

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
CARLA TAVARES**

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Xylella fastidiosa* EM
RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR
PARAQUAT®**

**MOGI DAS CRUZES, SP
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
CARLA TAVARES**

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Xylella fastidiosa* EM
RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR
PARAQUAT®**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

**MOGI DAS CRUZES, SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Tavares, Carla

Perfil transcricional de *Xylella fastidiosa* em resposta ao estresse oxidativo induzido por Paraquat® / Carla Tavares. -- 2007.

53 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

1. Interação planta - patógeno 2. Espécies reativas de oxigênio 3. Microarranjo 4. Bactéria I. Título II. Nunes, Luiz Roberto

CDD 579.3

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia seis de fevereiro de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE *Xylella fastidiosa* EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PARAQUAT®" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Carla Tavares**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 64 (sessenta e quatro), a saber: 40 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Luiz Roberto Nunes e Douglas Mascara da Universidade de Mogi das Cruzes e Luiz Eduardo Aranha Camargo da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovado por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/majoria)

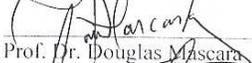
Mogi das Cruzes, 06 de fevereiro de 2007

Comissão Examinadora

Julgamento


Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof. Dr. Douglas Mascara

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste curso, a toda a equipe do laboratório de genômica do NIB, ao Prof. Dr. Luiz R. Nunes (orientador) e a Prof^a Dr^a Regina L.B. Costa de Oliveira (co-orientadora) por contribuírem muito para o meu crescimento pessoal e profissional, aos participantes da minha Banca Examinadora, Prof. Dr. Tiago Rodrigues (qualificação), Prof. Dr. Douglas Mascara (qualificação e defesa) e ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo (defesa), a minha família, principalmente minha irmã por sempre me apoiar em tudo que faço e acima de tudo, a Deus por ter me abençoado com mais esta vitória.

*O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento
do Santo a prudência.
Provérbios 9:10*

*Bem aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que
adquire conhecimento.
Provérbios 3:13*

*Em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da
ciência.
Colossenses 2:3*

*E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os
mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira
tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.
1Coríntios 13:2*

RESUMO

Xylella fastidiosa (*Xf*) é uma bactéria Gram-negativa, limitada ao xilema, fitopatogênica, causadora de várias doenças de grande importância econômica, entre elas a Clorose Variegada de Citrus (CVC). A interação planta-patógeno ativa na planta mecanismos de defesa, entre eles a explosão oxidativa, na qual são produzidas espécies reativas de oxigênio (ERO) como o $O_2^{\cdot-}$ (radical ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e HO^{\cdot} (radical hidroxil). Por sua vez, a bactéria, ao sofrer esse estresse oxidativo, desencadeia uma rede de sinalização que leva a produção de um conjunto de enzimas para detoxificar essas espécies, para que o processo de infecção e colonização obtenha sucesso. Para análise global de expressão gênica, a ferramenta mais utilizada é hibridação competitiva em microarranjos de DNA, e nosso laboratório desenvolveu um chip com 2200 ORF's de *Xylella fastidiosa*, que foi utilizado para avaliar a modulação da expressão gênica de *Xf* sob condições de estresse oxidativo induzido por Paraquat®. Um resultado interessante foi ativação de genes caracterizados como fatores de virulência, o que poderia estabelecer uma curiosa relação entre o mecanismo de defesa das plantas e o desencadeamento da ativação dos mecanismos de patogenicidade por parte da bactéria, principalmente genes que codificam adesinas. Outro resultado interessante foi o fato dos genes *hsf*, *ahpC*, *ahpF* (que apresentaram-se superexpressos) e o próprio regulador OxyR localizarem-se colinearmente no genoma de *Xf*. Uma melhor avaliação da região promotora destes genes poderá nos auxiliar a encontrar elementos controladores da transcrição em *Xf*, o que será muito útil para futuros estudos funcionais.

Palavras-chave: interação planta-patógeno, espécies reativas de oxigênio, microarranjo.

ABSTRACT

Xylella fastidiosa (*Xf*) is a Gram-negative bacterium, xylem-limited, that infects a broad range of plants and causes economically important diseases, including Citrus Variegated Chlorosis (CVC). The interaction plant-pathogen activates the plant defense mechanisms, between them there is the “oxidative burst”, in which reactive oxygen species (ROS), as the $O_2^{\cdot-}$ (superoxide radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide) and HO^{\cdot} (hydroxyl radical) are produced. In response to this oxidative stress, the bacterium triggers a signaling network that induces the production of a set of enzymes to detoxify these species, in order to the process of settling and infection gets success. For global analysis of genic expression, the most used tool is the competitive hybridization in DNA microarray. In our laboratory, it was developed a chip with 2200 ORF's of the *Xf*, which was used to evaluate the modulation of the genic expression of *Xf* under conditions of oxidative stress induced for Paraquat®. An interesting result was the activation of virulence factors characterized genes, which could establish a curious relation between the plant defense mechanisms and the activation of the pathogenicity mechanisms by the bacterium, mainly genes that codify adhesins. Another interesting result was the fact that genes the *hsf*, *ahpC*, *ahpF* (that had been presented up-regulated) and the OxyR regulator are situated side by side on the genome of *Xf*. A better evaluation of the promoter region of these genes could be interesting to find controlling elements of the transcription in *Xf*, what will be very useful for future functional studies.

Keywords: interaction plant-pathogen, reactive oxygen species, microarray.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Microscopia eletrônica de <i>Xylella fastidiosa</i> nos vasos do xilema de laranja	11
Figura 2 Folhas e frutos apresentando sintomas de CVC	12
Figura 3 Incidência de CVC em laranja dentro do estado de São Paulo	13
Figura 4 Interação entre a proteína Avr do patógeno e a proteína R da planta.....	15
Figura 5 Formas parcialmente reduzidas do oxigênio molecular.....	18
Figura 6 Ciclo redox do Paraquat®	21
Figura 7 Técnica de hibridação em microarranjos de DNA	25
Figura 8 Eletroforese em gel das amostras de células de <i>Xf</i> amplificadas por PCR	27
Figura 9 Curva de crescimento de <i>Xf</i> quando exposta a diferentes concentrações de Paraquat®.....	34
Figura 10 Folhas de laranja infiltradas a vácuo com solução PBS/NBT.....	35
Figura 11 Padrões de variação de expressão de 665 genes identificados como modulados durante a resposta de <i>Xf</i> às condições de estresse oxidativo	36
Figura 12 Diagrama de clusterização hierárquica mostrando os 93 genes com maior padrão de superexpressão em <i>Xf</i> submetida ao estresse oxidativo	37
Figura 13 Quantificação relativa da expressão gênica dos genes <i>cvcC</i> , <i>ahpF</i> e <i>hsf</i> em culturas de <i>Xf</i> tratadas com diferentes concentrações de Paraquat®	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CVC	Clorose Variegada de Citrus
Cy3/Cy5	Cianina3/Cianina5
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO ₆₀₀	Densidade Óptica em 600 nm
DTT	Ditiotreitol
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FUNDECITRUS	Fundo de Defesa da Citricultura
HO•	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hrp	Reação Hipersensitiva e Patogenicidade
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ORF	Fases Abertas de Leitura
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RH	Resposta Hipersensitiva
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase Reversa - Reação de Polimerase em Cadeia
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
SSC	Citrato Salino de Sódio
TBE	Tris-Borato-EDTA

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
1.1	<i>Xylella fastidiosa</i> e a Clorose Variegada de Citrus	11
1.2	Interação planta/patógeno	14
1.3	Espécies reativas de oxigênio (ERO)	17
1.3.1	Origem	17
1.3.2	Detoxificação e reparo	20
1.4	Paraquat®: um agente gerador de superóxidos.....	21
1.5	Reguladores de transcrição	22
1.6	Microarranjos de DNA	24
2	Objetivo	26
3	Métodos	26
3.1	Cultivo de <i>Xylella fastidiosa</i>	26
3.2	Determinação da curva de crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i>	28
3.3	Estresse oxidativo <i>in planta</i>	28
3.4	Estresse oxidativo <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de Paraquat®	29
3.5	Extração de RNA.....	29
3.6	Marcação e hibridação das amostras de RNA.....	30
3.7	Análise estatística dos resultados	31
3.8	Quantificação relativa da expressão gênica através de PCR em Tempo Real	32
4	Resultados	33
4.1	Curva de crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i> na presença de Paraquat®	33
4.2	Estresse oxidativo <i>in planta</i>	35
4.3	Genes significativamente expressos na presença de Paraquat®	35
4.4	Quantificação relativa da expressão gênica através de PCR em Tempo Real	40
5	Discussão	42
	Referências	44

1 Introdução

1.1 *Xylella fastidiosa* e a Clorose Variegada de Citrus

Xylella fastidiosa (*Xf*) é uma bactéria Gram-negativa, limitada ao xilema, aflagelada, possui forma de bastonete, não forma esporos, é apigmentada, não fermentativa, não móvel, aeróbica estrita, não halofítica, mede 0,1 a 0,5 μm x 1 a 5 μm , tem hábito nutricional fastidioso e o pH e temperatura ótimos de crescimento variam entre 6,5-6,9 e 26-28°C respectivamente (WELLS *et al.*, 1987) (Figura 1).



Figura 1: Microscopia eletrônica de *Xylella fastidiosa* nos vasos do xilema de laranja (FUNDECITRUS, 2007).

Xf é considerada espécie única do gênero *Xylella*, grupo *Xanthomonas*, família *Lysobacteriaceae*, ordem *Lysobacterales*, subdivisão gamma das eubactérias. Anteriormente, *Xf* era associada com a família *Rickettsiaceae*, devido à semelhança morfológica e requerimentos nutricionais. Os resultados dos estudos de hibridações de DNA e análise de seqüências de 16S rRNA, determinaram similaridades ao subgrupo gamma das eubactérias, que inclui os fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* excluindo, deste modo, qualquer relacionamento com *Rickettsiaceae*. Entretanto, diferenças genotípicas e fenotípicas em relação as espécies do gênero *Xanthomonas*, permitiram sua classificação em um gênero separado. Foi proposto então o nome *Xylella fastidiosa* para estabelecer um novo gênero, com uma única espécie incluindo todos as cepas de bactérias Gram-negativas fastidiosas limitadas

ao xilema (XLB ou FXLB) (WELLS *et al.*, 1987; HOPKINS, 1989; PURCELL & HOPKINS, 1996).

Xf foi o primeiro microrganismo fitopatogênico a ter seu genoma totalmente seqüenciado devido à sua importância, pois ele causa doenças em uma grande variedade de plantas como videira, pessegueiro, cafeeiro, ameixeira, laranjeira, plantas ornamentais entre outras. É transmitida por enxertos contaminados ou por insetos vetores, da subfamília Cicadellinae e Cercopidae, conhecidos popularmente como cigarrinhas, que se alimentam da seiva do xilema. (HOPKINS, 1989; SIMPSON *et al.*, 2000; COLETTA-FILHO *et al.*, 2001; BUZKAN *et al.*, 2005).

No Brasil, a *Xf* foi identificada em 1987 em pomares do Triângulo Mineiro e do Norte e Noroeste de São Paulo, sendo responsável por uma das doenças economicamente mais importante, a Clorose Variegada de Citrus (CVC), também conhecida popularmente como amarelinho (LI *et al.*, 2003). O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo atendendo a maioria do mercado internacional de sucos concentrados. Mais de 80% da produção vem do Estado de São Paulo, onde essa atividade gera 3,4 milhões de empregos e mais de 1,5 bilhão de dólares por ano, sendo que cerca de 90% dos pomares de São Paulo estão afetados pela CVC (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Os sintomas da doença são causados pela oclusão vascular devido à formação de biofilme, goma, tilose e matriz exopolimérica, levando ao estresse hídrico (MARQUES *et al.*, 2002; de SOUZA *et al.*, 2005a). Os primeiros sintomas aparecem nas folhas da copa como pequenas manchas amareladas na parte ventral da folha e lesões de cor palha na parte dorsal das folhas, com conseqüente desfolha dos ramos mais altos da planta, locais mais atacados pelas cigarrinhas. Os frutos se tornam duros, pequenos, queimados de sol, amadurecem precocemente e perdem seu valor comercial (www.fundecitrus.com.br) (Figura 2).



Figura 2: Folhas e frutos apresentando sintomas de CVC (FUNDECITRUS, 2007).

As estratégias de manejo utilizadas para controle da CVC são: seleção das mudas, controle do vetor, poda de ramos com sintomas iniciais em plantas com mais de dois anos e erradicação de plantas abaixo dessa idade. Desde 1996, o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) realiza anualmente um levantamento para retratar a incidência de CVC nas quatro principais variedades de laranja (Pêra Rio, Valência, Natal e Hamlin) dentro do estado de São Paulo. O levantamento é realizado nos meses que antecedem a colheita (Junho a Agosto) e são consideradas as zonas Norte, Noroeste, Oeste, Centro e Sul do estado, sendo que a CVC permanece estável nos últimos três anos (Figura 3).

