Xac-citros.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens de Xac 306 (linhagem que teve o genoma sequenciado por DA SILVA *et al.*, 2002) e do mutante 8B7 foram mantidas no laboratório em meio TSA (10 g/L triptona, 10g/L de sacarose, 1 g/L de glutamato monossódio) líquido suplementado com canamicina (100 mg/mL) para o mutante e sem canamicina para Xac selvagem e acrescido de glicerol para concentração final de 25% e armazenadas em ultrafreezer à -80 °C. Para a multiplicação das bactérias a partir do estoque em glicerol utilizou-se o meio de cultura sólido TSA (10 g/L triptona, 10g/L de sacarose, 1 g/L de glutamato monossódio, e 15 g/L de Ágar) e incubação a 28 °C por 72 h.

Inoculação da bactéria em planta hospedeira

Após as 72 horas de cultivo em meio de cultura sólido TSA, as células foram coletadas e a concentração celular foi padronizada com água bi-destilada gelada, para $D.O_{600nm} = 0,3$ (10^8 cfu/mL), em tubos Falcon de 50 mL contendo água bidestilada gelada. Em seguida, essa suspensão de células foi infiltrada, com o auxílio de uma seringa, em todo o limbo de folhas jovens de laranjeira Pêra. Foram utilizadas um total de 8 plantas, sendo 4 para o mutante e 4 para a Xac selvagem.

As plantas inoculadas foram mantidas no laboratório de segurança

concebido especialmente para a manipulação e inoculação de Xac em plantas de laranja Pêra, localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBM/UNESP/Jaboticabal), sob condições ótimas de temperatura, luminosidade e umidade. Este local possui um sistema de filtragem absoluta do ar (filtros EPA), além de possuir pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente.

Após 72 horas, as folhas inoculadas com as células bacterianas de Xac foram coletadas, cortadas em tiras bem finas com auxílio de uma lâmina de bisturi, e colocadas por 20 minutos em 100 mL de água destilada estéril gelada (banho de gelo) para a exsudação das células bacterianas para o meio aquoso. A seguir, a solução foi filtrada em gaze estéril para eliminar os restos foliares e as bactérias foram coletadas por centrifugação ($3.370 \times g$, 4 °C, 15 min) em tubos Falcon de 50 mL. Após centrifugação da suspensão bacteriana, as bactérias sedimentadas foram utilizadas para as extrações de RNA total.

Extração de RNA total de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

As extrações de RNA foram realizadas com o auxílio do conjunto de reagentes *Illustra RNAspin Mini Isolation Kit*, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (GE). As amostras obtidas foram quantificadas em um aparelho *NANODROP ND-100 Spectrophotometer* e submetidas à eletroforese em gel de agarose TAE 1% para análise da qualidade. As amostras de RNA apresentando relação A_{260}/A_{280nm} entre 1,8 e 2,0 e sem degradação visível no gel de agarose foram armazenadas a -80 °C até o momento da síntese e marcação do cDNA.

Síntese de cDNA marcado com fluoróforos Cy3 e Cy5

Para produzir os respectivos cDNAs, foi utilizado o conjunto de reagentes *SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen) a partir das amostras de RNA do isolado selvagem e do mutante 8B7 (XAC1495) obtidos previamente, bem

como para marcar estes cDNA com os fluoróforos Cy3™ e Cy5™ (Amersham Biosciences). O cDNA obtido a partir de RNA de células do mutante 8B7 foi marcado com o fluoróforo Cy3™, em todos os experimentos, e o obtido a partir de RNA de células da Xac selvagem foi marcado com o Cy5™. Seguiram-se, rigorosamente, as recomendações contidas no protocolo que acompanha o produto fornecido pela Invitrogen. A purificação dos respectivos cDNAs não marcados e marcados foi realizada utilizando o kit *Pure Link PCR Purification kit* da Invitrogen, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados

As amostras de cDNA do mutante 8B7 com Cy3™ e a amostra de cDNA de Xac 306 marcada com Cy5™ foram secas a vácuo sob proteção da luz. A amostra referente ao cDNA marcado com Cy3™ foi ressuspensa em 13,5 µL de água livre de nucleases e em seguida transferida para o tubo contendo o cDNA marcado com Cy5™, misturando as amostras em uma única solução. Em seguida, adicionou-se 13,5 µL de tampão de hibridização 4X (Amersham Biosciences) e 27 µL de formamida (Amresco) e a solução foi homogeneizada. A mistura com as amostras foi mantida a 90 °C no escuro por 2 min. e transferida para banho de gelo por igual período até deposição na lâmina.

A lâmina contendo o arranjo de DNA de Xac apresenta um total de 2.673 ORFs distribuídas em 24 subarranjos (12 de cada lado), cada um contendo 32 colunas e 9 linhas (288 pontos) em um arranjo 32 x 9 x 12 x 2, totalizando 6.912 pontos na lâmina, incluindo duplicatas (LAIA, 2007). Estas foram secas com auxílio de um jato de gás nitrogênio comprimido. Do mesmo modo, a lamínula a ser utilizada foi limpa com papel Kin Wipes™. A solução contendo os cDNAs marcado com Cy3™ e Cy5™ misturados foi depositada sobre a lâmina de microarranjos de DNA e coberta com a lamínula. A lâmina foi colocada em um suporte fechado para lâminas de microarranjo, o qual foi imerso em um banho a 42°C, por um período de 16 h, protegido da luz. Foram feitas 4 lâminas contendo

as amostras de Xac 306 e do mutante 18D6.

Previamente ao processamento digital dos sinais dos microarranjos de DNA hibridizados com os cDNAs, a lâmina foi submetida a cinco etapas de lavagem, manualmente e em cubas de vidro, a fim de eliminar sinais inespecíficos (“background”). Na primeira lavagem, a lâmina foi imersa cuidadosamente em uma solução contendo SSC 1x e SDS 0,2% por 5 min. a temperatura ambiente, sob leve agitação. A seguir, procederam-se duas lavagens em solução contendo SSC 0,1x e SDS 0,2% por 5 min. cada uma e uma lavagem em solução contendo SSC 0,1x a 55 °C, por 2,5 min. Finalizando, a lâmina foi imersa em água destilada à temperatura ambiente por 60 seg. e imediatamente submetida a um jato de gás nitrogênio comprimido a fim de secá-la o mais rápido possível.

Análise das imagens e estatística dos dados

As imagens produzidas pela hibridização dos alvos (marcados com Cy3™ ou Cy5™) com as sondas do microarranjo de DNA foram digitalizadas em um equipamento modelo GenePix™ 4000B (Axon Instruments, Inc). Em seguida elas foram analisadas, aos pares, Cy3™ e Cy5™, pelo programa Spotfinder (<http://www.tm4.org/spotfinder.html>). Este programa tem por finalidade transformar a intensidade do sinal dos “spots” (os pixels) em valores numéricos. Do mesmo modo, esse programa também contabiliza o valor da emissão de fundo, “background”.

Os dados numéricos gerados foram processados e analisados no programa estatístico R (R Development Core Team) por meio dos procedimentos estabelecidos no pacote limma (SMYTH, 2005). Considerou-se um gene como sendo diferencialmente expresso quando o valor de significância foi menor ou igual a 1% ($p\text{-value} \leq 0,01$).

RESULTADOS

A análise dos resultados mostrou que 323 genes foram diferencialmente expressos no mutante em relação à Xac selvagem, sendo 194 genes menos expressos e 129 mais expressos. Os genes cuja expressão foi menor ou maior que o observado no genótipo selvagem foram categorizados funcionalmente segundo as categorias utilizadas para a anotação do genoma da Xac, que consta de 9 grandes categorias contendo subcategorias, dando um total de 104 categorias (SILVA *et al.*, 2002; Tabela suplementar I), com os genes diferencialmente expressos se distribuindo em 56 delas. A quantidade de genes diferencialmente expressos dentro de cada uma das 9 grandes categorias está apresentada na Tabela 1 e a relação dos genes dentro de cada uma das 56 categorias está apresentada na Tabela 2).

A categoria VIII (Proteínas hipotéticas), com um total de 143 genes, foi a que apresentou o maior número de genes diferencialmente expressos (44,3% do total) (Tabela 1). Dentro da categoria VIII, a subcategoria VIII.A, que representa as proteínas cuja função ainda não é conhecida mas que estão presentes em vários organismos (Proteínas hipotéticas conservadas), é a que apresenta o maior número de genes diferencialmente expressos (84 genes; 58,7%) (Figura 1 e Tabela 2). Um fato interessante é que 27 genes encontrados até o momento apenas em *Xanthomonas* (Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas* – subcategoria VIII.C) se mostraram diferencialmente expressos, com 11 deles sendo menos expressos e 16 sendo mais expressos (Figura 1).

A categoria I (Metabolismo intermediário), com 39 genes diferencialmente expressos (12,1% do total), foi a segunda categoria em número de genes diferencialmente expressos, com 23 sendo menos expressos e 16 sendo mais expressos (Tabela 1 e Figura 2). Quando se olha mais detalhadamente para os genes desta categoria, verifica-se que os da subcategoria I.D.2 (Funções regulatórias; ativadores-repressores) é a que mais apresenta genes diferencialmente expressos (9 genes; 23,1%) (Figura 2).

Tabela 1– Genes diferencialmente expressos no mutante 8B7 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranjeira Pêra e sua distribuição pelas grandes categorias funcionais.

Categorias	Nº. de genes menos expresso	Nº. de genes mais expresso	Nº. total de genes diferencialmente expressos	% do Total
I Metabolismo Intermediário	23	16	39	12,1
II Biossíntese de pequenas moléculas	11	3	14	4,3
III Metabolismo de macromoléculas	13	12	25	7,7
IV Estrutura celular	8	5	13	4,0
V Processos celulares	16	11	27	8,4
VI Elementos genéticos móveis	28	2	30	9,3
VII Patogenicidade, virulência e adaptação	11	12	23	7,1
VIII Hipotéticas	76	67	143	44,3
IX Sem categoria definida	8	1	9	2,8
Total	194	129	323	100,0

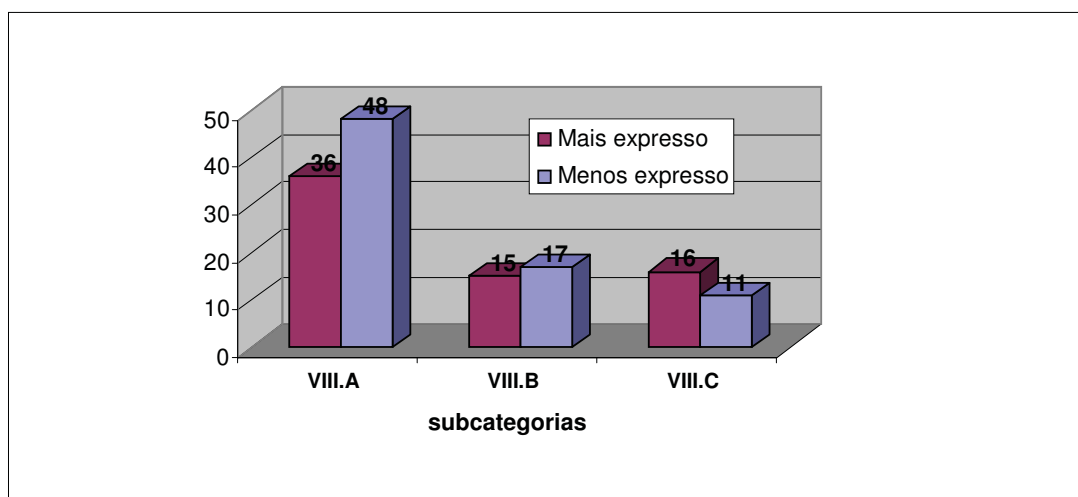


Figura 1. Genes diferencialmente expressos da categoria VIII (Proteínas hipotéticas) distribuídos nas subcategorias (VIII.A: Proteínas hipotéticas; VIII.B: Proteínas hipotéticas (inclui “no hits” e “hits” com baixo escore) e VIII.C: Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas*).

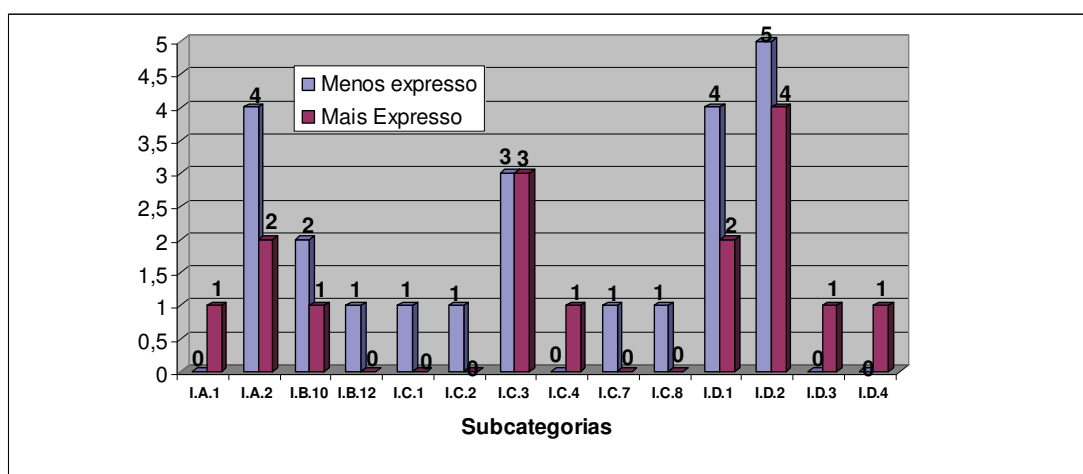


Figura 2. Genes diferencialmente expressos da categoria I (Metabolismo intermediário) distribuídos nas subcategorias (I.A I: Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos, IB.10: Pool, multipurpose conversions, I.C.1: Respiração aeróbica, I.C.3: Transporte de elétrons, I.C.7: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), I.D.1: Sistemas de dois componentes, I.D.3: Quinases-Fosfatases).

A terceira categoria em número de genes diferencialmente expressos foi a categoria VI (Elementos genéticos móveis), com um total de 30 genes (9,3% do total), dos quais 28 foram menos expressos e 2 foram mais expressos (Figura 3). A subcategoria VI.C (Transposon e funções relacionadas a introns), com 22 genes menos expressos (Figura 3), representa 73,3% do total de genes da categoria VI e 6,8% do total de genes diferencialmente expressos.

A categoria V (Processos celulares) apresentou 27 genes diferencialmente expressos (Tabela 1), que representa 8,4% do total, sendo assim a quarta categoria em número de genes diferencialmente expressos. Nesta categoria, a subcategoria V.A.7 (Transporte de outras moléculas) (Tabela 2), com 10 genes, foi a que mais apresentou genes com expressão alterada, seguida pela subcategoria V.C (Quimiotaxia e mobilidade) com 6 genes (Figura 4).

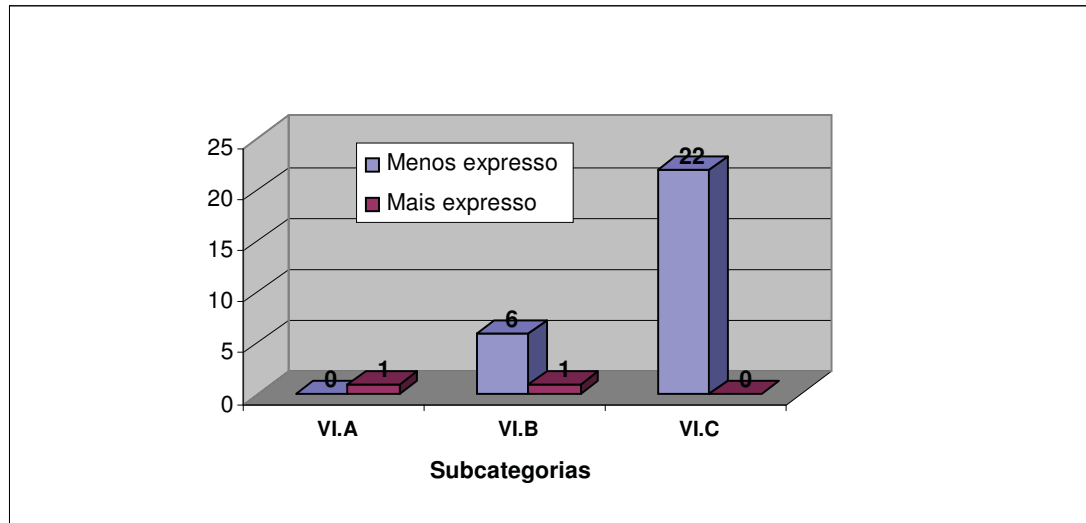


Figura 3. Genes diferencialmente expressos da categoria VI.(Elementos genéticos móveis) distribuídos nas subcategorias (V.I.A: Funções relacionadas a fagos e profagos, V.I.B: Funções relacionadas a plasmídeos e V.I.C: Funções relacionadas a transposon e íntron).

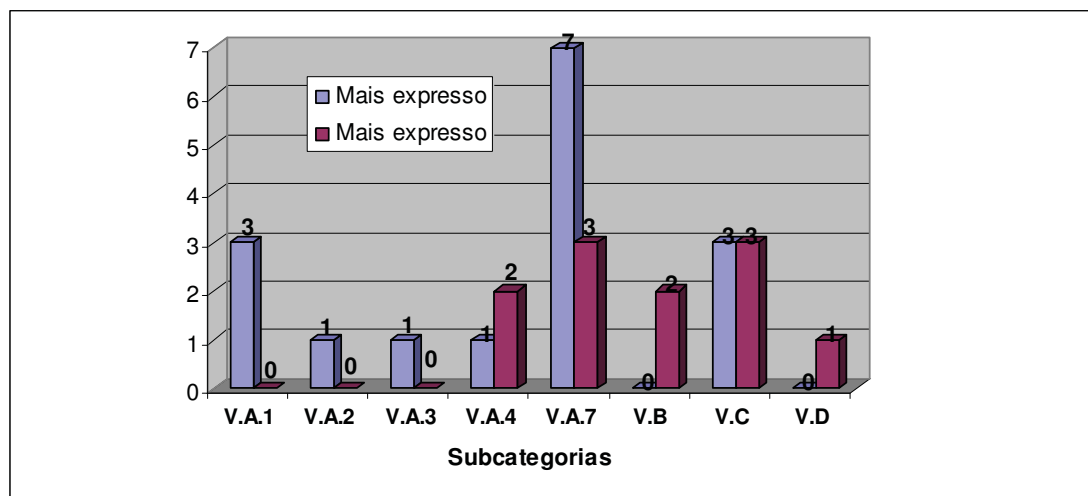


Figura 4. Genes diferencialmente expressos da categoria V (Estruturas celulares) distribuídos nas subcategorias (V.A.1: Aminoácidos, aminas , V.A.2: Ânions, V.A.3: Carboidratos, ácidos orgânicos, álcoois, V.A.4: Cátions, V.A.7: Outros, V.B: Divisão celular, V.C.: Quimiotaxia e mobilidade, V.D. Adaptação osmótica)

A quinta categoria em número de genes diferencialmente expressos foi a

categoria III (Metabolismo de macromoléculas), com um total de 25 genes (7,7% do total), dos quais 13 foram menos expressos e 12 foram mais expressos (Tabela 1). A subcategoria III.C.3 (Degradação de proteína), com 5 genes mais expressos (Figura 5), representa 20,0% do total de genes desta categoria e 1,5% do total de genes diferencialmente expressos no mutante. Das 17 subcategorias III, 9 apresentam genes com expressão alterada (Figura 5).

A sexta categoria em número de genes com expressão alterada foi a categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação), com um total 23 genes (Tabela 1), o que representa 7,1% do total de genes diferencialmente expressos. As subcategorias VII.C (Produção de toxina e detoxificação) e VII.H (Outras), ambas com 10 genes, foram as que mais apresentaram genes diferencialmente expressos (Figura 6).

As categorias II (Biossíntese de pequenas moléculas), IV (Estrutura Celular) e IX (ORFs sem categoria definida), com 14, 13 e 9 genes diferencialmente expressos, respectivamente, ocupam a sétima, oitava e nona posição em termos de números de genes diferencialmente expressos (Tabela 1 e Figura 7, 8,9).

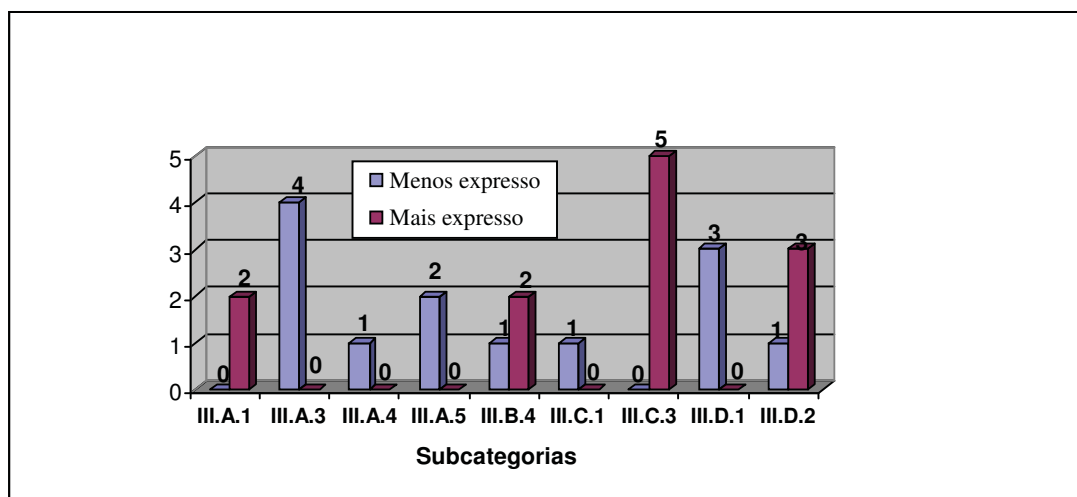


Figura.5. Genes diferencialmente expressos da categoria III (Metabolismo de macromoléculas) distribuídos nas subcategorias (III.A.1: Replicação, III.A.3: Recombinação, III.A.4.: Reparo III.A.5: Restrição, modificação, III.B.4.: Aminoacil tRNA sintetases, modificação de tRNA, III.C.1: Tradução e modificação, III.C.3: Degradação de proteína, III.D.1: Polissacarídeos, III.D.2: Fosfolípidos).

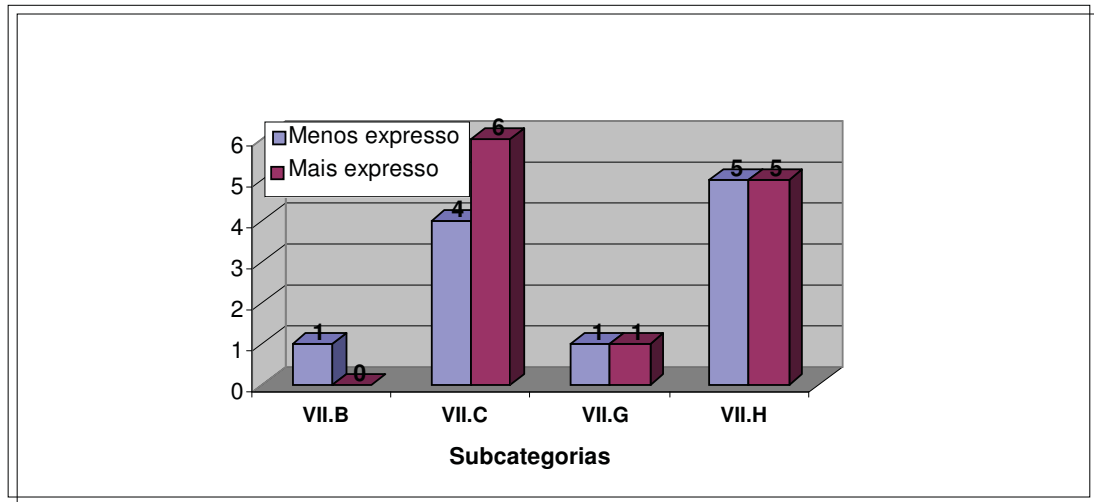


Figura 6. Genes diferencialmente expressos da categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) distribuídos nas subcategorias (VII.B.: Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade, VII.C: Produção de toxina e detoxificação, VII.G: Adaptação, condições atípicas, VII.H.:Outras).

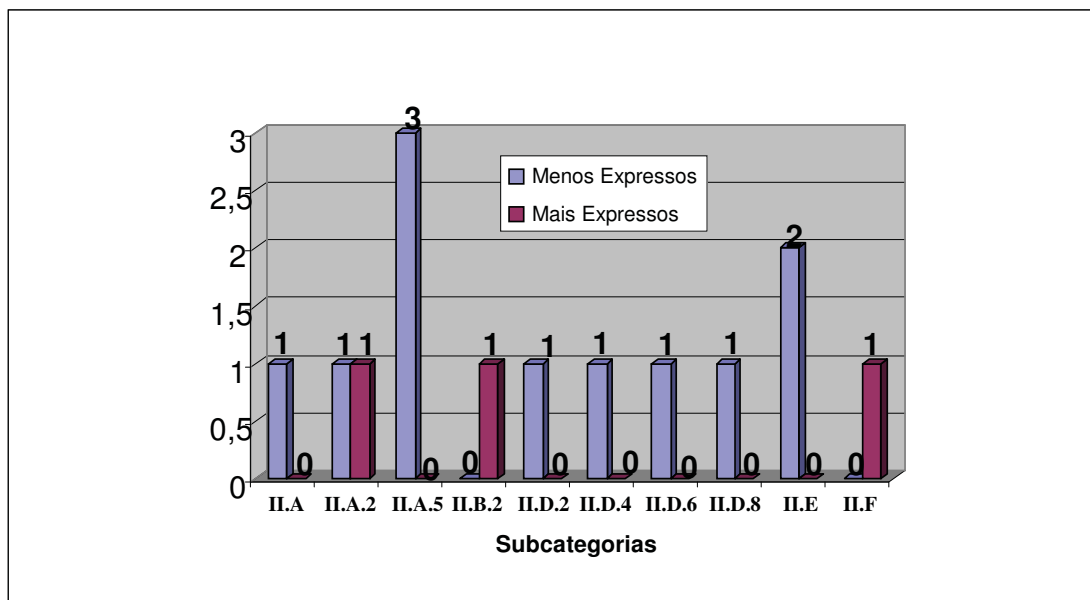


Figura 7. Genes diferencialmente expressos da categoria II (Biossíntese de pequenas moléculas) distribuídos nas subcategorias (II.A: Biossíntese de aminoácidos, II.A.2: Família do aspartato,

família do piruvato, II.A.5: Histidina, II.B.2: Ribonucleotídeos de pirimidina, II.D.2: Ácido fólico, II.D.4: Molibdopterina, II.D.6: Piridoxina, II.D.8: Tiamina, II.F: Biossíntese de poliaminas).

