

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

FLÁVIA ELIDIA GANDOLFI FEITOSA

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA
FITOBACTÉRIA *XYLELLA FASTIDIOSA* EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE DENSIDADE
CELULAR

Mogi das Cruzes, SP
2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
FLÁVIA ELIDIA GANDOLFI FEITOSA

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA
FITOBACTÉRIA *XYLELLA FASTIDIOSA* EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE DENSIDADE
CELULAR

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado da Universidade de Mogi das
Cruzes como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia B. Costa de Oliveira

Mogi das Cruzes, SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Feitosa, Flávia Elidia Gandolfi Feitosa

Modulação da expressão gênica da fitobactéria *Xylella fastidiosa* em diferentes condições de densidade celular / Flávia Elidia Gandolfi Feitosa. -- 2007.

79 f.

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Regina Lucia Batista da Costa de Oliveira

1. *Xylella fastidiosa* - Densidade celular 2. Microarranjo de DNA 3. Genética molecular – Bactérias fitopatogênicas I. Título II. Oliveira, Regina Lucia Batista da Costa de

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 doze de fevereiro de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Modulação da expressão gênica da fitobactéria *Xylella fastidiosa* em diferentes condições de densidade celular" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Flávia Elidia Gandolfi Feitosa**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 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 Regina Lúcia Batista da Costa de Oliveira e Luiz Roberto Nunes da Universidade de Mogi das Cruzes e Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner 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)

Aprovada por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 12 de fevereiro de 2007

Comissão Examinadora

Julgamento

[Assinatura]
Prof.^a Dr.^a Regina L. B. C. Oliveira

aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]
Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

Aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]
Prof.^a Dr.^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

Ao meu esposo Nilton pelo amor e compreensão.

A minha filha Luiza, razão do meu esforço.

OFEREÇO

A minha mãe Silvia, por fazer-me acreditar que seria possível.

DEDI CO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por não receber nada do que pedi...Mas por receber tudo de que precisava.

A Dr^a Regina Lúcia Batista da Costa de Oliveira pela orientação e por ter me concedido a oportunidade de crescimento profissional e principalmente pessoal, através das experiências vividas no Laboratório de Genômica.

Aos meus professores, Dr Luiz R. Nunes e Dr^a Regina Lucia Batista da Costa de Oliveira, pelo importante e indispensável incentivo a pesquisa, fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Welington Luiz de Araújo pelas valiosas sugestões e discussões e Dr^a Elisa Espósito pelas importantes sugestões.

Aos membros da banca de defesa, Dr. Luiz R. Nunes pelas sugestões e contribuição para a realização deste trabalho e Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A grande amiga Carla Tavares por compartilhar felicidade e tristeza, esperança e principalmente fé.

A amiga Neilce Ribeiro pela sabedoria e amizade.

Aos amigos do laboratório de Genômica Maristela Ciraulo, Daiene Souza, Deibs Barbosa, Maria Carolina e Priscila Luiz pelo convívio e pela troca de experiências. E aos amigos que por aqui passaram, Vanessa Nessner, Amanda Narcizo, Fabiana Rodrigues, Roberta Ferrari e Kelly Spena.

A Vivian Schmidt e Marcus Vinícius pela colaboração, sugestões e discussões.

Aos amigos Daniela Prates, Rogério e Sandro Soares pelo incentivo e amizade.

A toda equipe da pós-graduação, em especial Neilce Ribeiro, Luciana Soares e Renata Mesquita, pela colaboração e amizade.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade de realização do curso de mestrado e ao Núcleo Integrado de Biotecnologia pelo suporte dado na realização deste trabalho.

“Eu irei adiante de ti, e endireitarei os caminhos tortos, quebrarei as portas de bronze e despedaçarei os ferrolhos de ferro”.
(1 saías 45:2)

RESUMO

Xylella fastidiosa 9a5c é uma bactéria gram-negativa, limitada ao xilema, agente causal da Clorose Variegada de Citros (CVC), patologia esta responsável por grandes perdas econômicas na citricultura. O genoma deste fitopatógeno foi totalmente seqüenciado e a sua análise permitiu identificar vários genes possivelmente envolvidos na patogenicidade e/ou virulência da bactéria. Os sintomas da CVC desenvolvem-se um longo tempo após a infecção da planta pela bactéria e é possível que fatores de patogenicidade e/ou virulência sejam dependentes da densidade celular. A hibridação competitiva em microarranjo de DNA foi utilizada para investigar as alterações da expressão gênica associadas às mudanças na densidade celular. Este experimento permitiu a identificação de 870 genes que apresentaram modulação de transcrição estatisticamente significativa em respostas a estas mudanças. Um total de 506 genes foram significativamente induzidos na condição de alta densidade celular, enquanto que 364 genes foram significativamente induzidos na condição de baixa densidade celular. A maioria dos genes diferencialmente expressos codifica para proteínas ainda hipotéticas. Na condição de baixa densidade celular, genes relacionados ao Metabolismo intermediário e Metabolismo de macromoléculas tiveram sua expressão aumentada, enquanto que na condição de alta densidade celular, genes relacionados a Biossíntese de pequenas moléculas, Processos celulares e Estruturas celulares apresentaram super expressão na condição de alta densidade celular. Também foi detectado em grande número de genes de elementos genéticos móveis sendo diferencialmente expressos, o que poderia provavelmente estar associado com transferência horizontal de genes em *X. fastidiosa* na condição de alta densidade celular.

Palavra-chave: *Xylella fastidiosa*, microarranjo, expressão gênica, densidade celular.

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is the gram-negative and xylem-limited bacterium, that causes Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a pathology responsible for significant economic losses in citriculture. The genome of this phytopathogen has been completely sequenced and revealed several genes probably involved in pathogenicity and/or virulence. The CVC symptoms develop a long time after plant infection and it's possible that the expression of pathogenicity and/or virulence factor is dependent on cellular density. The competitive hybridization in *X. fastidiosa* DNA microarrays was used to investigate the global alteration in gene expression, associated with changes in cellular density. These experiments allowed the identification of 870 genes that displayed statistically significant modulation in response to changes in cellular density. A total of 506 genes were significantly up-regulated in high cellular density condition, while 364 genes were significantly up-regulated in low cellular density condition. The majority of the differentially expressed genes encodes hypothetical proteins. Intermediary and macromolecules metabolism related genes have been up regulated on low cellular density condition. Overexpression has also been observed in small molecules biosynthesis, cell processing and cell structures related genes. We also found a large number of genes from the mobile genetic elements being differentially expressed. This could possibly be associated with the onset of lateral gene transfer in *X. fastidiosa* in the high cellular density condition.