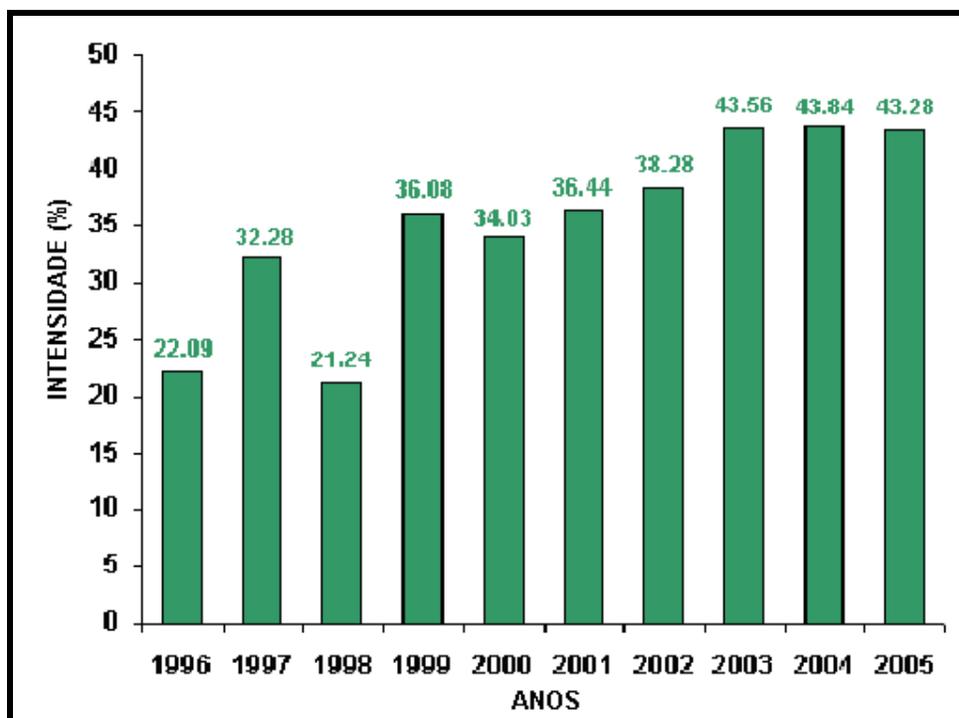


Figura 3: Incidência de CVC nas principais variedades de laranja dentro do estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2007).

1.2 Interação planta - patógeno

As plantas são exploradas como fonte de alimento e abrigo por vários parasitas, tais como vírus, bactérias, fungos, nematóides, insetos e outras plantas (MCDOWELL & DANGL, 2000). Existe uma grande diversidade de microrganismos, que habitam nas plantas interna e externamente, podendo interagir entre si e com o hospedeiro. Esses microrganismos são chamados endofíticos quando habitam o interior das plantas sem causar-lhes nenhum dano e epifíticos quando habitam o seu exterior, podem também se originar e multiplicar-se em locais externos da planta e depois se moverem para partes internas e vice-versa (SABARATNAM & BEATTIE, 2003).

Microrganismos epifíticos enfrentam variações ambientais, enquanto os endofíticos enfrentam as respostas de defesa da planta, que são induzidas pela invasão microbiana, sendo que os microrganismos que causam doenças são chamados de patogênicos. A interação entre esses microrganismos favorece o uso dos não patogênicos como agentes de biocontrole. Diversos estudos têm mostrado que esses microrganismos podem ter a capacidade de controlar patógenos, insetos e nematóides, podendo acelerar o crescimento e o desenvolvimento da planta (ARAÚJO *et al.*, 2002; SABARATNAM & BEATTIE, 2003; LACAVA *et al.*, 2004).

Por não possuírem um sistema imune adaptado circulante para protegê-las de patógenos e/ou, para sobreviver a agressões bióticas e abióticas, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa que são constitutivos ou induzidos. A adaptação e resistência são ocasionadas por alterações no metabolismo da célula vegetal, através da síntese de proteínas de defesa expressas por genes específicos, ativados por mecanismos complexos, de forma direta (combatendo o agente agressor) ou indireta (preservando a estrutura e as funções celulares) (MCDOWELL & DANGL, 2000).

A interação planta-patógeno é chamada compatível quando ocorre a doença e incompatível se a planta resiste à agressão. O mecanismo de defesa só é acionado se a planta reconhecer a presença do agressor. Isso acontece através de interações receptor-indutor nas quais os genes de Avirulência (*Avr*) do patógeno interagem com genes de resistência (*R*) do hospedeiro e acionam sinais que ativam, no núcleo da célula, os genes responsáveis pela defesa. Os indutores incluem proteínas, glicoproteínas, glicanos lipídios e moléculas sintéticas (ODJAKOVA & HADJIIVANOVA, 2001; BRUGGER *et al.*, 2006; DODDS *et al.*, 2006).

Esse sistema de interação receptor-indutor foi proposto por Harold H. Flor em 1942, que o identificou como sistema de reconhecimento gene-a-gene, com interação específica. Uma planta com o gene *R* reconhece um patógeno com o gene *Avr* correspondente, a presença do gene *Avr* torna o patógeno não virulento se a planta tiver o gene *R* correspondente. Se o gene correspondente não existe na planta ou no agente patogênico, não há reconhecimento nem resistência e assim doença se manifesta (Figura 4).

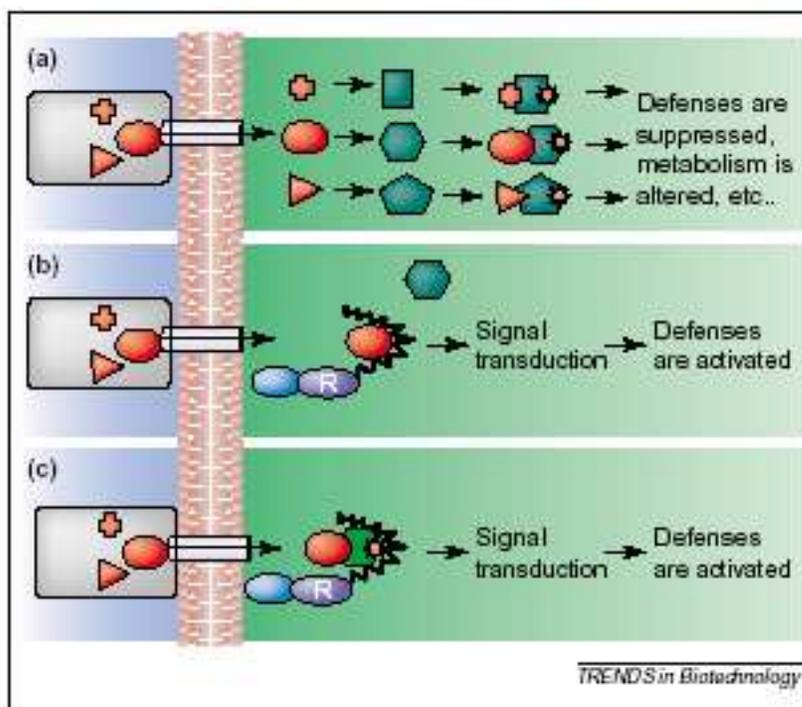


Figura 4: Interação entre a proteína *Avr* do patógeno e a proteína *R* da planta. O patógeno (cinza) liga-se a uma célula da planta e expressa um conjunto de proteínas (vermelhas). Estas proteínas são translocadas para dentro das células da planta e seus alvos são as proteínas do hospedeiro que controlam a resposta de defesa, metabolismo ou outros processos da planta que afetam a virulência do patógeno (verdes). (a) As células da planta não expressam proteínas *R* que são capazes de reconhecer a proteína do patógeno e a planta adoece. (b) Interação receptor-indutor, onde a proteína *R* liga-se a proteína *Avr* do patógeno ativando uma rede complexa de transdução de sinal que desencadeia a resposta de defesa. (c) A proteína *R* detecta uma proteína modificada do próprio hospedeiro (estrela vermelha) talvez como um complexo que se liga à proteína *Avr* do patógeno (MCDOWELL & WOFFENDEM, 2003, adaptado).

O sistema de reconhecimento envolvendo produtos dos genes *R* e *Avr* desencadeia respostas de defesa do hospedeiro, sendo que uma dessas respostas é a Resposta Hipersensitiva (RH) que é ativada no ponto onde ocorre a agressão e resulta na morte celular programada das células situadas no local do contato entre planta e o agressor, o patógeno fica confinado na lesão necrótica impedindo assim que ele invada as células vizinhas (ODJAKOVA & HADJIIVANOVA, 2001; DODDS *et al.*, 2006).

Entre as características da RH estão o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, o fluxo de íons através das membranas celulares, a destruição de compartimentos, reforço das paredes celulares por deposição e ligação cruzada de polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas e fenólicos insolúveis, síntese de fitoalexinas, peptídeos e proteínas relacionadas à patogênese, conhecidas como PR (ODJAKOVA & HADJIIVANOVA, 2001; DODDS *et al.*, 2006).

Outra resposta de defesa é a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), desencadeada pela RH como um segundo sistema de defesa, que envolve células vizinhas não infectadas e mantém a planta protegida contra ataques subsequentes (ODJAKOVA & HADJIIVANOVA, 2001; DODDS *et al.*, 2006).

Os produtos dos genes *Avr* são inseridos nas células do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III. Em *Xf* não foram encontrados genes que codificam proteínas com similaridades significativas às várias seqüências de genes *Avr*, embora haja uma grande variabilidade desses genes. Isto sugere que *Xf* não necessita desses genes, talvez porque o inseto vetor inocule a bactéria diretamente nos vasos do xilema (SIMPSON *et al.*, 2000).

Sistema de secreção tipo III funciona injetando efetores de patogenicidade e/ou virulência diretamente no citoplasma das células hospedeiras, os quais podem agir suprimindo respostas de defesa da planta, favorecendo o desenvolvimento das doenças ou promovendo a liberação de nutrientes da célula vegetal. Em alguns casos, esses efetores secretados podem ser reconhecidos pela planta e dispararem o sistema de defesa vegetal, sendo então considerados efetores de avirulência (DOW & DANIELS, 2000).

Entretanto algumas das proteínas Reação Hipersensitiva e Patogenicidade (Hrp) que estão envolvidas no sistema de secreção tipo III, encontraram alto nível de similaridade no genoma de *Xf*. Um exemplo é o gene *xpsE*, responsável pela secreção de enzimas de degradação e toxinas (de SOUZA *et al.*, 2005b).

Um dos primeiros eventos observados no mecanismo de defesa das plantas é o fluxo de íons através da membrana plasmática e o estresse oxidativo. A mudança na permeabilidade da membrana plasmática leva ao influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) e hidrogênio (H^+) e ao efluxo de íons cloro (Cl^-) e potássio (K^+). O Ca^{2+} , através de interação com a NADPH oxidase e proteínas como a calmodulina (CaM) e Proteína Quinase Dependente de Cálcio (CDPK), desempenha um importante papel na defesa. Os genes que codificam proteínas CDPK e CaM são superexpressos no estresse oxidativo. Quando a CaM e uma cascata de Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) são ativadas, elas induzem ou suprimem vários fatores de transcrição (MCDOWELL & DANGL, 2000; WAN *et al.*, 2002).

Uma complexa rede de sinalização é ativada durante a resposta de defesa da planta, por sinalizadores como íons, canais iônicos, espécies reativas de oxigênio (ERO), ácido salicílico (SA), óxido nítrico (NO·), hormônio gasoso etileno (ETH), ácido jasmônico (JA), MAPK, fatores de transcrição, lipases, proteases, mudança no pH exocelular, entre outros, os quais resultam numa reprogramação do metabolismo celular (ODJAKOVA & HADJIIVANOVA, 2001; WAN *et al.*, 2002).

Estudos com diferentes sistemas planta-patógeno têm mostrado que as plantas ativam diferentes vias de defesa dependendo do tipo de agressor, sugerindo possíveis interações entre essas vias de sinalização. A via dependente de ETH/JA é ativada por patógenos necrotróficos que se alimentam de células de plantas mortas para obter seus nutrientes. A via dependente de SA é ativada por patógenos biotróficos que obtêm seus nutrientes de tecidos de plantas vivas. Alguns estudos indicam que essas vias são mutuamente inibitórias (MCDOWELL & DANGL, 2000; BRUGGER *et al.*, 2006).

Entre os mecanismos de defesa mais importantes da planta, está a explosão oxidativa, produzida através da geração de altos níveis de ERO durante a interação planta-patógeno, ocasionando um estresse oxidativo no patógeno. Assim, o sucesso no estabelecimento de patógenos na planta está diretamente relacionado a sua capacidade de resistir aos diferentes tipos de estresse, notadamente o oxidativo.

1.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

1.3.1 Origem

As EROs são formas parcialmente reduzidas do oxigênio molecular (O₂). O O₂ é essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos, é atóxico e não é muito reativo, devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa, mas alterações na distribuição dos elétrons podem ativá-lo, como uma fotoexcitação, levando a formação de oxigênio singlete (¹O₂) ou através de sucessivas adições de 1, 2 ou 3 elétrons, produzindo respectivamente radical ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxil (HO·) (Figura 5) (MITTLER, 2002; RESENDE *et al.*, 2003).

O ânion $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerado pela NADPH oxidase da membrana plasmática, por peroxidases (POX) da parede celular e lipoxigenases (LOX), como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto. Nos cloroplastos, é gerado através da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada para o O_2 . $O_2^{\bullet-}$ oxida várias moléculas orgânicas como o ascorbato, tióis, tocoferol e catecolaminas e reduz metais como o Fe^{3+} nas reações de Fenton ou oxida grupos [4Fe-4S] de desidratases através da reação de Haber-Weiss liberando Fe^{2+} e quando protonado produz o radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), que pode converter ácidos graxos a peróxidos lipídicos tóxicos, destruindo membranas biológicas (FARR & KOGOMA, 1991; FRIDOVICH, 1997; GRANT & LOAKE, 2000; RESENDE *et al.*, 2003).