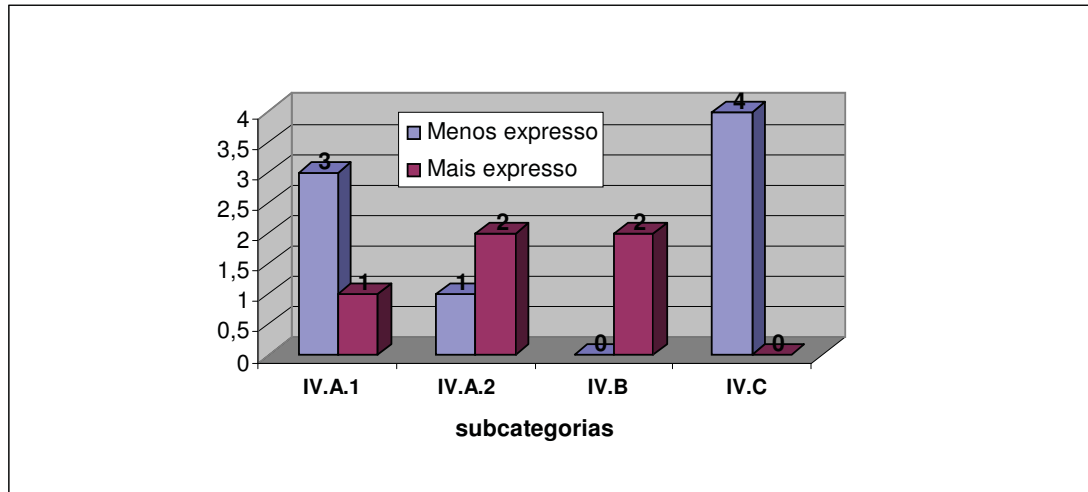


Figura 8. Genes diferencialmente expressos da categoria IV (Estrutura Celular) distribuídos nas subcategorias (IV.A.1 Membrana interna.; IV.A.2: Constituintes da membrana externa, IV.B: Rede de mureína, peptidoglicano, IV.C: Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos).

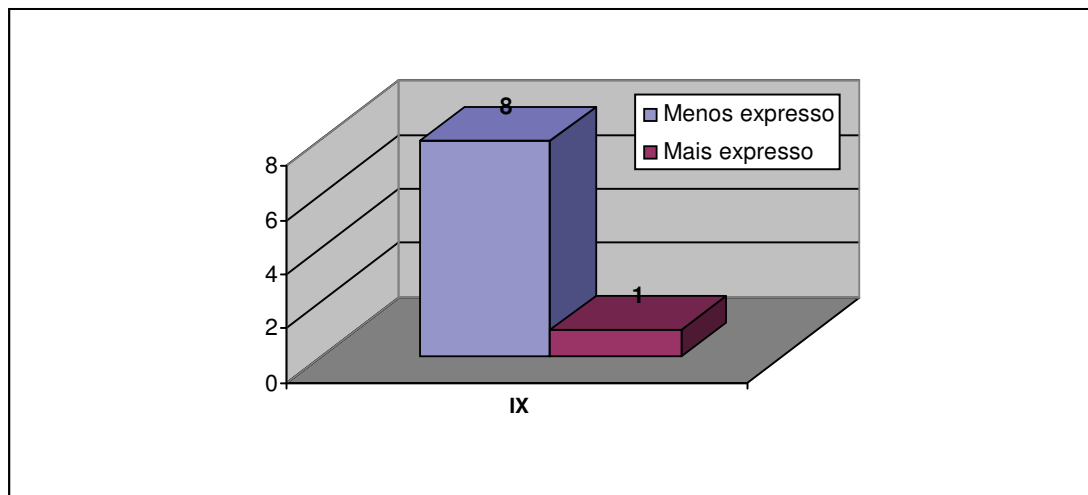


Figura 9. Genes diferencialmente expressos sem categoria funcional definida.

Tabela 2– Genes diferencialmente expressos no mutante 8B7 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranja Pêra e sua distribuição pelas categorias funcionais.

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC0575	arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase	+	I.A.1	0,62835481	0,002693888
XAC4327	allophanate hydrolase	-	I.A.2	-1,009563812	0,002074419
XAC4187	2-hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioateisomerase/5-carboxymethyl-2-oxo-hex-3-ene-1,7-dioatedecarboxylase	-	I.A.2	-0,466930959	0,005731985
XAC0360	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	+	I.A.2	0,81024076	0,008604881
XAC1851	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	-	I.A.2	-0,56974908	0,010010959
XAC0356	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	+	I.A.2	6,76157807	0,000741697
XAC1639	N-formimino-L-glutamate deiminase	-	I.A.2	-0,664831775	0,011531679
XAC1287	aldose 1-epimerase	+	I.B.10	1,580929611	0,001102562
XAC0812	phosphoanhydride phosphohydrolase	-	I.B.10	-0,753299072	0,002356473
XAC0923	pyridine nucleotide transhydrogenase, subunit alpha	-	I.B.10	-0,551856467	0,005229964
XAC0830	taurine dioxygenase	-	I.B.12	-0,501441825	0,005614633
XAC2699	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO1 subunit	-	I.C.1	-0,582693786	0,008167616
XAC0762	D-lactate dehydrogenase	-	I.C.2	-1,014225826	0,001673438
XAC0492	bacterioferritin-associated ferredoxin	+	I.C.3	4,804297946	0,000202228
XAC3425	cytochrome C6	-	I.C.3	-1,018950565	0,001115328
XAC3431	short chain dehydrogenase	-	I.C.3	-1,013389752	0,005262937
XAC1685	cytochrome C	+	I.C.3	0,624769281	0,005805225
XAC2750	reductase	+	I.C.3	0,359800989	0,013274055
XAC0583	oxidoreductase	-	I.C.3	-0,444944817	0,014077256
XAC2502	1-phosphofructokinase (fructose 1-phosphate kinase)	+	I.C.4	0,986766162	0,00332628
XAC1885	bifunctional aconitate hydratase 2/2-methylisocitrate dehydratase	-	I.C.7	-0,426328404	0,010818838
XAC3655	F0F1 ATP synthase subunit A	-	I.C.8	-0,464633505	0,013451389
XAC3250	two-component system, regulatory protein	+	I.D.1	0,991376584	0,001044146
XAC3975	two-component system, sensor protein	+	I.D.1	0,542454491	0,00547282
XAC0326	two-component system, sensor protein	-	I.D.1	-0,404171134	0,00736734
XAC0897	two-component system, sensor protein	-	I.D.1	-0,600255017	0,013961875
XAC0835	two-component system, sensor protein	-	I.D.1	-0,733875959	0,002942899
XAC2141	two-component system, regulatory protein	-	I.D.1	-1,063995732	0,006588574
XAC3137	transcriptional regulator	-	I.D.2	-0,617446135	0,008079722

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC3363	Blal family transcriptional regulator	+	I.D.2	1,140712257	7,687734241
XAC3476	transcriptional regulator	-	I.D.2	-1,073317551	0,001261281
XAC3988	transmembrane regulator protein prtR	-	I.D.2	-0,798174297	0,001338998
XAC0312	LysR family transcriptional regulator	-	I.D.2	-0,568156792	0,001609022
XAC0713	LacI family transcription regulator	+	I.D.2	1,173194464	0,009419456
XAC1499	transcriptional regulator	+	I.D.2	0,526771084	0,012309894
XAC3274	response regulator	+	I.D.2	6,801061485	0,000729268
XAC1912	serine/threonine kinase	+	I.D.3	0,590971697	0,00072417
XAC1938	GGDEF family protein	+	I.D.4	0,826785969	0,010947059
XAC0232	hypothetical protein	-	II.A	-0,491383807	0,013924598
XAC0059	asparagine synthetase like protein	-	II.A.2	-0,460397524	0,012903464
XAC3181	diaminopimelate decarboxylase	+	II.A.2	0,815818129	0,003424727
XAC1832	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	-	II.A.5	-1,561070853	0,001227877
XAC1833	phosphoribosylformimino-5- aminoimidazole carboxam	-	II.A.5	-1,757975873	0,001278624
XAC1831	imidazoleglycerolphosphate dehydratase/histidinol-phosphate phosphatase bifunctional enzyme	-	II.A.5	-1,259269497	0,008319502
XAC2916	aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	+	II.B.2	0,391106574	0,011758057
XAC3870	dihydroneopterin aldolase	-	II.D.2	-0,756187563	0,000644787
XAC2022	molybdopterin biosynthesis	-	II.D.4	-0,409193526	0,012518253
XAC3009	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	-	II.D.6	-0,882735149	0,002146081
XAC3415	thiamin-phosphate pyrophosphorylase	-	II.D.8	-0,543176283	0,003996208
XAC0519	CDP-diacylglycerol- glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase-related protein	-	II.E	-0,871468944	0,007677232
XAC3623	3-hydroxydecanoyl-(acyl carrier protein) dehydratase	-	II.E	-0,728163255	0,010792815
XAC0484	S-adenosylmethionine decarboxylase	+	II.F	0,652564887	0,003789029
XAC3107	ATP-dependent helicase	+	III.A.1	0,846753951	0,001228871
XAC1477	replicative DNA helicase	+	III.A.1	0,466175327	0,006230439
XAC1327	DNA repair protein RecO	-	III.A.3	-0,937945028	0,0001645
XAC2103	DNA recombinase	-	III.A.3	-0,625790636	0,005851878
XAC0636	site-specific tyrosine recombinase XerC	-	III.A.3	-0,790476399	0,002833708
XAC2919	DNA-3-methyladenine glycosylase I	-	III.A.4	-1,018267994	0,0035867
XAC0577	cytosine methyltransferase	-	III.A.5	-0,899497465	0,00168354
XAC2437	type II restriction enzyme XamI	-	III.A.5	-0,407296519	0,012594777
XAC1002	amidase	-	III.B.4	-0,563138169	0,006908308
XAC2594	threonyl-tRNA synthetase	+	III.B.4	0,945302721	0,01271203
XAC3846	7-cyano-7-deazaguanine reductase	+	III.B.4	0,588834046	0,011864978

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC1255	lipoprotein signal peptidase	r	III.C.1	-0,794356601	0,000688454
XAC1680	serine protease	+	III.C.3	0,926196435	0,001036181
XAC3859	D-alanyl-D-alanine dipeptidase	+	III.C.3	3,010679307	0,007492868
XAC3712	metallopeptidase	+	III.C.3	1,401103308	0,000317254
XAC2746	metallopeptidase	+	III.C.3	0,752644753	0,003354938
XAC2992	endoproteinase Arg-C	+	III.C.3	0,673941219	0,002780278
XAC3909	dolichol-phosphate mannosyltransferase	-	III.D.1	-0,621954411	0,002861509
XAC3518	cellulose synthase	-	III.D.1	-0,920592193	0,000679211
XAC3490	amylase or alpha amylase	-	III.D.1	-0,481973964	0,003231303
XAC2454	stringent starvation protein A	-	I.D.2	-0,874230021	0,001968844
XAC2046	CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase	-	III.D.2	-0,747795053	0,000301882
XAC0372	hydrolase	+	III.D.2	0,670414227	0,002531064
XAC4099	acyltransferase	+	III.D.2	1,835354621	0,00576848
XAC0222	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	+	III.D.2	1,875487632	0,002354598
XAC3912	phosphomannomutase	-	IV.A.1	-0,476324731	0,009972555
XAC3109	penicillin-binding protein 1B	-	IV.A.1	-0,4428734	0,011961915
XAC0070	ankyrin-like protein	-	IV.A.1	-0,569143068	0,012943822
XAC4076	hypothetical protein	+	IV.A.1	0,871946625	0,003619759
XAC2772	outer membrane protein	+	IV.A.2	0,486815278	0,007133687
XAC0999	colicin I receptor	+	IV.A.2	0,975368967	0,005449321
XAC2709	cyanoglobin	-	IV.A.2	-0,722612372	0,00793965
XAC2609	carboxypeptidase	+	IV.B	1,087171293	0,000395788
XAC3561	soluble lytic murein transglycosylase	+	IV.B	0,545276924	0,005731319
XAC2125	glycosyl transferase related protein	-	IV.C	-1,131691089	0,000762419
XAC0651	surface antigen gene	-	IV.C	-1,942119835	0,00082229
XAC0520	acyltransferase	-	IV.C	-0,504330333	0,002007797
XAC1176	glycosyl hydrolase	-	IV.C	-0,739520155	0,002824605
XAC1842	cationic amino acid transporter	-	V.A.1	-0,722608676	0,000913717
XAC0860	ABC transporter ATP-binding protein	-	V.A.1	-0,709780275	0,000950981
XAC1391	S-methylmethionine transporter	-	V.A.1	-0,689765144	0,003343744
XAC3358	molybdate-binding periplasmic protein; permease	-	V.A.2	-0,580148876	0,011263379
XAC2309	ABC transporter sugar permease	-	V.A.3	-1,076208569	0,000247798
XAC0206	ammonium transporter	-	V.A.4	-0,89601292	0,003424612
XAC3176	outer membrane receptor; citrate-dependent iron transporter	+	V.A.4	1,041340042	0,007973147

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC3370	outer membrane receptor for ferriciron uptake	+	V.A.4	0,779381052	0,001739282
XAC0811	TonB-dependent receptor	-	V.A.7	-0,4904713	0,005260232
XAC3601	ABC transporter permease	+	V.A.7	0,626997206	0,00602177
XAC3996	ABC transporter ATP-binding protein	-	V.A.7	-2,079015477	0,01077908
XAC3427	TonB-dependent receptor	-	V.A.7	-0,375668641	0,013602104
XAC0829	ABC transporter substrate binding protein	-	V.A.7	-0,846920979	0,014381298
XAC4062	TonB-dependent receptor	-	V.A.7	-1,21238314	0,000171975
XAC0144	TonB-dependent receptor	-	V.A.7	-0,78392075	0,001175392
XAC3641	ABC transporter permease	+	V.A.7	3,291341743	0,005839103
XAC1459	ABC transporter ATP-binding protein	+	V.A.7	0,625631649	0,009745035
XAC2024	TonB-dependent receptor	-	V.A.7	-0,484569465	0,010822968
XAC3973	cell division inhibitor	+	V.B	0,470129807	0,012439334
XAC1385	hypothetical protein	+	V.B	1,00031233	0,000547723
XAC3271	chemotaxis transducer	-	V.C	-4,893169851	0,001888802
XAC1666	chemotaxis protein	+	V.C	1,40416714	0,000788919
XAC1946	flagellar protein	+	V.C	1,658949222	0,001863084
XAC1979	flagellar basal body P-ring protein	+	V.C	2,50719552	0,002386738
XAC1746	chemotaxis protein	—	V.C	-0,467178673	0,006739212
XAC2865	chemotaxis histidine protein kinase	+	V.C	-0,653485007	0,014168616
XAC2915	osmotically inducible protein	-	V.D	0,735965834	0,00455503
XAC1498	integrase	+	VI.A	0,701250243	0,005586108
XAC1494	hypothetical protein	+	VI.A	1,42438251	0,008887037
XAC1104	plasmid mobilization protein	+	VI.B	0,952958938	0,008002589
XACb0030	TrwB protein	-	VI.B	-0,621331719	0,008608332
XACb0031	TrwC protein	-	VI.B	-1,917071023	0,000135226
XACa0041	partition protein A	-	VI.B	-0,921157846	0,000208057
XACa0028	plasmid stable inheritance protein I	-	VI.B	-0,817106726	0,008142549
XACa0027	plasmid stable inheritance protein K	-	VI.B	-0,487717318	0,009260441
XAC1921	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,411520757	0,000541303
XAC3221	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,334774632	0,001633194
XAC2889	ISxac2 transposase	-	VI.C	-0,838221801	0,001683164
XAC4323	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,0772727	0,002359429
XAC2634	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,967035409	0,00417688
XAC3247	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,250589618	0,006249658

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC0152	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,126334653	0,006468281
XAC3321	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,071153917	0,007561494
XAC1660	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,016397267	0,010414466
XAC2424	ISxcd1 transposase	-	VI.C	-0,582196229	0,011668929
XAC3248	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,898824808	0,012616332
XAC3938	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,212776219	0,0001967
XAC1053	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,355354633	0,001182064
XACb0062	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,069683647	0,001388122
XAC2174	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,790868782	0,004111778
XACa0009	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,596779781	0,004574976
XAC1103	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,136446781	0,00481061
XAC1071	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,858388409	0,005900624
XAC3223	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,965065426	0,006209921
XAC0578	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,31493649	0,008379567
XAC4137	ISxac1 transposase	-	VI.C	-0,851916967	0,008992918
XAC0093	ISxac1 transposase	-	VI.C	-1,077581934	0,010960056
XAC1994	HrpX related protein	-	VII.B	-0,533917591	0,008837362
XAC0866	organic solvent tolerance protein	+	VII.C	0,714792357	0,000152659
XAC1439	thiopurine S-methyltransferase	+	VII.C	0,649804377	0,002095758
XAC2475	transport protein	+	VII.C	0,526561889	0,003744262
XAC2843	multidrug efflux transporter	+	VII.C	0,592533366	0,007149461
XAC2341	glutaryl-7-ACA acylase precursor	-	VII.C	-0,54764413	0,009076838
XAC3995	acriflavin resistance protein	-	VII.C	-0,81581796	0,0112717
XAC4233	bleomycin resistance protein	-	VII.C	-0,717422751	0,005278058
XAC2473	outer membrane protein OprN precursor	+	VII.C	2,960665254	0,00785057
XAC1526	outer membrane component of multidrug efflux pump	-	VII.C	-0,564374384	0,01339828
XAC0210	superoxide dismutase	+	VII.C	0,457675563	0,005195965
XAC2369	general stress protein	+	VII.G	0,526447839	0,002018994
XAC2881	carbon starvation protein A	-	VII.G	-0,87017228	0,000352261
XAC2620	VirB9 protein	+	VII.H	1,152524371	0,007987341
XAC2616	VirB2 protein	+	VII.H	0,891605866	0,000714491
XAC2619	VirB10 protein	-	VII.H	-0,790736188	0,001547524
XAC2614	VirB4 protein	+	VII.H	0,693289385	0,002930414
XAC0700	type II secretion system protein I	-	VII.H	-0,977966885	0,000782708

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC1864	regulatory protein	+	VII.H	6,344672605	0,000892054
XACb0037	protein	-	VII.H	-0,547669559	0,007021574
XAC2621	VirB8 protein		VII.H	2,768258499	0,009457635
XACb0045	VirB4 protein	-	VII.H	-0,641849257	0,010514412
XAC1878	RpfC protein	-	VII.H	-0,788887961	0,011033775
XAC4061	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-2,099434484	7,299487978
XACb0022	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,44018312	7,896198896
XACb0023	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,859641254	0,000123714
XAC3726	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,003908993	0,000127225
XAC3408	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,932872018	0,00012906
XAC3566	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,829420209	0,000441334
XAC2795	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,691235777	0,000529323
XAC2605	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,787957405	0,001053726
XAC0199	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,600448829	0,001061631
XAC2444	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,67141135	0,001196834
XAC0017	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,033677444	0,001481383
XAC2443	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,130922998	0,001562582
XAC2227	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,739050992	0,001653341
XAC1431	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,638178692	0,002171634
XAC2784	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,575086266	0,002202038
XAC4316	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,137297682	0,002686888
XAC2223	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,683951465	0,002717527
XAC0687	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,483483092	0,002796553
XAC2857	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,643313802	0,003508711
XAC4133	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,983900557	0,004524656
XAC3841	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,378996233	0,005167094
XAC3770	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,665376956	0,005227707
XAC2439	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,46566163	0,00558066
XAC4181	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,536119835	0,006698721
XAC0268	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,498055415	0,007136725
XAC1330	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,498735675	0,007632557
XAC0770	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,534481975	0,009082068
XAC2312	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,545035437	0,011419475

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC0586	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,676796567	0,011460434
XAC1328	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,499247574	0,011682698
XAC0516	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-2,435237392	0,011728613
XAC3045	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,434069595	0,011787998
XAC4223	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,594267029	0,011953269
XAC3576	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,565288079	0,013185125
XAC1687	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,723181838	0,000171139
XAC3965	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,676512672	0,000203888
XAC2557	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,067275843	0,000501469
XAC4329	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,090013006	0,001011366
XAC4358	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,893191948	0,001260127
XAC1644	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,122013434	0,001729101
XAC4073	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,628193452	0,002617242
XAC2969	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,860146944	0,003890099
XAC3178	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,138994536	0,004148705
XAC2828	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,712953355	0,005227508
XAC2134	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	3,290709947	0,005842253
XAC2792	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,482495021	0,008684732
XAC0013	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,436070684	0,010058448
XAC1190	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,815016497	0,014416366
XAC0497	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,697500519	0,000919439
XAC0270	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,797933936	0,00158325
XAC3288	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,956883264	0,001769132
XAC2124	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,648693964	0,001875389
XAC3125	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,767643605	0,002119482
XAC0112	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,79774045	0,002191166
XACb0033	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,588678431	0,003100225
XAC2319	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,511120975	0,00341366
XAC2187	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,713260898	0,003562625
XAC3802	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,722351362	0,004871309
XAC4324	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,085833781	0,006317764
XAC3898	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,512363688	0,00732772
XAC4124	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	2,910007151	0,008236271
XAC1008	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,205574905	0,008610833

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC0587	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,432949763	0,009057544
XAC3904	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,389333244	0,009332365
XAC2434	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,634094353	0,009572881
XAC3108	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,834771834	0,009933332
XAC2879	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,403737827	0,011401709
XAC0838	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,443813169	0,012281841
XAC2798	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,89951302	0,012508515
XAC3460	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,322552366	0,013677364
XAC2886	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,968681801	0,013848358
XAC1607	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	2,407420713	0,013860981
XAC3106	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,592834141	0,000863629
XAC4194	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,678149762	0,002251963
XAC2052	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,621620289	0,002525004
XAC0517	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,767803132	0,002853473
XAC1588	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,772295185	0,002972142
XAC0764	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,796108493	0,006567988
XAC1883	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,432730938	0,006824291
XAC4095	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,505747511	0,007396137
XAC3177	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	2,124315175	0,007846133
XAC3396	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,647263504	0,010102861
XAC3364	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,532367067	0,011094677
XAC4077	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,525534988	0,011407344
XAC3982	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,913986204	0,013815969
XAC0048	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,993122314	0,000120368
XAC2506	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,777861265	0,000993527
XAC3278	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,966621839	0,001093469
XACb0029	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,739652062	0,001134001
XAC2613	hypothetical protein	+	VIII.B	0,836991795	0,001603186
XAC2252	hypothetical protein	+	VIII.B	0,456730074	0,003829669
XAC2254	hypothetical protein	+	VIII.B	0,885858293	0,00455985
XAC4091	hypothetical protein	+	VIII.B	0,588674163	0,005339227
XAC3369	hypothetical protein	=	VIII.B	0,744914204	0,00573673
XAC0796	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,595615438	0,008637674
XAC3599	hypothetical protein	+	VIII.B	0,446292332	0,010280862

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC4265	hypothetical protein	+	VIII.B	1,574290756	0,012303574
XAC0099	hypothetical protein	+	VIII.B	0,617753919	0,013146859
XAC3019	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,660076999	0,014111116
XAC2262	hypothetical protein	+	VIII.B	0,915938446	0,000124539
XAC1502	hypothetical protein	+	VIII.B	1,062384778	0,000145779
XAC1611	hypothetical protein	-	VIII.B	-4,779792315	0,002020445
XACb0021	hypothetical protein	-	VIII.B	-1,340439543	8,644887165
XAC0016	hypothetical protein	+	VIII.B	0,87377149	0,00041282
XAC2859	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,654636171	0,003590545
XACb0025	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,866291	0,003786032
XAC2610	hypothetical protein	+	VIII.B	3,836091187	0,003787987
XACb0028	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,637218828	0,005822131
XAC0149	hypothetical protein	+	VIII.B	0,664118754	0,006265486
XAC0045	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,662358361	0,007029772
XAC0754	hypothetical protein	-	VIII.B	-1,565597703	0,008111126
XAC1069	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,708958001	0,008182892
XACb0024	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,600147562	0,008948848
XAC3319	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,575124329	0,009159524
XAC0098	hypothetical protein	+	VIII.B	0,760678254	0,011389097
XAC3287	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,929118213	0,002933524
XAC0392	hypothetical protein	+	VIII.B	0,557827596	0,003378896
XAC1119	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	2,388648485	5,611895512
XAC1857	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-1,268074863	0,000115952
XAC3446	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,706091463	0,000200471
XAC3361	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,790951416	0,000584602
XAC3966	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,392971471	0,00096763
XAC0822	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,13865441	0,001040409
XAC3734	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,281236164	0,0014431
XAC2606	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,906151776	0,002709267
XAC3657	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,816494826	0,003347172
XAC3752	Xanthomonas conserved hypothetical	=	VIII.C	0,57092378	0,008843538
XAC1470	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,765471496	0,011888829
XAC0871	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,456832628	0,012589308
XAC1779	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,384746669	0,012900566

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC3501	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,396553248	0,013250623
XAC3322	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,741536854	0,014010719
XAC0885	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	2,344485241	1,540179049
XAC1412	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,719368805	0,001616694
XAC2640	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-1,019288488	0,001899639
XAC2568	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,669184905	0,00525597
XAC3844	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,949949456	8,431082449
XAC1616	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,634772685	8,4171541458
XAC2611	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,005414026	0,000507202
XAC2539	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,951715404	0,000685362
XAC2367	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,612645569	0,000860183
XAC3496	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,557251107	0,004515127
XAC0768	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-1,520814087	0,00823404
XAC1370	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,730365905	0,010513558
XAC1364	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,748961805	0,002007839
XAC3428	hydrolase	-	IX	-1,02784469	0,000178313
XAC1399	sensor protein	-	IX	-0,611480035	0,00728249
XAC0873	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	-	IX	-0,548184575	0,010521762
XAC1812	HmsF protein	-	IX	-1,132080681	0,010855047
XAC3424	TdcF protein	-	IX	-0,750622523	0,002929476
XAC0674	putative nicotinate phosphoribosyltransferase	-	IX	-0,913575797	0,003163464
XAC2133	oxidoreductase	-	IX	-1,002354865	0,010499796
XAC0053	methyltransferase	-	IX	-2,134587456	0,004754295

* Para cada gene encontrado como diferencialmente expresso foi feita uma busca no NCBI (fevereiro de 2010) para verificar a anotação atual do gene, ou seja, o produto que ele codifica. **(+) genes que foram mais expressos; (-) genes que foram menos expressos.