Keywords: *Xylella fastidiosa*, microarray, gene expression, cellular density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Sintomas da Clorose Variegada dos Citros.....	15
Figura 02	Obstrução do vaso xilemático por <i>Xylella fastidiosa</i>	16
Figura 03	Gráfico representativo das categorias gênicas em <i>Xylella fastidiosa</i>	18
Figura 04	Modelo de ativação da bioluminescência em <i>Vibrio fischeri</i> sistema de <i>quorum sensing</i> LuxR/LuxI.....	24
Figura 05	Modelo do mecanismo de <i>quorum sensing</i> em bactérias gram-positivas	27
Figura 06	Esquema de Microarranjo de cDNA	36
Figura 07	Imagem do biochip de Xf 9a5c obtida pelo “scanner” óptico.....	37
Figura 08	Curva de crescimento de Xf 9a5c cultivada em PW.....	41
Figura 09	Distribuição funcional das 870 ORFs obtidas pela linhagem Xf 9a5c em condições de alta e baixa densidade celular.....	42
Figura 10	Distribuição funcional das ORFs com modulação estatisticamente significativas encontradas no cromossomo circular de <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c em condições de baixa densidade celular contra um RNA de referência obtido de células em condição de alta densidade celular	43
Figura 11	Clusterização a partir da semelhança na expressão dos genes nas condições de alta e baixa densidade celular, resultando em 20 agrupamentos com modulações estatisticamente significativas.....	44
Figura 12	Padrão de super expressão de proteínas ribossomais identificadas como moduladas na condição de baixa densidade celular	46
Figura 13	Padrão de modulação dos elementos genéticos móveis	53
Figura 14	Padrão de modulação de profagos	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHL	acil-lactona-homoserina
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina 5' trifosfato
BSA	soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
CFU	unidades formadoras de colônia
CVC	Clorose Variegada dos Citros
Cy3-dCTP	2'-desoxicitina 5'-trifosfato acoplado ao fluoróforo cianina 3
Cy5-dCTP	2'-desoxicitina 5'-trifosfato acoplado ao fluoróforo cianina 5
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanidina 5'-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos
DO ₆₀₀	Densidade óptica medida a 600 nanômetros
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EPS	exopolissacarídeo
FOM	figura de mérito
GI	ilha genômica
HR	reação de hipersensibilidade
MEV	arquivo "Multi-Experiment Viewer"
NAD	nicotina adenina dinucleotídeo
OHHL	N-(3-oxohexanoyl) homoserina lactona
ORF	<i>open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia de polimerase
pGI	ilhas genômicas putativas
pXF	plasmídeo de <i>Xylella fastidiosa</i>
PW	Periwinkle Wilt

QS *quorum sensing*

RNA Ácido ribonucléico

RPM rotações por minuto

SAM Significance analysis of microarray (Análise de significância de microarranjo)

SAR resistência sistêmica adquirida

SDS dodecil sulfato de sódio

SSC Solução de citrato de sódio e cloreto de sódio

TE Solução de Tris e EDTA

UV luz ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 O fitopatógeno <i>Xylella fastidiosa</i>	14
1.2 Clorose Variegada dos Citros.....	15
1.2.1 Interação planta patógeno.....	19
1.3 Mecanismo de Regulação Gênica por <i>Quorum sensing</i>	22
1.4 Análise de expressão gênica por microarranjos de DNA.....	28
2 OBJETIVOS	30
3 MÉTODO	31
3.1 Manutenção do isolado de <i>Xylella fastidiosa</i>	31
3.2 Extração do RNA Total	32
3.3 Síntese, Purificação e Marcação do cDNA	33
3.4 Hibridação com o Microarranjo de <i>Xylella fastidiosa</i>	35
3.5 Análise de Imagens	36
3.6 Normalização e análise estatística dos dados obtidos	37
3.7 Identificação de genes diferencialmente expressos	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Determinação de condições de alta e baixa densidade celular para <i>Xylella fastidiosa</i>	40
4.2 Análise dos agrupamentos gênicos diferencialmente expressos	42
4.3 Resultado de hibridação competitiva em diferentes densidades celulares.....	44
4.4 Genes diferencialmente expressos na condição de baixa densidade celular.....	45
4.5 Genes diferencialmente expressos na condição de alta densidade celular.....	49
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 A bactéria *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* (*X. fastidiosa*) é uma bactéria fitopatogênica, agente causal da Clorose Variegada de Citros (CVC) e de diversas outras doenças como o mal de Pierce da videira, redução do porte do pessegueiro, nanismo da alfafa, escaldadura da folha da ameixeira, entre outros. É uma bactéria gram-negativa, limitada ao xilema e aflagelada. Possui 0,25 – 0,35 µm de comprimento e 0,9 – 3,5 µm de diâmetro, suas células são em forma de bastonetes retos a ligeiramente curvos (WELLS *et al.*, 1987).

Xylella fastidiosa é uma “bactéria limitada ao xilema” difícil de ser isolada por métodos bacteriológicos convencionais e nutricionalmente fastidiosa, que depois de isolada, requer meios complexos para seu adequado crescimento *in vitro* (LEMOS *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2004). A utilização de meios de cultura específicos tem o objetivo de manter microrganismos viáveis sob a forma de culturas axênicas. Estes meios devem refletir as necessidades nutricionais do microrganismo, necessidades estas semelhantes às encontradas em seu habitat natural, neste caso, o fluido dos vasos xilemáticos. A composição química do fluido do xilema, em geral, se constitui de uma solução diluída de aminoácidos, ácidos orgânicos, amido, glutamina, asparagina e sais, contendo também uma pequena concentração de açúcares (0,1 mM) como glicose, frutose e sucrose (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002; REDAK *et al.*, 2004). Além disso, ao ser mantida nestas condições de crescimento, *X. fastidiosa*, assim como outros microrganismos perdem a virulência ou exibem uma virulência reduzida, após aproximadamente um ano de cultivo (DE SOUZA *et al.*, 2003).