H_2O_2 é relativamente estável e eletricamente neutro, por isso é capaz de atravessar as membranas celulares e alcançar locais distantes de onde foi produzido. O H_2O_2 é produzido através da redução de O_2 a $O_2^{\bullet-}$ seguida pela dismutação espontânea ou catalisada de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , também pode ser gerado por uma peroxidase dependente de pH no apoplasto. O H_2O_2 oxida glutatona, grupos tióis e reage com íons ferro e cobre reduzidos para gerar HO^{\bullet} na reação de Fenton, participa do cruzamento oxidativo de proteínas da parede celular reforçando-a, além de atuar como substrato das peroxidases e disparar a química de lignificação (WOJTASZEK, 1997; RESENDE *et al.*, 2003).

O radical HO^{\bullet} é extremamente reativo, pode reagir com proteínas reduzindo a atividade de enzimas, reagir com lipídios causando lipoperoxidação e aumentar a permeabilidade de membranas e ainda reagir com o DNA causando mutações (GRANT & LOAKE, 2000; RESENDE *et al.*, 2003).

O 1O_2 gerado nos cloroplastos, através da transferência de energia de uma clorofila fotoexcitada para o O_2 , reage facilmente com ligações duplas e tem alta afinidade com dienos da cadeia acíclica dos fosfolipídios da membrana e aminoácidos específicos como histidina, metionina, triptofano e cisteína (RESENDE *et al.*, 2003).

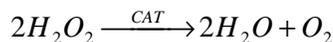
1.3.2 Detoxificação e Reparo

Para que um microrganismo tenha condições de colonizar e se multiplicar no interior de uma planta, ele deve possuir um mecanismo específico para se proteger da explosão oxidativa. Este mecanismo é caracterizado pela ação de um grupo de genes, conhecidos como genes de resposta ao estresse oxidativo (OSR). Estes genes codificam enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) e enzimas de reparo (FRIDOVICH, 1998; MITTLER *et al.*, 1999; STORZ & IMLAY, 1999; POMPOSIELLO & DEMPLE, 2002; BROWN *et al.*, 2003; ANDERSON & PADHYE, 2004; ZEIER *et al.*, 2004).

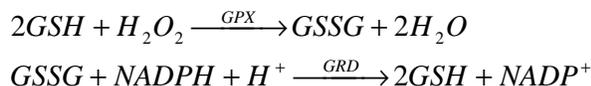
As SODs são enzimas que catalisam a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e podem estar ligadas a um metal (cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe)) (RESENDE *et al.*, 2003; RIO *et al.*, 2002).



As CATs são enzimas que convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 . Podem ser localizadas nos peroxissomos de muitos organismos, incluindo fungos, quando aplicadas nas células vegetais, impedem a ação positiva do gene da glicose oxidase na resistência do hospedeiro e inibem a explosão oxidativa, a produção de fitoalexinas e a ação de H_2O_2 na RH (MITTLER, 2002; RESENDE *et al.*, 2003).



Além da CAT e da SOD, outra enzima que atua como antioxidante é a glutathione peroxidase (GPX) que utiliza a glutathione (GSH) como agente redutor do H_2O_2 . A glutathione oxidada (GSSG) é reduzida depois pela glutathione redutase (GRD) dependente de NADPH.



As enzimas endonuclease IV, Dps e exonuclease III são exemplos de enzimas responsáveis por proteger e/ou reparar danos no DNA causados por estresse oxidativo (FARR & KOGOMA, 1991; FRIDOVICH, 1997; CABISCOL *et al.*, 2000).

1.4 Paraquat®: um agente gerador de superóxidos

Paraquat® (1,1'-dimetil-4,4'-dicloreto de biperidínio), também conhecido como metil viologeno, é um herbicida biperidil amônio quaternário de contato. Esse composto é reduzido com o auxílio de NADPH como doadora de elétrons e na presença de O_2 é oxidado gerando $O_2^{\bullet-}$, podendo ser reduzido novamente por NADPH criando assim, um ciclo redox, o qual é catalisado pela enzima NADPH citocromo-P450 redutase (Figura 6) (KITZLER *et al.*, 1990).

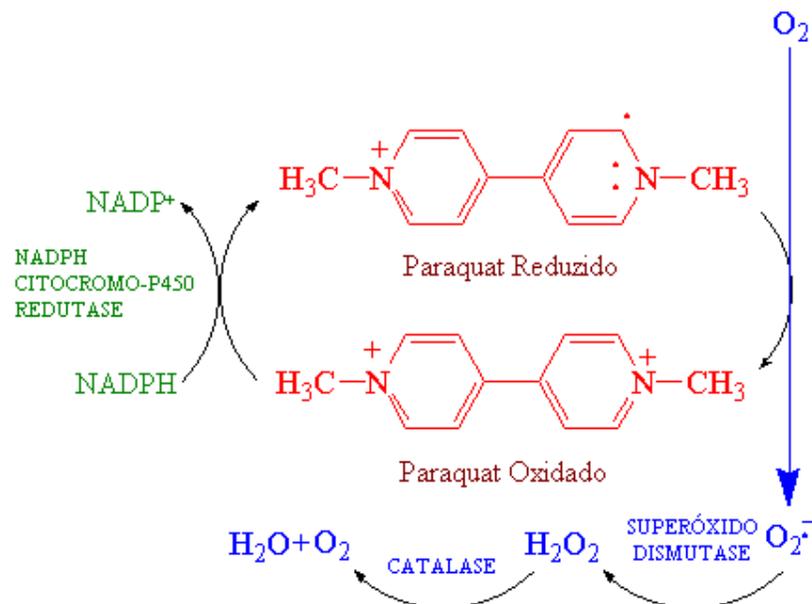


Figura 6: Ciclo redox do Paraquat®. O Paraquat® é reduzido através da NADPH como doadora de elétrons. Na presença de O_2 , é oxidado formando radical superóxido, podendo ser novamente reduzido por NADPH, formado assim, um ciclo redox. Fonte: <http://biologi.uio.no/plfys/haa/okologi/ugras.htm> (modificado).

O radical $O_2^{\bullet-}$ é detoxificado por SOD gerando H_2O_2 que é detoxificado por CAT. Por este motivo ele é um eficiente indutor de respostas generalizadas em condições de estresse oxidativo, sendo muito utilizado para análises biológicas dos seus efeitos.

O ciclo redox do Paraquat® oferece duas ameaças as células: primeiro a produção de ERO e segundo o consumo de agentes redutores (NADPH, GSH) do meio, limitando assim as capacidades biossintéticas das células. Paraquat® induz a expressão da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a primeira enzima da via das pentoses - fosfato, via que fornece NADPH, e também induz a expressão de duas enzimas do Ciclo de Krebs, a fumarase

C e a aconitase, enzimas que reduzem o NADP^+ a NADPH, garantindo assim o fornecimento de NADPH ao meio (BUS & GIBSON, 1984; POMPOSIELLO & DEMPLE, 2002).

O radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, gerado por Paraquat®, causa lesões nas membranas celulares através da lipoperoxidação, o radical oxida o lipídio formando um radical lipídio que na presença de O_2 forma um lipídio hidroperóxido. O radical peróxido lipídio retira o hidrogênio de outra molécula de lipídio que pode reagir com outro O_2 , num processo que pode ser repetido várias vezes originando uma reação em cadeia. A lipoperoxidação causa perda da função da membrana levando a morte celular e os radicais lipídios formados podem reagir com outras moléculas como proteínas e ácidos nucleicos. A peroxidação causada por Paraquat® pode ser prevenida por vitamina E, vitamina C, GSH, SOD e CAT (BUECHTER, 1988).

1.5 Reguladores de transcrição

Escherichia coli (*E.coli*) tem sido um excelente modelo para estudos de regulação gênica em resposta ao estresse oxidativo. Dois reguladores transcricionais têm sido bem definidos em *E.coli*, o OxyR, induzido por H_2O_2 e o SoxRS induzido por $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Os genes *soxR* e *soxS* codificam dois diferentes ativadores transcricionais que participam de uma cascata de ativação que modulam vários outros genes que constituem o regulon SoxRS, tais como *sodA* (codifica a proteína superóxido dismutase-mangans), *zwf* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *acnA* (aconitase A), *fumC* (fumarase C), *acrAB* (bomba de efluxo de drogas), *micF* (ácido ribonucleico (RNA) que regula a repressão da porina OmpF), *nfo* (endonuclease IV) entre outros (POMPOSIELLO & DEMPLE, 2001; ZHENG *et al.*, 2001).

O SoxR é um homodímero contendo dois centros [2Fe-2S] que são oxidados por $\text{O}_2^{\bullet-}$, age como sensor do regulon SoxRS e aumentam a transcrição do gene *soxS*, cuja proteína se liga na região promotora dos genes regulados (FRIDOVICH, 1998)

O H_2O_2 ativa o gene *oxyR* que regula a expressão de vários genes que fazem parte do regulon OxyR, tais como os genes *katG* (catalase ou hidroperoxidase I), *gorA* (glutathione redutase), *ahpCF* (alquil hidroperóxido redutase), *grxA* (glutarredoxina I), *trxC* (tioredoxina II), *fur* (repressor da entrada de ferro), *dps* (proteína de ligação ao DNA), *oxyS* (codifica um pequeno RNA regulatório) entre outros. Entre os genes reprimidos estão o *flu* (proteína de

membrana externa antígeno 43) e o *fhuF* (redutase íon férrico) (PRIETO-ÁLAMO *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2001).

A transcrição do regulon OxyR ocorre pela proteína OxyR oxidada. O H₂O₂ oxida duas cisteínas formando pontes dissulfeto intramolecular, podendo a proteína OxyR ser reduzida novamente pela GrxA dependente de GSH, indicando assim uma autoregulação do OxyR (STORZ & IMLAY, 1999; PRIETO-ÁLAMO *et al.*, 2000).

H₂O₂ oxida um resíduo específico de cisteína da proteína OxyR, causando mudança conformacional na estrutura terciária do tetrâmero OxyR, alterando sua especificidade de ligação ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e resultando num aumento da transcrição de *katG* e de vários outros genes dependentes de OxyR (SCHELLHORN, 1994).

Análises realizadas com os dados obtidos a partir do seqüenciamento da *Xf*, demonstraram que esta bactéria é convenientemente provida de genes capazes de detoxificar ERO, incluindo genes que codificam CAT, SOD, GRD, alquil hidroperóxido redutase (AHP) e glutationa-S-transferase (GST), assim como genes capazes de reparar danos causados por ERO, principalmente no DNA (*mutT*, *fpg*, *xth*, etc.), além de genes reguladores de transcrição como o *oxyR* e a proteína de Resistência a Hidroperóxidos Orgânicos (*Ohr*) (SIMPSON *et al.*, 2000).

No entanto, não foram encontradas seqüências homólogas ao regulador transcricional SoxRS. Estes dados demonstram uma discrepância particularmente notável, uma vez que genes que são normalmente ativados por este fator de transcrição estão presentes no genoma de *Xf* (*fumC*, *sod*, *zwf*, etc.) (SIMPSON *et al.*, 2000).

Para avaliar o perfil transcricional de microrganismos em diferentes condições, incluindo estresse oxidativo, a ferramenta muito utilizada atualmente é a técnica de hibridação em microarranjos, que fornece uma análise global da modulação da expressão de milhares de genes num único experimento.

1.6 Microarranjos de DNA

Microarranjo é uma poderosa ferramenta usada para análise global de padrões de expressão gênica. Várias plataformas de microarranjos têm sido fabricadas incluindo plataformas de DNA, de peptídeos, de pequenas moléculas, proteínas e células. Dezenas de milhares de fragmentos de DNA podem ser amplificados e espotados num único arranjo de alta densidade. A técnica parte de um princípio básico: a habilidade de uma seqüência de nucleotídeos de fita simples hibridar com sua seqüência complementar e formar uma dupla fita de DNA (FADIEL & NAFTOLIN, 2003; HU *et al.*, 2006).

Os microarranjos de DNA também têm sido usados para análise comparativa e perfil transcricional de várias bactérias patogênicas incluindo *Mycobacterium tuberculosis* (BEHR *et al.*, 1999), *Helicobacter pylori* (SALAMA *et al.*, 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (WOLFGANG *et al.*, 2003; SALUNKHE *et al.*, 2005), *Bacillus anthracis* (READ *et al.*, 2003), *Yersinia pestis* e *pseudotuberculosis* (HINCHLIFFE *et al.*, 2003); *Escherichia coli* (ZHENG *et al.*, 2001), entre outras.

O seqüenciamento completo do genoma de *Xf* (SIMPSON *et al.*, 2000), possibilitou a construção, em nosso laboratório, do microarranjo de DNA que contém seqüências representativas de aproximadamente 2.200 Fases Abertas de Leitura (ORF) do isolado *Xf* 9a5c. Este chip tem sido utilizado para análise genômica comparativa de diferentes isolados de *Xf* (de OLIVEIRA *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2003) e análise do perfil transcricional de isolados de *Xf* em diferentes condições (de SOUZA *et al.*, 2003, 2004 e 2005a; PASHALIDIS *et al.*, 2005).

Para análise do perfil transcricional, o RNA é extraído de uma amostra de células de interesse e de uma amostra controle apropriada, por exemplo, uma amostra de células doentes e uma de células normais. Cada amostra deve ser convertida em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) através da Transcriptase Reversa – Reação de Polimerase em Cadeia (RT - PCR) e marcada com moléculas fluorescentes, geralmente usa-se molécula fluorescente verde cyanina 3 (Cy3 - para a amostra controle) e molécula fluorescente vermelha cyanina 5 (Cy5 - para a amostra experimental), uma quantidade igual de volume das amostras são unidas, desnaturadas e hibridadas num único chip, sendo chamadas de alvos (FADIEL & NAFTOLIN, 2003; GOLDSMITH & DHANASEKARAN, 2004).