DISCUSSÃO

A mutação no gene *xrvA* no mutante 8B7 mostrou resultados interessantes em relação aos genes diferencialmente expressos neste mutante quando comparado com o fenótipo selvagem. Este gene codifica uma proteína H-NS (Figura 10) e alguns estudos sugerem que a mesma está envolvida em processos biológicos como replicação, recombinação e transposição (USSERY *et al.*, 1994). Proteínas H-NS já foram identificadas em algumas bactérias como *Eschechiria coli*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae*, onde agem como um repressor transcricional de um grande número de genes (TENDENG & BERTIN, 2003; DORMAN, 2004; FANG & RIMSKY, 2008).

FENG *et al.* (2009) produziram um mutante de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* estirpe 13751 contendo o gene *xrvA* inativado. Quando o mutante foi inoculado em planta de arroz houve uma redução da virulência em relação à estirpe selvagem, e quando foi inoculado em planta não hospedeira (plantas de mamona - *Ricinus communis*) ocorreu um retardamento da resposta de hipersensibilidade. Além disso, o mutante para o gene *xrvA* apresentou uma diminuição na quantidade de polissacarídeo extracelular (EPS) e na produção de DSF e um aumento no acúmulo de glicogênio intracelular. Análises de hibridização por *Northen blot* revelaram que os genes *hrpG*, *hrpX*, *rpfC*, *rpfF*, *rpfG* e *gumB* associados à virulência foram menos expressos no mutante do que na estirpe selvagem.



Figura 10. Representação esquemática do domínio presente na proteína codificada pela ORF XAC1495 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A proteína contém 134 resíduos de aminoácidos e um domínio H-NS.

Sistema de secreção do tipo II (Degradação da parede celular)

Um gene que codifica uma proteína constituinte do sistema de secreção do tipo II (ORF XAC0700 – gene *xcsI*) foi menos expresso no mutante 8B7. O Sistema de secreção do tipo II (SST2), largamente encontrado em bactérias gram-negativas, consiste de um mecanismo composto por 12 a 15 proteínas, a maioria das quais estão associadas a proteínas da membrana interna (SANDKVIST, 2001). A secreção através desse sistema ocorre em dois passos: a maquinaria Sec (Sistema Secretório Geral Conservado) exporta através da membrana interna da bactéria as proteínas possuindo o peptídeo sinal e as proteínas do SST2 as secretam através da membrana externa (Figura 11). O SST2 secreta diversos tipos de proteínas, tais como celulasas, pectato liases, toxinas, proteases e fosfatases alcalinas (BRUNINGS & GABRIEL, 2003), as quais desempenham um papel importante na patogenicidade de bactérias gram-negativas. Este sistema foi primeiramente descoberto em bactérias patogênicas de animais e foi identificado posteriormente em muitas outras bactérias (CIANCIOTTO, 2005). No entanto, está ausente em vários patógenos humanos, como *Salmonella enterica* e *Shingella flexneri*, e também no patógeno de planta *Agrobacterium tumefaciens* (GOODNER *et al.*, 2001; WOOD *et al.*, 2001; CIANCIOTTO, 2005). No genoma de Xac foram identificados dois grupamentos gênicos (operons – *xcs* e *xps*) que codificam proteínas constituintes do SST2 e HOMEM (2008) mostrou que estes dois operons (*xcs* e *xps*) são independentes e funcionais e estão envolvidos com a manifestação do cancro cítrico. *Xylella fastidiosa* apresenta apenas o operon *xps*, o qual apresenta sintonia completa com o *xps* de Xac (MOREIRA *et al.*, 2004). O fato de Xac possuir dois SST2 pode estar relacionado ao fato de que esta bactéria possui uma grande quantidade de genes que codificam enzimas que degradam parede celular e que precisam ser excretadas.

Estudos funcionais indicam que o SST2 pode promover a virulência de patógenos humano, de animal e de plantas (CIANCIOTTO, 2005). A contribuição precisa de substratos do SST2 de bactérias virulentas e a identificação de seus

alvos em plantas ainda não é bem entendida. Contudo, sabe-se que uma grande quantidade de enzimas desse sistema contribui para a degradação da parede celular de plantas, a qual é o principal obstáculo à entrada das bactérias fitopatogênicas nas células (MCNEILL *et al.*, 1984). O SST2 é mais conhecido por sua importância na patogenicidade de organismos como *Erwinia chrysanthemi*, que causa a podridão-mole em diversas plantas através da secreção de uma bateria de enzimas degradadoras da parede celular (KAZEMI-POUR *et al.*, 2004). Contudo, estudos recentes demonstram que a *Xac* não só possui genes preditos para a secreção via SST2, como de fato secreta celulases ativas que são responsáveis por degradar a parede celular do hospedeiro cítrico (BAPTISTA, 2006; FERREIRA, 2009). Essa característica, apesar de não ser imprescindível para o desenvolvimento da doença, possui um papel importante na patogênese, de modo que mutantes que tiveram interrompidos genes para celulases do SST2 apresentaram sintomas atenuados de cancrose quando comparados à bactéria selvagem (BAPTISTA, 2006). FURUTANI *et al.* (2004) relatou que enzimas secretadas pelo SST2 são correlacionadas com os genes do sistema de secreção do tipo III (SST3), sugerindo uma interação entre ambos os sistemas. Esta hipótese foi analisada a partir de mutantes para o gene do SST2 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* por FURUTANI *et al.* (2004), que observou que proteínas do SST2, quando expressas em meio de cultura indutor XOM2, são reguladas pela proteína HrpXo, a qual é secretada via SST3 e que também o gene *hrpXo* regula a expressão de uma cisteína protease (CysP2) que é secretada pelo SST2, além das proteínas HrpE1 e HrpF.

compreendendo os genes *hpa2* a *hpaF* (Figura 13). A expressão desses genes é induzida pela planta e a regulação é efetuada por proteínas de dois componentes, fatores sigma alternativos e ativadores transcricionais do tipo AraC.

Mutantes da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revelaram que a ativação transcricional dos genes *hrp* depende de um regulador chave de expressão, o *hrpG*, o qual é um regulador de resposta do tipo OmpR e presumivelmente percebe sinais ambientais por meio de um sensor proteína quinase ainda não conhecido (WENGELNIK *et al.*, 1996a, WENGELNIK *et al.*, 1996b, WENGELNIK *et al.*, 1999). Ainda, a expressão de *hrpG* é suprimida em meios complexos e na superfície da planta, mas é expresso em meio sintético XVM2 e quando a bactéria penetra na planta (WENGELNIK *et al.*, 1996b; ZHANG *et al.*, 2009). Evidências experimentais sugerem que em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a expressão de genes *hrpG* é controlada por múltiplas vias regulatórias incluindo o sistema de dois componentes PhoPQ, as proteínas H-NS, XrvA e Trh, um membro da família de reguladores GntR (citado em BÜTTNER & BONAS, 2010). A proteína HrpX é responsável por codificar um ativador transcricional do tipo AraC, que se liga a uma região promotora conservada (PIP box) presente na maioria dos genes induzidos por HrpG e é responsável por controlar a expressão dos operons *hrpB* e *hrpF* (WENGELNIK & BONAS, 1996). As proteínas HrpX e HrpG em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ativam a expressão de um gene regulador *hpaR*, que codifica um regulador transcricional da família MarR (WEI *et al.*, 2007). A proteína MarR (“multiple antibiotic resistance regulator”), um regulador de resistência múltipla a antibióticos que foi inicialmente caracterizado com o repressor do operon *marRAB* de resistência a antibióticos em *Escherichia coli*, é um membro prototípico da família MarR de reguladores de transcrição e é encontrada amplamente em bactérias e organismos do domínio Archaea (ALEKSHUN *et al.*, 2001, COHEN *et al.*, 1993, SEOANE *et al.*, 1995). Os membros MarR regulam uma variedade de funções biológicas, incluindo resistência múltipla a antibióticos e outros produtos químicos tóxicos como solventes orgânicos, desinfetantes usados em casa e agentes de estresse

acumula no meio extracelular no início da fase estacionária de crescimento. DSF ativa o sistema de dois componentes RpfC/RpfG, o qual atua na hidrólise do di-GMP cíclico. Um segundo sistema de dois componentes que contribui para a hidrólise do di-GMP cíclico é constituído pelo sensor quinase RavS e pelo regulador de resposta RavR. RavS contém dois domínios PAS que permite sua ativação por baixos níveis de oxigênio. Altos níveis de di-GMP cíclico promove a formação de biofilme e reprime a ligação do regulador transcricional Clp aos promotores de seus genes alvos. Clp induz a síntese de enzimas extracelulares e ativa a expressão dos genes regulatórios *flhR* e *zur*. O ativador transcricional Zur e o regulador de resposta HrpG induzem a expressão de *hrpX*, o qual codifica um ativador transcricional tipo-AraC e é crucial para a expressão de genes *hrp*. A expressão dos operons *hrpE* e *hrpC* de Xcc é também controlada pelo sistema de dois componentes ColS/ColR. Além disso, a expressão de genes *hrp* é reprimida por FhrR. HrpX regula a expressão de genes adicionais incluindo *hpaR*, o qual codifica um regulador transcricional do tipo MarR. (BÜTTNER & BONAS, 2010).

Os genes reguladores *hrpG* e *hrpX* são responsáveis pela ativação da expressão de genes *hrp* *in planta* e em meio de cultura XVM2 (WENGELNIK & BONAS 1996; WENGELNIK *et al.*, 1996B). Da biblioteca de mutantes de Xac obtida por LAIA *et al.* (2009), dois mutantes carregam mutação em genes *hrp*: um no gene *hrpB4* (mutante 02H02) e outro no gene *hrpXct* (mutante 03C01). Estes dois mutantes não apresentam sintomas de cancro e sua multiplicação em folhas de citros é bem inferior ao apresentado pela bactéria de fenótipo selvagem.

O SST3 é responsável pela regulação de fatores de patogenicidade e também possibilita a translocação de proteínas efetoras da bactéria diretamente para o interior da célula eucariótica do hospedeiro, as quais são utilizadas para manipular o hospedeiro durante a infecção (BLOCKER *et al.*, 2003). A deficiência nesse sistema pode interferir no processo de patogenicidade. O fato do mutante 8B7 levar à diminuição da expressão de genes do SST2 e SST3 pode explicar a sua quase avirulência, caracterizada pela ausência de encharcamento, leve hiperplasia e ausência de necrose.

Um grande número de espécies de bactérias gram-negativas são capazes de infectar plantas, podendo tanto causar doença ou estabelecer uma interação simbiótica com a planta hospedeira (ALFANO & COLLMER, 2001). Estas bactérias fitopatogênicas utilizam diversas estratégias e mecanismos moleculares para conseguirem entrar e colonizar os tecidos da planta hospedeira. Estes mecanismos envolvem uma variedade de fatores como adesinas, 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 e proteínas necessárias para a montagem e regulação de sistemas macromoleculares de secreção para o transporte de fatores de patogenicidade da bactéria para dentro do tecido da planta hospedeira. No entanto, esses processos são pouco conhecidos a nível molecular, sobretudo no que diz respeito às características particulares da interação entre patógeno e hospedeiro (ALEGRIA *et al.*, 2004).

Genes envolvidos na regulação de fatores de patogenicidade (*rpf*)

O gene que codifica uma proteína RpfC (XAC1878) foi menos expresso no mutante 8B7 (Tabela 2). Os genes do cluster *rpf* (*for regulation of pathogenicity factors*) estão envolvidos em diversas ações de regulação, contribuindo para virulência em diferentes *Xanthomonades*. Todavia vários desses genes codificam elementos de comunicação célula-célula, mecanismo este que já foi estudado no patógeno de crucíferas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). O processo de virulência em Xcc depende da sinalização mediada por um fator de sinalização difusível (DSF) que foi caracterizado como sendo o ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (BARBER *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2004)

As proteínas RpfC/RpfG formam um sistema com dois componentes, receptor/regulador que está implicado na percepção de DSF e na tradução de sinal (Figura 13). RpfG contém um domínio HD-GYP, que é um domínio conservado encontrado em bactérias gram-negativas e gram-positivas e é presumivelmente envolvido na hidrólise do di-GMP cíclico (GALPERIN *et al.*, 2001; DOW *et al.*, 2006; RYAN *et al.*, 2006). O di-GMP cíclico (c-di-GMP) é um mensageiro secundário intracelular que regula uma variedade de funções celulares como formação de biofilme e expressão de genes de virulência. Este foi descrito pela primeira vez em *Gluconacetobacter xylinus* como um inibidor alostérico ativador da síntese de celulose (RÖMLING & AMIKAM, 2006). Além do

domínio HD-GYP, duas outras proteínas também estão implicadas na síntese e degradação de c-di-GMP (Figura 13), as proteínas contendo os domínios GGDEF e EAL (JENAL, 2004). Uma proteína GGDEF (XAC1938) foi mais expressa no mutante 8B7 (Tabela 2). O papel do domínio HD-GYP na hidrólise de c-di-GMP foi proposto baseado em estudos do número de distribuição de GGDEF, EAL e HD-GYP codificado pelo genoma bacteriano, onde várias proteínas que codificam o domínio GGDEF e HD-GYP não codificam o domínio EAL (GALPERIN 2005; GALPERIN *et al.* 1999, 2001)

O domínio HD-GYP regula RpfG e o complexo sensor histidina quinase RpfC que compreende o sistema de dois componentes e está implicado na regulação e sinalização bacteriana (Figura 13). Em Xcc, a síntese de fatores de virulência, incluindo a síntese de enzimas extracelulares, e a dispersão de biofilme são controladas positivamente pelo sistema de dois componentes RpfC/RpfG contendo o domínio regulatório HD-GYP e pela sinalização célula-célula mediada pela molécula sinalizadora difusível DSF (“diffusible signal factor”) (DOW *et al.*, 2003, RYAN *et al.*, 2006; SLATER *et al.*, 2000). Os genes *rpfG* e *rpfC* são transcritos pelo operon *rpfGH* e o sistema de dois componentes RpfG/RpfC tem sido implicado na percepção de DSF e na transdução do sinal.

Estudos em Xcc mostraram que a adição de DSF em cepas mutantes para *rpfF* pode restaurar a síntese de enzimas extracelulares, mas não em cepas com mutação em *rpfG* ou *rpfC*. Mutantes de *rpfC*, *rpfG* e *rpfF* conduzem à formação de biofilme em Xcc em certos meios, no entanto no fenótipo selvagem ocorre multiplicação de maneira dispersa (DOW *et al.* 2003).

O fato de *rpfC* ter sido menos expresso no mutante 8B7 é condizente com o fato do mesmo ter sua patogenicidade extremamente atenuada.

Genes do sistema de secreção do tipo IV

Dentre os genes diferencialmente expressos no mutante 8B7 encontramos

proteínas *virB* do sistema de secreção do tipo IV (SST4). O isolado 306 de Xac possui dois SST4, um presente no cromossomo e outro no plasmídeo pXAC64 (SILVA *et al.*, 2002). O mutante 8B7 apresentou dois genes *virB* do SST4 menos expressos e quatro mais expressos. LAIA (2007), ao analisar a expressão gênica de Xac 306 inoculada *in planta*, observou que todos os genes *virB* foram menos expressos. No entanto, para o mutante 8B7, encontramos que alguns genes *virB* foram mais expressos e outros menos expressos.

Os compostos VirB são transcritos em baixo nível e eles são induzidos por compostos fenólicos (GIJSEGEM, 1997), baixa temperatura, pH ácido e presença de açúcares (LIU *et al.*, 2006), condições típicas encontradas no solo próximo à rizosfera. O sistema de secreção do tipo IV (SST4) em bactérias gram negativas é estruturalmente complexo e mediam a transferência de macromoléculas por meio de conjugação, onde um grande número de proteínas atravessam a membrana plasmática, o espaço periplasmático e a membrana externa (HAFT *et al.*, 2007). LAIA (2007) encontrou que os genes *virB1*, *virB3*, *virB4*, *virB8*, *virB9* e *virB11* presentes no cromossomo de Xac 306 foram menos expressos logo no início da colonização. No entanto, no mutante 8B7 os genes *virB2* (XAC2616), *virB4* (XAC2614), *virB8* (XAC2121) e *virB9* (XAC2620), presentes no cluster de genes do SST4 do cromossomo de Xac foram mais expressos 72 horas após inoculação em folhas de laranjeira, enquanto que o gene *virB10* (XAC2619) cromossomal e os genes *virB4* (XACb0045) e *virB11* (XACb0037) presentes em um dos dois plasmídeos de Xac (plasmídeo pXAC64) se mostraram menos expressos. LAIA (2007) mostrou que em Xac os genes *virB9*, tanto o cromossomal como o plasmidial, foram menos expressos quando multiplicadas em meio XAMI e *in planta*.

As proteínas do SST4 estão presentes na maioria das bactérias patogênicas de plantas e animais. Em *Agrobacterium tumefaciens* os genes *virB* são essenciais para o processo de infecção mediada pela transferência de DNA para plantas hospedeiras (WARD *et al.*, 1991). Em *Bordetella pertussis*, patógeno causador da coqueluche, a proteína PtlC, homóloga a *virB4*, desempenha um

papel chave no processo de liberação da toxina pertussis (COVACCI e RAPPUOLI, 1993). Também em *Brucella suis* (O'CALLAGHAN, 1999, FOULONGNE, 2000) e em *Brucella abortus* (SIEIRA *et al.*, 2000) a virulência está associada à expressão dos genes *virB*, uma vez que mutantes para os genes *virB* leva à perda da capacidade de sobreviver e se multiplicar em células de mamíferos e a virulência é restaurada por complementação com um plasmídeo contendo a região *virB* (O'CALLAGHAN, 1999; SIEIRA *et al.*, 2000;). No caso de *Xanthomonas*, algumas proteínas hipotéticas são secretadas pelo SST4, mostrando que esse sistema pode ser de alguma forma importante para Xac.

Transporte de Ferro

Na categoria dos genes relacionados a transportadores (V.A.7.), encontram-se genes relacionados à expressão de receptores dependentes de TonB e transportadores ABC (Tabelas 2 e Figura 5). Em relação à expressão de genes desta categoria no mutante 8B7, 10 genes se mostraram diferencialmente expressos, sendo 5 receptores dependentes de TonB (todos menos expressos). Os receptores dependentes de TonB (TBDRs) são proteínas da membrana externa conhecidas principalmente pelo transporte ativo de complexos sideróforo-ferro em bactérias gram-negativas (BLANVILLAIN *et al.*, 2007). O ferro é essencial para quase todas as bactérias patogênicas e a capacidade de obtenção deste e outros nutrientes é um grande determinante de virulência (LITWIN & CALDERWOOD, 1993). Todos os organismos vivos necessitam de ferro para realizar vias metabólicas cruciais à sua existência. Além disso, o Fe é um fator limitante para a multiplicação de células bacteriana *in planta* e concentrações micromolares são necessárias para permitir sua multiplicação. O sistema TonB também está envolvido na transdução de sinal da superfície celular para o citoplasma, como relatado para *E. coli* e *Pseudomonas putida* (HARLE *et al.*, 1995; KOSTER *et al.*, 1994). Em Xcc, os genes envolvidos na captação de Fe são

essenciais para a indução de uma resposta de hipersensibilidade (WIGGERICH & PUHLER, 2000). O fato de que 5 genes responsáveis pelos transcritos que codificam receptores dependentes de TonB foram menos expressos no mutante 8B7 de Xac, um mutante que apresenta ausência de encharcamento, leve hiperplasia e sem necrose, mostra que o sistema TonB é importante para o processo de infecção na interação planta-patógeno no patossistema Xac-citros.

Transportadores ABC

Ainda na categoria dos genes transportadores V.A.7., o mutante 8B7 apresentou 5 transportadores ABC com expressão alterada (3 mais expressos e 2 menos expressos) em comparação com Xac selvagem (Tabela 2 e Figura 5).

Todas as proteínas transportadoras ABC são energeticamente dependentes de ATP e estão ligadas à membrana das células, sendo capazes de transportar uma grande variedade de substratos através da membrana celular, como biotina, sulfato, maltose, ribose, fosfato, entre outros (MISHIMA *et al.*, 2001). Os transportadores ABC foram considerados importantes para multiplicação de células bacterianas *in planta* (LLAMA-PALACIOS *et al.*, 2002), provavelmente devido ao envolvimento no transporte de açúcares e aminoácidos da planta para o interior da bactéria. Os transportadores ABC são indispensáveis não somente para suprir as células bacterianas de nutrientes como também para a proteção contra compostos perigosos (HASHIMOTO *et al.*, 2001).

Os transportadores ABC em bactérias tem mostrado a capacidade de importação de muitos compostos, mas eles são amplamente controlados por compostos de pequeno peso molecular, como por exemplo, histidina, maltose, ribose, fosfato, sulfato, níquel, molibdênio, oligopeptídeos, ácidos graxos, e assim por diante, tanto que nenhum transportador ABC de importação de compostos de alta massa molecular foi relatado na literatura (HASHIMOTO *et al.*, 2001). Eles são implicados também em uma variedade de doenças hereditárias humana, como a fibrose cística e na resistência multidrogas de células cancerígenas e de

uma ampla extensão de microorganismos (HASHIMOTO *et al.*, 2001). Uma característica importante dos transportadores ABC é a capacidade de transportar uma ampla quantidade de compostos para fora (secreção ou exportação) ou para dentro (importação) da célula, utilizando energia proveniente da hidrólise de ATP. O sistema de importação utilizando transportadores ABC é típico de muitas células procarióticas e é utilizado para a captação de pequenas moléculas (HASHIMOTO, *et. al.*, 2001).

Quimiotaxia e motilidade celular

Na categoria relacionada à motilidade celular (V.C), 4 genes codificando proteínas flagelar foram mais expressos no mutante 8B7 (Tabela 2 e Figura 5). Dentro desta mesma categoria, 6 genes relacionados à quimiotaxia apresentaram expressão alterada no mutante 8B7 (Tabela 2) sendo 4 menos expressos e 2 mais expressos. Proteínas flagelar são responsáveis pela movimentação da maioria das bactérias gram-negativas, o que ajuda no confronto com o hospedeiro. A motilidade nessas bactérias permite obter maior e melhor quantidade de nutrientes, fugir de substâncias tóxicas ou ambientes desfavoráveis (MACNAB, 1996). Sabe-se que a rotação flagelar é controlada no corpo basal pelo motor flagelar, o qual é composto pelas proteínas FliG, FliM e FliN (MACNAB, 1996) (Figura 14).

Em *Salmonella* e *E. coli* a estrutura flagelar é constituída por filamento, corpo basal e gancho, com as duas últimas estruturas sendo responsáveis pela inserção na membrana e movimentação do filamento (Figura 14). O corpo basal, que é a estrutura mais complexa do flagelo, apresenta 4 anéis: anel C que se localiza no citoplasma, anel MS que se localiza na membrana interna, anel P que se localiza no periplasma e anel L que se encontra na membrana externa. Os anéis P e L juntos formam uma estrutura cilíndrica rígida que segura a rotação da haste (AKIBA *et al.*, 1991). Os anéis externos L e P associam-se ao LPS e peptidoglicano, respectivamente, enquanto os anéis S e M estão associados à

membrana citoplasmática.

A ORF XAC1979, que codifica a proteína FlgI, foi mais expressa no mutante 8B7 (Tabela 2). O anel P do corpo basal do flagelo é formado por múltiplas cópias de FlgI. O precursor de FlgI é transportado para dentro do periplasma via sistema de secreção Sec (HOMMA *et al.*, 1987; JONES *et al.*, 1989). Outra proteína também transportada para dentro do periplasma via sistema de secreção Sec, a proteína FlgA, auxilia na formação do anel P. Já foi mostrado em estudos com mutantes que existe uma interação FlgA-FlgI, indicando que FlgA, além de agir no periplasma, atua como uma chaperona periplásmica, auxiliando na reação de polimerização de FlgI no anel P por meio de interação FlgA-FlgI (HIZUKURI *et al.*, 2006; NAMBU & KUTSUKAKE, 2000; JONES *et al.*, 1990; KUBORI *et al.*, 1992; SOSINSKY *et al.*, 1992).

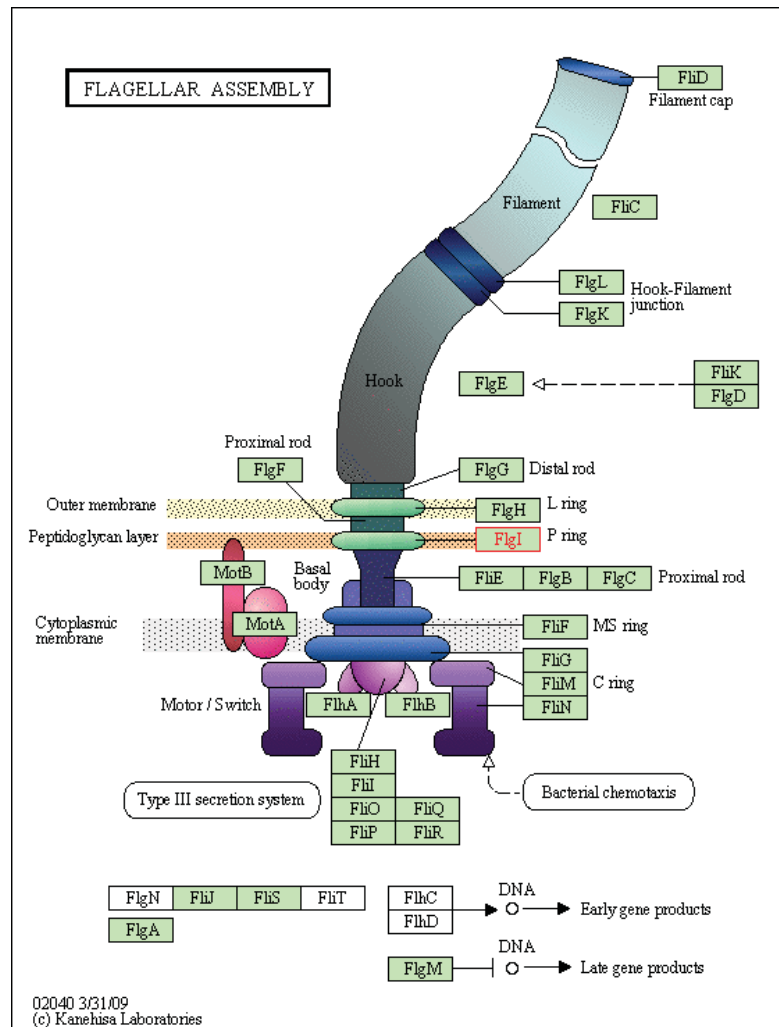


Figura 14. Representação esquemática do sistema flagelar em bactéria gram-negativa, onde o corpo basal é composto pelas proteínas FliG, FliM e FliN. Múltiplas cópias da proteína FliI forma o Anel P, o qual, juntamente com o anel L forma uma estrutura cilíndrica rígida que segura a rotação da haste. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

As proteínas flagelar, além de responsáveis pela motilidade, também estão relacionadas com a interação precoce com o hospedeiro, um exemplo no funcionamento em nível molecular (VANDE-BROEK & VANDERLEYDEN, 1995, MOENS & VANDERLEYDEN, 1996, FINLEY & FALKOW, 1997, MINAMINO & NAMBA, 2004, HONKO & MIZEL, 2005, JOURNET *et al.*, 2005). O processo de locomoção de células em direção a um ambiente químico é chamado de

quimiotaxia Este sistema requer sensibilidade à concentração de um produto químico no ambiente e a transmissão de um sinal para os flagelos bacterianos. Em *Xac* os genes flagelar codificam proteínas com subunidades de um flagelo polar como também várias proteínas auxiliares envolvidas na regulação e união dos flagelos. Embora nenhum gene codificando a chaperone flagelar FlgN foi identificado quando da anotação da *Xac* (SILVA *et al.*, 2002), experimentos de duplo híbrido mostraram que a ORF XAC1990 codifica FlgN, sendo que FlgN expressa em *E. coli* interage com FlgK também expressa em *E. coli* (KHATER *et al.*, 2002). As proteínas envolvidas na quimiotaxia são na sua grande maioria receptores transmembrânicos que utilizam desmetilação/desaminação reversível e são denominadas de proteínas quimiotáticas aceptoras de metil (MCPs). Estes receptores percebem o sinal extracelular e o endereça para um sistema de transdução de sinais onde a proteína CheA recebe o sinal da MCP e fosforila CheY, que liga-se ao complexo flagelar para controlar a direção rotacional dos flagelos. O sistema para quando a sensibilidade da MCP na recepção do sinal é alterada por modificações da MCP pela ação de CheC e CheD (CHAO *et al.*, 2006) (Figura 15).