Os meios de cultura utilizados para isolamento e cultivo da *X. fastidiosa* devem portanto, ser desenvolvidos baseados na composição química do fluido dos vasos xilemáticos, sanando as necessidades básicas requeridas por este fitopatógeno. A composição do xilema mostra uma quantidade reduzida de nutrientes, tornando-se necessária a adição de outros componentes ao meio de

cultura para promover o crescimento da bactéria *in vitro*, como vitaminas (tiamina e biotina) (LEITE *et al.*, 2004; CAMPANHARO *et al.*, 2003; LEMOS *et al.*, 2003). Além dos nutrientes necessários para seu crescimento, *X. fastidiosa* também necessita que a temperatura seja mantida entre 28° C e 30° C, e que o pH do meio esteja entre 6,8 e 6,9 (FEIL; PURCELL, 2001).

1.2 Clorose Variegada dos Citros

Em 1987, a Clorose Variegada dos Citros (CVC), também conhecida popularmente como “Amarelinho”, foi identificada oficialmente no Brasil em pomares de laranja doce do Triângulo Mineiro e do Norte e Nordeste do estado de São Paulo. Atualmente esta doença encontra-se presente na maioria das áreas citrícolas do país, causando perdas econômicas consideráveis na produção e exportação de laranja, afetando rapidamente a produção do pomar com 75% de perda de peso do fruto (www.fundecitrus.com.br). Um indício de que a planta foi contaminada é a visualização de pequenas manchas amareladas, espalhadas pela folha, que evoluem para lesões de cor palha por toda a folha (Figura 1A). Há também a diminuição da copa e perda de folhas, além de morte dos ponteiros e ramos com inter-nós curtos (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990; SILVA *et al.*, 2004). As plantas afetadas pela CVC apresentam ramos com frutos atrofiados e endurecidas com maturação precoce, frutos queimados pelo sol, além de pouco suco (Figura 1B), fatores que levam a restrição desses frutos à comercialização (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990).

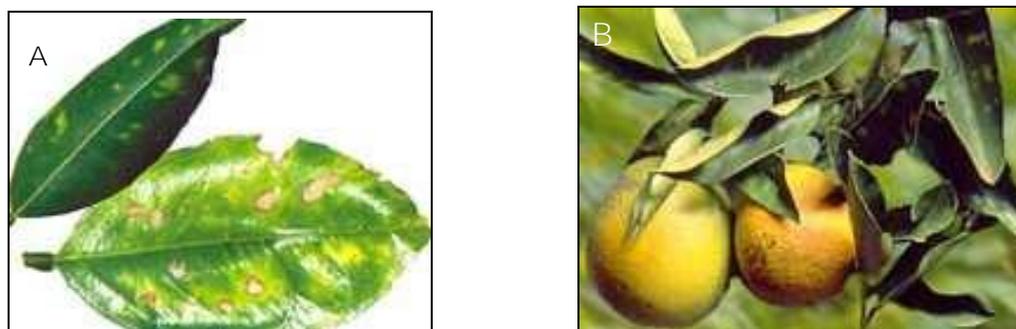


Figura 01 Sintomas da Clorose Variegada dos Citros. (A) Manchas cloróticas nas folhas, (B) Frutos atrofiados e com queimadura do sol. Fonte: www.fundecitrus.com.br. Última visualização janeiro/2007.

Estes sintomas, apresentados por plantas infectadas, provavelmente são ocasionados pela oclusão dos vasos xilemáticos e conseqüente estresse hídrico, onde o tamanho da população do fitopatógeno *X. fastidiosa* dentro do xilema pode ser diretamente relacionado com a intensidade da oclusão (MARQUES *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2003). Coletas, em campo, de folhas de citros com sintomas de CVC apresentam população de *X. fastidiosa* de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônia, sendo 10^3 unidades formadoras de colônia a quantidade mínima de bactérias para apresentar os sintomas desta doença (ALMEIDA; PEREIRA, 2001). Esta bactéria fitopatogênica adere-se à parede do xilema, multiplica-se e forma agregados através da colonização das bactérias e deposição de exopolissacarídeos, que tendem a se acumular na parede do xilema, conseqüentemente afetando o transporte de água e nutrientes da raiz para a parte aérea da planta (Figura 02) (OSIRO *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2004). Tanto *in vitro* como *in vivo*, em insetos vetores e plantas, esta bactéria é capaz de formar biofilme, o qual pode estar relacionado com o mecanismo de oclusão dos vasos do xilema, indicando ser um dos fatores da patogenicidade de *X. fastidiosa* (MARQUES *et al.*, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2003).

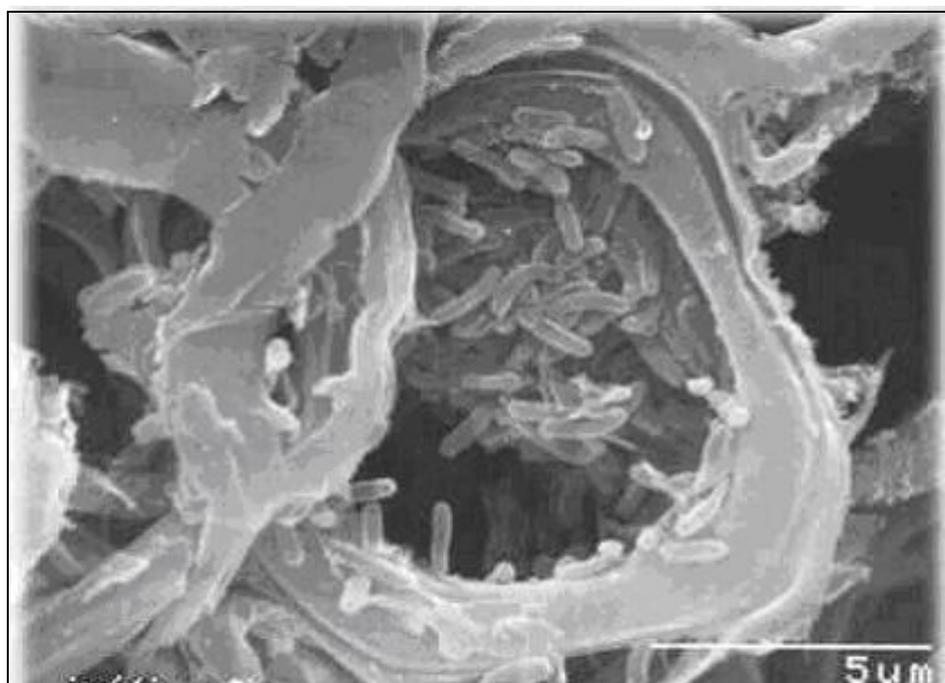


Figura 02 Obstrução do vaso xilemático por *Xylella fastidiosa*.
Obtida de: <http://www.citrolima.com.br/xylella/enxylella.htm>.
Última visualização janeiro/2007.