Ambas amostras alvo vão competir pelos sítios de ligação correspondentes na sonda, esta técnica é conhecida como hibridação competitiva, a amostra que conter maior quantidade

de um determinado gene irá inibir a hibridação da outra, então para cada coordenada no chip, a intensidade fluorescente vermelha ou verde é diretamente proporcional a quantidade de alvo presente em cada amostra comparada com a outra (Figura 7).

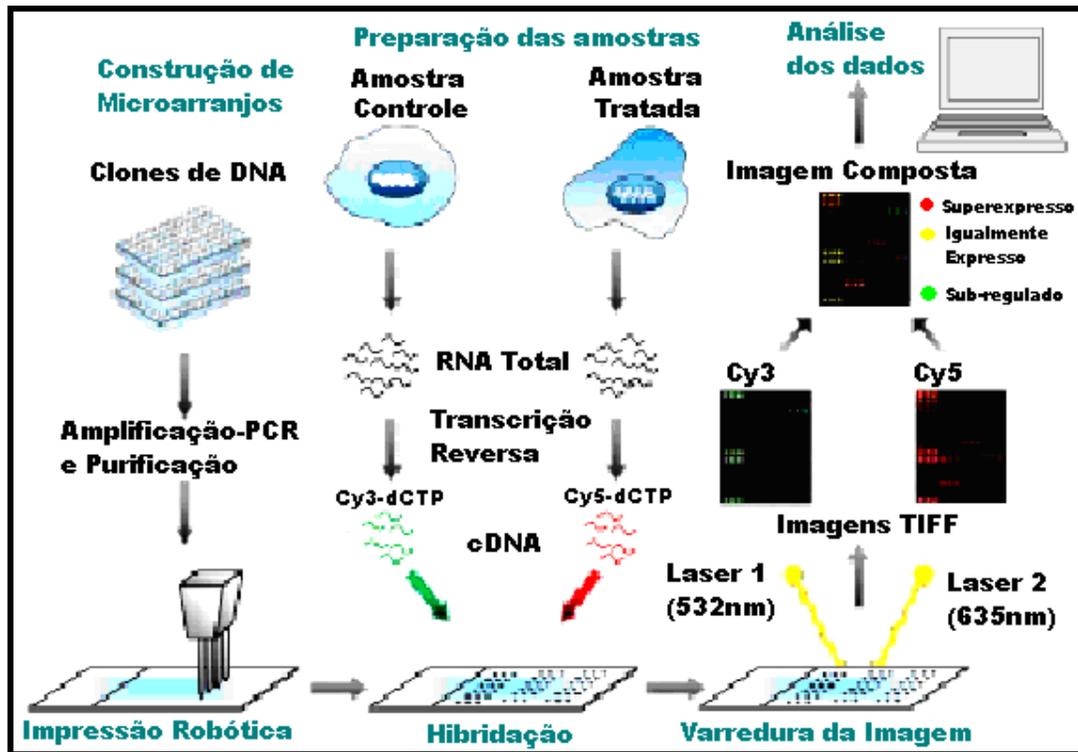


Figura 7: Técnica de hibridação em microarranjos de DNA. As sondas são amplificadas por PCR e impressas no chip usando um robô. As amostras de RNA, experimental e controle, são extraídas, convertidas em cDNA e marcadas com Cy3 (verde) e Cy5 (vermelho). As amostras são unidas e hibridadas no microarranjo, em seguida são lavadas para remover sondas não hibridadas, o chip é submetido ao laser do “scanner” e o sinal de fluorescência é medido no canal de cada cor. Programas de computador são utilizados para avaliar a intensidade de fluorescência e a razão de intensidade de cada ponto, os quais são analisados estatisticamente e a expressão de cada gene é identificada (WHITE & SALAMONSEN, 2005, modificado).

Microarranjos geram uma lista de genes candidatos que podem ser verificados após a aquisição de dados, esses devem ser normalizados, filtrados e validados. A validação dos resultados é muito importante, devido ao grande número de genes analisados que resultam na geração de falso-positivo. Essa validação pode ser feita usando “Northern” ou “Western blotting”, PCR em Tempo Real ou hibridações *in situ* (FADIEL & NAFTOLIN, 2003; GOLDSMITH & DHANASEKARAN, 2004).

2 Objetivo

Sendo a planta capaz de ativar uma resposta de defesa, mediada pela geração de ERO, contra *Xylella fastidiosa*, o objetivo do presente trabalho é analisar o perfil transcricional de *Xylella fastidiosa* sob condições de estresse oxidativo induzido por Paraquat®, utilizando a técnica de microarranjos.

3 Métodos

3.1 Cultivo de *Xylella fastidiosa*

Xf (isolado 9a5c) foi cultivada em 15 mL de meio líquido CCON (CIRAULO, 2006), a 28°C em agitação constante de 150 rpm, em um agitador orbital (Orbit Environ Shaker Lab-Line). Foram feitos repiques semanais (1:10 mL) e o crescimento celular foi monitorado diariamente através de leituras de densidade óptica (DO₆₀₀), com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Visível Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000.

O meio de cultura CCON possui em sua composição K₂HPO₄ (8,6 mM), KH₂PO₄ (7,3 mM), MgSO₄.7H₂O (1,2 mM), peptona de soja (2,0 g/L), triptona (0,5 g/L), hemina clorada (0,008 mM), vermelho de fenol (0,029 mM), D-biotina (1 x 10⁻⁴ g/L), H₂O deionizada (q.s.p. 1L), L-glutamina (27,4 mM), pirofosfato férrico (0,2 mM), glutatona reduzida (0,010 mM) e glicose (5,5 mM). Os componentes: K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, D-biotina, vermelho de fenol, peptona de soja, triptona, hemina clorada foram pesados e dissolvidos em 779 mL de H₂O deionizada, o pH da solução foi ajustado entre 6,6 e 6,7 utilizando HCl ou KOH, em seguida a solução foi autoclavada por 20 minutos a 120°C e 1 atm. Pirofosfato férrico, L-glutamina e glicose foram dissolvidos separadamente em 60 mL, 100 mL e 50 mL de H₂O deionizada respectivamente, uma solução de glutatona 20mM foi preparada separadamente, 0,5 mL dessa solução foi adicionado a solução de glutamina e essas soluções foram em seguida filtradas em filtro de polifluoreto de vinila (PVF) com poro de 0,22 µm (Millipore). As soluções, autoclavada e a filtrada, foram mantidas em estufa a 28° C por 24 horas para teste de esterilidade, sendo depois unidas e homogeneizadas para uso.

Periodicamente, as células de *Xf* foram semeadas em placas de Petri contendo meio CCON sólido para a obtenção de colônias, com o objetivo de avaliar a morfologia das colônias e confirmar a identidade bacteriana através de PCR de colônia. Além disso, foram feitas observações das células bacterianas de cultura líquida através de microscópio e coloração de Gram.

Para os experimentos de PCR foram utilizados iniciadores específicos para *Xf* (CVC-1 5'AGATGAAAACAATCATGCAAA3' e 272-2-int 5'GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT3'). Uma colônia de *Xf* foi ressuspensa em 10µL de água ultrapura autoclavada, em seguida foi aquecida a 95°C por 5 minutos e centrifugada 20800 g por 3 minutos. A PCR foi realizada com uma solução contendo 2µL da amostra de bactérias lisadas, 1µL de mistura de dNTP (10mM), 1µL de iniciador CVC-1, 1µL de iniciador 272-2-int, 5µL de tampão cloreto de magnésio (MgCl₂) GeneAmp Buffer 10X (Applied Biosystems), 1µL de enzima AmpliTaq 2U (Applied Biosystems) e água ultrapura autoclavada q.s.p 50µL.

A amplificação por PCR foi realizada a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 10 min a 72°C, após os 30 ciclos a solução era mantida a 4°C por tempo indefinido. Também foi preparada uma solução com DNA de *Xf* para controle positivo (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Após a amplificação por PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1.2%) com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), utilizando-se 5 µL dos produtos da PCR para verificação do resultado e o marcador λDNA/*Hind III* Fragments 0,5µg/µL (Invitrogen) para comparação do peso molecular. A visualização do gel foi realizada com tampão TBE mais brometo de etídio, com o auxílio de um transluminador de luz UV (TFX-20M Life Technologies™ Gibco BRL UV Transilluminator) (Figura 8).

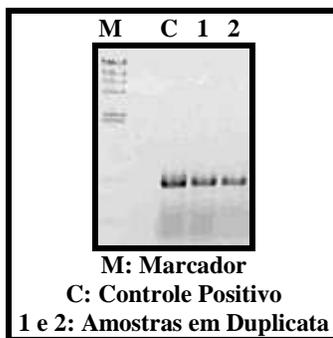


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose das amostras de células de *Xylella fastidiosa* amplificadas por PCR.

3.2 Determinação da curva de crescimento de *Xf*

Para a construção da curva de crescimento de *Xf*, foi repicada uma cultura em fase exponencial para um volume de 120mL com inóculo de 1:10 em meio líquido CCON. A cultura foi mantida a 28°C sob agitação constante de 150 rpm em um agitador orbital. As leituras de DO₆₀₀ foram feitas diariamente no espectrofotômetro UV-Visível Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000 a partir do primeiro dia de inoculação. Quando a DO₆₀₀ da cultura alcançou o valor de 0,3, o volume de 120mL foi fracionado em 6 volumes e a cada frasco foram adicionadas diferentes concentrações de Paraquat® (5 µM; 15 µM, 25 µM, 50 µM e 75 µM, além do controle não tratado) e as bactérias voltaram a ser incubadas nas condições descritas acima. A DO₆₀₀ continuou sendo lida diariamente até se atingir a fase estacionária de crescimento.

3.3 Estresse oxidativo *in planta*

A verificação da produção de O₂^{•-} *in planta* foi realizada usando uma solução de Tampão Fosfato de Sódio (PBS - pH 7,5) 0,05M contendo 0,05% de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (VENISSE *et al.*, 2001).

Folhas jovens de mudas de laranja doce foram retiradas e mergulhadas em recipientes contendo 15 mL da solução de PBS/NBT, uma controle (somente solução PBS/NBT) e outra com bactérias *Xf*, um volume de 15mL de cultura de bactérias em fase exponencial, foi centrifugado e o “pellet” ressuspenso em 15 mL da solução PBS/NBT.

Esses recipientes foram colocados dentro de um dessecador e submetidos a vácuo, por um intervalo de 6 horas. Vários experimentos com diferentes intervalos de tempo foram realizados e esse foi o intervalo que apresentou melhor pigmentação.

Após este intervalo, as folhas foram retiradas e cortes histológicos foram feitos no pecíolo de cada folha e essas seções foram observadas e fotografadas em microscópio óptico.

3.4 Estresse oxidativo *in vitro* com diferentes concentrações de Paraquat®

Para os experimentos de análise transcricional de *Xf* sob condições de estresse oxidativo, células foram cultivadas em 250 mL de meio CCON, inoculadas 1:10 a partir de uma cultura em fase exponencial. Estas culturas foram mantidas a 28°C sob agitação constante de 150 rpm, num agitador orbital. Quando estas culturas atingiram o valor da DO₆₀₀ igual a 0,3, cada frasco foi tratado com diferentes concentrações de Paraquat® (2 frascos para controle, 5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM e 75 µM) e após 48 horas, a cultura desses frascos foram transferidas para tubo plástico Nalgene, centrifugadas a 16.900 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os “pellets” mantidos no gelo para a extração de RNA.

3.5 Extração de RNA

RNA de *Xf* foi extraído a partir dos “pellets” das culturas descritas anteriormente. O RNA total de *Xf* foi obtido através da metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989), que consiste, brevemente, de uma reação de lise utilizando lisozima (0,5mg/mL) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (10%), seguido de extrações consecutivas com fenol (pH = 5) aquecido à 65°C e clorofórmio. O sobrenadante resultante das extrações foi acrescido de etanol 100% e acetato de sódio 3 M e incubado a -70°C por 20 minutos. O RNA precipitado, foi tratado com DNaseI Free RQ1 (10U/µL) a 37°C por 1 hora, sendo então novamente tratado com fenol, precipitado e ressuspenso em água. Antes de serem submetidos às reações de marcação, os RNAs foram quantificados através de absorbância a 260 nm e 280 nm, com o auxílio de um NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, e visualizadas em gel de agarose desnaturante (1%) a fim de verificar sua integridade e então submetidos a purificação com o auxílio do Kit RNeasy (Qiagen), permitindo a obtenção de material com grau de pureza satisfatório para as marcações. Só foram utilizadas as amostras de RNAs que não apresentavam degradação visível no gel e cuja DO mostrasse uma razão A₂₆₀/A₂₈₀ entre 1,9 e 2,0.

3.6 Marcação e hibridação das amostras de RNA

Foram utilizados 30 µg de RNA total purificado de cada amostra de *Xf* tratada com Paraquat® e da amostra controle para a síntese de cDNA. A síntese de 1ª fita foi realizada com cada amostra independente, utilizando 4µL de mistura de iniciadores (100µM) de *Xf*, 1µL de RNA de λQ 20ng/µL (controle positivo), 0,5µL de iniciador λQ Plus AS 10mM (5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGTTGGGTAAG3'), 10µL de RNA alvo (30µg), 4µL de H₂O ultrapura autoclavada (RNase “free”) totalizando 19,5µL de solução final.

A solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos para desnaturar o RNA e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente para o anelamento dos iniciadores. Após esse período, foram adicionados 6µL de 5X “First Strand Buffer” (Invitrogen), 3µL Ditioneitol (DTT) 0,1M, 0,6µL de mistura de dNTPs (25mM de cada dNTP), 1µL de “Superscript” II RT (200 U/µL-Invitrogen) e a solução foi incubada por 2 horas a 42°C. Depois de 2 horas, foi acrescentado 1µL de RNase (10mg/mL) para degradar o RNA molde e a solução permaneceu por mais 30 minutos a 37°C. A purificação foi realizada em Microcon YM-30 (Millipore) e o volume final ajustado para 21µL.

Para marcar o cDNA sintetizado, a solução foi aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturar o cDNA e em seguida foram adicionados 20µL de 2,5X de iniciadores randômicos, 5µL de mistura de dNTPs (dATP 24mM, dTTP 24mM, dGTP 24mM e dCTP 12mM – Amersham Bioscience), 1µL de Klenow 40U/µL (Invitrogen) e 2µL de Fluorolink dCTP-Cy3 25nmol (Amersham Bioscience) para a amostra controle e 2µL de dCTP-Cy5 25nmol (Amersham Bioscience) para a amostra tratada com Paraquat®.

Essa reação foi incubada a 37°C por 2 horas, purificada em Microcon YM-30 (Millipore) em 3 lavagens consecutivas utilizando-se 400µL de H₂O ultrapura autoclavada para remoção de nucleotídeos não incorporados, as duas amostras (controle e tratada) foram unidas num único tubo e o volume final foi completamente seco em “speed vac”.

Amostras de cDNA marcadas independentemente com os dois fluoróforos foram ressuspendidas em 100µL de solução de hibridação (6X Citrato Salino de Sódio (SSC), 5X Denhart's, 0,25 mg/ml de DNA de esperma de salmão, 0,5% SDS, 50% Formamida) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. A solução foi então hibridada contra um chip de *Xf* 9a5c por um período de 14 horas a 42°C, em uma estação de hibridação GeneTac (Genomic Solutions). Após a hibridação, os chips foram lavados duas vezes a 42°C em solução 0,5X SSC, 0,01% SDS, seguida por duas lavagens em solução 0,06X SSC, 0,01% SDS e duas

lavagens finais em 0,06X SSC. Cada lavagem consiste de 1 minuto de fluxo, seguida de 5 min de incubação sem agitação a 25°C.

Após o período de lavagem, o chip foi centrifugado a 20°C, 1500 g por 2 min para secar, em seguida foi realizada a varredura da imagem da intensidade de fluorescência de cada fluoróforo, utilizando-se um “scanner” óptico Affymetrix 418, nos comprimentos de onda 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5).

3.7 Análise estatística dos resultados

Para cada condição experimental testada (hibridação com cDNAs obtidos de células tratadas com diferentes concentrações de Paraquat®) foram realizados dois pares de experimentos independentes, com troca de fluoróforos (“Dye Swap”). Em cada par, há uma hibridação em que a amostra referência (controle) é marcada com Cy3 e a amostra teste (tratada) é marcada com Cy5 e uma hibridação onde esta ordem de marcação é invertida (referência-Cy5 e teste-Cy3). No total, cada condição experimental testada é analisada a partir de 8 leituras de intensidade para cada ponto, uma vez que cada biochip carrega duplicatas do arranjo. Nas hibridações com amostras de cDNA é importante ressaltar que cada par de “DyeSwap” é feito com uma preparação diferente de RNA, de maneira a contemplar tanto réplicas técnicas como réplicas biológicas do mesmo experimento.

Os chips submetidos ao “scanner” geraram imagens de hibridação para cada um dos fluoróforos (Cy3 e Cy5) independentemente. Para cada uma dessas leituras, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados de forma a minimizar o “background” e evitar a saturação de sinal nos pontos do microarranjo.

A análise preliminar das imagens foi realizada pelo programa TIGR Spotfinder v.2.2.4 que delimita as áreas dos pontos a partir da imagem bruta. Através de um algoritmo de segmentação de histograma, os “pixels” pertencentes a cada ponto são identificados e quantificados, gerando para cada ponto um valor integrado de intensidade, já descontado o “background” local. Foram excluídos das análises todos os pontos que tinham valores inferiores ao “background” local mais 2 desvios-padrão. Os dados referentes às intensidades de fluorescência dos dois canais foram salvos em um arquivo contendo a extensão .mev.

Para a análise dos experimentos de hibridação com as amostras de cDNA obtido de células tratadas com Paraquat®, os valores de intensidade contidos nos arquivos .mev foram submetidos a uma série de transformações matemáticas com o auxílio do programa TIGR

Midas. Assim, cada arquivo .mev foi filtrado, de maneira a retirar ponto cujos valores integrados fossem inferiores a 10.000 unidades análogo-digitais (a/d). Depois disso, as intensidades dos dois canais (Cy3 e Cy5) foram normalizadas pelo algoritmo matemático conhecido como “Lowess” de regressão não-linear, que utiliza fatores de normalização intensidade-dependentes para diferentes pontos, de acordo com a intensidade de seus respectivos sinais. As variações nos valores de expressão em cada setor do chip foram então equalizadas, utilizando-se a opção de regularização de desvio-padrão (“Block Mode”) (DUDOIT, 2002).

Os dados foram então submetidos a uma checagem de consistência a fim de reduzir erros sistemáticos entre os experimentos, sendo excluídos os pontos que apresentavam inconsistência com seu par.

As planilhas contendo os dados finais das análises foram carregadas em um outro programa do pacote TIGR denominado “MultiExperiment Viewer” (MEV) v3.03 onde foi feita a normalização entre os experimentos e a análise de variância (ANOVA) entre os grupos, utilizando-se valor de $p=0,01$ como limite de confiabilidade para identificar genes com variação de expressão estatisticamente significativa. Em seguida, os genes foram agrupados por um algoritmo de clusterização hierárquica, a fim de permitir a visualização dos genes super regulados durante a resposta a estresse oxidativo. Todos os softwares empregados nestes estudos, bem como detalhes referentes à sua utilização podem ser obtidos em <http://www.tigr.org/software>.

3.8 Quantificação relativa da expressão gênica através de PCR em Tempo Real

Para validar os resultados obtidos com as hibridações em microarranjos, foram realizados experimentos utilizando a técnica de PCR em Tempo Real com o auxílio do aparelho Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

O experimento foi realizado utilizando-se 50 µg de RNA total extraído das culturas de *Xf*, tratada e não tratada com Paraquat®. Primeiramente, foi sintetizada a 1ª fita de cDNA utilizando 4µL de mistura de iniciadores de *Xf*, 1µL de RNA de λQ 20ng/µL (controle positivo), 0,5µL de iniciador λQ Plus AS 10mM

(5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGTTGGGTAAG3'), 10µL de RNA alvo (30µg), 4µL de H₂O ultrapura autoclavada (RNase “free”) totalizando 19,5µL de solução final.

Para cada reação de amplificação no aparelho Real Time-PCR, foram utilizados 300 ng de cDNA, as amplificações foram realizadas sempre em triplicata e um controle negativo era feito sem amostra de cDNA. Em cada reação foram adicionados 10 µL da TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de sonda TaqMan® contendo os iniciadores “forward” e “reverse” (Applied Biosystems) e 9 µL da amostra de cDNA, totalizando 20 µL de reação em cada poço da placa.

O controle endógeno utilizado nas reações foi a ORF XF1468, que corresponde ao gene *mrsA*, escolhida devido a sua expressão gênica ter sido similar nos experimentos de microarranjo de *Xf* nas amostras tratada e não tratada. As ORFs XF1529, XF0263 e XF1531, que correspondem aos genes *hsf*, *cvaC* e *ahpF* respectivamente, foram utilizadas como alvos. Os iniciadores e o controle endógeno foram desenhados utilizando o Primer Express software (Applied Biosystems). O controle endógeno foi utilizado para normalizar as amostras, para diferenças na quantidade de cDNA adicionado em cada reação.

A amplificação foi realizada em 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Como calibrador foi utilizada a amostra controle de cultura de *Xf* não tratada.

4 Resultados

4.1 Curva de crescimento de *Xylella fastidiosa* na presença de

Paraquat®

Para sabermos qual o melhor momento para se extrair o RNA das células de *Xf*, submetidas ao estresse oxidativo induzido por Paraquat®, foi plotada uma curva de crescimento da bactéria em diferentes concentrações do agente oxidante e seu crescimento foi acompanhado diariamente através de leituras de DO₆₀₀. De acordo com o gráfico, após 48 horas da adição do Paraquat®, as curvas de crescimento diminuíram de acordo com a concentração crescente das doses de Paraquat®. Nos dias seguintes, as curvas com concentrações iguais a 5, 15, 25µM não apresentaram significativas diferenças entre si e as

curvas com concentrações iguais a 50 e 75 μ M mostraram uma queda bem acentuada em comparação com a curva controle. A extração de RNA foi feita após 48 horas da adição de Paraquat®, tempo correspondente a uma geração (Figura 9).

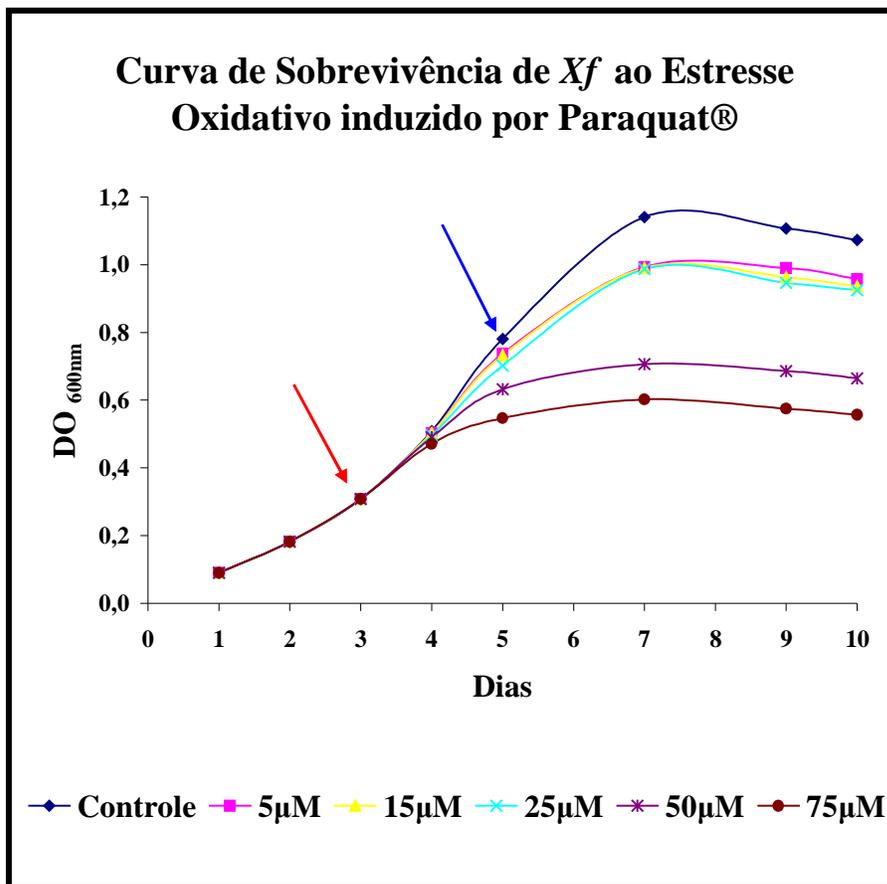


Figura 9: Curva de crescimento de *Xf* quando exposta a diferentes concentrações de Paraquat®. O crescimento bacteriano foi monitorado diariamente, através da leitura da DO₆₀₀, de cada cultura submetida ao estresse oxidativo induzido com as concentrações de Paraquat® descritas no gráfico. Cada ponto experimental representa a média de três leituras. A seta vermelha indica o dia no qual foi adicionado o Paraquat® e a seta azul indica o dia no qual as culturas foram centrifugadas para extração de RNA.

Estes experimentos mostraram que a taxa de crescimento da *Xf* é afetada numa correlação direta com o aumento de concentração da droga, refletindo a sensibilidade da bactéria à presença de ERO produzidas pelo Paraquat®. Esta inibição de crescimento ocorre em concentrações extremamente reduzidas, uma vez que experimentos idênticos demonstraram que diversas outras bactérias são capazes de sustentar taxas de crescimento inalteradas, mesmo em concentrações de até 100mM de Paraquat® (TURNER *et al.*, 1999; MERKMAMM *et al.*, 2001; POYART *et al.*, 2001; POMPOSIELLO *et al.*, 2003).

4.2 Estresse oxidativo *in planta*

Com a finalidade de comprovar a ativação da explosão oxidativa na planta, através da presença do patógeno em seu interior, foram realizados testes de infiltração a vácuo usando solução PBS/NBT. De acordo com a figura 10, podemos notar que a amostra que foi infiltrada com solução PBS/NBT mais bactéria *Xf* (Figura 10B), apresentou formação de um precipitado escuro no xilema, devido à reação entre o NBT e o $O_2^{\bullet-}$ formado pela planta como defesa contra o patógeno, essa reação produz esse complexo insolúvel de cor azul escuro conhecido como formazan, que é um indicador da formação de ERO (DOKE, 1983).