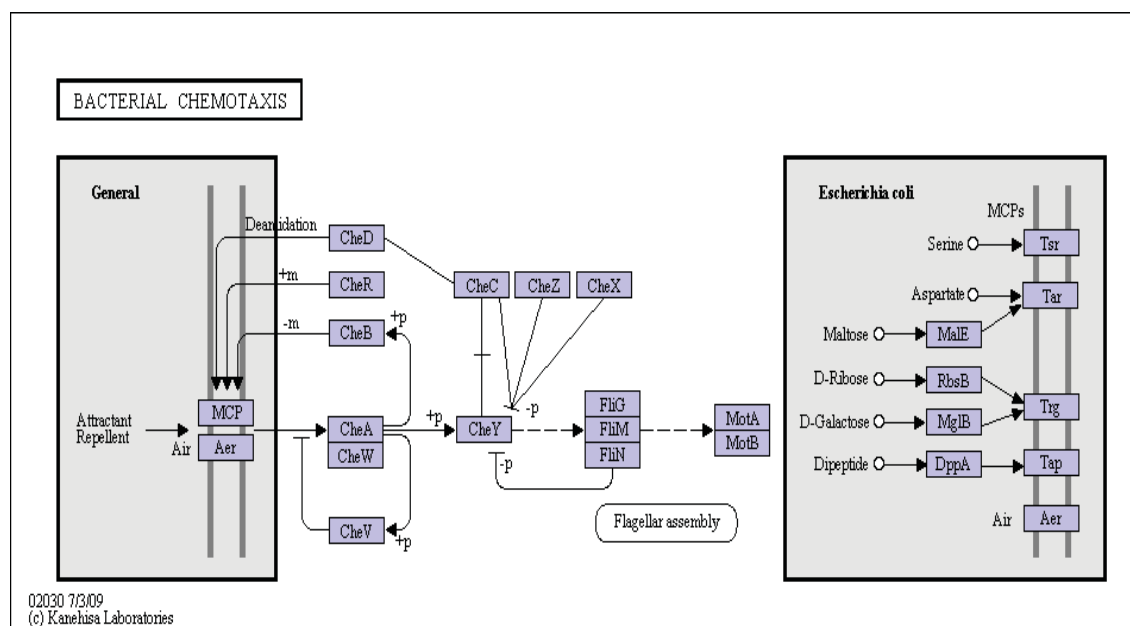


Figura 15. Representação do esquema de quimiotaxia em bactérias, na qual os receptores de sinal extracelular endereçam para o sistema de tradução de sinais, onde a proteína CheA recebe o sinal da MCP fosforilando CheY, que se liga ao corpo basal (complexo de proteínas FliG, FliM e FliN) e assim inicia o movimento rotacional dos flagelos. Este sistema para quando MCP sofre modificação pela ação das proteínas CheC e CheD, alterando a sensibilidade na percepção do sinal. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Assim o sistema sensor de quimiotaxia transfere para os flagelos os estímulos necessários para que estes possam fazer com que a célula se mova na direção correta. O fato de que houve no mutante 8B7 expressão de genes codificando proteínas de flagelo quando comparado ao fenótipo selvagem sugere a importância desse sistema para a Xac. LAIA (2007) também observou que genes pertencentes ao sistema flagelar de Xac e envolvidos na captação de sinais externos e movimentação foram mais expressos 24 horas após infecção, quando fenômenos de adaptação ao ambiente, representados pela planta hospedeira, encontram-se em ação.

Elementos genéticos móveis

Em relação aos genes relacionados ao processo de transposição, das 21 cópias que codifica transposase *ISxac3* em Xac (SILVA *et al.*, 2002), 18 apareceram como diferencialmente expressas no mutante 8B7 (Tabela 2 e Figura 4), sendo todas menos expressas. Além de *ISxac3*, outros genes que codificam transposases também foram diferencialmente expressas como *ISxac1*, *ISxac2*, *ISxac4* e *ISxad1*, todas pertencentes à categoria VI.C. LAIA (2007) também encontrou que em Xac selvagem todos esses genes são menos expressos *in planta*. Isso confere estabilidade ao genoma, pois evita a translocação de genes.

CONCLUSÕES

Um grande número de genes que codificam proteínas hipotéticas foi diferencialmente expresso no mutante de Xac que tem o gene *xrvA* interrompido (mutante 8B7), sugerindo que elas podem estar envolvidas nos processos de patogenicidade e virulência de Xac.

A diminuição da expressão do genes *xcsI* do SST2 e do gene *hrpX* do SST3, ambos necessários para a virulência e patogenicidade, pode explicar em parte a sua quase avirulência do mutante, caracterizada pela ausência de encharcamento, leve hiperplasia e ausência de necrose.

A menor expressão de genes codificadores de receptores dependentes de TonB no mutante deve alterar a sua capacidade de transporte de ferro, o que pode contribuir para diminuir a sua virulência.

A alteração na expressão de genes que codificam transportadores ABC, os quais são indispensáveis tanto para a nutrição da célula como para proteção contra compostos tóxicos, pode ter diminuído a capacidade do mutante em obter nutrientes e em excretar compostos tóxicos.

A mutação no gene *xrvA* de Xac leva à mudanças na expressão de alguns genes *vir* dos dois cluters presentes nesta bactéria. Esses resultados sugerem que esses genes devem ser de alguma forma importantes para a virulência e patogenicidade de Xac, embora ainda não se tenha nada descrito na literatura neste sentido.

REFERÊNCIAS

- AKIBA, T.; YOSHIMURA, H.; NAMBA, K. Monolayer crystallization of flagellar l-p rings by sequential addition and depletion of lipid. **Science**, New York, v.252, n.5012, p. 1544–1546, 1991.
- ALEGRIA, M. C. *et al.* New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. **Journal of Bacteriology**, Washington., v.186, n.18, p. 6186–6197, 2004.
- ALEKSHUN, M. N., S.B. LEVY. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemical. **Trends in Microbiology**, Cambridge v.7, n.10, p.410–413, 1999.
- ALEKSHUN, M. N., S.B.LEVY, T.R. MEARLY, B.A.SEATON, AND J.F.HEAD. The crystal struture of MarR , a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**.,New York, v.8, p.710-714, 2001.
- ALFANO, J. R., COLLMER. A. Mechanisms of bacterial pathogenesis in plants: familiar foes in a foreign kingdom, p. 179–226. *In* E. A. Groisman (ed.), Principles of bacterial pathogenesis. **Academic Press, Inc., New York**, 2001.
- BARBER, C.E., TANG, J.L., FENG, J.X., *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.24, n.3, p.555–566,1997.
- BAPTISTA, J. C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. 2006. 93f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas.
- BLANVILLAIN S., MEYER, D., BOULANGER A., LAUTIER M., GUYNET C., *et al.* Plant carbohydrate scavenging through TonBdependent receptors: A feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. **PLoS ONE**,San Francisco, v.2, n.2, p.e224, 2007.
- BLOCKER, A.; KOMORIYA, K.; AIZAWA, S.-I. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. **Proceeding of the National Academy Science of the United States**, Washington, v.100, n.6, p.3027–3030, 2003.
- BONAS, U., SCHULTE, R., FENSELAU, S., MINSAVAGE, G.V., STASKAWICZ,

B.J., STALL, R.E. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.4, p.81–88, 1991.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, Florida, v.4, p. 141-157, 2003.

BÜTTNER, D., BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.34, p.107–133, 2010.

CARVALHO, F.M.S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira** Ribeirão Preto, 2006. 190p. Tese (Doutorado em Ciências – Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

CHAO, X.; MUFF, T.J.; PARK, SANG-YOUN ; ZHANG, S.; POLLARD, A.M.; ORDAL, G.W.; BILWES, A.L.; CRANE, B.R. A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation. **Cell**, Cambridge, v.124, n.3, p 561–571, 2006.

CIANCIOTTO, N.P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends In Microbiology**, Cambridge, v 13, n.12, p.581–588, 2005

COHEN, S.P., LEVY, S.B., FOULDS, J., ROSNER, J.L. Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the mar operon and a Mar-independent pathway. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.7856-7862, 1993.

CONWAY, T. & SCHOOLNIK, G.K. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. **Molecular microbiology**, Oxford v.47, p. 879-889, 2003

COVACCI, A., RAPPUOLI, R. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.8, n.3, p.429–434, 1993.

DORMAN, C. J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. **Nature Review Microbiology**, London, v. 2, n. 25 p. 391-400, 2004.

DOW, J.M., CROSSMAN, L., FINDLAY, K., HE, Y.Q., FENG, J.X., TANG, J.L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceeding of the National Academy Science of the United States**, Washington, v.100, n.19, p.10995–11000, 2003.

DOW, J.M., FOUHY, Y., LUCEY, J.F., RYAN, R.P. The HD-GYP domain, cyclic di-

GMP signaling, and bacterial virulence to plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.19, n.12, p.1378–1384, 2006

ELLISON, D.W., MILLER, V.L.. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr. Opin. Microbiology*, Washington, v.9, p.296-300, 2006.

FADL, A.A., GALINDO, C.L., ZHANG, F., GARNER, R., WANG, H., CHOPRA, A.K. Global transcriptional responses of wild-type *Aeromonas hydrophila* and its virulence-deficient mutant in a murine model of infection. **Microbial Pathogenesis**, London, v.42, n.5-6, p.193-203, 2007.

FANG, F. C. & RIMSKY, S. New insights into transcriptional regulation by H-NS. **Current Opinion Microbiology**, London, v. 11, p. 113-120.2008.

FENG, J.X.; SONG, Z.Z.; DUAN, C.J.; ZHAO, S.; WU, Y.Q.; WANG, C.; DOW, J.M.; TANG, J.L. The *xrvA* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, encoding an H-NS-like protein, regulates virulence in rice. **Microbiology**, Washington, v. 155, n.9, p.3033-3044, 2009.

FERREIRA, R.M. **Secretoma da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Jaboticabal, 2009. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FINLEY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.2, p.136–169, 1997

FOULONGNE, V.; BOURG, G.; CAZEVIEILLE, C.; MICHAUX-CHARACHON, S.; O'CALLAGHAN, D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. **Infection and Immunology**, Washington, v.68, n.3, p.1297–1303, 2000

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. 2010. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 02 Fev. 2010

FURUTANI, A.; TSUGE, S.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; INOUE, Y.; OCHIAI, H., KAKU, H. AND KUBO. Y. Evidence for HrpXo-Dependent Expression of Type II Secretory Proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, n. 5., p. 1374-1380, 2004.

GALPERIN, M. Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. **BMC Microbiology**, London, v.5, n.35, p. ?2005.

GALPERIN, M.Y., NATALE, D.A., ARAVIND, L., E., KOONIN, V. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, Wymonham, v.1, n.2, p.303–305, 1999.

GALPERIN, M.Y.; NIKOLSKAYA, A.N.; AND KOONIN, E.V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v.11, n.21, p. 213-214, 2001

GILSEGEM, F. V. In planta regulation of phytopathogenic bacteria virulence genes: relevance of plant-derived signals. **European Journal of Plant Pathology** Dordrecht, v. 103, n.4, p. 291–301, 1997.

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, B.Q.; GOLDMAN, B. S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; LARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, B.M.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, G.; CIELO, C.; SLATER, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, New York, v. 294, n.5550, p. 2323–2328, 2001.

HAFT, R. J.; GACHELET, E. G.; NGUYEN, T.; TOUSAINT, L.; CHIVIAN, D.; TRAUHLER, B. In vivo oligomerization of the F conjugative coupling protein TraD. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, n.18, p.6626-6634, 2007

HAN, T., WANG, J., TONG, W., MOORE, M.M., FUSCOE, J.C., Microarray analysis distinguishes differential gene expression patterns from large and small colony *Thymidine kinase* mutants of L5178Y mouse lymphoma cells. **BMC Bioinformatics**, London, n.7, Suppl 2:S9, 2006.

HARLE, C.; KIM, I.; ANGERER, A.; AND BRAUN V. Signal transfer through three compartments: Transcription initiation of the *Escherichia coli* ferric citrate transport system from the cell surface. **The EMBO Journal**, Eynsham, v.14, n.7, p.1430-1438, 1995.

HASHIMOTO, W.; MOMMA, K.; MISHIMA, Y.; MIZAMI, B.; and MURATA. K. Super-channel in Bacteria: Function and Structure of a Macromolecule Import System Mediated by a Pit-dependent ABC Transporter. **Biosciences. Biotechnology and Biochemistry**, Bhopal, v. 65, n.9, p.1949-1956, 2001.

HIZUKURI, Y.; TOSHIHARU, Y.; KAWAGISHI, I.; HOMMA, M. . Role of the intramolecular disulfide bond in flgI, the flagellar p-ring component of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.188, n.12, p.4190–4197, 2006.

HOMEM, R.F. **Análise funcional do sistema de secreção tipo II de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**. Campinas. 2008. 95p. Dissertação (Genética de microrganismos). Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas.

HOMMA, M.; IINO, T.; AND MACNAB, R.M. The flafix gene product of salmonella typhimurium is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 4, p. 1493–1498, 1987.

HONKO, A.N.; MIZEL, S.B. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. **Immunologic Research**, Basel, v.33,n.1,p.83–101,2005.

JENAL, U. 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? **Current Opinion Microbiology**, London, v. 7,n.2,p.185–191, 2004

JONES, C. J.; HOMMA, M.; MACNAB, R. M. L-, p-, and m-ring proteins of the flagellar basal body of salmonella typhimurium: gene sequences and deduced protein sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n.7, p. 3890–3900, 1989.

JONES, C. J.; OKINO, R. M.; AND AIZAWA, S..Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 212, n.2, p. 377–387, 1990.

JOURNET, L.; HUGHES, K.T.; CORNELIS, G.R.; Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. **Molecular Membrane Biology**, London, v. 22,n.1-2,p.41–50, 2005.

KAZEMI-POUR, N., CONDEMIN, G., HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. **Proteomics**, Weinheim,v. 4, n. 10. p. 3177 – 3186, 2004.

KHATER, L., *et al.* Identification of the flagellar chaperone FlgN in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri by its interaction with hook-associated FlgK. **Archives of Microbiology**, Berlim, v.188, n.3, p.243-250, 2007.

KOSTER, M. VAN KLOMPENBURG W, BITTER W, LEONG J AND WEISBEEK P. Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. **The EMBO Journal**, Eynsham, v.13,n.12,p.2805-13,1994.

KUBORI, T.; SHIMAMOTO, N.; YAMAGUSHI, S.; NAMBA, K.; AIZAWA, S.. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 226, n. 2, p. 433–446, 1992.

LAIA, M.L.; MOREIRA, L.M.; DEZAJACOMO, J. BRIGATI, J.B.; FERREIRA, C.B.; FERRO, M.I.T.; SILVA, A.C.R.; OLIVEIRA, J.C.F.; FERRO, J.A. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, London, v.9, n.12, p.1-17, 2009.

LAIA M.L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese**. Jaboticabal. 2007. 356p. Tese (Doutorado em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

LLAMA-PALACIOS A, LOPEZ-SOLANILLA, E.; AND RODRIGUEZ-PALENZUELA P. The ybIT gene of *Erwinia chrysanthemi* encodes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.68, n.4, p.1624-1630, 2002

LIU, P.; NESTER, E. W. Indoleacetic acid, a product of transferred dna, inhibits vir gene expression and growth of agrobacterium tumefaciens c58. **Proceeding of the National Academy Science of the United States**, Washington, v.103, n.12, p.4658–4662, 2006.

LITWIN, C. M. & CALDERWOOD, S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, n.2, p. 137-149.1993.

LLAMA-PALACIOS A, LOPEZ-SOLANILLA, E.; AND RODRIGUEZ-PALENZUELA P. The ybIT gene of *Erwinia chrysanthemi* encodes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.68, n.4, p.1624-1630, 2002.

LUCCHINI, S.; THOMPSON, A. & HINTON, J.C. Microarrays for microbiologist. **Microbiology**, v. 147, p. 1403-1414. 2001

MACNAB, R. M.. Flagella and motility, p. 123–145. In F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: **cellular and molecular biology**, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. 1996.

MCNEILL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. & ALBERSHEIM P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemichal**, Palo Alto, v.53, p. 625–663.1984.

MINAMINO, T.; NAMBA, K. Self-assembly and type III protein export of the bacterium flagellum. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Wymonham, v.7, n1-2, p.5–17, 2004.

MISHIMA, Y.; MOMMA, K.; HASHIMOTO, W.; MIKAMI, B.; AND MURATA K. Super-channel in bacteria: Function and structure of the macromolecule import system mediated by a pitdependent ABC transporter. **FEMS Microbiology**,Amsterdan, v.204, n.2, p.215-221,2001.

MOENS, S.; VANDERLEYDEN, J. Functions of bacterial flagella. **Critical Reviews in Microbiology**,London, v.22, n.2, p.67–100, 1996.

MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F; ALMEIDA Jr., N. F. *et al.* Comparative genomics analysis of citrus-associated bacteria. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v.42, p.163-184, 2004.

MÜLLER, C.M.; DOBRINDT, U.; NAGY, G.; EMÖDY, L.; UHLIN, B.E.; HACKER, J. Role of Histone-Like Proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**,Washington, v.188, n.15, p.5428-5438, 2006.

NAMBU, T.; KUTSUKAKE, K. The salmonella flga protein, a putativeve periplasmic chaperone essential for flagellar p ring formation. **Microbiology**,Washington, v. 146, n.5, p. 1171–1178, 2000.

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M. L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y.; RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Molecular Microbiology**,Oxford, v.33,n.6, p.1210–1220,1999.

RÖMLING, U., AMIKAM, D. Cyclic di-GMP as a second messenger. **Cellular and Molecular Life Science**, Birkhäuser. V.9, n.2, p. 218–228, 2006.

ROSSETTI, V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus. 207p, 2001.

RYAN, R.P., FOUHY, Y., LUCEY, J.F., *et al.* Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proceeding Science of the United State of America**,Washington n.103, n. 17, p.6712–6717, 2006.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. MOLECULAR CLONING - A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1. 1989.

SANDKVIST, M. Biology of type II secretion. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.40, n.2, p.271–283, 2001.

SCHOOLNIK, G.K. Functional and comparative genomics of pathogenic bacterial. **Current Opinion Microbiology**, London, v.5, p.20-26. 2002.

SEIB, K.L, WU, H., SRIKHANTA, Y.N., EDWARDS J.L., FALSETTA, M.L., HAMILTON, A.J., MAGUIRE, T.L., GRIMMOND, S.M., APICELLA, M.A., MCEWAN, A.G., JENNINGS, M.P., Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*. **Molecular Microbiology**, Oxford v.63, n.1, p.54-68, 2006.

SEOANE, A.S., AND S.B.LEVY. Caracterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.3414-3419, 1995.

SHI, X.; BI, J.; MORSE, J.G.; TOSCANO, N.C.; COOKSEY, D.A. Differential expression of genes of *Xylella fastidiosa* in xylem fluid of citrus and grapevine. **FEMS Microbiology Letters**, v.304, n.1, p.82-88, 2010.

SIEIRA, R., COMERCI, D.J., SANCHEZ, D.O., UGALDE, R.A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. **Journal of Bacteriology**, Washington v.182, n.17, p.4849–4855, 2000.

SILVA, A. C. R. DA.; FERRO, J.A.; REINACH, F. C. *et al.*, Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v.417, p.459-463, 2002.

SLATER, H., ALVAREZ-MORALES, A., BARBER, C.E., DANIELS, M.J., and DOW, J.M. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell–cell signaling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, n.5, p. 986–1003, 2000.

SOSINSKY, G. E.; FRANCIS, N.R.; DEROSIER, D.J.; WALL, J.L.; SIMON, M.N.; HAINFELD, J. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v. 89, n.11, p.4801–4805, 1992.

TANG, X., XIAO, Y., ZHOU, J-M. Regulation of the Type III Secretion System in

Phytopathogenic Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, n.11, p.1159–1166, 2006.

TENDENG, C. & BERTIN, P. N. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted 11 proteins. *Trends Microbiology*, Cambridge, v. 11, p. 511-518, 2003.

TSENG, H.J., McEWAN, A.G., APICELLA, M.A., JENNINGS, M.P. OxyR acts as a repressor of catalase expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity*, Washington, v.71, p.550–556, 2003.

USSERY, D.W.; HINTON, J.C.D.; JORDI, B.J.A.M. Granum, P.E., Seirafi, A., Stephen, R.J., *et al.* The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie*, Paris, v. 76, n. 10-11, p. 968–980. 1994.

VANDE, B. A.; VANDERLEYDEN, J. The role of bacterial motility, chemotaxis and attachment in bacteria-plant interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, v.8, p. 800–810, 1995.

WANG, L. H.; HE, Y.; GAO, Y.; WU, J. E., DONG, Y. H., HE, C.; WANG, S. X.; WENG, L. X., XU, J. L. TAY, L; FANG, R.X, ZHANG L.H.. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.51, n.3, p. 903-912, 2004.

WARD, J.E., DALE, E.M., BINNS, A.N. Activity of the *Agrobacterium* T-DNA transfer machinery is affected by *virB* gene products. *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America*, Washington, v.88, n. ? p.9350-9354, 1991.

WEI, K., TANG D., HE, Y., FENG, J., JIANG, B., LU, G., CHEN, B., TANG, J., hrpA, a Putative marR Family Transcriptional Regulator, Is Positively Controlled by HrpG and HrpX and Involved in the Pathogenesis, Hypersensitive Response, and Extracellular Protease Production of *Xanthomonas campestris* Pathovar *campestris*. *Journal of Bacteriology*, v.189, n.5, p. 2055-2062, 2007.

WENGELNIK, K., U. BONAS. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five or the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.178, p.3462-3469, 1996.

WENGELNIK, K., MARIE, C., RUSSEL, M., BONAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.178, p. 1061–1069, 1996a.

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 Interaction**, Oxford, v 9, n.8, p.704-712, 1996b.

WENGELNIK, K., ROSSIER, O., BONAS, U. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria result in constitutive expression of all *hrp* genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, n.21, p. 6828-6831, 1999.

WIGGERICH, H.G.; and PUHLER, A. The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*), **Microbiology**, Washington, v. 146, n.5, p.1053-1060, 2000.

WILKINSON, S.P., GROVE, A. HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.279, p.51442–51450, 2004.

WOOD, D.W., SETUBAL, J.C., KAUL, R. *et al.* The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, New York, v. 294, n. 5550, p.2317–2323, 2001

ZHANG Y., CALLAWAY, E.M., JONES, J.B., WILSON, M. Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.124, n.3, p.379–390, 2009.

CAPÍTULO 3 – Análise da expressão gênica global *in vivo* do mutante de uma histidina quinase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

RESUMO – Foi mostrado recentemente que a interrupção de um gene de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) que codifica uma histidina quinase híbrida sensora (ORF XAC3673) que faz parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS) tornou a bactéria mutante (18D6) avirulenta, não causando mais sintomas de cancro quando inoculada no seu hospedeiro cítrico. O sistema TCSTS consiste de uma histidina quinase sensora (HK) e um regulador de resposta (RR) que pode agir como um fator de transcrição, sendo o mecanismo molecular dominante pelo qual os procariotos percebem e respondem aos estímulos ambientais. Assim, o sistema TCSTS desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica e no comportamento celular de bactérias. No presente trabalho o objetivo foi verificar se a interrupção desse gene afeta a expressão de outros genes. Para isso avaliou-se, por meio da técnica de microarranjo de DNA, a expressão diferencial global de genes do mutante (18D6) após 72 h de infecção *in planta* comparado com Xac selvagem. Os resultados obtidos mostraram que 230 genes foram diferencialmente expressos, sendo 111 mais expressos e 119 menos expressos em comparação com Xac selvagem, distribuídos em 49 categorias funcionais. Embora a grande maioria codifique proteínas hipotéticas, a mutação na ORF XAC3673 resultou também na redução da expressão do gene *xcsI* relacionado à virulência e pertencente ao sistema de secreção do tipo II (SST2). Genes relacionados ao TCSTS, transportadores ABC, genes relacionados a quimiotaxia e motilidade celular, elementos genéticos móveis, genes do sistema de secreção do tipo IV (SST4) e de vias de biossíntese de pequena moléculas também apareceram como diferencialmente expressos no mutante.

Palavras-chaves: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, microarranjo de DNA, genes diferencialmente expressos, patogenicidade, histidina quinase.

CAPÍTULO 3- *In vivo* global gene expression analysis of a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) mutant carrying a mutation in a two-component histidine kinase gene .

SUMMARY- Recently was demonstrated that mutation in a Xac gene (ORF XAC3673) that codes for a hybrid histidine quinase sensor of a two-component signal transduction system (TCSTS) led to virulence loss, with any canker symptoms elicited upon inoculation in citrus host. In the present work DNA microarray analysis was used to verify which other had their expression profile altered by the disruption of the hybrid histidine quinase sensor gene. A global gene expression analysis was performed in the mutant (18D6) 72 hours after plant infection in comparison with Xac wild type. The results showed that 230 genes were differentially expressed in the mutant, with 111 being more expressed and 119 being less expressed in relation to Xac wild type. These genes are distributed um 56 functional categories, and although the majority code for hypothetic proteins, the *xcsI* gene, a gene related to virulence and a member of the type II secretion system (T2SS) showed a marked reduction in its expression. Genes related to the TCSTS system, ABC transporters, chemotaxis and cell motility related genes, mobile elements, type IV secretion system (T4SS) genes and *genes* involved in biosynthesis of small molecules were also differentially expressed in the mutant.