A transmissão da bactéria para plantas sadias pode ocorrer por material propagativo contaminado, e a disseminação natural desta doença dá-se através de insetos vetores, principalmente cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae. Recentemente foi identificada uma nova espécie de cigarrinha (*Fingeriana dúbia*) que também tem a capacidade de transmitir a bactéria para plantas sadias (CAVICHIOLI *et al.*, 2003). Agora são no total 12 espécies responsáveis pela disseminação da CVC no Brasil (*Acrogonia citrina*, *Oncometopia facialis*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Plesiommata corniculata*, *Macugonalia leucomelas*, *Sonesimia grossa*, *Ferrariana trivittata*, *Acrogonia virescens*, *Parathona gratiosa*, *Homalodisca ignorata* e *Fingeriana dúbia*), sendo as espécies mais freqüentemente encontradas em pomares: *Oncometopia facialis*, *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina* (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

As épocas de maior expressão dos sintomas da CVC são primavera e verão, devido a altas temperaturas e precipitação pluviométrica, sendo estes principais fatores para desencadear maior desenvolvimento das brotações, local onde, em campo, as cigarrinhas são observadas alimentando-se (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2002; LARANJEIRA *et al.*, 2003). Mas um fator determinante para a eficiência da transmissão da bactéria para plantas sadias está relacionado ao sucesso na infectividade das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* (YAMAMOTO *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2001).

Até o presente, o método mais eficaz de combate a esta doença é o manejo dos pomares, além da utilização de mudas sadias, eliminação de plantas doentes, poda de ramos infectados, mas também são de grande importância o controle químico, para a eliminação das cigarrinhas vetores e conseqüente controle da CVC (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

Graças à iniciativa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), *X. fastidiosa* (linhagem 9a5c) foi o primeiro fitopatógeno a ser seqüenciado, devido à importância dos danos causados por essa bactéria à citricultura brasileira e também devido ao tamanho de seu genoma ser relativamente pequeno (aproximadamente 2,7 milhões de pares de bases) (DOW, ; DANIELS, 2000). A publicação do seqüenciamento completo da bactéria *X. fastidiosa* linhagem 9a5c e a anotação funcional de seus genes revelaram que este fitopatógeno possui um cromossomo circular com 2.679.305 pb, com um conteúdo de 52,7 % de G+C e dois plasmídeos, um de

51.158 pb (denominado pXF51) e 1.285 pb (denominado pXF1.3). Foram caracterizadas 2884 fases abertas de leitura (ORFs), e através da similaridade com outros genes de função conhecida depositados em bancos de dados, somente 1314 tiveram sua função predita (Figura 03) (SIMPSON *et al.*, 2000).

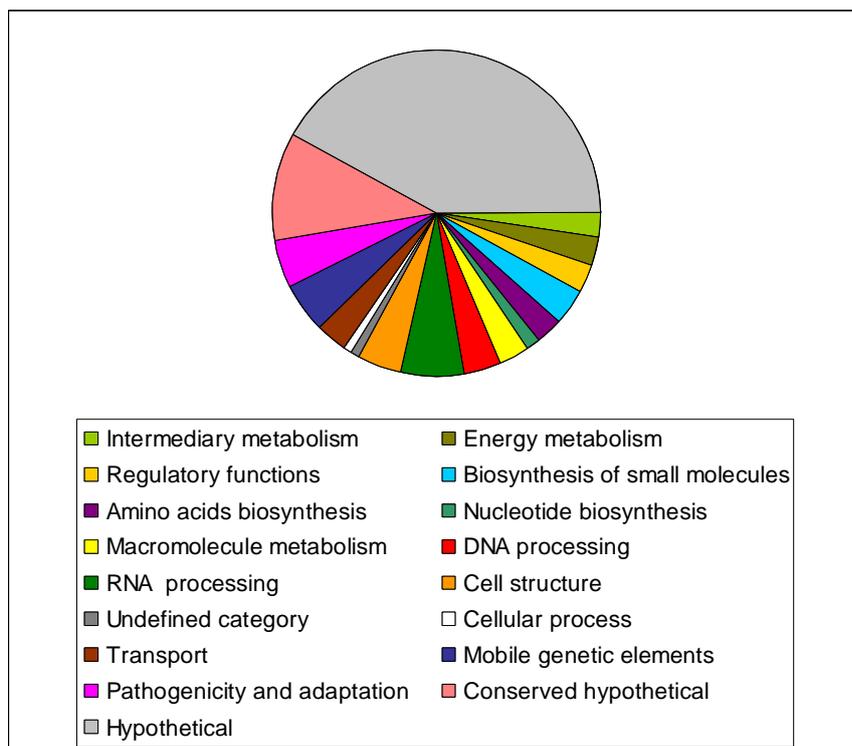


Figura 03 Gráfico representativo das categorias gênicas em *Xylella fastidiosa*.
Obtida de: SIMPSON *et al.*, 2000

O genoma da bactéria *Xylella fastidiosa* 9a5c possui 2,7 Mb, sendo que 18 % deste total corresponde a elementos adquiridos por transferência gênica lateral (NUNES *et al.*, 2003). Esses elementos constituem-se por dois plamídeos (pXF51 e pXF1.3), quatro profagos (XfP1, XfP2, XfP3, XfP4) (representam 7% do genoma desta bateria), além de uma região de integração do plasmídeo (PI1), cinco ilhas genômicas (GI1, GI2, GI3, GI4, GI5) e seis putativas ilhas genômicas (pGI1, pGI2, pGI3, pGI4, pGI5, pGI6) (NUNES *et al.*, 2003; SIMPSON *et al.*, 2000). As ilhas genômicas se caracterizam por demonstrar o conteúdo GC e o uso de códon diferentes do resto do genoma. Geralmente apresentam um gene codificando uma integrase, ainda que em alguns casos este gene não esteja presente, resultando em

ilhas genômicas presumidas que poderiam ser consideradas um resquício evolutivo de ilhas genômicas (NUNES *et al.*, 2003).