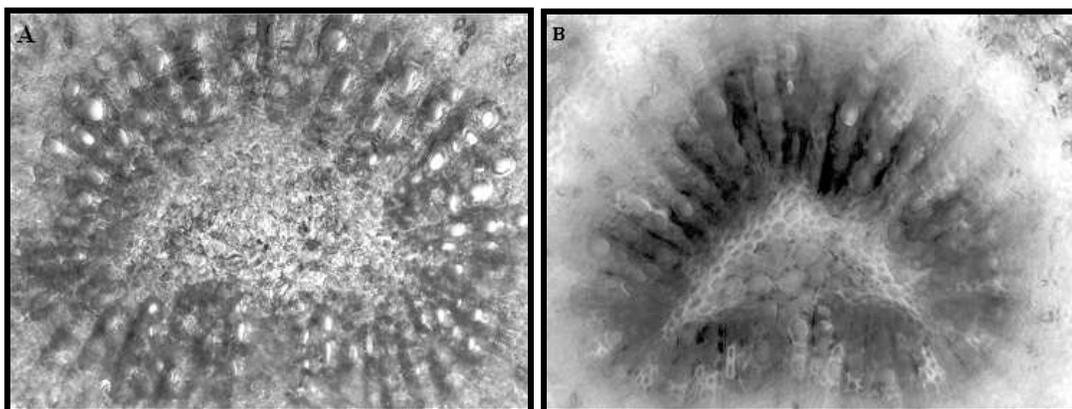


Figura 10: Folhas de laranja infiltradas a vácuo com solução PBS/NBT. A) Folha controle infiltrada somente com solução PBS/NBT. B) Folha infiltrada com PBS/NBT mais bactérias, apresentando precipitado escuro nos vasos do xilema, devido à reação que ocorre entre o $O_2^{\bullet-}$ e o corante NBT formando um complexo insolúvel de cor azul escura, chamado formazan.

4.3 Genes significativamente expressos na presença de Paraquat®

Para a verificação da variação no padrão de expressão gênica, células de culturas tratadas com diferentes concentrações de Paraquat®, foram centrifugadas após 48 horas do início do tratamento e seus RNAs foram extraídos e marcados com Cy3- ou Cy5-dCTP para a realização de experimentos de hibridação competitiva contra os biochips de *Xf* 9a5c. Os RNAs extraídos de células submetidas aos tratamentos mais intensos (50 μ M e 75 μ M), apresentaram uma baixa eficiência de incorporação do fluoróforo e um alto grau de degradação pós-extração, provavelmente devido à baixa tolerância da *Xf* a presença de ERO.

Já em condições mais moderadas de estresse oxidativo, as hibridações realizadas demonstraram que as células de *Xf* apresentaram uma significativa variação em seu transcriptoma, com consistente modulação de 665 genes (Figura 11). Uma análise mais detalhada dos genes modulados durante o tratamento com Paraquat® revela uma série de aspectos interessantes acerca da resposta de *Xf* a condições de estresse oxidativo, sobretudo entre os genes superexpressos pela bactéria (Figura 12).

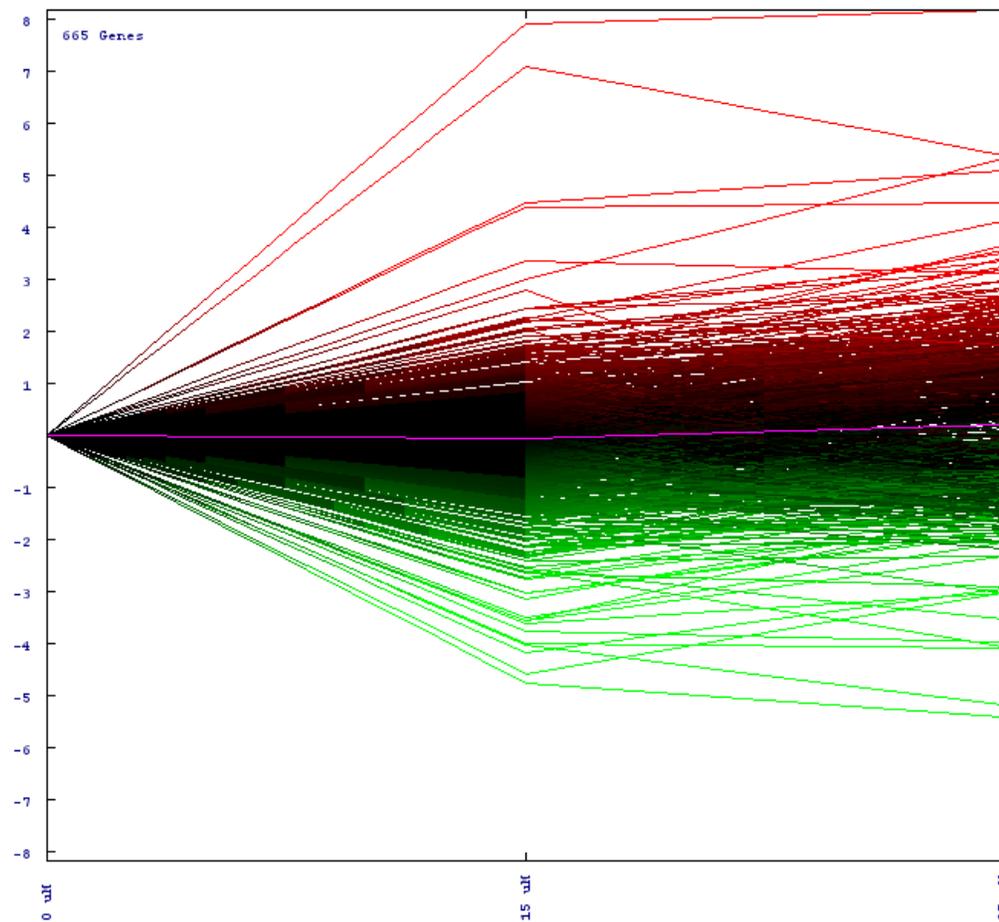


Figura 11: Padrões de variação de expressão de 665 genes identificados como modulados durante a resposta de *Xf* às condições de estresse oxidativo. A figura mostra as variações nos valores de log (Cy5/Cy3) em resposta às diferentes concentrações de Paraquat® testadas. A intensidade de coloração é proporcional ao nível da indução (para as linhas vermelhas) ou de repressão (linhas verdes) de cada gene, tomando-se como referência seus respectivos níveis de expressão em uma cultura controle crescida sem Paraquat®.

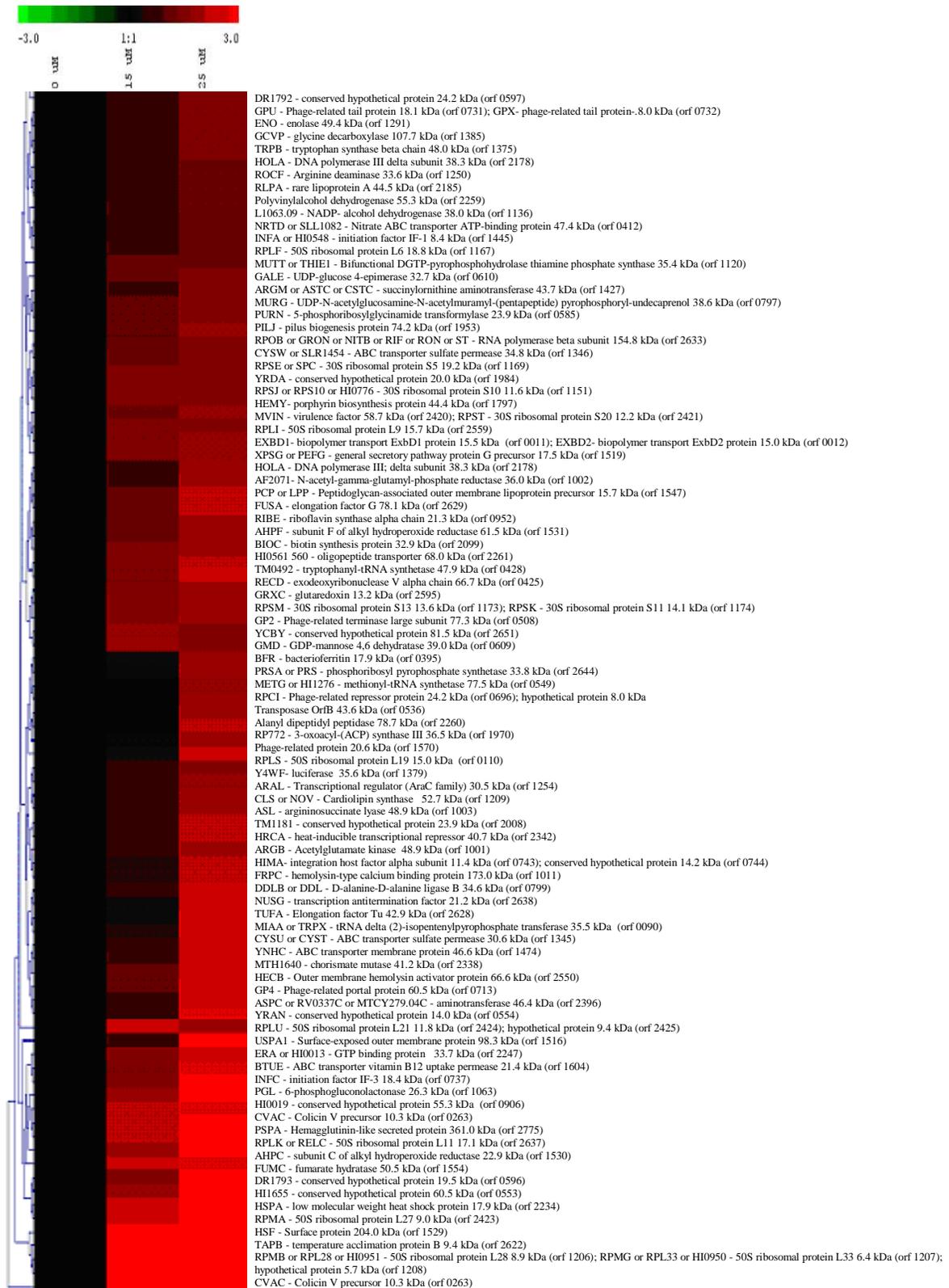


Figura 12: Diagrama de clusterização hierárquica mostrando os 93 genes com maior padrão de superexpressão em *Xf* submetida ao estresse oxidativo. De maneira a adequar o tamanho do “dataset”, o diagrama mostra apenas os genes com função putativa designada durante a anotação do genoma da *Xf* 9a5c, tendo sido retiradas da análise a maioria das ORFs hipotéticas e hipotéticas conservadas.

Em primeiro lugar, destaque deve ser dado para a existência de pontos comuns entre a resposta de *Xf* e de outras bactérias estudadas anteriormente, como no caso da superexpressão dos genes *ahpCF* (que codificam a enzima alquil hidroperóxido redutase), responsável pela detoxificação direta de H_2O_2 (função semelhante a do gene *katG*) e defesa contra ONO_2^- (MASTER *et al.*, 2002; SEAVER & IMLAY, 2001) e *fumC*, uma isoenzima da fumarato hidratase, expressa preferencialmente em condições de estresse oxidativo (GOH *et al.*, 2005).

Além disso, proteínas diretamente envolvidas com a manutenção do potencial redox intracelular, como a Glutarredoxina (HOLMGREEN, 1989; PRIETO-ÁLAMO *et al.*, 2000) e com a homeostase de íons ferro, como a Bacterioferritina (CARRONDO, 2003) também apresentam significativa e consistente superexpressão em resposta a Paraquat®.

A expressão constitutiva de outros genes associados à resposta contra agentes oxidantes (*sodA*, *kat*, *zwf* e outros) (POMPOSIELLO *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001) foi detectada em todas as condições testadas, apresentando sinais medianos significativamente superiores ao “background” local (valor médio dos “pixels” do “background” mais dois desvios-padrão), possibilitando a detoxificação completa dos radicais oxidantes formados e viabilizando a sobrevivência da célula diante das condições experimentais testadas.

Estudos realizados com *Pseudomonas aeruginosa* sugerem que os genes *fumC* e *sodA* residem no mesmo operon e que são regulados pelo *Fur* (HASSET *et al.*, 1997).

Um outro aspecto a destacar da análise dos genes superexpressos em resposta a Paraquat® é a ativação de expressão da ORF XF1254, que codifica um ativador transcricional (gene *araL*) pertencente à família AraC – a qual também pertence o regulador SoxS, ainda não identificado em *Xf* e responsável pela ativação de genes em resposta à presença de radicais superóxido (POMPOSIELLO *et al.*, 2003; CHANDLER & DEMPLE, 2004). Experimentos mais aprofundados, envolvendo ensaios de complementação em linhagens de *E.coli* mutantes para SoxS estão sendo conduzidos na esperança de verificar a identidade funcional desta ORF como o equivalente de SoxS em *Xf*.

Estes resultados sugerem duas possibilidades interessantes acerca do mecanismo de regulação gênica em *Xf*, em resposta a condições de estresse oxidativo: 1) os genes que codificam estes fatores de transcrição apresentaram um padrão de evolução diferenciado, desenvolvendo uma estrutura significativamente divergente do observado em outras bactérias, ou 2) o mecanismo de ativação gênica em resposta a estresse oxidativo, desenvolvido pela *Xf* é diferenciado, podendo depender de outros ativadores ou de outros processos bioquímicos, até então desconhecidos.

Seja qual for a resposta, é possível que as diferenças existentes estejam relacionadas à adaptação da bactéria aos sistemas vegetais, podendo fornecer interessantes informações a respeito da evolução dos sistemas fitopatogênicos. Além disso, os mecanismos de ativação dos genes OSR podem representar um sistema único da bactéria que pode servir como alvo de eficientes abordagens quimioterápicas para o controle da CVC.

Além disso, foi detectada superexpressão de uma surpreendente quantidade de genes potencialmente associados à virulência da *Xf* e à composição de sua superfície celular (SIMPSON *et al.*, 2000; de SOUZA *et al.*, 2003).