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, DNA microarray, differentially expressed genes, pathogenicity

INTRODUÇÃO

A técnica de microarranjo de DNA tornou possível monitorar a expressão de milhares de genes simultaneamente, e a mesma já foi utilizada para analisar a expressão gênica em larga escala das seguintes bactérias fitopatogênicas: *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas campestris*, *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (ASTUA-MONGE *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006; SEO *et al.*, 2008).

SEO *et al.* (2008) utilizou a técnica de microarranjo de DNA para estudar dois patógenos importantes de arroz que causa doença de importância econômica mundial, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) que causa marchitamento em folhas de arroz e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) agente causal da estria bacteriana em folhas de arroz. O trabalho avaliou a expressão gênica de ambas multiplicadas em meio rico PBS comparado com meio mínimo XOM2 relatado como indutor de genes *hrp* em Xoo. Os resultados apresentados pelos autores mostraram que em Xoo 106 genes foram mais expressos e 141 foram menos expressos em meio indutor XOM2 comparado com meio rico PBS. Em relação à Xoc, somente 28 genes foram mais expressos e 11 menos expressos em meio indutor XOM2 comparado com meio rico PBS, respectivamente. Esses genes foram caracterizados em 17 categorias funcionais.

TSUKADA *et al.* (2009) analisaram a expressão de genes de *Azorhizobium caulinodans* por meio da técnica de microarranjo de DNA em células de vida livre e em bacterióides isolados de nódulos de caule de *Sesbania rostrata* crescidos em meio de cultura mínimo (MMO) ou rico (TY). Foi analisado também o efeito do flavonóide naringerina, um dos mais eficientes indutores dos genes *nod* de *A. caulinodans*, sobre células de vida livre desta bactéria endossimbionte. As diferenças mais marcantes foram observadas quando se comparou bacterióides e células de vida livre crescidos em meio rico (TY). Nesta condição, 32% dos genes se mostraram diferencialmente expressos, sendo que os níveis de expressão de

582 genes foram maiores em bacterióides do que em células de vida livre, e o nível de expressão de 919 genes foram menores em bacterióides do que em células de vida livre. Observou-se ainda que o ambiente nutricional também afetou drasticamente a expressão gênica em *A. caulinodans*, com 20% dos genes sendo diferencialmente expressos em células de vida livre que cresceram em meio mínimo (MMO) quando comparado com o crescimento em meio rico (TY); 466 genes foram altamente expressos, enquanto 477 genes foram expressos em menor extensão em meio pobre que em meio rico. A adição de naringerina influenciou a expressão de 32 genes; 18 genes foram altamente expressos e 14 genes foram expressos em menor quantidade em células suplementadas com naringerina.

Da biblioteca de mutantes de Xac linhagem 306 obtida por LAIA (2009), o mutante 18D6 (XAC3673) apresentou ausência total de sintoma de cancro cítrico quando inoculado em laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osborn) e em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). O gene mutado codifica uma histina quinase híbrida sensora (*hybrid histidine kinase sensor*) que faz parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS). O sistema TCSTS consiste de uma histidina quinase sensora (HK) e um regulador de resposta (RR) que pode agir como um fator de transcrição, sendo o mecanismo molecular dominante pelo qual os procariotos percebem e respondem aos estímulos ambientais (QIAN *et al.*, 2008). Assim, o sistema TCSTS desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica e no comportamento celular de bactérias. Como a histidina quinase é um sensor ligado a membrana, ela é muito utilizada por bactérias para monitorar mudanças ambientais, estando também presente em plantas, fungos e outros protistas. (ZHANG *et al.*, 2010). Em procariotos o TCSTS representa os mecanismos dominantes no sentido de regular respostas de uma grande número de vias fisiológicas (PARKINSON & KOFOID, 1992; STOCK *et al.*, 2000). Os genomas de *Xanthomonas* já seqüenciados contêm um amplo repertório de genes do TCSTS, entre 92 a 121, que codificam grupos estruturais diversos de HKs e RRs (QIAN *et al.*, 2008).

Os genes de um patógeno que se tem interesse do ponto de vista do entendimento da sua interação com o hospedeiro são aqueles que apresentam sua expressão alterada na presença do mesmo. São estes genes que determinam a especificidade da interação, o estabelecimento de uma interação compatível e a patogenicidade e a virulência. A técnica de microarranjo associada ao uso de mutantes pode revelar estes genes de interesse.

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica global, por meio da técnica de microarranjo de DNA, de um mutante avirulento (18D6) de Xac que possui uma mutação no regulador de resposta do sistema de dois componentes de uma histina quinase (ORF XAC3673), comparada com a Xac 306 selvagem após 72 horas de multiplicação *in planta*, afim de elucidar a diferenciação na expressão de genes relacionados à patogenicidade e virulência no patossistema Xac-citros.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens de Xac 306 (linhagem que teve o genoma sequenciado por DA SILVA *et al.*, 2002) e do mutante 18D6 foram mantidas no laboratório em meio TSA (10 g/L triptona, 10g/L de sacarose, 1 g/L de glutamato monossódio) líquido suplementado com canamicina (100 mg/mL) para o mutante e sem canamicina para Xac selvagem e acrescido de glicerol para concentração final de 25% e armazenadas em ultrafreezer à -80 °C. Para a multiplicação das bactérias a partir do estoque em glicerol utilizou-se o meio de cultura sólido TSA (10 g/L triptona, 10g/L de sacarose, 1 g/L de glutamato monossódio, e 15 g/L de Ágar) e incubação a 28 °C por 72 h.

Inoculação da bactéria em planta hospedeira

Após as 72 horas de cultivo em meio de cultura sólido TSA, as células foram coletadas e a concentração celular foi padronizada com água bi-destilada gelada, para $D.O_{600nm} = 0,3$, em tubos Falcon de 50 mL contendo água bidestilada gelada. Em seguida, essa suspensão de células foi infiltrada, com o auxílio de uma seringa, em todo o limbo de folhas jovens de laranjeira Pêra. Foram utilizadas um total de 8 plantas, sendo 4 para o mutante e 4 para a Xac selvagem..

As plantas inoculadas foram mantidas num laboratório de segurança concebido especialmente para a manipulação e inoculação de Xac em plantas de laranja Pêra, localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBM/UNESP/Jaboticabal), sob condições ótimas de temperatura, luminosidade e umidade. Este local possui um sistema de filtragem absoluta do ar (filtros EPA), além de possuir pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente.

Após 72 horas, as folhas inoculadas com as células bacterianas de Xac foram coletadas, cortadas em tiras bem finas com auxílio de uma lâmina de bisturi,

e colocadas por 20 minutos em 100 mL de água destilada estéril gelada (banho de gelo) para a exsudação das células bacterianas para o meio aquoso. A seguir, a solução foi filtrada em gaze estéril para eliminar os restos foliares e as bactérias foram coletadas por centrifugação ($3.370 \times g$, 4 °C, 15 min.) em tubos Falcon de 50 mL. Após centrifugação da suspensão bacteriana, as bactérias sedimentadas foram utilizadas para as extrações de RNA total.

Extração de RNA total de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

As extrações de RNA foram realizadas com o auxílio do conjunto de reagentes *Illustra RNAspin Mini Isolation Kit*, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (GE). As amostras obtidas foram quantificadas em um aparelho *NANODROP ND-100 Spectrophotometer* e submetidas à eletroforese em gel de agarose TAE 1% para análise da qualidade. As amostras de RNA apresentando relação A_{260}/A_{280nm} entre 1,8 e 2,0 e sem degradação visível no gel de agarose foram armazenadas a -80 °C até o momento da síntese e marcação do cDNA.

Síntese de cDNA marcado com fluoróforos Cy3 e Cy5

Para produzir os respectivos cDNAs, foi utilizado o conjunto de reagentes *SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen) a partir das amostras de RNA do isolado selvagem e do mutante 18D6 (XAC3673) obtidos previamente, bem como para marcar estes cDNA com os fluoróforos Cy3™ e Cy5™ (Amersham Biosciences). O cDNA obtido a partir de RNA de células do mutante 18D6 foi marcado com o fluoróforo Cy3™, em todos os experimentos, e o obtido a partir de RNA de células da Xac selvagem foi marcado com o Cy5™. Seguiram-se, rigorosamente, as recomendações contidas no protocolo que acompanha o produto fornecido pela Invitrogen. A purificação dos respectivos cDNAs não marcados e marcados foi realizada utilizando o kit *Pure Link PCR Purification kit* da Invitrogen, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Hibridização dos microarranjos com os cDNAs marcados

As amostras de cDNA do mutante 18D6 com Cy3™ e a amostra de cDNA de Xac 306 marcada com Cy5™ foram secas a vácuo sob proteção da luz. A amostra referente ao cDNA marcado com Cy3™ foi ressuspensa em 13,5 µL de água livre de nucleases e em seguida transferida para o tubo contendo o cDNA marcado com Cy5™, misturando as amostras em uma única solução. Em seguida, adicionou-se 13,5 µL de tampão de hibridização 4X (Amersham Biosciences) e 27 µL de formamida (Amresco) e a solução foi homogeneizada. A mistura com as amostras foi mantida a 90 °C no escuro por 2 min. e transferida para banho de gelo por igual período até deposição na lâmina.

A lâmina contendo o arranjo de DNA de Xac apresenta um total de 2.673 ORFs distribuídas em 24 subarranjos (12 de cada lado), cada um contendo 32 colunas e 9 linhas (288 pontos) em um arranjo 32 x 9 x 12 x 2, totalizando 6.912 pontos na lâmina, incluindo duplicatas. Estas foram secas com auxílio de um jato de gás nitrogênio comprimido. Do mesmo modo, a lamínula a ser utilizada foi limpa com papel Kin Wipes™. A solução contendo os cDNAs marcado com Cy3™ e Cy5™ misturados foi depositada sobre a lâmina de microarranjos de DNA e coberta com a lamínula. A lâmina foi colocada em um suporte fechado para lâminas de microarranjo, o qual foi imerso em um banho a 42 °C, por um período de 16 horas, protegido da luz. Foram feitas 4 lâminas contendo as amostras de Xac 306 e do mutante 18D6.

Previamente ao processamento digital dos sinais dos microarranjos de DNA hibridizados com os cDNAs, a lâmina foi submetida a cinco etapas de lavagem, manualmente e em cubas de vidro, a fim de eliminar sinais inespecíficos (background). Na primeira lavagem, a lâmina foi imersa cuidadosamente em uma solução contendo SSC 1x e SDS 0,2% por 5 min. a temperatura ambiente, sob leve agitação. A seguir, procederam-se duas lavagens em solução contendo SSC 0,1x e SDS 0,2% por 5 min. cada uma e uma lavagem em solução contendo SSC 0,1x a 55 °C, por 2,5 min. Finalizando, a lâmina foi imersa em água destilada à

temperatura ambiente por 60 seg e imediatamente submetida a um jato de gás nitrogênio comprimido a fim de secá-la o mais rápido possível.

Análise das imagens e estatística dos dados

As imagens produzidas pela hibridização dos alvos (marcados com Cy3TM ou Cy5TM) com as sondas do microarranjo de DNA foram digitalizadas em um equipamento modelo GenePixTM 4000B (Axon Instruments, Inc). Em seguida elas foram analisadas, aos pares, Cy3TM e Cy5TM, pelo programa Spotfinder (<http://www.tm4.org/spotfinder.html>). Este programa tem por finalidade transformar a intensidade do sinal dos “spots” (os pixels) em valores numéricos. Do mesmo modo, esse programa também contabiliza o valor da emissão de fundo, “background”.

Os dados numéricos gerados foram processados e analisados no programa estatístico R (R Development Core Team) por meio dos procedimentos estabelecidos no pacote limma (SMYTH, 2005). Considerou-se um gene como sendo diferencialmente expresso quando o valor de significância foi menor ou igual a 1% ($p\text{-value} \leq 0,01$).

RESULTADOS

A análise dos resultados mostrou que 323 genes foram diferencialmente expressos no mutante 18D6 em relação à Xac selvagem, sendo 111 genes mais expressos e 119 menos expressos. Os genes cuja expressão foi menor ou maior que o observado no genótipo selvagem foram categorizados funcionalmente segundo as categorias utilizadas para a anotação do genoma da Xac, que consta de 9 grandes categorias contendo subcategorias, dando um total de 104 categorias (SILVA *et al.*, 2002; Tabela suplementar I), com os genes diferencialmente expressos se distribuindo em 49 delas. A quantidade de genes diferencialmente expressos dentro de cada uma das 9 grandes categorias está apresentada na Tabela 1 e a relação dos genes dentro de cada uma das 49 categorias está apresentada na Tabela 2. Dentre as categorias funcionais que apresentaram genes diferencialmente expressos encontram-se: genes envolvidos no metabolismo intermediário, metabolismo energético de carbono, funções regulatórias, biossíntese de pequenas moléculas, metabolismo de macromoléculas, estrutura celulares, proteínas hipotéticas e ORFs que codificam genes sem categoria definida (Tabela 1).

A categoria VIII (Proteínas hipotéticas), com um total de 90 genes, foi a que apresentou o maior número de genes diferencialmente expressos (39,1% do total) (Tabela 1 e Figura 1). Dentro da categoria VIII, a subcategoria VIII.A, que representa as proteínas cuja função ainda não é conhecida mas que estão presentes em vários organismos (Proteínas hipotéticas conservadas), é a que apresenta o maior número de genes diferencialmente expressos (50 genes – 55,6%) (Figura 1). Um fato que chama a atenção é que 24 genes encontrados até o momento apenas em *Xanthomonas* (Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas* – subcategoria VIII.C) se mostraram diferencialmente expressos, com 5 deles sendo menos expressos e 19 sendo mais expressos (Figura1).

A categoria I (Metabolismo intermediário), com 34 genes diferencialmente expressos (14,8% do total), foi a segunda categoria em número de genes

diferencialmente expressos, com 15 sendo menos expressos e 19 sendo mais expressos (Tabela 1 e Figura 2).

A terceira categoria em número de genes diferencialmente expressos foi a categoria III (Metabolismo de macromoléculas), com um total de 25 genes (10,9 % do total), dos quais 10 foram menos expressos e 15 foram mais expressos (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos no mutante 18D6 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranjeira Pêra e sua distribuição pelas grandes categorias funcionais

Categorias	Nº. de genes menos expresso	Nº. de genes mais expresso	Nº. total de genes diferencialmente expressos	% do Total
I Metabolismo Intermediário	15	19	34	14,8
II Biossíntese de pequenas moléculas	11	0	11	4,8
III Metabolismo de macromoléculas	10	15	25	10,9
IV Estrutura celular	4	6	10	4,3
V Processos celulares	4	6	10	4,3
VI Elementos genéticos móveis	20	2	22	9,6
VII Patogenicidade, virulência e adaptação	9	15	24	10,4
VIII Hipotéticas	35	55	90	39,1
IX Sem categoria definida	3	1	4	1,7
Total	111	119	230	100,0

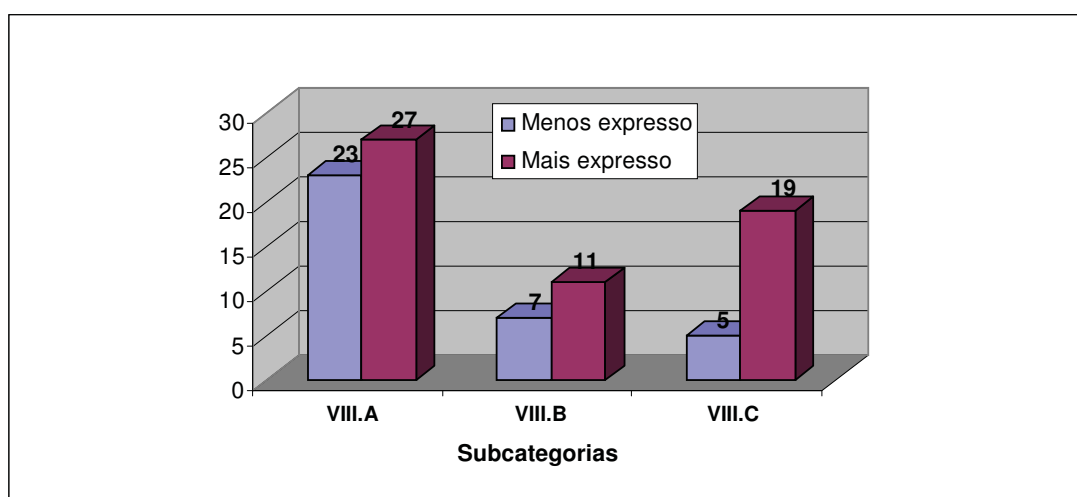


Figura 1. Genes diferencialmente expressos da categoria VIII (Proteínas hipotéticas) distribuídos na subcategorias (VIII.A: Proteínas hipotéticas, VIII.B: Proteínas hipotéticas (inclui “no hits” e “hits” com baixo escore) e VIII.C: Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas).

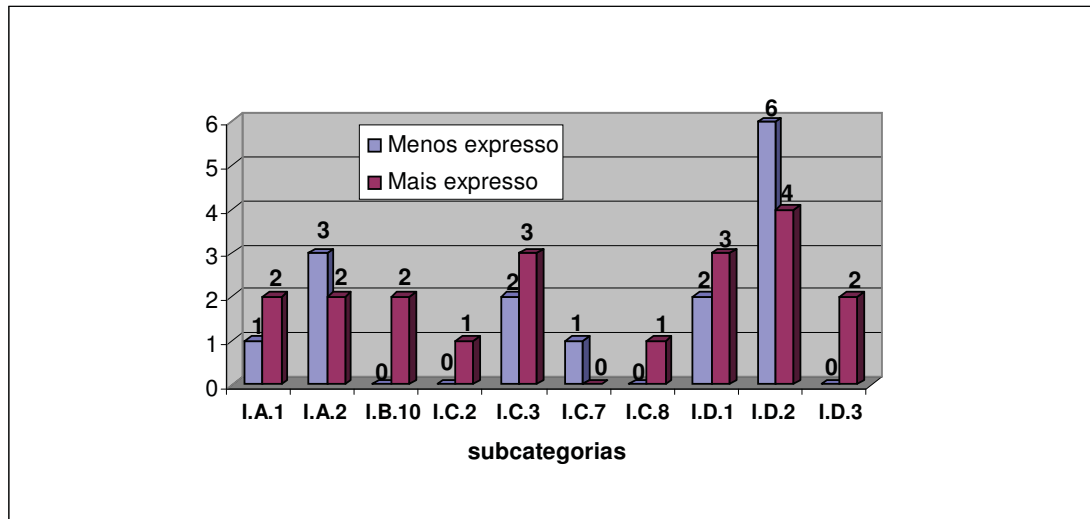


Figura 2. Genes diferencialmente expressos da categoria I (Metabolismo intermediário) distribuídos nas subcategorias (I.A I: Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos, I.A.2: Degradação de moléculas pequenas, IB.10: Pool, multipurpose conversions, I.C.2: Respiração anaeróbica e fermentação, I.C.3: Transporte de elétrons, I.C.7: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos, I.C.8: Interconversão da força motriz ATP-próton, I.D.1: Sistemas de dois componentes, I.D.2: Ativadores-Repressores I.D.3: Quinases-Fosfatases).

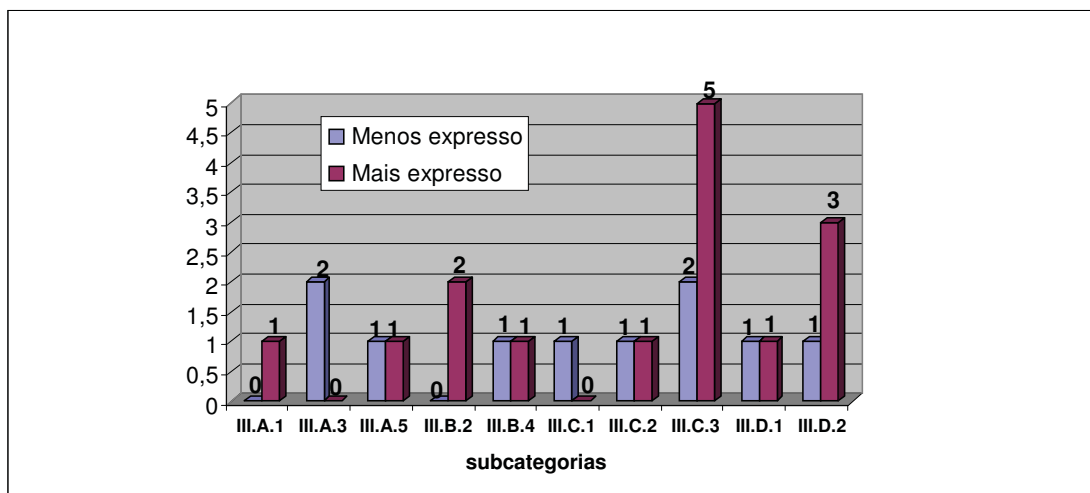


Figura 3. Genes diferencialmente expressos da categoria III (Metabolismo de macromoléculas) distribuídos nas subcategorias (III.A.1: Replicação, III.A.3: Recombinação, III.A.5: Restrição,

modificação, III.B.2: Proteínas Ribossomais, III.B.4.: Aminoacil tRNA sintetases, modificação de tRNA, III.C.1: Tradução e modificação, III.C.2: Chaperonas, III.C.3: Degradação de proteína, III.D.1: Polissacarídeos, III.D.2: Fosfolípidos).

A categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação), com 24 genes diferencialmente expressos (10,4% do total), foi a quarta categoria em número de genes diferencialmente expressos, com 9 sendo menos expressos e 15 sendo mais expressos (Tabela 1 e Figura 4).

A quinta categoria em número de genes diferencialmente expressos foi a categoria VI (Elementos genéticos móveis), com um total de 22 genes (9,6% do total), dos quais 20 foram menos expressos e 2 foram mais expressos (Tabela 1 e Figura 5). A subcategoria VI.C (Transposon e funções relacionadas a introns), com 18 genes menos expressos e com 1 mais expresso (Figura 5), representa 86,4% do total de genes da categoria VI e 8,3% do total de genes diferencialmente expressos.

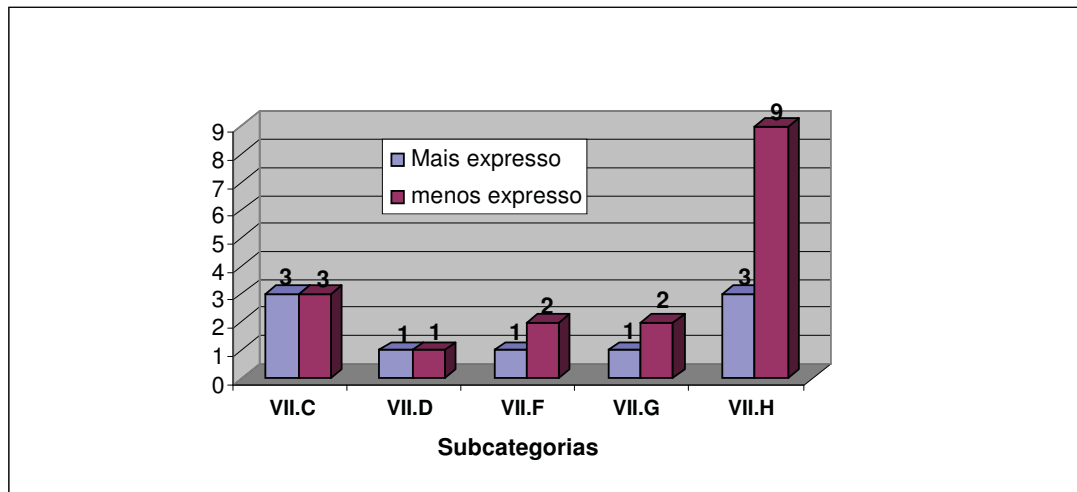


Figura 4. Genes diferencialmente expressos da categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação). distribuídos na subcategorias (VII.C: Produção de toxina e detoxificação, VII.D: Degradação da parede da célula hospedeira, VII.F: Proteínas de superfície VII.G: Adaptação, condições atípicas, VII.H.:Outras).

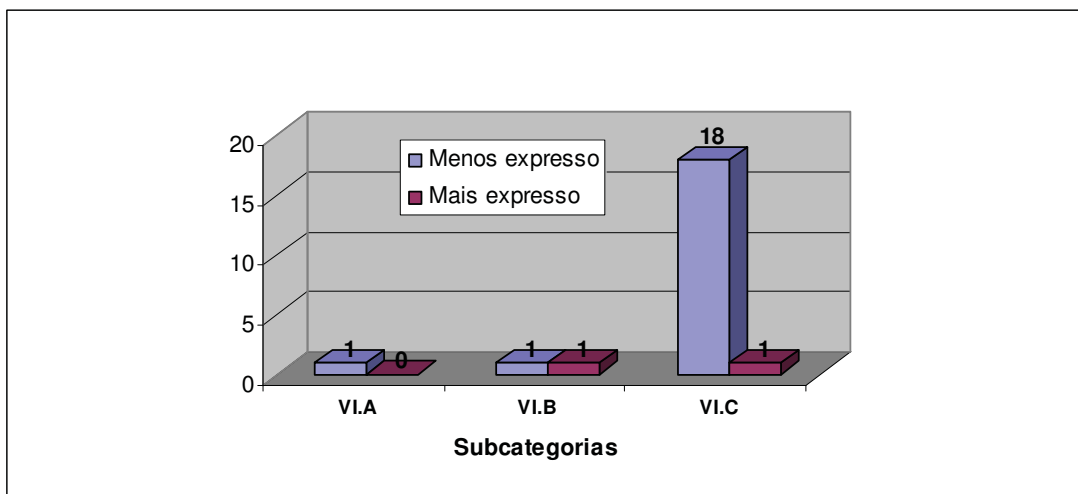


Figura 5. Genes diferencialmente expressos da categoria VI.(Elementos genéticos móveis) distribuídos na subcategorias (V.I.A: Funções relacionadas a fagos e profagos, V.I.B: Funções relacionadas a plasmídeos e V.I.C: Funções relacionadas a transposon e íntron).

A categoria II (Biossíntese de pequenas moléculas), com 11 genes, foi a sexta categoria em números de genes diferencialmente expressos, os quais representam 4,8% do total (Tabela 1 e Figura 7).