1.2.1 Interação planta patógeno

Para uma planta ser infectada por um patógeno é necessário que este patógeno tenha a capacidade de penetrar e posteriormente colonizar os tecidos do hospedeiro, obter os nutrientes necessários para sua sobrevivência, assim como anular os mecanismos de defesa da planta. No caso da bactéria *X. fastidiosa*, o primeiro passo para a invasão do tecido hospedeiro é, em geral, através da sua inoculação por meio do aparelho bucal do tipo sugador do inseto vetor. Estes insetos das famílias Cicadellidae e Cercopidae alimentam-se da seiva obtida dos vasos xilemáticos e acabam por adquirir a bactéria de plantas doentes. Estas bactérias restringem-se provavelmente à parte anterior do aparelho digestivo (estomodeu) e as peças bucais do inseto, que posteriormente inocula a bactéria em plantas saudáveis (PAIVA *et al.*, 2001). Outro modo de invasão da bactéria no tecido hospedeiro é através da enxertia envolvendo material contaminado, sendo este o fator de maior propagação de mudas infectadas (www.fundecitrus.com.br). Além disso este fitopatógeno também pode estar presente em sementes e raízes de citros (LI *et al.*, 2001).

A capacidade das plantas de resistir a uma infecção é crucial para diminuir os efeitos danosos, restringindo ou retardando a penetração destes organismos em seus tecidos e criando condições adversas para a colonização dos tecidos vegetais. A interação planta-patógeno que ocorre após invasão de bactérias é mediada por determinantes de avirulência, como os genes *avr*, sendo o produto destes genes injetados na célula do hospedeiro através do sistema de secreção do tipo III. A resposta de resistência é induzida somente se o patógeno codifica um gene de avirulência específico (gene *avr*) e a planta carrega um gene correspondente de resistência (gene *R*). Uma vez no interior da célula, o produto do gene *avr* é reconhecido e interage com proteínas de resistência no hospedeiro (*R*), desencadeando a ativação do sistema de defesa vegetal. A doença ocorre somente

se o gene *R* da planta e o *avr* dos invasores não existem ou são inativos. (MCDOWELL; WOFFENDEN, 2003).

Após a invasão do patógeno no tecido hospedeiro, o reconhecimento deste pela planta é essencial para a eficiente ativação dos mecanismos de defesa, e posterior resistência à infecção. O sistema de defesa e adaptação das plantas pode atuar como: resistência localizada, também conhecida como reação de hipersensibilidade (HR), e como resistência sistêmica adquirida, conhecida por SAR (*systemic acquired resistance*). A reação de hipersensibilidade leva a morte celular programada local, isto é, morte das células situadas no local da infecção, gerando uma barreira de células mortas do hospedeiro, limitando assim a disponibilidade de nutrientes ao patógeno. Além desta barreira física, há também outros mecanismos que inibem o progresso da infecção pelo patógeno, como aumento rápido de agentes oxidantes, espessamento das paredes celulares e da cutícula, além de síntese de toxinas (fitoalexinas) e de proteínas PR (*pathogenesis related*) relacionadas à defesa. Posteriormente, a planta pode desenvolver a resistência sistêmica adquirida com a ativação de defesas em regiões da planta não infectadas pelo patógeno, protegendo o hospedeiro contra ataques de um mesmo patógeno, tornando a planta resistente a infecções posteriores (MCDOWELL; DANGL, 2000; MITTLER *et al.*, 1999).

Nestas condições, onde as plantas reagem severamente à invasão de microrganismos, estes devem possuir mecanismos que os capacitem a sobrevivência e que também proporcionem defesa aos ataques do hospedeiro. Bactérias como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* utilizam fitotoxinas, como a siringopeptina, a qual possui a atividade de formar poros na membrana plasmática das plantas, promovendo assim um fluxo de íons transmembrânico acarretando o desenvolvimento de necrose no tecido do hospedeiro (BENDER *et al.*, 1999). A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* possui genes *avr* (Bs3/PthA), os quais são associados com a proliferação celular na planta e indução dos sintomas do cancro cítrico. Porém no genoma da *X. fastidiosa*, bactéria que também infecta plantas cítricas e também pertence à família *Xanthomonadaceae*, não foram identificadas genes homólogos ao gene *avr*, assim como também se verificou a ausência dos genes que compõe o sistema de secreção do tipo III.

A ausência destes genes sugere que estes não são necessários devido a interação planta-patógeno que ocorre entre *X. fastidiosa* e seu hospedeiro ser

diferenciada, onde o reconhecimento desta bactéria no tecido da planta e conseqüente ativação do sistema de defesa vegetal só ocorrerá após a formação do biofilme e posterior oclusão dos vasos xilemáticos, através da formação de uma barreira física. Esta barreira física formada, caracterizada pela formação de agregados de bactérias, é indicada como sendo um dos fatores da patogenicidade de *X. fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2004).

Algumas bactérias, para protegerem-se contra agentes agressivos, formam fibras de polissacarídeos extracelulares, o principal constituinte do biofilme bacteriano, que são comunidades de microrganismos mobilizados sobre uma superfície, com vantagens nutricionais, proteção e facilidade de comunicação. A bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* necessita de diversos fatores para estimular o desenvolvimento da doença, incluindo a síntese de celulases como também a formação de biofilme, constituído por exopolissacarídeos microbianos denominados goma xantana, que protegem o patógeno contra os mecanismos de resistência do hospedeiro (WATNICK; KOLTER, 2000; DOW *et al.*, 2003).