Dentre estes, destaque deve ser dado ao significativo aumento de expressão de proteínas de adesão, como *pilJ*, *pspA*, *uspA1* e *hsf* (DARZINS, 1994; ST GEME *et al.*, 1996; LAFONTAINE *et al.*, 2000; GREEN & DARWIN, 2004). Os resultados obtidos com *uspA1* e *hsf* são interessantes, uma vez que a superexpressão destes genes já foi detectada em células de *Xf* recém extraídas de plantas, que apresentam maior capacidade infectiva quando comparadas a culturas mantidas em laboratório por períodos prolongados de tempo (de SOUZA *et al.*, 2003).

Além das adesinas, outros fatores diretamente associados à composição do revestimento celular parecem ser ativados na presença de Paraquat®, como a proteína MTLB, uma mureína transglicosilase de membrana, reconhecidamente atuante em processos de reestruturação de parede durante a elongação celular e morfogênese em *Neisseria meningitidis* (ORF XF2184), ou a lipoproteína associada à peptidoglicana (Lpp - ORF XF1547). Ambas proteínas já foram caracterizadas como fatores de virulência em *N. meningitidis* e *Salmonella enterica*, embora ainda não haja evidência sobre seus eventuais papéis no processo de patogenicidade em *Xf* (ADU-BOBIE *et al.*, 2004; SHA *et al.*, 2004).

A proteína HecB (ORF XF2550) é outro fator associado à membrana bacteriana que apresenta superativação em condições de estresse oxidativo, sendo responsável pela ativação de moléculas de hemolisina, uma toxina secretada por diversos tipos de bactérias e com reconhecida capacidade citotóxica (ROJAS *et al.*, 2002). Curiosamente, o gene *frpC*, também aqui superexpresso, codifica uma hemolisina (THOMPSON *et al.*, 1993), sugerindo que a *Xf* estaria respondendo à presença de radicais oxidantes através da ativação de suas próprias toxinas, talvez na tentativa de eliminar outros tipos de células presentes ao seu redor.

Esta possibilidade é reforçada pela verificação de que outro gene (*cvaC*) responsável pela produção de colicinas (toxinas com ação bactericida de amplo espectro) também é superexpresso em resposta ao estresse oxidativo (HAVARSTEIN *et al.*, 1994).

4.4 Quantificação relativa da expressão gênica através de PCR em Tempo Real

Os resultados obtidos com a amplificação em PCR em Tempo Real estão representados na figura 13:

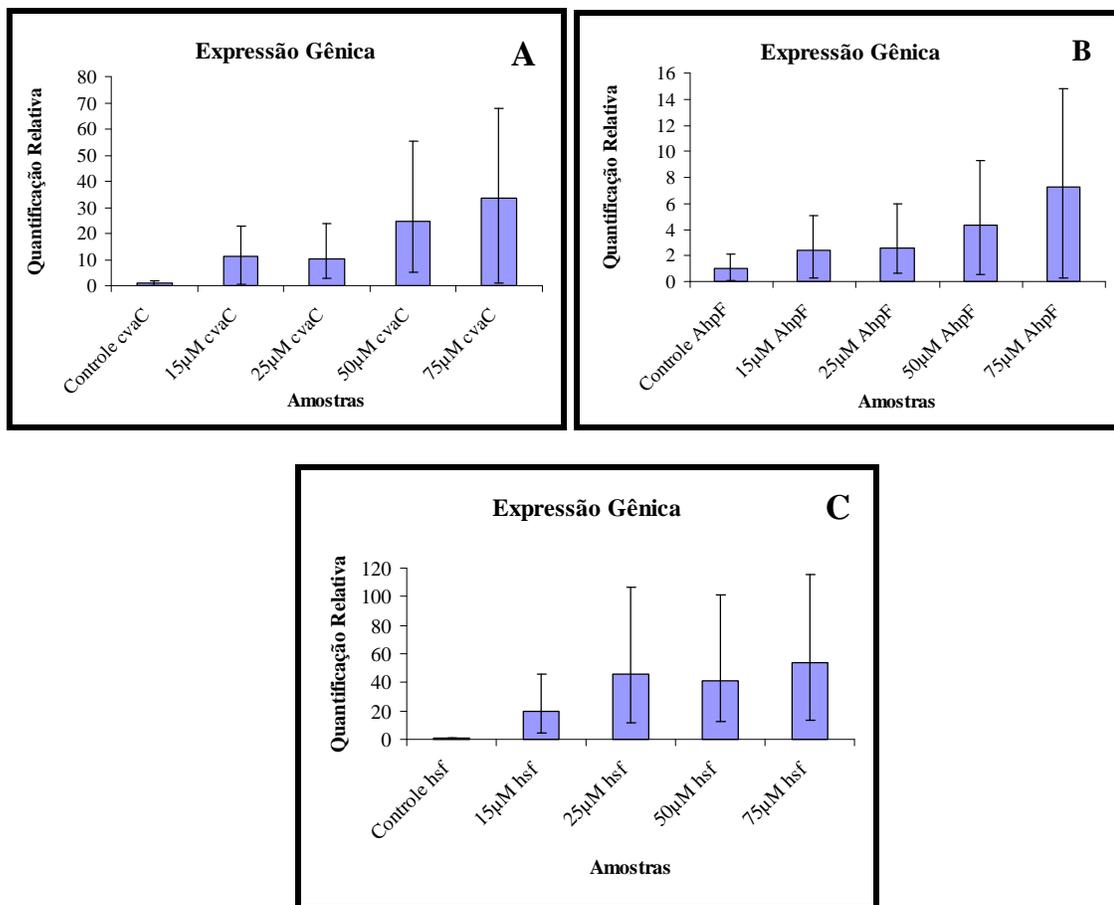


Figura 13: Quantificação relativa da expressão gênica dos genes *cvaC* (A), *ahpF* (B) e *hsf* (C) em culturas de *Xf* tratadas com diferentes concentrações de Paraquat® e cultura controle não tratada. Os valores representam o número de vezes da expressão dos genes na cultura tratada comparados com a cultura controle. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão entre elas.

Os resultados eram normalizados utilizando os Cts (Ciclos Iniciais) obtidos para o controle endógeno. O Ct é definido como o ciclo em que cada curva atravessa o limiar (“Threshold”), servindo como base para comparação entre amostras. Para a normalização, foi utilizada a equação: $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{controle endógeno})$, o número de vezes ou quantidade de cada gene em relação ao calibrador era determinado pela equação: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$ e a quantificação relativa era obtida por $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Os três genes escolhidos como alvos para os experimentos de PCR em Tempo Real foram o gene *cvaC* por codificar uma bacteriocina, o *ahpF* por ser um gene tipicamente expresso sob condições de estresse oxidativo e o *hsf* por codificar uma adesina.

A técnica PCR em Tempo Real foi utilizada para validar os experimentos realizados com hibridações em microarranjos de DNA e o gráfico nos mostra que estes genes foram superexpressos nas condições de estresse oxidativo confirmando os resultados observados nas hibridações de microarranjos. Segue abaixo, uma tabela comparativa dos valores de intensidade de fluorescência desses genes em \log_2 , nos experimentos em microarranjos e PCR em Tempo Real (Tabela 1):

Tabela 1: Comparação da expressão gênica entre os experimentos de microarranjos e PCR em Tempo Real. Os valores dos resultados de microarranjos são obtidos através do tratamento das imagens com ferramentas de bioinformática, e os valores dos experimentos de PCR em Tempo Real são obtidos através do software do fabricante e correspondem as quantificações relativas entre as amostras tratadas e a amostra controle em \log_2 .

Amostras	PCR em Tempo Real	Microarranjos
15mM <i>cvaC</i>	3,457	7,906
25mM <i>cvaC</i>	3,329	8,178
15mM <i>AhpF</i>	1,235	0,998
25mM <i>AhpF</i>	1,354	1,995
15mM <i>hsf</i>	4,306	2,994
25mM <i>hsf</i>	5,522	5,318

5 Discussão

Estudos relacionados à resposta da *Xf* ao estresse oxidativo foram realizados, uma vez que a resistência à explosão oxidativa da planta pode ser determinante para o sucesso do processo de infecção e colonização (BRIAT & LEBRUN, 1999; MORRISSEY & OSBOURN, 1999; PEDRAS *et al.*, 2000).

Surpreendentemente, a *Xf* revelou uma reduzida capacidade de resistência à presença de Paraquat® quando comparada a outras bactérias, capazes de sustentar ritmos inalterados de crescimento mesmo quando submetidas a concentrações mil vezes maiores (TURNER *et al.*, 1999; POYART *et al.*, 2001; MERKMAMM *et al.*, 2001; POMPOSIELLO *et al.*, 2003). O confinamento da *Xf* no interior dos vasos xilemáticos pode estar associado a esta baixa capacidade de resistência a ERO da *Xf* (ZEIER *et al.*, 2004).

A análise do perfil de expressão gênica da bactéria em resposta a concentrações crescentes de Paraquat®, mostrou alguns resultados condizentes com aqueles observados em outros sistemas, além de algumas surpresas (POMPOSIELLO *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001).

Alguns genes pertencentes aos regulons Sox e Oxy, ligados à resposta contra radicais superóxido e peróxido foram superexpressos da mesma forma como já observado em outros sistemas, como é o caso de *ahpC*, *ahpF* e *fumC*. Além disso, a superexpressão de um regulador transcricional pertencente à família AraC poderá finalmente levar à caracterização do fator equivalente ao ativador SoxS de *Xf*.

No entanto, os resultados aqui obtidos parecem indicar que, apesar de algumas semelhanças, o mecanismo de resistência ao estresse oxidativo da *Xf* apresenta significativas diferenças quando comparado ao observado em *E.coli*, onde estes processos foram caracterizados de maneira mais detalhada (POMPOSIELLO *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001).

Em primeiro lugar, verifica-se que muitos genes descritos como indutíveis em *E.coli* apresentam-se constitutivamente expressos em *Xf*, sendo que a incapacidade da bactéria em aumentar a expressão de alguns destes genes poderia ajudar a explicar sua reduzida tolerância ao Paraquat®. Além disso, células de *E.coli* possuem um mecanismo capaz de regular a entrada de íons ferro em resposta à presença de ERO através da superexpressão do gene *fur*, que codifica um inibidor do processo de importação deste elemento pelos seus receptores de membrana (MUKHOPADYAY *et al.*, 2004).

Em *Xf* verifica-se que o gene *fur* não apresenta modulação de expressão, mas o nível de íons ferro em solução no interior da célula pode ser reduzido devido a superexpressão de bacterioferritina, uma proteína capaz de ligar íons ferro, retirando-os de solução (CARRONDO, 2003).

Outro aspecto interessante relacionado à resposta de *Xf* ao Paraquat® é o aumento da expressão de glutarredoxina, uma proteína envolvida na manutenção do potencial redox das células (PRIETO-ÁLAMO *et al.*, 2000). O aumento desta proteína pode estar envolvido com a necessidade de reduzir pontes dissulfeto criadas entre grupamentos SH oxidados por diversos tipos de ERO (FRATELLI *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2002).

Finalmente, o comportamento da *Xf* em resposta ao crescimento na presença de Paraquat® é surpreendente no que se refere à ativação de diversos genes anotados como fatores de virulência, o que poderia estabelecer uma curiosa correlação entre o mecanismo de defesa das plantas (explosão oxidativa) e o desencadeamento da ativação dos mecanismos de patogenicidade por parte da bactéria.

Entre os genes de virulência acionados pela *Xf*, destaque deve ser dado para o significativo número de proteínas de revestimento da célula, notadamente as adesinas. Alterações nesse sentido são conhecidas também na resposta ao estresse oxidativo em *E. coli*, onde se verifica que o ativador transcricional OxyR é capaz de regular a taxa de expressão da proteína de aglutinação Ag43, contribuindo para a formação de agregados celulares que apresentam maior capacidade de resistir à presença de ERO (SCHEMBRI *et al.*, 2003).

Nesse sentido, a ativação de uma grande quantidade de adesinas, como *hsf*, *uspA1*, *pspA* e *pilJ* poderia desempenhar um papel semelhante em *Xf*.

Curiosamente, verifica-se que o gene *hsf* localiza-se colinearmente no genoma de *Xf* aos genes *ahpC*, *ahpF* e ao próprio regulador OxyR, reforçando a idéia de que a ativação desta adesina estaria diretamente associada à presença de ERO geradas pela presença do Paraquat®. A avaliação da região promotora destes genes e posterior comparação com as regiões promotoras putativas de outros genes aqui superexpressos, poderá nos auxiliar a encontrar elementos controladores da transcrição em *Xf*, contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos de controle de expressão gênica nesta bactéria, o que será uma ferramenta muito útil a futuros estudos funcionais.

Referências

ADU-BOBIE, J.; LUPETTI, P.; BRUNELLI, B.; GRANOFF, D.; NORAIS, N.; FERRARI, G.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. GNA33 of *Neisseria meningitidis* is a lipoprotein required for cell separation, membrane architecture, and virulence. **Infect. Immun.**, v. 72, n.4, p. 1914-1919, 2004.

ANDERSON, J.A.; PADHYE, S.R. Protein aggregation, radical scavenging capacity, and stability of hydrogen peroxide defense systems in heat-stressed Vinca and Sweet Pea leaves. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 129, n.1, p. 54-59, 2004.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; Jr, W.M.; ELSAS, J.D.van; VUURDE, J.W.L.van; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.10, p. 4906-4914, 2002.

BEHR, M.A.; WILSON, M.A.; GILL, W.P.; SALAMON, H.; SCHOOLNIK, G.K.; RANE, S.; SMALL, P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray. **Science**, v. 284, p. 1520-1523, 1999.

BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant response to metal toxicity. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 322, n.1, p. 43-54, 1999.

BROWN, N.L.; STOYANOV, J.V.; KIDD, S.P.; HOBMAN, J.L. The MerR family of transcriptional regulators. **FEMS Microbiology Letters**, v.27, n.2-3, p.145-163, 2003.

BRUGGER, A.G.; LAMOTTE, O.; VANDELLE, E.; BOURQUE, S.; LECOURIEUX, D.; POINSSOT, B.; WENDEHENNE, D.; PUGIN, A. Early signaling events induced by elicitors to plant defenses. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.19, n.7, p.711-724, 2006.

BUECHTER, D.D. Free radicals and oxygen toxicity. **Pharmaceutical Research**, v.5, n.5, p.253-260, 1988.

BUS, J.S.; GIBSON, J.E. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v.55, p.37-46, 1984.

BUZKAN, N.; KOCSIS, L.; WALKER, A.M. Detection of *Xylella fastidiosa* from resistant and susceptible grapevine by tissue sectioning and membrane entrapment immunofluorescence. **Microbiological Research**, v. 160, p.225-231, 2005.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Internatl Microbiol**, v. 3, p. 3-8, 2000.

CARRONDO, M.A. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. **The EMBO Journal**, v. 22, n.9, p. 1959-1968, 2003.

CHANDER, M.; DEMPTE, B. Functional analysis of SoxR residues affecting transduction of oxidative stress signals into gene expression. **J Biol Chem.**, v. 279, n.40, p. 41603-41610, 2004.

CIRAULO, M.B. Análise genômica da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* cultivada em 3G10-R - um meio baseado na composição química do xilema. **Dissertação de Mestrado da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2006.

COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; de SOUZA, A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a Variable Number of Tandem Repeat Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.9, p. 4091-4095, 2001.

DARZINS, A. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. **Mol Microbiol.**, v. 11, n.1, p. 137-153, 1994.

DODDS, P.N.; LAWRENCE, G.J.; CATANZARITI, A.; TEH, T.; WANG, C.A.; AYLIFFE, M.A.; KOBE, B.; ELLIS, J.G. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **PNAS**, v. 103, n.23, p.8888-8893, 2006.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 23, p. 345-357, 1983.

DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity. **Yeast**, v.17, n.1, p.263-271, 2000.

DUDOIT, S.; YANG, Y.H.; CALLOW, M.J.; SPEED, T.P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. **Statistica Sinica**, v. 12, p. 111-139, 2002.

FADIEL, A.; NAFTOLIN, F. Microarray applications and challenges: a vast array of possibilities. **Int. Arch. Biosci.**, p. 1111-1121, 2003.

FARR, S.B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiological Reviews**, v. 55. n.4, p. 561-585, 1991.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 32, p. 653-659, 1942.

FRATELLI, M.; DEMOL, H.; PUYPE, M.; CASAGRANDE, S.; EBERINI, I.; SALMONA, M.; BONETTO, V.; MENGOZZI, M.; DUFFIEUX, F.; MICLET, E.; BACHI, A.; VANDEKERCKHOVE, J.; GIANAZZA, E.; GHEZZI, P. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n.6, p. 3505-3510, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.30, p.18515-18517, 1997.

FRIDOVICH, I. Adverse effects of superoxide and defenses: studies with *Escherichia coli*. **Drug Metab. Rev.**, v. 30, n.2, p. 277-283, 1998.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: www.fundecitrus.com.br. Acesso em: 23/01/2007.

GOLDSMITH, Z.G.; DHANASEKARAN, N. The microevolution: applications and impacts of microarray technology on molecular biology and medicine. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 13, p. 483-495, 2004.

GOH, L.L.; BARKHAM, T.; SIM, T.S. Molecular cloning and functional characterization of fumarases C in *Neisseria species*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, n.3, p. 205-213, 2005.

GRANT, J.J.; LOAKE, G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, v. 124, p. 21-29, 2000.

GREEN, R.C.; DARWIN, A.J. PspG, a new member of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n.15, p. 4910-4920, 2004.

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

HASSETT, D.J.; HOWELL, M.L.; OCHSNER, U.A.; VASIL, M.L.; JOHNSON, Z.; DEAN, G.E. An operon containing *fumC* and *sodA* encoding fumarase C and manganese superoxide dismutase is controlled by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: *fur* mutants produce elevated alginate levels. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n.5, p. 1452–1459, 1997.

HINCHLIFFE, S. J.; ISHERWOOD, K. E.; STABLER, R. A.; PRENTICE, M. B.; RAKIN, A.; NICHOLS, R. A.; OYSTON, P. C. F.; HINDS, J. R.; TITBALL, W.; WREN, B. W. Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. **Genome Research**, v. 13, p. 2018–2029, 2003.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n.24, p. 13963-13966, 1989.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem limited bacteria pathogen of plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.27, p.271-290. 1989.

HU, Y.; UTTAMCHANDANI, M.; YAO, S.Q. Microarray: A versatile platform for high-throughput functional proteomics. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 9, n.3, p. 203-212, 2006.

KITZLER, J.W.; MINAKAMI, H.; FRIDOVICH, I. Effects of Paraquat® on *Escherichia coli*: Differences between B and K-12 Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n.2, p. 686-690, 1990.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.Jr.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p.55-59, 2004.

LAFONTAINE, E.R.; COPE, L.D.; AEBI, C.; LATIMER, J.L.; MCCRACKEN, G.H. Jr; HANSEN, E.J. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 1364-1373, 2000.

LI, W.-B.; PRIA, W.D. Jr; LACAVA, P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, v. 93, p.953–958, 2003.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 56-68, 2003.

MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P.; REID, D.M.; OLSON, M.E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* *in vitro*. **Plant Disease**, v. 86, n.6, p. 633-638, 2002.

MASTER, S.S.; SPRINGER, B.; SANDER, P.; BOETTGER, E.C.; DERETIC, V.; TIMMINS, G.S. Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. **Microbiology**, v. 148, p. 3139-3144, 2002.

MCDOWELL, J.M.; DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Elsevier Trends Journals**, Tibs 25, p. 79-82, 2000.

MCDOWELL, J.M.; WOFFENDEN, B.J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 178-183, 2003.

MERKAMM, M.; GUYONVARCH, A. Cloning of the *sodA* gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n.4, p. 1284-1295, 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants e stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R.; HERR, E.H.; ORVAR, B.L.; CAMP, W.Van; WILLEKENS, H.; INZE, D.; ELLIS, B.E. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n.24, p. 14165-14170, 1999.

MORRISSEY, J.P.; OSBOURN, A.E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, n.3, p. 708-724, 1999.

MUKHOPADHYAY, P.; ZHENG, M.; BEDZYK, L.A.; LAROSSA, R.A.; STORZ, G. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n.3, p. 745-750, 2004.

NUNES, L.R., ROSATO, Y.B., MUTO, N.H., YANAI, G.M., da SILVA, V.S., LEITE, D.B., GONÇALVES, E.R., de SOUZA, A.A., COLETTA-FILHO, H.D., MACHADO, M.A.,

LOPES, S.A.; de OLIVEIRA, R.C. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, v. 13; p. 570-578; 2003.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogens defense in plants. **Bulg. J. Plant Physiol**, v. 27(1-2), p. 101-109, 2001.

OLIVEIRA, R.C. de; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; LEITE, D.B.; de SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; NUNES, L.R. Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216, p. 15-21, 2002.

PASHALIDIS, S.; MOREIRA, L.M.; ZAINI, P.A.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.C.; CIAPINA, L.P.; VÊNCIO, R.Z.N.; LEMOS, E.G.M.; da SILVA, A.M.; da SILVA, A.C.R. Whole-Genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. **A Journal of Integrative Biology**, v. 9, n.1, p.77-90, 2005.

PEDRAS, M.S. *et al.* Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis and biotransformation. **Phytochemistry**, v. 53, n.2, p. 161-176, 2000.

PLANTEØKOFYSIOLOGI. Disponível em:<http://biologi.uio.no/plfys/haa/okologi/ugras.htm>. Acesso em: 23/01/2007.

POMPOSIELLO, P.J.; BENNIK, M.H.; DEMPLE, B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n.13, p. 3890-3902, 2001.

POMPOSIELLO, P.J.; DEMPLE, B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. **TRENDS in Biotechnology**, v.19, n.3, p.109-114, 2001.

POMPOSIELLO, P.J.; DEMPLE, B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 46, p. 319-341, 2002.

POMPOSIELLO, P.J.; KOUTSOLIOUTSOU, A.; CARRASCO, D.; DEMPLE, B. SoxRS-regulated expression and genetic analysis of the *yggX* gene of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n.22, p. 6624-6632, 2003.

POYART, C.; PELLEGRINI, E.; GAILLOT, O.; BOUMAILA, C.; BAPTISTA, M.; TRIEU-CUOT, P. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. **Infect. Immun.**, v. 69, n.8, p. 5098-5106, 2001.

PRIETO-ALAMO, M.J.; JURADO, J.; GALLARDO-MADUENO, R.; MONJE-CASAS, F.; HOLMGREN, A.; PUEYO, C. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n.18, p. 13398-13405, 2000.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plants pathogens. **Annual Reviews Phytopathology**, v.34, p.131-151, 1996.

READ, T. D.; PETERSON, S. N.; TOURASSE, N.; BAILLIE, L. W.; PAULSEN, I. T.; *et al.* The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. **Nature**, v. 423, p. 81–86, 2003.

REZENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RIO, L.A. del; CORPAS, J.F.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n.372, p. 1255-1272, 2002.

ROJAS, C.M.; HAM, J.H.; DENG, W.L.; DOYLE, J.J.; COLLMER, A. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n.20, p. 13142-13147, 2002.

SABARATNAM, S.; BEATTIE, G.A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.2, p. 1220–1228, 2003.

SALAMA, N.; GUILLEMIN, K.; MCDANIEL, T.K.; SHERLOCK, G.; TOMPKINS, L.; FALKOW, S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 14668–14673, 2000.

SALUNKHE, P.; TÖPFER, T.; BUER, J.; TÜMMLER, B. Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n.8, p. 2565-2572, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - a laboratory manual (2nd edition). New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SCHELLHORN, H.E. Regulation of hidroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 113-119, 1994.

SCHEMBRI, M.A.; HJERRILD, L.; GJERMANSSEN, M.; KLEMM, P. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n.7, p. 2236-2242, 2003.

SEAVER, L.C.; IMLAY, J.A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n.24, p. 7173-7181, 2001.

SHA, J.; FADL, A.A.; KLIMPEL, G.R.; NIESEL, D.W.; POPOV, V.L.; CHOPRA, A.K. The two murein lipoproteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribute to the virulence of the organism. **Infect Immun.**, v. 72, n.7, p. 3987-4003, 2004.

SIMPSON, A.J. G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.C.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000.

SONG, J.J.; RHEE, J.G.; SUNTHARALINGAM, M.; WALSH, S.A.; SPITZ, D.R.; LEE, Y.J. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress: Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. **J Biol Chem.**, v. 277, n.48, p. 46566-46575, 2002.

SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; de OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 16, p.223-228, 2005a.

SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; de OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Gene expression profile of the pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 341-353, 2004.

SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; PEREIRA, E.O.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. **Current Microbiology**, v. 50, n.10, p.867-875, 2003.

SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; PEREIRA, E.O.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. **Current Microbiology**, v. 50, p.223-228, 2005b.

ST GEME, J.W. 3rd; CUTTER, D.; BARENKAMP, S.J. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 6281-6287, 1996.

STORZ, G.; IMLAY, J.A. Oxidative stress. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n.2, p. 188-194, 1999.

THOMPSON, S.A.; WANG, L.L.; SPARLING, P.F. Cloning and nucleotide sequence of *frpC*, a second gene from *Neisseria meningitidis* encoding a protein similar to RTX cytotoxins. **Mol. Microbiol.**, v. 9, n.1, p. 85-96, 1993.

TIGR, The Institute for Genomic Research. Disponível em: <http://www.tigr.org/software>. Acesso em: 23/01/2007.

TURNER, M.S.; WOODBERRY, T.; HAFNER, L.M.; GIFFARD, P.M. The *bspA* locus of *Lactobacillus fermentum* BR11 encodes an L-cystine uptake system. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n.7, p. 2192-2198, 1999.

VENISSE, J-S.; GULLNER, G.; BRISSET, M-N. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. **Plant Physiology**, v. 125, p. 2164-2172, 2001.

WAN, J.; DUNNING, M.F.; BENT, A.F. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. **Funct. Integr. Genomics**, v. 2, p. 259-273, 2002.

WELLS, JM; RAJU, BC; HUNG, H-Y; WEISBURG, WG; MANDELCO-Paul, L; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n.2, p. 136-143, 1987.

WHITE, C.A.; SALAMONSEN, L.A. A guide to issues in microarray analysis: application to endometrial biology. **Reproduction**, v. 130, p. 1-13, 2005.

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

WOLFGANG, M. C.; KULASEKARA, B. R.; LIANG, X. Y.; BOYD, D.; WU, K.; YANG, Q.; MIYADA, C. G.; LORY, S. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 8484–8489, 2003.

ZEIER, J.; DELLEDONNE, M.; MISHINA, T.; SEVERI, E.; SONODA, M.; LAMB, C. Genetic elucidation of nitric oxide signalling in incompatible plant-pathogen interactions. **Plant Physiol.**, v. 136, n.1, p. 2875-2886, 2004.

ZHENG, M.; WANG, X.; TEMPLETON, L.R.; Smulski, D.R.; LAROSSA, R.A. e STORZ, G. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n.15, p. 4562-4570, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)