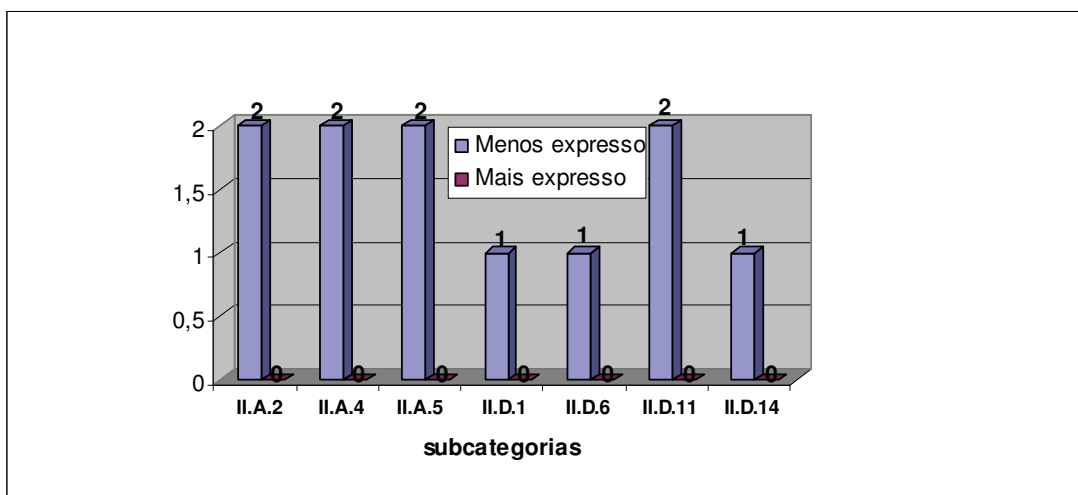


Figura 6. Genes diferencialmente expressos da categoria II (Biossíntese de pequenas moléculas). distribuídos na subcategorias (II.A.2: Família do aspartato, família do piruvato, II.A.4: Família dos aminoácidos aromáticos, II.A.5: Histidina, II.D.1: Biotina, II.D.6: Piridoxina, II.D.11: Menaquinona,

ubiquinona: II.D.14: Cobalamina).

As categorias IV (Estrutura Celular), V (Processos celulares) e IX (ORFs sem categoria definida), com 10, 10 e 4 genes diferencialmente expressos, respectivamente, ocupam a sétima, oitava e nona posição em termos de números de genes com expressão alterada (Tabela 1 e Figuras 7, 8 9).

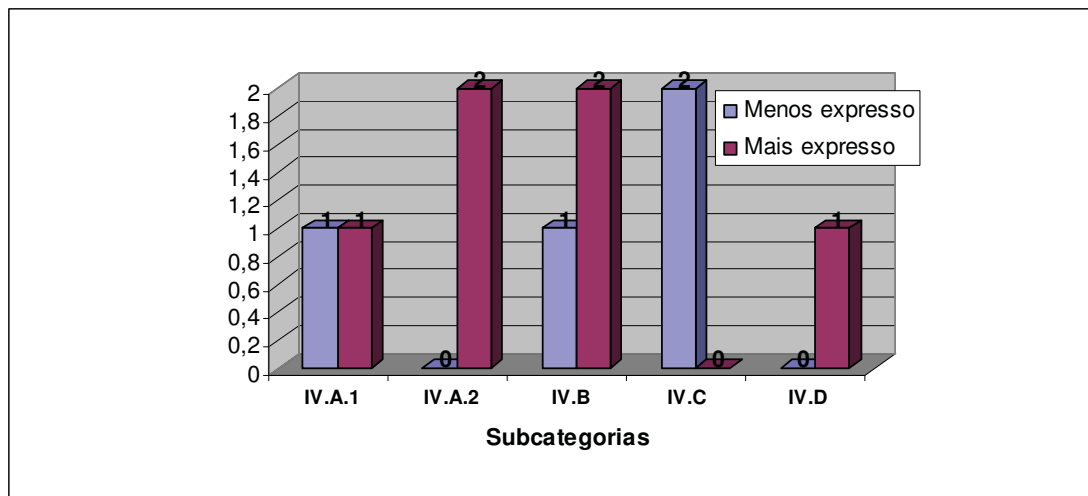


Figura 7. Genes diferencialmente expressos da categoria IV (Estrutura Celular) distribuídos nas subcategorias (IV.A.1 Membrana interna; IV.A.2: Constituintes da membrana externa, IV.B: Rede de mureína, peptidoglicano, IV.C: Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos, IV.D: Estruturas de superfície).

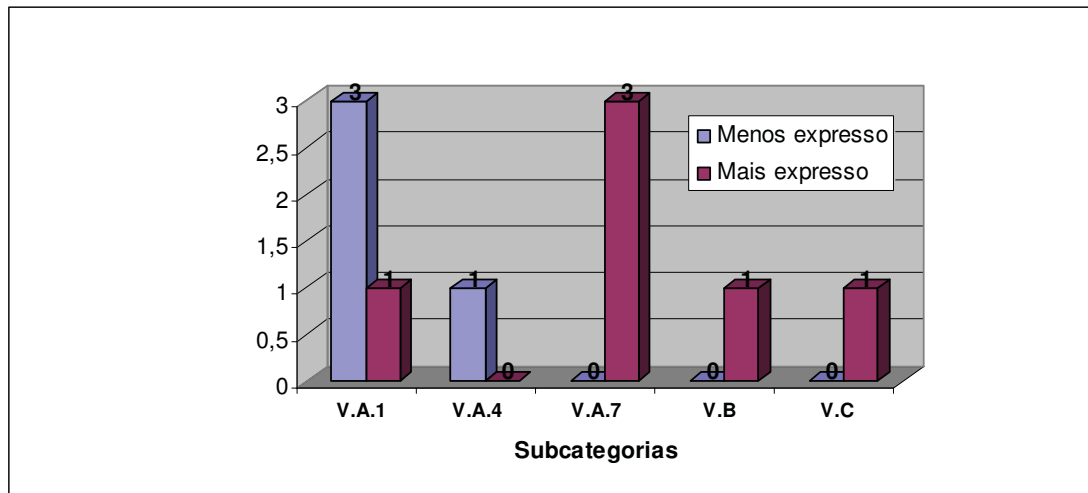


Figura 8. Genes diferencialmente expressos da categoria V (Processos celulares) distribuídos nas subcategorias (V.A.1: Aminoácidos, aminas , V.A.4: Cátions, V.A.7: Outros, V.B: Divisão celular, V.C.: Quimiotaxia e mobilidade).

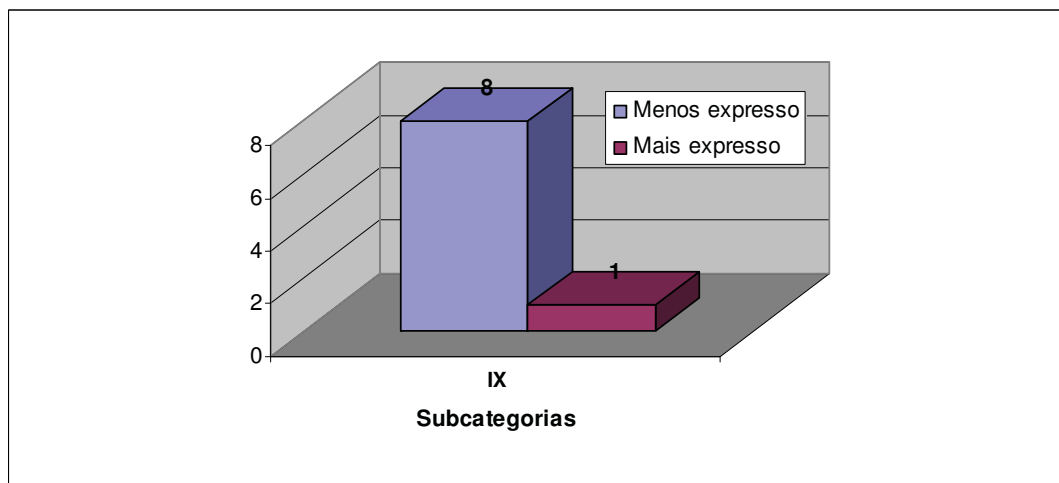


Figura 9. Genes diferencialmente expressos da categoria IX (ORFs sem categoria definida).

Tabela 2- Genes diferencialmente expressos no mutante 18D6 quando multiplicado por 72 horas em folhas de laranja Pera e sua distribuição pelas categorias funcionais.

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC3254	glycogen debranching enzyme	+	I.A.1	1,942377235	0,000185638
XAC0933	truncated xylanase	+	I.A.1	1,013923369	0,001710534
XAC3505	rhamnogalacturonase B	-	I.A.1	-0,936865191	0,010952911
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	-	I.A.2	-1,065806919	0,00036892
XAC1776	xylose isomerase	-	I.A.2	-0,69471962	0,003666851
XAC1138	methylcitrate synthase	+	I.A.2	0,914010697	0,0062769
XAC3890	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-	I.A.2	-1,151196017	0,000545816
XAC1636	formylglutamate amidohydrolase	+	I.A.2	0,566134088	0,004639023
XAC1287	aldose 1-epimerase	+	I.B.10	1,982914992	4,61151496573362e-05
XAC1580	carbonic anhydrase	+	I.B.10	0,489954976	0,014672113
XAC0652	alcohol dehydrogenase class III	+	I.C.2	1,105482932	0,00283322
XAC3960	oxidoreductase	+	I.C.3	1,079762336	0,000257276
XAC0831	oxidoreductase	+	I.C.3	0,903977586	0,00672155
XAC2133	oxidoreductase	-	I.C.3	-0,810020412	0,012701005
XAC2051	oxidoreductase	+	I.C.3	0,81616507	0,00973929
XAC1384	ferredoxin	-	I.C.3	-0,735918612	0,009741231
XAC2896	alcohol dehydrogenase	-	I.C.3	-0,547734882	0,011157482
XAC2076	succinate dehydrogenase, membrane anchor subunit	-	I.C.7	-0,648633811	0,014121191
XAC3649	F0F1 ATP synthase subunit beta	+	I.C.8	0,663041781	0,01323534
XAC3250	two-component system, regulatory protein	+	I.D.1	1,539784766	1,94829320223831e-05
XAC4022	two-component system, sensor protein	+	I.D.1	0,792454499	0,003283199
XAC2150	nodulation protein	-	I.D.1	-2,604248435	0,004139308
XAC3975	two-component system, sensor protein	+	I.D.1	0,753314431	0,008521288
XAC3238	two-component system, regulatory protein	+	I.D.1	0,659594085	0,010602696
XAC3363	Blal family transcriptional regulator	+	I.D.2	0,901513696	0,0005689
XAC1499	transcriptional regulator	-	I.D.2	-2,211330192	0,001769021
XAC0312	LysR family transcriptional regulator	-	I.D.2	-0,748243214	0,005749206
XAC0166	LacI family transcription regulator	+	I.D.2	2,02148591	0,008051774
XAC1925	transcriptional regulator	+	I.D.2	0,657864203	0,008496904

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC3137	transcriptional regulator	-	I.D.2	-0,606365885	0,010662347
XAC3476	transcriptional regulator	-	I.D.2	-0,796504002	0,011626841
XAC0316	LysR family transcriptional regulator	-	I.D.2	-1,513100673	0,012621081
XAC4064	transcriptional activator FtrA	-	I.D.2	-0,628062499	0,008717644
XAC3961	TetR family transcriptional regulator	+	I.D.2	0,548371853	0,012646705
XAC2555	histidine kinase	+	I.D.3	1,120279904	0,000318264
XAC2555	histidine kinase	+	I.D.3	1,153456134	0,000508513
XAC2723	aspartate semialdehyde dehydrogenase	-	II.A.2	-1,190034364	0,001407492
XAC1433	asparagine synthase B	-	II.A.2	-0,602423724	0,007749695
XAC4223	recombination associated protein	-	III.A.3	-0,66006193	0,011475409
XAC1525	prephenate dehydrogenase	-	II.A.4	-1,48362668	3,98985481190079e-05
XAC3010	shikimate kinase	-	II.A.4	-0,56200826	0,003950622
XAC1832	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	-	II.A.5	-1,668417365	2,89611216972584e-05
XAC1831	imidazole glycerol-phosphate dehydratase/histidinol phosphatase	-	II.A.5	-1,609795822	0,000614814
XAC0564	phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase	-	II.D.1	-1,523242027	0,002918197
XAC3009	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	-	II.D.6	-0,631596832	0,004194658
XAC3115	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC	-	II.D.11	-1,019839423	0,000215213
XAC3116	PqqC/D protein	-	II.D.11	-0,700369994	0,007012809
XAC2157	uroporphyrin-III C-methyltransferase	-	II.D.14	-1,776478801	0,002043288
XAC3914	bifunctional phosphopantothienoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase	+	III.A.1	1,118273822	0,010953604
XAC0636	site-specific tyrosine recombinase XerC	-	III.A.3	-0,630313225	0,01091526
XAC3769	endonuclease precursor	+	III.A.5	1,977863039	1,90104196836849e-05
XAC2084	DNA competence protein	-	III.A.5	-0,919528439	0,00311767
XAC0997	50S ribosomal protein L17	+	III.B.2	0,739228083	0,005668309
XAC0977	50S ribosomal protein L22	+	III.B.2	0,801264776	0,007951042
XAC2781	leucyl-tRNA synthetase	-	III.B.4	-0,786178642	0,001973961
XAC3875	ribonuclease BN	+	III.B.4	0,987961692	0,003595883
XAC1875	peptide chain release factor 2	-	III.C.1	-0,600260526	0,006013289
XAC1426	pili assembly chaperone	-	III.C.2	-1,215163733	0,000544924
XAC2528	heat shock protein 90	+	III.C.2	0,677944483	0,009555391
XAC3712	metallopeptidase	+	III.C.3	1,264887394	0,000130263
XAC2746	metallopeptidase	+	III.C.3	1,440037881	0,000855806
XAC2992	endoproteinase Arg-C	+	III.C.3	1,028986904	0,00111036

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC3547	serine protease	+	III.C.3	0,951624283	0,008231252
XAC2140	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	-	III.C.3	-1,4140266	0,008251001
XAC2001	ATP-dependent Clp protease subunit	+	III.C.3	0,498201116	0,011717305
XAC4362	dipeptidase	-	III.C.3	-0,923764573	0,013012458
XAC0425	glycogen synthase	+	III.D.1	0,795399339	0,006311127
XAC3909	dolichol-phosphate mannosyltransferase	-	III.D.1	-0,715201834	0,008210613
XAC1463	phospholipase A1	+	III.D.2	1,606833256	1,33712113313583e-05
XAC2046	CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase	-	III.D.2	-0,628491558	0,005990365
XAC2393	carboxylesterase	+	III.D.2	0,679300443	0,009701456
XAC0372	hydrolase	+	III.D.2	0,786629526	0,0103474
XAC4001	integral membrane protein	-	IV.A.1	-0,513181273	0,008767738
XAC2672	Oar protein	+	IV.A.2	1,415372239	0,001316184
XAC2772	outer membrane protein	+	IV.A.2	0,621470496	0,011324428
XAC2609	carboxypeptidase	+	IV.B	1,149708203	0,001070397
XAC2729	membrane-bound lytic murein transglycosylase D precursor	-	IV.B	-0,511867855	0,011207829
XAC3141	outer membrane protein P6 precursor	+	IV.B	0,655385637	0,01185046
XAC2125	glycosyl transferase related protein	-	IV.C	-0,920716161	0,010101749
XAC0520	acyltransferase	-	IV.C	-0,531106138	0,014410516
XAC3241	fimbriin	+	IV.D	0,812280287	0,010474276
XAC1841	cationic amino acid transporter	-	V.A.1	-0,849494797	0,000218681
XAC1842	cationic amino acid transporter	-	V.A.1	-0,772680878	0,001647549
XAC3373	proton glutamate symport protein	-	V.A.1	-0,70551546	0,005161647
XAC2985	amino acid transporter	+	V.A.1	0,717874843	0,014717895
XAC0206	ammonium transporter	-	V.A.4	-0,606281771	0,011694238
XAC1459	ABC transporter ATP-binding protein	+	V.A.7	1,04078931	0,00016064
XAC3198	alkanesulfonate transporter substrate-binding subunit	+	V.A.7	0,9276703	0,006838752
XAC2082	ABC transporter ATP-binding protein	+	V.A.7	0,793371072	0,004729497
XAC1666	chemotaxis protein	+	V.C	0,82813386	0,002833838
XAC2660	phage-related baseplate assembly protein	-	VI.A	-1,73895319	0,002293612
XAC2238	plasmid-related protein	+	VI.B	0,697450876	0,00925346
XACb0031	TrwC protein	-	VI.B	-0,831700644	0,014660083
XAC1103	ISx3 transposase	-	VI.C	-1,731265422	0,000378766
XAC0153	ISx3 transposase	-	VI.C	-1,695109875	0,000608906

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC2634	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,7260706	0,000650373
XAC1052	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,307414565	0,001022164
XAC0152	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,454985782	0,002238414
XAC1924	transposase	+	VI.C	1,070460532	0,002607135
XAC1660	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,059330131	0,003180134
XAC1102	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,10084957	0,003475237
XAC0343	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,363233561	0,003725623
XAC1071	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,993120818	0,005086138
XAC2174	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,045570602	0,007584917
XAC1916	ISxac1 transposase	-	VI.C	-1,253109617	0,008277028
XAC2889	ISxac2 transposase	-	VI.C	-0,854364233	0,009599115
XAC3247	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,31138486	0,011021279
XAC3764	ISxac2 transposase	-	VI.C	-1,122147583	0,012293017
XAC1504	ISxcd1 transposase	-	VI.C	-0,578277396	0,012785619
XAC3938	ISxac3 transposase	-	VI.C	-0,931547168	0,014464426
XAC0342	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,156811554	0,014170234
XAC0578	ISxac3 transposase	-	VI.C	-1,059802191	0,005239977
XAC3995	acriflavin resistance protein	-	VII.C	-1,236269604	0,003674371
XAC1445	multidrug resistance efflux pump	+	VII.C	0,878891347	0,004421781
XAC4160	cation efflux system protein	-	VII.C	-0,647420419	0,008079585
XAC1482	RND multidrug efflux membrane fusion protein	-	VII.C	-1,377882627	0,008524759
XAC4008	entericidin A	+	VII.C	0,983874792	0,00033438
XAC0866	organic solvent tolerance protein	+	VII.C	0,701633951	0,005650206
XAC0168	5-keto-4-deoxyuronate isomerase	+	VII.D	0,852763609	0,000889252
XAC3507	truncated cellulase S	-	VII.D	-0,864623441	0,009680481
XAC4274	OmpA-related protein	+	VII.F	1,684159905	0,000588479
XAC1427	protein U	-	VII.F	-1,282581853	0,003391739
XAC4273	OmpA-related protein	+	VII.F	0,92950189	0,004136792
XAC3211	trehalose-6-phosphate synthase	+	VII.G	0,746097006	0,002463288
XAC2881	carbon starvation protein A	-	VII.G	-0,831214239	0,009022713
XAC1357	heat shock protein	+	VII.G	0,633122287	0,013896167
XAC2616	VirB2 protein	+	VII.H	1,662096668	5,37639761150315e-05
XAC2614	VirB4 protein	+	VII.H	1,649095734	0,000121087

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC0700	type II secretion system protein I	-	VII.H	-0,951699075	0,00111187
XAC2614	VirB4 protein	+	VII.H	1,111545169	0,001117162
XAC1882	aconitate hydratase	+	VII.H	0,917709731	0,002377589
XAC1495	virulence regulator	-	VII.H	-2,675412414	0,003132637
XAC2620	VirB9 protein	+	VII.H	0,748815196	0,004380137
XAC2612	VirB6 protein	+	VII.H	0,676243561	0,005696591
XAC2614	VirB4 protein	+	VII.H	0,887964943	0,007473372
XAC2618	VirB11 protein	+	VII.H	0,668001606	0,00956592
XACb0045	VirB4 protein	-	VII.H	-0,614828853	0,012174282
XAC2617	VirB1 protein	+	VII.H	1,253221193	9,12175856915847e-05
XAC3525	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,031640639	0,000154531
XAC1030	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,370922635	0,000207409
XAC3802	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,852475255	0,000234889
XAC3982	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,35346148	0,000555844
XAC1351	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,828932741	0,001027284
XAC1644	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,408898293	0,001344742
XAC2319	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,130236391	0,001580689
XAC2126	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,091847662	0,001865611
XAC1353	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,024818612	0,001901823
XAC0586	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,238095649	0,001919789
XAC3566	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,806213663	0,002173939
XAC0587	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,158991772	0,002338587
XAC0193	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,653143328	0,002388105
XAC0876	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,88431257	0,002566738
XAC3696	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,022247317	0,00296864
XAC1306	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,592307071	0,003386452
XAC3965	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,089866724	0,006674289
XAC3460	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,376381477	0,006714699
XAC2155	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-2,741259677	0,006865212
XAC4181	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,951429376	0,008686313
XAC2227	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,296878812	0,009521846
XAC0270	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,733990863	0,009536747
XAC2554	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,837261109	0,009756

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XACb0033	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,888109001	0,010782337
XAC0423	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,947552655	0,010885159
XAC2190	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,793914696	0,011255096
XAC4077	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,616190286	0,011705324
XAC2795	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,739456721	0,013021389
XAC3106	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,923810157	0,013629048
XAC4095	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,976860019	0,013796046
XAC3948	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,598053447	0,014165968
XAC1179	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,70416897	0,014242651
XAC4324	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,813981714	0,014269329
XAC2217	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,47090712	0,014461954
XAC1706	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,701272375	0,014505528
XAC2439	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,512603232	0,014911281
XAC1492	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-2,341044449	7,43150962307074e-05
XAC1008	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,507804602	8,28266670062992e-05
XAC2052	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,045164317	0,000246352
XAC2857	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,928071843	0,000279098
XAC3618	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,047949547	0,000531315
XAC1394	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,016867508	0,001256689
XAC2019	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,646808074	0,002122181
XAC4358	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,774333283	0,002669666
XAC2152	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-1,286751525	0,002755914
XAC0292	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,801897469	0,004109367
XAC1588	Conserved hypothetical protein	-	VIII.A	-0,755059098	0,004430896
XAC3959	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	1,168288681	0,004667018
XAC2792	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,76624714	0,005757839
XAC2969	Conserved hypothetical protein	+	VIII.A	0,591611479	0,006615423
XAC1385	hypothetical protein	+	VIII.B	0,683986522	0,013117187
XAC4076	hypothetical protein	+	VIII.B	1,441032438	0,000898035
XAC2613	hypothetical protein	+	VIII.B	1,285946	7,83307021783638e-05
XAC2610	hypothetical protein	+	VIII.B	1,527316074	0,000117289
XAC0099	hypothetical protein	+	VIII.B	1,309234941	0,000497246
XAC3278	hypothetical protein	-	VIII.B	-1,093607295	0,000683954

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC2127	hypothetical protein	+	VIII.B	1,181212483	0,000892404
XAC3255	hypothetical protein	+	VIII.B	1,075839541	0,001332305
XAC3380	hypothetical protein	+	VIII.B	1,207514366	0,001358601
XAC3658	hypothetical protein	+	VIII.B	1,177836221	0,001790799
XAC2143	hypothetical protein	-	VIII.B	-2,150520241	0,003372805
XAC1817	hypothetical protein	-	VIII.B	-1,400769478	0,004020144
XAC2610	hypothetical protein	+	VIII.B	1,518848239	0,004518608
XAC0796	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,659933245	0,004780807
XAC4206	hypothetical protein	-	VIII.B	-1,231190182	0,005565502
XAC0149	hypothetical protein	+	VIII.B	0,797611102	0,007693854
XAC2262	hypothetical protein	+	VIII.B	0,743994414	0,01104239
XAC2254	hypothetical protein	+	VIII.B	1,217804929	0,000155252
XACb0021	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,682189778	0,005511291
XACb0029	hypothetical protein	-	VIII.B	-0,550702462	0,008518807
XAC2611	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,275501841	4,52886933774173e-05
XAC2611	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,302321528	0,00015189
XAC1616	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,270665084	0,00022494
XAC3322	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,995350265	0,001066146
XAC4330	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,831345462	0,001084609
XAC1364	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,888423368	0,001929599
XAC1779	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,962506998	0,00216937
XAC3966	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,191233287	0,00253976
XAC2622	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,040598304	0,002768835
XAC2367	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,927620631	0,004232305
XAC3734	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,081464088	0,005201744
XAC1206	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-1,077431349	0,009622238
XAC1470	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,650190074	0,010858216
XAC3501	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,524954245	0,010877318
XAC1381	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,865318267	0,011596809
XAC0275	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,853631012	0,014219295
XAC1119	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	2,853690998	5,41392155699016e-08
XAC2606	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,283382047	0,000609709
XAC3844	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,840043971	0,001394698

ORF	Nome*	P72H	Categoria	logFC	P.Value
XAC1354	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,020234888	0,002301464
XAC3657	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	1,229393835	0,002814807
XAC1857	Xanthomonas conserved hypothetical	-	VIII.C	-0,75075608	0,005294202
XAC2445	Xanthomonas conserved hypothetical	+	VIII.C	0,759044499	0,006961125
XAC3446	hypothetical protein	-	VIII.C	-0,538447024	0,013503401
XAC0674	pre-B putative nicotinate phosphoribosyltransferase	-	IX	-0,853616033	0,004942555
XAC3245	RhsD protein	+	IX	0,788910147	0,001586216
XAC3424	TdcF protein	-	IX	-0,786300404	0,00297543

* Para cada gene encontrado como diferencialmente expresso foi feita uma busca no NCBI (fevereiro de 2010) para verificar a anotação atual do gene, ou seja, o produto que ele codifica.

**(+) genes que foram mais expressos; (-) genes que foram menos expressos.

DISCUSSÃO

A mutação no gene (XAC3673) que codifica uma histina quinase híbrida sensora (*hybrid histidine kinase sensor*) que faz parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS) revelou resultados interessantes referente aos genes diferencialmente expressos quando o mutante (18D6) foi multiplicado *in planta* por 72 h em comparação com a expressão gênica apresentada pela Xac selvagem nas mesmas condições. LAIA *et al.* (2009) observou que, apesar de ocorrer uma alta concentração celular deste mutante quando multiplicado *in planta*, não houve desenvolvimento de nenhum sintoma de cancro, o que demonstra que a mutação não afetou a capacidade do mutante de se multiplicar no hospedeiro mas afetou a sua virulência e patogenicidade.

O protótipo do sistema TCSTS, que pode ser exemplificado pelo sistema osmorregulatório de *E. coli* codificado pelos genes *EnvZ* e *OmpR* (Figura 10), é constituído por uma histidina quinase sensora ligada à membrana (HK) e por um regulador de resposta citoplasmático (RR). Ao detectar um estímulo específico, HK sofre autofosforilação em um resíduo de histina presente em um domínio transmissor e então transfere o grupo fosforil para um resíduo de ácido aspártico conservado no domínio N-terminal do receptor cognato RR. O componente RR ativado leva a mudanças adaptativas por modular a expressão de genes pertencentes a diversas vias metabólicas.

Uma subfamília atípica do componente HK do TCSTS tem sido identificada (QIAN *et al.*, 2008). Os membros HK desta subfamília possuem um domínio fosforilável adicional e são chamados de histina quinase sensora híbrida (*hybrid histidine kinase sensor*) (HyHK).