No caso da bactéria *X. fastidiosa*, esta fibra polissacarídea extracelular é chamada goma fastidiana e a evolução do quadro patogênico originado por esta bactéria certamente depende da adesão e posterior formação do biofilme (DE SOUZA *et al.*, 2003).

A possibilidade de aderência da bactéria ao trato digestivo do inseto através de fímbrias capacita este se estabilizar no vetor. Importante também é a capacidade desta bactéria em formar biofilme nos vasos xilemáticos, auxiliando na fixação deste fitopatógeno dentro dos vasos após sua inoculação, sendo assim capaz de resistir a alta turbulência e pressão negativa constantes dentro do xilema (DE SOUZA *et al.*, 2004; OSIRO *et al.*, 2004). O biofilme também age na proteção do patógeno ao ataque do hospedeiro, o qual após o reconhecimento da bactéria inicia a resposta de defesa da planta através da explosão oxidativa, a qual conduz a reação de hipersensibilidade (RESENDE *et al.*, 2003; MAH T; O'TOLLE, 2001).

1.3 Mecanismo de Regulação Gênica por *Quorum sensing*

Os primeiros estudos da vida procariótica indicavam que estes organismos eram solitários e que respondiam a estímulos externos isoladamente. Atualmente estes conceitos foram submetidos a mudanças radicais. Diversos estudos foram realizados e evidenciaram que muitas bactérias agem através de uma “ação social organizada”, utilizando um sistema de comunicação sofisticado para coordenar as atividades de indivíduos dentro de uma população (GERA; SRIVASTAVA, 2006; DE KIEVIT *et al.*, 2000).

A comunicação intercelular entre bactérias reforça que estes microrganismos são capazes de coordenar atividades que, antes, acreditava-se ser restrita a organismos multicelulares (BOSGELMEZ-TINAZ, 2002). Este mecanismo de comunicação e sua ação coordenada por mudanças ambientais foram denominados *quorum sensing*, que nada mais é do que um processo pelo qual as comunidades bacterianas, rápida e coordenadamente, alteram o padrão de expressão gênica em resposta ao aumento na densidade celular bacteriana, desencadeando assim modificações no ambiente (SUGA; SMITH, 2003).

Quorum sensing (QS) é um mecanismo pelo qual a bactéria monitora a densidade celular populacional, através da concentração de pequenas moléculas sinalizadoras secretadas, chamadas auto-indutores. No geral, bactérias gram-negativas utilizam como auto-indutores derivados de ácidos graxos, as N-acil homoserinas lactonas, enquanto que bactérias gram-positivas utilizam oligopeptídeos modificados após a sua tradução. À medida que a densidade populacional bacteriana aumenta, cada bactéria produz e secreta os auto-indutores no meio extracelular. A concentração externa de auto-indutores é correlacionada com a densidade populacional bacteriana e quando esta concentração alcança um limite, a bactéria detecta e responde a este sinal através de alterações em sua expressão gênica, ativando ou reprimindo genes alvo (MILLER; BASSLER, 2001; READING; SPERANDIO, 2006; FEDERLE; BASSLER, 2003).

Bactérias, tanto gram-positivas como negativas utilizam o *quorum sensing* para regular os diversos conjuntos de atividades fisiológicas. Estes processos incluem simbiose, virulência, conjugação, produção de antibióticos, mobilidade,

esporulação e formação de biofilme. Por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa*, o mecanismo de *quorum sensing* regula a expressão de fatores de virulência como hemolisinas e exoenzima S, que facilitam o rompimento da integridade epitelial, e exotoxina A, que inibe a síntese protéica em células eucarióticas (JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 1995). O principal modelo de estudo de *quorum sensing* tem sido a bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Esta bactéria vive em associação simbiótica com peixes marinhos e moluscos, especialmente com a espécie *Euprymna scolopes* (WATERS; BASSLER, 2005). Quando crescida até altas concentrações celulares, *V. fischeri* induz a expressão de genes responsáveis pela bioluminescência, gerando uma luz azul-esverdeada, diferentemente de quando se desenvolve isoladamente no ambiente marinho, onde as moléculas sinais não se concentram em níveis mínimos para desencadear o mecanismo de *quorum sensing* (MILLER; BASSLER, 2001). *E. scolopes* possui hábitos noturnos, e utiliza a bioluminescência produzida pela bactéria para confundir suas presas e para camuflar-se, evitando o ataque de predadores (VISICK *et al.*, 2000), enquanto que *Vibrio fischeri* beneficia-se da associação simbiótica através da aquisição de nutrientes para seu crescimento em um habitat livre de outros microrganismos (WATERS; BASSLER, 2005; BOSGELMEZ-TINAZ *et al.*, 2002). Em *V. fischeri*, a bioluminescência é dependente da acumulação de um auto-indutor, que foi identificado como sendo um N-(3-oxohexanoyl) homoserina lactona (OHHL) (MILLER; BASSLER, 2001).

Duas proteínas, Lux I e Lux R, controlam a expressão do operon luciferase (*lux ICDABE*) responsável pela produção de luz. A transcrição deste cluster é bidirecional, sendo Lux I uma sintase auto-indutível, que produz acil-homoserina-lactona (AHL), a qual ativa o sistema de regulação (BOSGELMEZ-TINAZ *et al.*, 2002). O aumento na produção dos auto-indutores, moléculas apolares e com livre difusão pela membrana da bactéria, está diretamente relacionado com o aumento da densidade populacional bacteriana. Assim, quando OHHL atinge uma concentração crítica, e a população bacteriana alcança uma alta densidade celular ($> 10^7$ CFU/ml), este se liga a proteína Lux R formando um complexo muito específico (KAPLAN; GREENBERG, 1985; GERA *et al.*, 2006; FEDERLE *et al.*, 2003). O complexo Lux R - OHHL, quando se liga a região promotora de *lux*, conhecida como *lux box*, estimula a transcrição do operon luciferase, resultando no aumento da produção de auto-indutores, em decorrência do aumento da transcrição de *lux I*, assim como aumento na produção de luz. A expressão do gene *lux R* é regulada por este complexo,

desencadeando um mecanismo compensatório que diminui a expressão de *lux* *ICDABE*, em resposta ao feedback positivo do processo produtor de luz (Figura 04) (GERA *et al.*, 2006; BOSGELMEZ-TINAZ *et al.*, 2002).

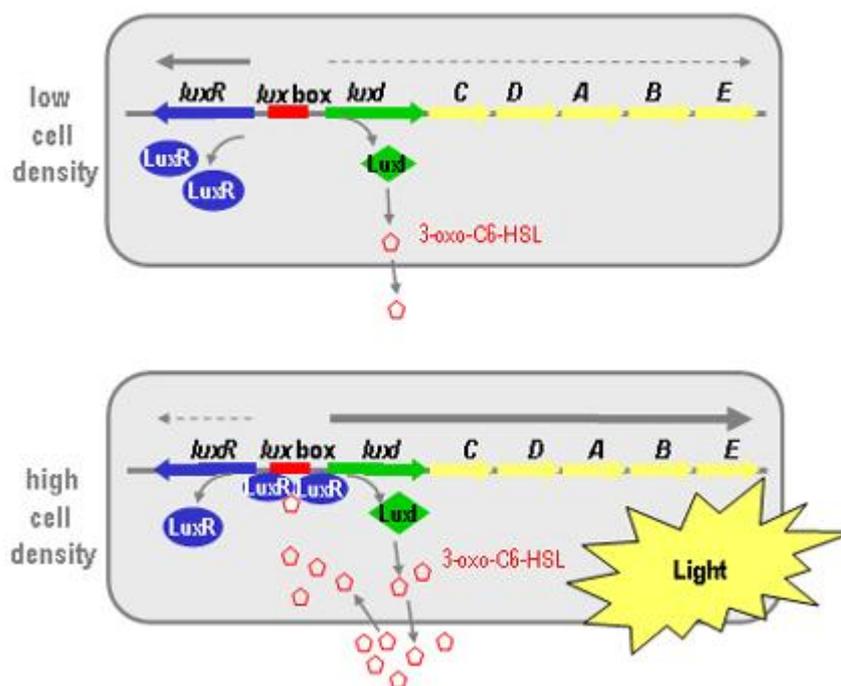


Figura 04 Modelo de ativação da bioluminescência em *Vibrio fischeri* pelo sistema de *quorum sensing* LuxR/LuxI. Em alta densidade celular, o auto-indutor N-(3-oxohexanoyl) homoserina lactona (OHHL) liga-se a Lux R. O complexo LuxR-OHHL estimula a transcrição do operon luciferase. Figura obtida de : <http://botserv1.unizh.ch/site/site/research/pictures/Vibrio.gif>. Autor: KAPLAN, 1985.

Recentemente foram identificadas diversas espécies de bactérias gram-negativas que utilizam sistema de *quorum sensing* análogo ao sistema utilizado pela bactéria *Vibrio fischeri*. Através deste sistema, estas bactérias utilizam uma sintase auto-indutível e um fator de transcrição para regular diversos conjuntos de atividades biológicas como produção de fatores de virulência, motilidade, conjugação, formação de biofilme, entre outros (MILLER; BASSLER, 2001). Muitas destas bactérias são patogênicas e acredita-se que a regulação da virulência através do processo de infecção desempenhe uma importante função na patogenicidade destes microrganismos. Utilizando o *quorum sensing*, estas bactérias patogênicas podem

realizar um ataque simultâneo e produzir fatores de virulência para oprimir as defesas do hospedeiro (DE KIEVIT *et al.*, 2000).

Pseudomonas aeruginosa é uma das bactérias que regulam seu fator de patogenicidade através do *quorum sensing*. Esta bactéria possui um grande número de fatores de virulência, mas nem todos são expressos constantemente. A expressão destes fatores depende da densidade celular, quando a expressão gênica controlada por *quorum sensing* adia o reconhecimento do processo infeccioso até que haja um número suficiente de bactérias para que se obtenha êxito na proliferação do microrganismo, evitando assim a sua expressão prematura (GERA *et al.*, 2006; MILLER; BASSLER, 2001). Estas bactérias utilizam uma grande variedade de enzimas extracelulares que contribuem para sua virulência por causar extensivos danos ao tecido do hospedeiro, como elastase, protease alcalina, hemolisinas, exotoxina A, ramnolipídios biosurfactantes e fosfolipases (BOSGELMEZ-TINAZ *et al.*, 2002). Esta bactéria patogênica possui dois sistemas *quorum sensing* completos análogos a LuxI/LuxR, LasI/LasR e RhII/RhIR. No sistema LasI/LasR, Las R é um fator de transcrição cuja molécula sinalizadora [N-(3-oxododecanoil) homoserina lactona] é sintetizada por enzima codificada pelo gene *lasI*. Este sistema regula a expressão de enzimas tais como elastase, protease alcalina e exotoxina A. No sistema RhII/RhIR, RhIR é um fator de transcrição e possui uma molécula sinalizadora produzida por uma AHL sintase (RhII). Esta molécula sinalizadora, N-butiril homoserina lactona, interage com RhIR para ativar a expressão de genes que resultam na produção de ramnolipídios biosurfactantes (DE KIEVIT *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2003; MILLER; BASSLER, 2001). Globalmente, estes dois sistemas respondem pela regulação da produção de fatores de virulência em *P. aeruginosa*, sugerindo que o *quorum sensing* contribui com a habilidade desta bactéria para iniciar a infecção e persistir no hospedeiro (WAGNER *et al.*, 2003).

Erwinia carotovora é uma bactéria gram-negativa, agente causal da podridão mole em pequenas áreas das raízes de batatas e em outras plantas. A patogenicidade desta bactéria está relacionada à secreção de exoenzimas, incluindo celulases, proteases e diversas pectinases que degradam o tecido parenquimal do hospedeiro. (BOSGELMEZ-TINAZ *et al.*, 2002). No sistema de *quorum sensing* utilizado por esta bactéria, o par homólogo a LuxI/LuxR é ExpI/ExpR, responsáveis pelo controle de secreção de exoenzimas (MILLER; BASSLER, 2001). Há também um segundo par homólogo a LuxI/LuxR, o sistema CarI/CarR, responsável por

regular a biossíntese do antibiótico carbapenem em resposta a alta densidade populacional e a uma molécula auto-indutora. A produção do antibiótico e das exoenzimas ocorre simultaneamente, sendo que CarI e ExpI produzem um idêntico auto-indutor, [N-(3-oxohexanoyl)- homoserina lactona], e por sua vez CarR e ExpR respondem ao mesmo sinal e portanto a regulação das atividades ocorre ao mesmo tempo (MILLER; BASSLER, 2001; BOSGELMEZ-TINAZ *et al.*, 2002).