A proteína codificada pela ORF XAC3673 é uma histidina quinase sensora híbrida que possui três domínios: um domínio HisKA, um domínio HATPase e um domínio regulador sensor (REC) receptor de fosfato (Figura 11). A análise de localização desta proteína na célula utilizando a ferramenta Psort (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) prediz que a mesma se localiza na membrana interna da

bactéria gram-negativa.

Já é conhecido que em proteínas do TCSTS contendo os domínios HisKa, HATPase e REC a presença do estímulo ativa a autofosforilação da histidina conservada presente no domínio HisKA (catalizada pelo domínio HATPase ligante de ATP). No passo seguinte o domínio HisKA doa o grupo fosfato para o domínio regulador sensor (REC) receptor de fosfato presente no C-terminal, que é semelhante ao domínio encontrado nos reguladores de resposta RR citoplasmáticos. Na sequência, grupo fosfato do domínio REC é transferido para um regulador de resposta citoplasmático, o qual pode ativar cascata(s) de fosforilação que levam à modulação de vias ou processos metabólicos através da ativação/desativação de proteínas já existentes ou, através da interação com o DNA, regular a atividade gênica de uma maneira coordenada. Em muitos casos, a sinalização direta de um único TCSTS resulta em uma mudança coordenada na expressão de vários genes (WEST & STOCK, 2001).

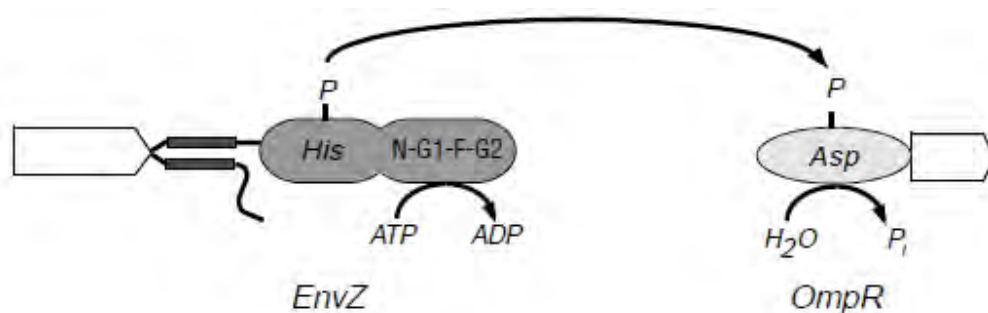


Figura 10- Sistema osmorregulatório de *E. coli*. Neste sistema ocorre um único evento de transferência de grupo fosforil entre a proteína histidina quinase (HK) EnvZ e a sua proteína reguladora de resposta (RR) OmpR.



Figura 11- Representação esquemática dos domínios presentes na proteína codificada pela ORF

XAC3673 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). A proteína contém 579 resíduos de aminoácidos e três domínios: domínio fosforeceptor histidina quinase A (HisKA) próximo ao N-terminal; domínio ATPase histidina quinase (HATPase) e domínio regulador sensor (REC) receptor de fosfato presente no C-terminal. O local de inserção do Transposon no mutante 18D6 ocorreu no domínio REC logo após o resíduo 533 (indicado pela ponta de seta).

Sistemas de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS)

Dentre os genes diferencialmente expressos pelo mutante 18D6, o gene *fixL* (XAC2555), que codifica uma histidina quinase, foi mais expresso quando comparado com Xac 306 (Tabela 2). A proteína codificada por este gene possui 540 resíduos de aminoácidos e apresenta três domínios quando analisada no banco de dados Pfam de famílias protéicas (<http://pfam.sanger.ac.uk/>): um domínio PAS no N-terminal, um domínio HATPase e um domínio REC no C-terminal. Portanto, à semelhança do gene mutado, deve fazer parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes. Ambas possuem os domínios HATPase e REC, mas a proteína FixL tem um domínio PAS ao invés do domínio HisKA. O domínio PAS é um sensor importante que modula a resposta da célula à tensão de O₂, potencial redox e intensidade de luz.

As ORFs XAC3250 e XAC3238, que codificam proteínas reguladoras do TCSTS, e as ORFs XAC4022 e XAC3975, que codificam proteínas sensoras do TCSTS, foram mais expressas no mutante quando comparado com Xac selvagem (Tabela 2). Embora o papel do TCSTS na patogenicidade de bactérias seja pouco compreendido, a redução de virulência foi descrita em mutantes de genes TCSTS sem que tenha havido um completo entendimento dos mecanismos fundamentais para essa redução da virulência (BEIER & GROSS, 2006), uma vez que a atenuação de virulência no fenótipo mutante de genes TCSTS é frequentemente causado por interferência nos requisitos de metabolismo celular em vez de alterações na expressão de fatores de virulência específicos. Nos estudos de interação bactéria-hospedeiro, o metabolismo tem sido desconsiderado, embora seja a chave para uma maior compreensão dos princípios subjacentes a uma

infecção bem sucedida no hospedeiro pelos microrganismos patogênicos (BEIER & GROSS, 2006). No entanto, em *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* os sistemas de regulação e propriedades de virulência são bem caracterizados e envolvem uma interação sofisticada de vários TCSTSs e outros reguladores para controlar a expressão de virulência em diferentes fases durante a infecção. A ausência de virulência do mutante 18D6 está relacionada à mutação de uma proteína sensora de um TCSTS. Neste mutante, o que se observou foi uma alteração pronunciada na expressão em genes relacionados com o metabolismo celular e não de fatores de virulência e patogenicidade. Nenhum gene associado à virulência, como RpfC e RpfG, apareceu como diferencialmente expressos neste mutante.

Transportadores ABC

Na categoria dos genes transportadores (subcategoria V.A.7), dois transportadores ABC foram mais expressos no mutante 18D6 e um foi menos expresso (Tabela 2). Sabe-se que todos os genes transportadores são energeticamente dependentes de proteínas de membrana para uma variedade de translocação de substrato através da membrana celular, como biotina, sulfato, maltose, ribose, fosfato, entre outros, (MISHIMA *et al.*, 2001). Os transportadores ABC são considerados importantes para multiplicação de células bacterianas *in planta* (LLAMA-PALACIOS *et al.*, 2002) e podem estar envolvidos no transporte de açúcares e aminoácidos da planta para o interior da bactéria. Os transportadores ABC são indispensáveis no suprimento de nutrientes para as células bacterianas e também para a proteção contra compostos nocivos (HASHIMOTO *et al.*, 2001).

Os transportadores ABC em bactérias apresentam a capacidade de importação de muitos compostos, mas eles são amplamente controlados por compostos de pequeno peso molecular, como por exemplo, histidina, maltose, ribose, fosfato, sulfato, níquel, molibdênio, oligopeptídeos, ácidos graxos, e assim por diante, tanto que nenhum transportador ABC de importação de compostos de

alto peso molecular foi relatado na literatura (HASHIMOTO *et al.*, 2001). Eles são implicados também em uma variedade de doenças hereditária humana, como a fibrose cística, na resistência multidroga de células cancerígenas e de uma ampla extensão de microorganismos (HASHIMOTO *et al.*, 2001). Uma característica importante dos transportadores ABC é a capacidade de transportar uma grande quantidade de compostos para fora (secreção ou exportação) ou para dentro (importação) da célula, utilizando energia proveniente da hidrólise de ATP. O sistema de importação utilizando transportadores ABC é típico de muitas células procarióticas e é utilizado para a captação de pequenas moléculas (HASHIMOTO, *et al.*, 2001).

Dos mais de 50 transportadores ABC conhecidos, a maioria são encontradas em procariotos. Típicamente esses transportadores utilizam da energia de hidrólise do ATP para lançar substratos através da membrana contra o gradiente de concentração e cada transportador ABC é específico para um dado substrato (Figura 12).

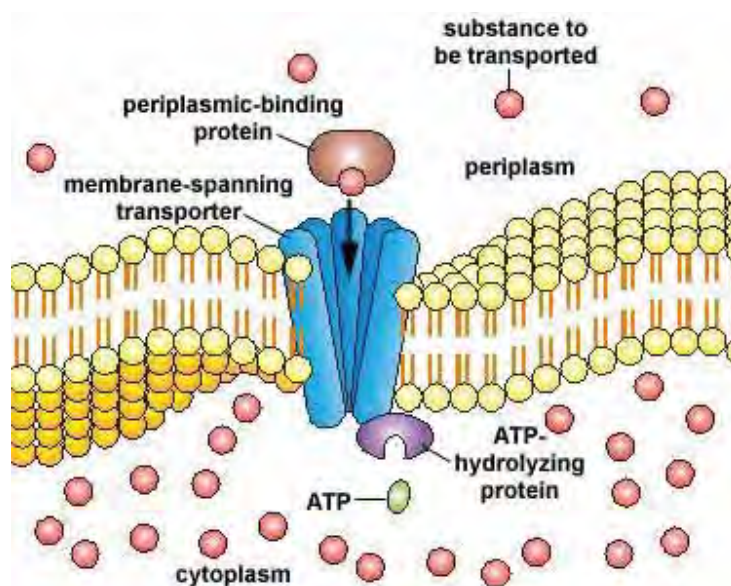


Figura 12. Representação esquemática de uma proteína transportadora ABC na sua forma ativada pela hidrólise de uma molécula de ATP. Uma proteína específica periplasmática carrega a substância a ser transportada pelo transportador de membrana.

Fonte: <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/u1fig7a.html>

Quimiotaxia e motilidade celular

Na categoria relacionada à motilidade celular (subcategoria V.C), a ORF XAC1666 foi mais expressa no mutante quando comparado com a *Xac* selvagem. Essa ORF codifica uma proteína relacionado à quimiotaxia. Das proteínas envolvidas na quimiotaxia, a maioria são receptores transmembrânico que utilizam desmetilação/desaminação reversível e são denominadas de proteínas quimiostáticas aceptoras de metil (MCPs). Estes receptores percebem o sinal extracelular e o endereça para um sistema de transdução de sinais onde a proteína CheA, a qual é uma proteína histidina quinase (HPK), catalisa a transferência de grupos fosfatos do ATP para o grupamento imidazol de uma histidina presente na sua cadeia polipeptídica (STOCK *et al.*, 2000). O grupo fosforilado de CheA é transferido posteriormente para uma cadeia lateral aspartil da proteína CheY formando CheYP que rapidamente se dissocia de CheA e se difunde livremente ligando-se ao complexo flagelar para controlar a direção rotacional dos flagelos no sentido anti-horário. Quando não ocorre a fosforilação de CheY, esta não é capaz de se ligar ao complexo flagelar (ALON *et al.*, 1998; SOURJIK *et al.*, 2002). O sistema para quando a sensibilidade da MCP na recepção do sinal é alterada por modificações da MCP pela ação de CheC e CheD (CHAO *et al.*, 2006). Assim, o sistema sensor de quimiotaxia transfere para os flagelos os estímulos necessários para que estes possam fazer com que a célula se mova na direção correta (Figura 13).

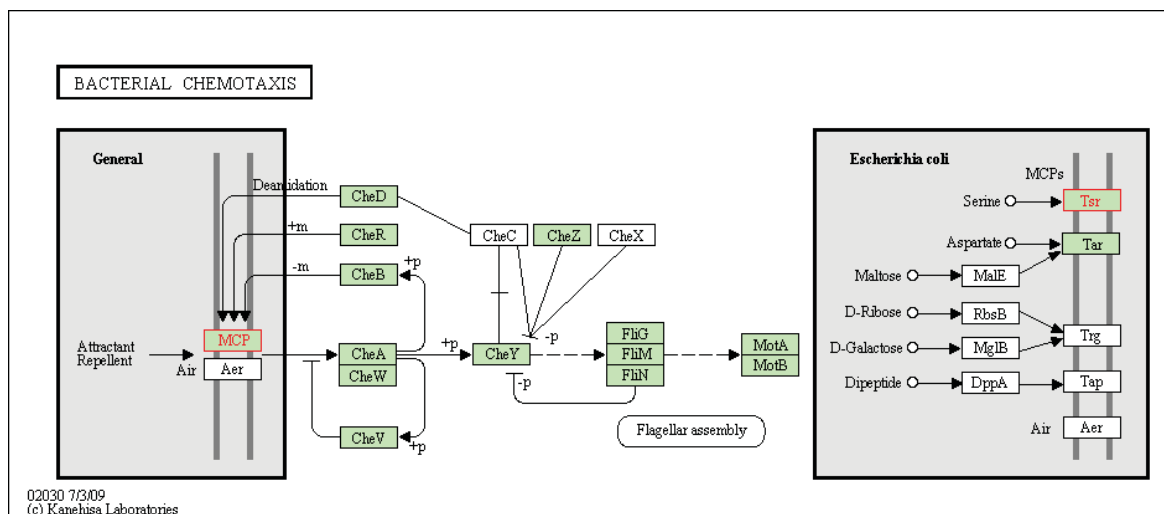


Figura 13. Representação do esquema de quimiotaxia em bactérias, na qual os receptores de sinal extracelular endereçam para o sistema de tradução de sinais, onde a proteína CheA recebe o sinal da MCP fosforilando CheY, que se liga ao corpo basal (complexo de proteínas FliG, FliM e FliN) e assim inicia o movimento rotacional dos flagelos. Este sistema para quando MCP sofre modificação pela ação das proteínas CheC e CheD, alterando a sensibilidade na recepção do sinal. (<http://www.genome.jp/kegg/>)

Elementos genéticos móveis

Dos genes diferencialmente expressos na categoria das transposases (subcategoria VI.C) das 21 cópias do gene que codifica transposase *ISxac3* em Xac (da SILVA *et al.*, 2002), 14 apareceram como diferencialmente expressas no mutante 18D06, sendo todas menos expressas (Tabela 2). Além de *ISxac3*, outros genes que codificam transposases também foram diferencialmente expressas como *ISxac1*, *ISxac2*, *ISxac4* e *ISxad1*, todas pertencentes à subcategoria VI.C. LAIA (2007) também encontrou que em Xac 306 selvagem todas estas transposases se apresentaram menos expressas. Isso confere estabilidade ao genoma, pois evita a translocação de genes.

Sistema de secreção do tipo II (SST2)

Na categoria dos genes relacionados ao sistema de secreção, a ORF

XAC0700 (gene *xcsI*), a qual codifica uma proteína do SST2, foi menos expressa. O sistema de secreção do tipo II é o principal sistema que medeia o transporte de proteínas do periplasma bacteriano para o meio extracelular. Este sistema secreta enzimas responsáveis pela degradação da parede celular e contribui para a interação patógeno-hospedeiro (BUTTNER & BONAS *et al.*, 2010). O SST2 de Xac consiste de dois agrupamentos gênicos, *xcs* e *xps*, e não apresentam similaridade na sequência de nucleotídeos. O agrupamento *xps* consiste de 12 genes e duas unidades transcricionais, onde a primeira contém os genes *xpsE* e *xpsF* e a segunda contém os outros 10 genes, ao passo que o agrupamento *xcs* consiste de um operon contendo 13 genes (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). O SST2 foi primeiramente identificado em *Klebsiella oxytoca*, a qual tem no mínimo trinta genes *pul* que são requeridos para secretar uma lipoproteína pululanase responsável pela degradação de amido (D'ENFERT *et. al.*, 1987). O SST2 tem-se tornado importante na virulência de muitos patógenos de planta e animal, na exportação de proteínas como toxinas, proteases, lipases e fosfolipases, como também enzimas de degradação da parede celular como celulases, pectinases e xilanases (SANDKVIST, 2001) (Figura 15). A contribuição do SST2 na degradação da parede celular de plantas contribui no processo de patogenicidade, na qual o maior obstáculo da bactéria patogênica de planta é a parede celular (MCNEILL *et. al.*, 1984). O fato de uma ORF que codifica uma proteína SST2 ser menos expressa no mutante 18D6 indica um dos fatores pelo qual esse mutante provavelmente não causa sintomas de cancro em citros. No entanto, o maior número de genes diferencialmente expressos neste mutante ainda está ligado ao metabolismo celular.

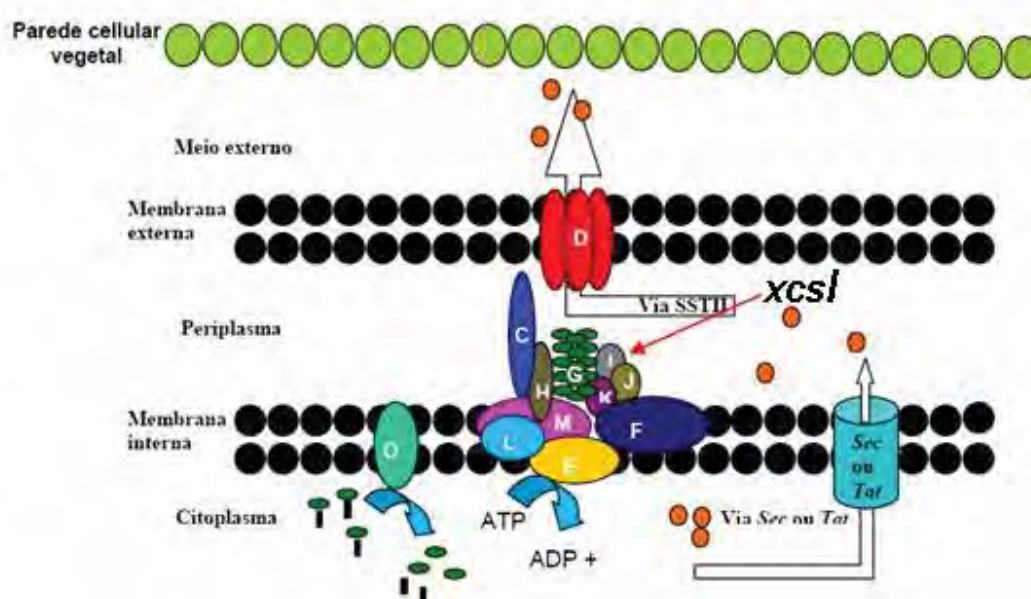


Figura 14. Representação esquemática do sistema de secreção do tipo II (SST2). Fonte: HOMEM, 2008.

A seta vermelha indica o produto do gene *xcsI* que foi menos expresso no mutante 18D6.

Mutações no agrupamento *xps* em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tem tido uma redução na virulência. Os genes *xcs*, apesar da sua similaridade com *xps* em paralelo, fica claro que eles não são funcionalmente redundantes. E mutações no agrupamento *xcs* em algumas cepas tem sido relatado por não afetar a virulência. (LU *et al.*, 2008).

Sistema de secreção do tipo IV (SST4)

O isolado 306 de Xac possui dois SST4, um presente no cromossomo e outro no plasmídeo pXAC64 (SILVA *et al.*, 2002). O sistema de secreção que apresentou vários genes diferencialmente expressos no mutante foi o SST4, onde 7 genes que codificam genes *virB* foram mais expressos e 1 foi menos expresso (Tabela 2). Os genes *virB* são induzidos por compostos fenólicos (GIJSEGEM, 1997), baixa temperatura, pH ácido e presença de açúcares (LIU *et al.*, 2006),

condições típicas encontradas no solo próximo à rizosfera. O SST4, encontrado em bactérias gram-negativas, é estruturalmente complexo e medeia a transferência de macromoléculas por meio de conjugação, onde um grande número de proteínas atravessa a membrana plasmática, o espaço periplásmico e a membrana externa (HAFT *et al.*, 2007). LAIA (2007) mostrou que os genes *virB1*, *virB3*, *virB4*, *virB8*, *virB9* e *virB11* que estão presentes no cromossomo de *Xac* 306 foram menos expressos no início da colonização *in planta*. Contudo, no mutante 18D6, os genes *virB1* (XAC2617), *virB2* (XAC2616), *virB4* (XAC2614), *virB6* (XAC2612), *virB9* (XAC2620) e *virB11* (XAC2618) cromossomais foram mais expressos, enquanto que o gene *virB4* (XACb0045) plasmidial se mostrou menos expresso (Tabela 2). LAIA (2007) também mostrou que em *Xac* 306 os genes *virB9*, tanto o cromossomal como o plasmidial, foram menos expressos quando multiplicadas em meio indutor XAMI e *in planta*.

Muitas bactérias patogênicas de plantas e animais possuem o SST4. No caso de *Agrobacterium tumefaciens* os genes *virB* são essenciais no processo de infecção, pois estes são responsáveis pela transferência de DNA da bactéria para as plantas hospedeiras (WARD *et al.*, 1991). Este sistema de secreção é encontrado também em patógenos humanos, como em *Bordetella pertussis*, agente causador da coqueluche. Nesta bactéria, a proteína PtlC, homóloga a VirB4, desempenha um papel chave no processo de liberação da toxina pertussis (COVACCI e RAPPUOLI, 1993). Também em *Brucella suis* (O'CALLAGHAN, 1999, FOULONGNE, 2000) e em *Brucella abortus* (SIEIRA *et al.*, 2000) a virulência está associada à expressão dos genes *virB*, uma vez que mutantes para os genes *virB* leva à perda da capacidade de sobreviver e se multiplicar em células de mamíferos e a virulência é restaurada por complementação com um plasmídeo contendo a região *virB* (O'CALLAGHAN, 1999; SIEIRA *et al.*, 2000;). No entanto, no caso de *Xanthomonas*, os genes *virB* podem ser essenciais para o processo de patogenicidade e sobrevivência de *Xac*, apesar de não se saber até hoje a relação deste sistema em *Xac*. Contudo sabe-se que algumas proteínas hipotéticas são secretadas por esse sistema.

Biossíntese de pequenas moléculas

Uma ORF que se mostrou menos expressa no mutante e que participa de uma via metabólica importante foi a XAC3010, que codifica uma chiquimato quinase (Tabela 2). A enzima chiquimato quinase é responsável por catalisar a quinta reação da via do chiquimato que é a fosforilação de chiquimato para chiquimato-3-fosfato utilizando ATP como doador de fosfato. A via do chiquimato é responsável pela biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) em bactérias, leveduras, plantas, fungos e parasitas como *Plasmodium falciparum* (ROBERTS *et al.*, 1988; HERRMANN & WEAVER, 1999). Esta via é importante, uma vez que no geral as bactérias consomem mais de 90% de seu metabolismo energético na biossíntese de proteínas e praticamente todas as proteínas possuem aminoácidos aromáticos na sua composição.

Uma característica do gênero *Xanthomonas* é a produção de pigmentos amarelo ligados à membrana chamados xantomonadinas (STARR, 1981). POPLAWSKY & CHUN (1997) mostraram que a sintomatologia da patogenicidade e multiplicação em plantas são afetadas em cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* deficientes em xantomonadinas. GOEL *et al.* (2001) relataram que a deficiência deste pigmento em um mutante de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), leva à perda de virulência e a ser auxotrófico para aminoácidos aromáticos.

PARK *et al.* (2009), em estudo com mutantes para o gene *aroK* em Xoo, que codifica a enzima chiquimato quinase, mostraram que genes relacionados à patogenicidade foram regulados, incluindo genes *hrp* e *hrc* e celulase, uma enzima importante secretada pelo SST2 e que é utilizada para degradação da parede celular de plantas. Esses genes tiveram um aumento significativo de expressão no mutante. Estes resultados mostram que em Xoo o nocaute de um gene que codifica uma enzima que participa de uma via metabólica importante para o patógeno pode alterar a sua virulência, apesar dos altos níveis de expressão dos genes relacionados à patogenicidade (incluindo *hrp/hrc* e celulase).

CONCLUSÕES

Um grande número de genes que codificam proteínas hipotéticas foi diferencialmente expresso no mutante de Xac (18D6) que possui interrompido um gene que codifica uma histidina quinase híbrida sensora (ORF XAC3673) que faz parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS), sugerindo que elas podem estar envolvidas nos processos de patogenicidade e virulência de Xac.

Transportadores ABC se mostraram diferencialmente no mutante. Como eles são importantes tanto para a nutrição da célula como para a proteção contra compostos tóxicos e estão ainda relacionados com a multiplicação bacteriana, isso pode explicar o fato do mutante apresentar uma boa colonização *in planta* (LAIA, *et al.*, 2009)., apesar de ser um mutante avirulento

Um gene relacionado ao sistema de secreção do tipo II (ORF XAC0700, gene *xcs*) se apresentou como menos expresso no mutante. Uma vez que este sistema é importante para a patogenicidade e virulência, isso pode ser um dos fatores responsáveis pela avirulência do mutante.

Genes do sistema de secreção do tipo IV (SST4) se mostraram diferencialmente expressos no mutante, sendo que 7 genes foram mais expressos e 1 menos expresso. Este sistema é importante para a sobrevivência de algumas bactérias patogênicas. Contudo, não é relatado como importante para Xac, e o fato desses genes serem diferencialmente expressos no mutante sugere que o SST4 pode ter alguma importância no processo de patogenicidade e virulência de Xac.

REFERÊNCIAS

- ALON, U.; CAMARENA, L.; SURETTE, M.G.; AGUERA, Y.; ARCAS, B.; LIU, Y.; LEIBLER, S.; STOCK, J.B. Response regulator output in bacterial chemotaxis. **EMBO Journal**, Eynsham, v.17, p. 4238-4248, 1998.
- AUSTA-MONGE, G.; FREITAS-AUSTA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, n. 3, p. 1201-1205, 2005.
- BEIYER, G., and GROSS, R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. **Science**, New York, v.9, p.143-152, 2006.
- BÜTTNER, D.; and BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.34, p.107–133, 2010.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.
- CHAO, X.; MUFF, T.J.; PARK, SANG-YOUN ; ZHANG, S.; POLLARD, A.M.; ORDAL, G.W.; BILWES, A.L.; CRANE, B.R. A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation. **Cell**, Cambridge, v.124, n.3, p 561–571, 2006.
- COVACCI, A., RAPPUOLI, R. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.8, n.3, p.429–434, 1993.
- D'ENFERT, C.; RYTER A & PUGSLEY AP. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 6, n.11, p. 3531–3538, 1987
- FOULONGNE, V.; BOURG, G.; CAZEVIEILLE, C.; MICHAUX-CHARACHON, S.; O'CALLAGHAN, D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. **Infection and Immunology**, Washington, v.68, n.3, p.1297–1303, 2000.
- GAO, R. & STOCK, A. M. Biological insights from structures of two-component proteins. **Annual. Review of Microbiology**, Palo Alto, v.63, p.133–154, 2009.

GILSEGEM, F. V. In planta regulation of phytopathogenic bacteria virulence genes: relevance of plant-derived signals. **European Journal of Plant Pathology** Dordrecht, v. 103,n.4,p. 291–301, 1997.

GOEL AK, RAJAGOPAL L & SONTI RV (2001) Pigment and virulence deficiencies associated with mutations in the *aroE* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.1,p. 245–250,2001.

HAFT, R. J.; GACHELET, E. G.; NGUYEN, T.; TOUSAINT, L.; CHIVIAN, D.; TRAUXLER, B. In vivo oligomerization of the F conjugative coupling protein TraD. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, n.18,p.6626-6634,2007

HASHIMOTO, W.; MOMMA, K.; MISHIMA, Y.; MIZAMI, B.; and MURATA. K. Super-channel in Bacteria: Function and Structure of a Macromolecule Import System Mediated by a Pit-dependent ABC Transporter. **Biosciences. Biotechnology and Biochemistry**, Bhopal, v. 65,n.9,p.1949-1956, 2001.

HE, Y.W.; XU, M.; LIN, K.; NG, Y.J.; WEN, C.M.; WANG, L.H.; LIU, Z.D.; ZHANG, H.B.; DONG, Y.H.; DOW, J.M.; ZHANG, L.H. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication dependent genes and functions. **Molecular microbiology**, Oxford, v.59, n. 2, p.610-622, 2006.

HERRMANN, K.M. & WEAVER, L.M, The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 50, p.473–503, 1999.

KOIDE, T.; VENCIO, R.Z.; GOMES, S.L. Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 16, p.5821-5830, 2006

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. 1.ed. Porto Alegre: Editora Rígel. 1994. 446 p.

LAIA, M.L.; MOREIRA, L.M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J.B.; FERREIRA, C.B.; FERRO, M.I.T.; SILVA, A.C.R.; OLIVEIRA, J.C.F.; FERRO, J.A. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, London, v.9, n.12, p.1-17, 2009.

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

LLAMA-PALACIOS A, LOPEZ-SOLANILLA, E.; AND RODRIGUEZ-PALENZUELA P. The ybiT gene of *Erwinia chrysanthemi* encodes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.68, n.4, p.1624-1630, 2002

LIU, P.; NESTER, E. W. Indoleacetic acid, a product of transferred dna, inhibits vir gene expression and growth of agrobacterium tumefaciens c58. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v. 103, n. 12, p. 4658–4662, 2006.

LU H, PATIL P, VAN SLUYS MA *et al.* Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. **PLoS One** , v.3, p. e3828.2008.

MCNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. & ALBERSHEIM P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemichal**, Palo Alto, v.53, p. 625–663.1984.

MISHIMA, Y.; MOMMA, K.; HASHIMOTO, W.; MIKAMI, B.; AND MURATA K. Super-channel in bacteria: Function and structure of the macromolecule import system mediated by a pitdependent ABC transporter. **FEMS Microbiology**,Amsterdan, v.204, n.2,p.215-221,2001

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M. L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y.; RAMUZ, M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Molecular Microbiology**,Oxford, v.33,n.6, p.1210–1220,1999.

PARK, Y.H.; SONG, E.S.; NOH, T.H.; KIM, H.; YANG, K.S.; HAHN, J.H.; KANG, H.W.& LEE, B.M. Virulence analysis and gene expression profiling of the pigment-deficient mutant of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*.**FEMS Microbiology Letter**,Amsterdan, v.301, p.149-155, 2009.

PARKINSON, J. S.; AND KOFOID, E. C. Communication modules in bacterial signaling proteins. **Annual. Review.of Genetics**. Palo Alto,v 26, p. 71-112, 1992.

POPLAWSKY, A.R. & CHUN, W. pigB determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v .179, n.2,p. 439–444, 1997.

QIAN, W.; HAN, Z.J. & HE, C. Two-Component Signal Transduction Systems of *Xanthomonas* spp.: A Lesson from Genomics. **The American Phytopathological Society**, v. 21, n. 2, 2008, p. 151–161, 2008

ROBERTS, D.P.; DENNY, T.P. & SCHELL, M.A. Cloning of *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170. p.1445–1451. 1988.

SANDKVIST, M. Biology of type II secretion. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.40, n.2, p.271–283, 2001.

SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. In: . **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**. New York: Springer, 2005. p.397–420.

SEO, Y.S.; SRIARIYANUN, M.; WANG, L.; PFEIFF, J.; PHETSOM, J.; LIN, Y.; JUNG, K.H.; CHOU, BOGDANOVE, A. and RONALD, P.; A two-genome microarray for the Rice pathogens *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* and its use in the discovery of a difference in their regulation of *hrp* genes. **BMC Microbiology**, London, v. 8, n. 99, p. 1-12, 2008.

SIEIRA, R., COMERCI, D.J., SANCHEZ, D.O., UGALDE, R.A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. . **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, n.17, p.4849–4855, 2000.

SILVA, A. C. R. DA.; FERRO, J.A.; REINACH, F. C.*et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v.417, p.459-463, 2002.

SOURJIK, V.; BERG, H. C. Binding of the Escherichia coli response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v 99, n.20, p.12669-12674, 2002.

STARR MP. The genus *Xanthomonas*. **The Prokaryotes**, Vol. 1 (STARR M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A. & SCHLEGEL H. G.; eds), pp. 742–763. Springer-Verlag, Berlin, Germany.1981

STOCK, A. M., ROBINSON, V. L. & GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemichal**, Palo Alto, v. 69, p. 183–215, 2000.

TSUKADA, S.; AONO, T.; AKIBA, N.; LEE, K.B.; LIU, C.T.;TOYAZAKI, H.; OYAIZU, H. Comparative Genome-Wide Transcriptional Profiling of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 Grow under Free-Living and Symbiotic conditions. **Applied and Evironmental Microbiology**,Washington, v.75, n.15,p.5037-5046, 2009

WANG, N.; LU, S.E.; WANG, J.; CHEN, Z.J.; GROSS, D.C. The expression of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**,Saint Paul, v. 19, n. 3, p. 257-269, 2006.

WARD, J.E., DALE, E.M., BINNS, A.N. Activity of the Agrobacterium T-DNA transfer machinery is affected by *virB* gene products. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**, Washington, v.88,n.? p.9350-9354, 1991.

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**, APS Press, Saint Paul, 1988. p.1-80.

WEST, A.H.; STOCK, A.M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends Biochemichal Science**, v. 26,p. 369-376, 2001

VALLS, M.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. **PLoS pathogens**, San Francisco, v.2, n. 8, p. e82, 2006.

ZHANG, Z. and HENDRICKSON, W.A. Structural Characterization of the Predominant Family of Histidine Kinase Sensor Domains. **Journal of Molecular Biology**, London, p.1-19, 2010.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de microarranjo de DNA utilizada para este estudo mostrou resultados interessantes em relação aos genes diferencialmente expressos para os dois mutantes quando comparados com a bactéria selvagem (Xac 306), sendo que um mutante apresenta ausência total de virulência (18D6) e o outro apresenta ausência de encharcamento e necrose e leve hiperplasia (8B7), sendo o mesmo parcialmente avirulento.

A análise dos microarranjos, utilizando-se o programa Spotfinder e análises estatísticas com o programa Limma com uma significância de 1% ($p\text{-value} \leq 0,01$), mostrou que 323 genes foram diferencialmente expressos no mutante 8B7 (194 mais expressos e 129 menos expressos), distribuídos em 56 categorias funcionais. No mutante 18D6 a quantidade de genes diferencialmente expressos foi de 230 (111 mais expressos e 119 menos expressos), distribuídos em 49 categorias funcionais. Dentre as categorias funcionais que apresentaram genes diferencialmente expressos encontram-se: proteínas hipotéticas; funções regulatórias e ativadores-repressores; transposon e funções relacionadas a introns; transporte de moléculas; quimiotaxia e mobilidade; degradação de proteína; patogenicidade, virulência e adaptação; produção de toxina e detoxificação; biossíntese de pequenas moléculas, estrutura celular e ORFs que codificam genes sem categoria definida.

Quando se compara os genes diferencialmente expressos em cada um dos mutantes utilizando o diagrama de Venn, encontra-se que 103 genes foram diferencialmente expressos em ambos os mutantes e que 220 foram diferencialmente expresso apenas no mutante 8B7 e 127 apenas no mutante 18D6 (Figura 1). Entre os 103 genes diferencialmente expressos nos dois mutantes encontram-se proteínas hipotéticas, transposases, reguladores transcricionais, proteínas do sistema de secreção tipo II e enzimas que participam do metabolismo celular, entre outros.



Figura 1 – Diagrama de Venn mostrando o número total de genes diferencialmente expressos comuns aos dois mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o número de genes diferencialmente expressos e exclusivos para cada um deles.

Dos 103 genes que foram diferencialmente expressos em ambos os mutantes, 55 codificam proteínas hipotéticas, sendo que 35 foram mais expressos e 20 foram menos expressos. O mesmo comportamento foi verificado para os outros 48 genes que se mostraram diferencialmente expressos nos dois mutantes, ou seja, ou foram mais expressos ou menos expressos em ambos os mutantes. Ademais, muitos genes que apareceram no mutante 8B7 não apareceram no mutante 18D6 e vice-versa (Tabela 1).

Tabela1. Tabela comparativa de alguns dos genes diferencialmente expressos que apareceram nos mutantes 8B7 e 18D6.

ORF	Nome	8B7*	18D6*
XAC3250	two-component system, regulatory proteln	+	+
XAC3975	two-component system, sensor proteln	+	+
XAC0326	two-component system, sensor proteln	-	
XAC0897	two-component system, sensor proteln	-	
XAC0835	two-component system, sensor proteln	-	
XAC2141	two-component system, regulatory proteln	-	
XAC4022	two-component system, sensor protein		+

XAC3238	two-component system, regulatory protein		+
XAC1938	GGDEF family protein	+	
XAC1878	RpfC protein	-	
XAC1994	HrpX related protein	-	
XAC0860	ABC transporter ATP-binding protein	-	
XAC3601	ABC transporter permease	+	
XAC3996	ABC transporter ATP-binding protein	-	
XAC2309	ABC transporter sugar permease	-	
XAC0829	ABC transporter substrate binding protein	-	
XAC3641	ABC transporter permease	+	
XAC2082	ABC transporter ATP-binding protein		+
XAC1459	ABC transporter ATP-binding protein	+	+
XAC0811	TonB-dependent receptor	-	
XAC3427	TonB-dependent receptor	-	
XAC4062	TonB-dependent receptor	-	
XAC0144	TonB-dependent receptor	-	
XAC2024	TonB-dependent receptor	-	
XAC3271	chemotaxis transducer	-	
XAC1666	chemotaxis protein	+	+
XAC1946	flagellar protein	+	
XAC1979	flagellar basal body binding protein	+	
XAC1746	chemotaxis protein	-	
XAC2865	chemotaxis histidine protein kinase	-	
XAC1921	ISxac3 transposase	-	
XAC3221	ISxac3 transposase	-	
XAC2889	ISxac2 transposase	-	-
XAC4323	ISxac3 transposase	-	
XAC2634	ISxac3 transposase	-	-
XAC3247	ISxac3 transposase	-	-
XAC0152	ISxac3 transposase	-	-
XAC3321	ISxac3 transposase	-	
XAC1660	ISxac3 transposase	-	-
XAC2424	ISxcd1 transposase	-	
XAC3248	ISxac3 transposase	-	
XAC3938	ISxac3 transposase	-	-
XAC1053	ISxac3 transposase	-	
XACb0062	ISxac3 transposase	-	
XAC2174	ISxac3 transposase	-	-
XACa0009	ISxac3 transposase	-	
XAC1071	ISxac3 transposase	-	-
XAC3223	ISxac3 transposase	-	
XAC0578	ISxac3 transposase	-	-
XAC4137	ISxac1 transposase	-	
XAC0153	ISxac3 transposase		-
XAC1052	ISxac3 transposase		-
XAC1924	transposase		+
XAC1102	ISxac3 transposase		-
XAC0343	ISxac3 transposase		-

XAC1916	ISxac1 transposase	-	
XAC3764	ISxac2 transposase	-	
XAC1504	ISxcd1 transposase	-	
XAC0342	ISxac3 transposase	-	
XAC0093	ISxac1 transposase	-	
XAC2620	VirB9 protein	+	
XAC2616	VirB2 protein	+	+
XAC2619	VirB10 protein	-	
XAC2614	VirB4 protein	+	+
XAC2621	VirB8 protein	+	
XAC2612	VirB6 protein		+
XAC2614	VirB4 protein		+
XAC2618	VirB11 protein		+
XACb0045	VirB4 protein		-
XAC2620	VirB9 protein		+
XACb0045	VirB4 protein	-	
XAC0700	type II secretion system protein I	-	-
XAC3960	oxidoreductase		+
XAC0831	oxidoreductase		+
XAC2133	oxidoreductase	-	-
XAC2051	oxidoreductase		+
XAC0583	oxidoreductase	-	

* Mutante 8B7 e mutante 18D6, o sinal (+) indica genes mais expressos e o sinal (-) indica genes menos expressos. As linhas em branco indicam que aquele gene não apareceu como diferencialmente expresso no mutante.

No mutante 8B7, genes do sistema de secreção do tipo III (*hrpX*), gene regulador de virulência (*rpfC*), gene que codifica um domínio GGDEF e genes transportadores ABC foram diferencialmente expressos apenas neste mutante, com nenhum aparecendo no mutante 18D6 (Tabela 1). Outro fato interessante foi que o número de proteínas hipotéticas diferencialmente expressas encontradas em ambos os mutantes foi maior no mutante 8B7 do que no mutante 18D6, assim como genes que codificam transposases e também TonB dependentes, os quais apareceram em maior número no mutante 8B7. A diferença dos genes diferencialmente expressos no mutante 8B7 comparado com o mutante 18D6 é que houve um maior número de genes relacionados a metabolismo celular sendo diferencialmente expressos no mutante 18D6, como por exemplo: genes que codificam oxidoreductase, na qual apareceu 4 genes diferencialmente expressos

no mutante 18D6 (3 mais expresso e 1 menos expresso) e apenas 2 (menos expresso) no mutante 8B7 (Tabela 1).

O que mais chama a atenção nesses resultados é que em ambos os mutantes o número de genes diferencialmente expressos que apareceram em maior quantidade foi da categoria das proteínas hipotéticas, os quais de alguma forma devem estar envolvidos nos processos de patogenicidade e virulência de Xac. Outro resultado interessante foi o fato de genes do sistema de secreção do tipo IV (SST4) terem aparecido como diferencialmente expressos no dois mutantes, pois embora este sistema seja encontrado em muitas bactérias fitopatogênicas além de Xac, até o momento não se sabe se esse sistema está envolvido no processo de patogenicidade e virulência para Xac, mas sabe-se que algumas proteínas hipotéticas são secretadas por este sistema em Xac. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o SST4 pode ter alguma importância no processo de patogenicidade e virulência de Xac.

A categoria que mais apresentou genes diferencialmente expressos nos dois mutantes foi a categoria VIII (proteínas hipotéticas), com a VIII.A (proteínas hipotéticas conservadas) sendo a que mais apresentou genes diferencialmente expressos. Entretanto, houve diferenças significativas entre os dois mutantes: 1) enquanto no mutante 8B7 o número total de genes diferencialmente expressos na categoria VIII foi de 143, no mutante 18D6 foi de 90; 2) no mutante 8B7 o número de genes menos expressos nesta categoria foi 76 (53,1%) e o número de genes mais expressos foi de 67 (46,9%), enquanto que no mutante 18D6 estes números foram de 35 (38,9%) e 55 (61,1%), respectivamente. Ou seja, o mutante 8B7 não só apresentou 1,6 vezes mais genes diferencialmente expressos nesta categoria do que o mutante 18D6, mas também houve uma inversão entre eles: no mutante 8B7 a proporção entre genes menos expressos e genes mais expressos foi praticamente meio a meio, mas no mutante 18D6 a maior parte dos genes (61,1%) foram mais expressos. Um diagrama de Venn comparando os genes diferencialmente expressos nesta categoria em ambos os mutantes mostrou claramente que o gene “desligado” em cada um dos mutantes levou à alteração da

expressão de um conjunto de genes com função desconhecida que não é a mesma para cada mutante. Enquanto 52 genes foram diferencialmente expressos nos dois mutantes, 91 foram diferencialmente expressos apenas no mutante 8B7 e 38 diferencialmente expressos apenas no mutante 18D6 (Figura 2).

Se por um lado este resultado é extremamente interessante, por outro lado coloca um desafio que é a utilização de uma abordagem que possibilite descobrir a função de cada um destes genes e daí inferir que vias ou mecanismos estão sendo ativados ou reprimidos. Este é um desafio comum a todos os organismos que tiveram seus genomas sequenciados até o momento e para os quais se aplica uma abordagem de genômica funcional. Pelo menos é possível descobrir que genes sem função conhecida até o momento estão envolvidos com o fenótipo dos mutantes e, portanto, eles são os alvos de próximas pesquisas.



Figura 2– Diagrama de Venn mostrando o número de genes da categoria VIII diferencialmente expressos comuns aos dois mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o número de genes diferencialmente expressos exclusivos para cada um deles.

Validação do microarranjo

Normalmente, para que os resultados de expressão gênica global obtidos com

microarranjo sejam publicados em revistas especializadas, exige-se que a expressão de alguns dos genes que foram mais expresso ou menos expresso seja validado por uma outra metodologia. Inicialmente esta validação da expressão de alguns genes era feita através da técnica de *Northern blot* e, mais recentemente, através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR - “Real Time Quantitative RT-PCR”). Entretanto, ambas as técnicas são aceitas. No presente caso ela será feita por qRT-PCR. Entretanto, há um dado importante que mostra a qualidade e a acurácia dos dados obtidos. Como mencionado em Material e Métodos, todas as sequências gênicas (ORFs) presentes no microarranjo foram colocadas em duplicata, formando um par, e a análise estatística utiliza a média de cada duplicata do par. Se por alguma razão uma sequência do par não é considerada, a expressão daquele gene não é considerada. Para várias sequências, há mais de um par no microarranjo e, se todas elas forem consideradas válidas no final da análise, teremos para uma mesma sequência mais de uma medida. Se todos os procedimentos forem feitos corretamente e não houver nenhum problema, o que espera é que os diferentes pares de uma mesma sequência dêem valores iguais ou muito semelhantes. Foi o que aconteceu no presente caso. Tanto para o mutante 8B7 (Tabela 2) como para o mutante 18D6 (Tabela 3), os resultados obtidos para os pares de sequências presentes mais do que uma vez nas lâminas do microarranjo foram concordantes tanto no perfil de expressão do gene (aumentada ou diminuída) como na amplitude da variação da expressão e na significância estatística. Este resultado sugere fortemente que os dados obtidos espelham a real expressão gênica dos mutantes nas condições experimentais utilizadas, o que deve então ser confirmada pela qRT-PCR.

Tabela 2. Sequências gênicas (ORFs) presentes mais de uma vez (na forma de pares) no microarranjo e que se mostraram diferencialmente expressas no mutante 8B7.

ORF	Nome	Perfil	Categoria	logFC*	AveExpr**	t***	P.Value****
XAC2606	hypothetical protein	i	VIII.C	0,895267	12,374885	5,070164	0,000494936
XAC2606	hypothetical protein	i	VIII.C	0,906152	11,126211	3,962894	0,002709267
XAC2606	hypothetical protein	i	VIII.C	0,729240	11,370486	3,526525	0,005535157
XAC2610	hypothetical protein	i	VIII.B	1,009944	12,955601	4,692652	0,000866626
XAC2610	hypothetical protein	i	VIII.B	1,496274	11,101882	4,366790	0,001428683
XAC2610	hypothetical protein	i	VIII.B	3,836091	9,4403299	8,449265	0,003787987
XAC2611	hypothetical protein	i	VIII.C	1,005414	12,033254	5,053373	0,000507202
XAC2611	hypothetical protein	i	VIII.C	0,790853	12,746392	4,333722	0,001504279
XAC2614	VirB4 protein	i	VII.H	0,693289	12,502719	3,914281	0,002930414
XAC2614	VirB4 protein	i	VII.H	0,627137	12,632637	3,533575	0,005470703
XAC2614	VirB4 protein	i	VII.H	0,540342	13,391631	3,285160	0,00954685
XACb0030	TrwB protein	r	VI.B	-1,041169	12,011396	-4,533340	0,00144667
XACb0030	TrwB protein	r	VI.B	-0,621332	12,035650	-3,262774	0,008608332

*, **, *** e ****: Parâmetros do pacote estatístico Limma. LogFC: estimativa da razão de variação da expressão gênica em escala $\log_2$ (razão de 1 e -1) ; AveExpr: média da expressão em $\log_2$ para a sonda em todos os arrays; t: t-estatístico moderado calculado com base nos erros padronizados para cada gene; P.Value: valor bruto do p-value.

Tabela 3 . Sequências gênicas (ORFs) presentes mais de uma vez (na forma de pares) no microarranjo e que se mostraram diferencialmente expressas no mutante 18D6.

ORF	Nome	Perfil	Categoria	logFC*	AveExpr**	t***	P.Value****
XAC2610	hypothetical protein	i	VIII.B	1,527316	12,562545	5,811403	0,000117289
XAC2610	hypothetical protein	i	VIII.B	1,518848	10,050949	3,755072	0,004518608
XAC2611	hypothetical protein	i	VIII.C	1,275502	11,767724	6,483305	0,000045289
XAC2611	hypothetical protein	i	VIII.C	1,302322	12,362919	5,636085	0,000151890
XAC2614	VirB4 protein	i	VII.H	1,649096	12,891396	6,065339	0,000121087
XAC2614	VirB4 protein	i	VII.H	1,111545	12,247797	4,370119	0,001117162
XAC2614	VirB4 protein	i	VII.H	0,887965	12,409647	3,269340	0,007473372
XAC2555	histidine kinase	i	I.D.3	1,120280	12,366927	5,149835	0,000318264
XAC2555	histidine kinase	i	I.D.3	1,153456	12,848894	4,852654	0,000508513

*, **, *** e ****. Parâmetros do pacote estatístico Limma. LogFC: estimativa da razão de variação da expressão gênica em escala $\log_2$ (razão de 1 e -1) ; AveExpr: média da expressão em $\log_2$ para a sonda em todos os arrays; t: t-estatístico moderado calculado com base nos erros padronizados para cada gene; P.Value: valor bruto do p-value

APÊNDICE

Tabela suplementar I . Categorias de genes da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) utilizadas para anotação do genoma (SILVA *et al.*, 2002)

-
- I. Metabolismo intermediário
 - A. Degradação
 - 1. Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos
 - 2. Degradação de moléculas pequenas
 - 3. Degradação de lipídeos
 - B. Metabolismo intermediário central
 - 1. Amino açúcares
 - 2. Via de Entner-Doudoroff
 - 3. Gliconeogênese
 - 4. Ciclo do Glioxilato
 - 5. Metabolismo diverso da glucose
 - 6. Ramo não oxidativo, via das pentoses
 - 7. Hidrólise de nucleotídeos
 - 8. Interconversões de nucleotídeos
 - 9. Compostos de fósforo
 - 10. Pool, multipurpose conversions
 - 11. Biossíntese de açúcar nucleotídeo, conversões
 - 12. Metabolismo de enxofre
 - C. Metabolismo energético, carbono
 - 1. Respiração aeróbica
 - 2. Respiração anaeróbica e fermentação
 - 3. Transporte de elétrons
 - 4. Glicólise
 - 5. Ramo oxidativo, via das pentoses
 - 6. Piruvato desidrogenase
 - 7. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA)
 - 8. Interconversão da força motriz ATP-próton
 - D. Funções regulatórias
 - 1. Sistemas de dois componentes
 - 2. Ativadores-Repressores
 - 3. Quinases-Fosfatases
 - 4. Fatores Sigma e outros componentes regulatórios
 - 5. Não usados
 - II. Biossíntese de pequenas moléculas
 - A. Biossíntese de aminoácidos
 - 1. Família do glutamato|assimilação de nitrogênio
 - 2. Família do aspartato, família do piruvato
 - 3. Família glicina-serina|metabolismo do enxofre
 - 4. Família dos aminoácidos aromáticos
 - 5. Histidina
 - B. Biossíntese de nucleotídeos
 - 1. Ribonucleotídeos de purina
 - 2. Ribonucleotídeos de pirimidina
 - 3. 2'-Desoxiribonucleotídeos
 - 4. Via de salvamento de nucleosídeos e nucleotídeos
 - C. Biossíntese de açúcares e de açúcares nucleotídeos
 - D. Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e transportadores
 - 1. Biotina
 - 2. Ácido fólico
 - 3. Lipoato

4. Molibdopterina
5. Pantotenato
6. Piridoxina
7. Nucleotídeos de pirimidina
8. Tiamina
9. Riboflavina
10. Tioredoxina, glutaredoxina, glutathione
11. Menaquinona, ubiquinona
12. Heme, porfirina
13. Proteína transportadora de biotinil-carboxil (BCCP)
14. Cobalamina
15. Enteroquelina
16. Biopterina
17. Outros
- E. Biossíntese de ácidos graxos e de ácido fosfatídico
- F. Biossíntese de poliaminas
- III. Metabolismo de macromoléculas
 - A. Metabolismo de DNA
 1. Replicação
 2. Proteínas estruturais ligantes de DNA
 3. Recombinação
 4. Reparo
 5. Restrição, modificação
 - B. Metabolismo de RNA
 1. RNAs Ribossomal e estável
 2. Proteínas Ribossomais
 3. Ribossomas – maturação e modificação
 4. Aminoacil tRNA sintetases, modificação de tRNA
 5. Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
 6. Degradação de RNA
 - C. Metabolismo de Proteína
 1. Tradução e modificação
 2. Chaperons
 3. Degradação de proteína
 - D. Metabolismo de outras macromoléculas
 1. Polissacarídeos
 2. Fosfolípidos
 3. Lipoproteínas
- IV. Estrutura Celular
 - A. Componentes de membrana
 1. Membrana interna
 2. Constituintes da membrana externa
 - B. Rede de mureína, peptidoglicano
 - C. Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
 - D. Estruturas de superfície
- V. Processos celulares
 - A. Transporte
 1. Aminoácidos, aminas
 2. Ânions
 3. Carbohidratos, ácidos orgânicos, álcoois
 4. Cátions
 5. Nucleosídeos, purinas, pirimidinas
 6. Proteína, secreção de peptídeos
 7. Outros

- B. Divisão celular
 - C. Quimiotaxia e mobilidade
 - D. Adaptação osmótica
 - E. Morte celular
 - VI. Elementos genéticos móveis
 - A. Funções relacionadas a fagos e profagos
 - B. Funções relacionadas a plasmídeos
 - C. Funções relacionadas a transposon e íntron
 - VII. Patogenicidade, virulência e adaptação
 - A. Avirulência
 - B. Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade
 - C. Produção de toxina e detoxificação
 - D. Degradação da parede da célula hospedeira
 - E. Exopolissacarídeos
 - F. Proteínas de superfície
 - G. Adaptação, condições atípicas
 - H. Outras
 - VIII. Hipotéticas
 - A. Proteínas hipotéticas conservadas
 - B. Proteínas hipotéticas (inclui “no hits” e “hits” com baixo score)
 - C. Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas*
 - IX. ORFs sem categoria definida
-