As bactérias gram-positivas, ao contrário das bactérias gram-negativas possuem moléculas sinalizadoras que não circulam livremente pela membrana bacteriana, normalmente sendo secretadas por transportadores dependentes de ATP (transportador ABC) (FEDERLE *et al.*, 2003; GERA *et al.*, 2006). Alguns peptídeos interagem com quinases sensoras ligadas a membrana bacteriana, enviando o sinal através da mesma. Outros peptídeos são transportados para dentro da célula por oligopeptídeos permeases, que interagem com receptores intracelulares (READING; SPERANDIO, 2006). Após serem liberados para o meio externo, estes peptídeos sinais aumentam sua concentração conforme aumenta a densidade populacional bacteriana. Quando a concentração extracelular do peptídeo sinal acumula a um nível mínimo estimulatório, este interage com o elemento sensor da histidina quinase (MILLER; BASSLER, 2001; GERA *et al.*, 2006).

O mecanismo de sinalização é regulado por processos de fosforilação e desfosforilação, e a interação dos peptídeos sinais com o elemento sensor da histidina quinase inicia uma série de eventos de fosforilação. A quinase sensora autofosforila um resíduo de histidina conservado e subseqüentemente o grupo fosforil é transferido para uma proteína reguladora de resposta, fosforilando um resíduo de aspartato conservado. O regulador de resposta fosforilado ativa a transcrição dos genes de interesse (Figura 05) (MILLER; BASSLER, 2001).

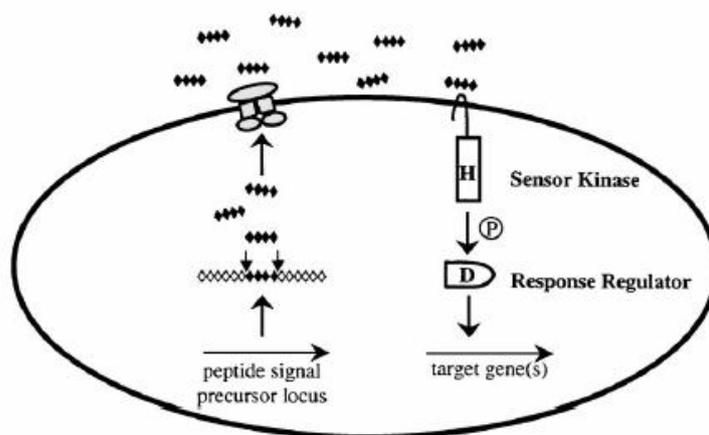


Figura 05 Modelo do mecanismo de *quorum sensing* em bactérias gram-positivas. H - resíduo de histidina conservado. D - resíduo de aspartato conservado. Figura obtida de MILLER et al., 2001.

Enterococcus faecalis é uma bactéria gram-positiva encontrada no trato gastrointestinal, assim como na cavidade oral, vesícula biliar, uretra e vagina. A toxina citolisina, maior fator de virulência desta bactéria, possui atividade hemolítica. A citolisina também serve como um auto-indutor para o sistema *quorum sensing* do operon citolisina. Composta de duas subunidades, CyILL e CyILS, as quais são modificadas pós-traducionalmente para atingir sua forma extracelular plenamente desenvolvida. O controle da citolisina é regulado por um limite de concentração da CyILS. CyILL liga-se fortemente as membranas celulares, permitindo que CyILS fique livre para acumular-se até um limite de indução crítico. Esta subunidade age como um auto-indutor que ativa a transcrição do promotor *cyl* criando altos níveis de citolisina em condições apropriadas (GERA *et al.*, 2006; MILLER; BASSLER, 2001). A bactéria gram-negativa *X. fastidiosa* não possui o sistema de sinalização através da molécula homoserina lactona, mas há evidências que, assim como *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*), suas moléculas sinalizadoras são derivadas de ácidos graxos e desempenham uma importante função no desenvolvimento da clorose variegada de citros. Em *X. fastidiosa* foi encontrado um sistema de sinalização ortólogo ao utilizado por *X. campestris*, o cluster gênico *rpf* (regulação do fator de patogenicidade), responsável pela indução de fatores para o desenvolvimento da doença (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002). Um fato importante que vem reforçar a utilização do mecanismo de comunicação de *X. fastidiosa* através de *quorum sensing* é o aparecimento de sintomas da CVC após meses de infecção, sugerindo

que o desenvolvimento da doença é dependente da densidade populacional da bactéria nos vasos xilemáticos.

Através dos estudos sobre o sistema de comunicação bacteriana, tem sido demonstrado que a presença de regulação temporal de genes nesses microrganismos é de extrema importância para o sucesso de sua sobrevivência. Esta regulação gênica em resposta a densidade populacional reflete a necessidade destes microrganismos de se adaptarem ao meio e conseqüentemente agirem de forma coordenada quando presente em diferentes situações, como no processo de infecções, onde a produção prematura dos fatores de virulência pode alertar os sistemas de defesa do hospedeiro. Um exemplo desta situação é descrito na Clorose Variegada dos Citros, onde os sintomas são visíveis aproximadamente 3-6 meses após a infecção, sugerindo que a doença é dependente da densidade de população do patógeno nos vasos xilemáticos, demonstrando assim, que o mecanismo de *quorum sensing* é um fator multigênico que pode interferir na patogenicidade de *Xylella fastidiosa*.

1.4 Análise de expressão gênica por microarranjos de DNA

Técnicas de análise em escala genômica tem tornado possível o monitoramento simultâneo dos níveis de expressão gênica global, permitindo a identificação funcional e elucidação dos padrões de expressão de uma enorme quantidade de genes de um dado organismo. O microarranjo de DNA é uma metodologia que foi desenvolvida para explorar os dados gerados a partir das seqüências de DNA e produzir informações sobre os níveis dinâmicos de expressão gênica de genomas inteiros, além de possibilitar a integração de grandes conjuntos de dados vindos de diversos experimentos (KURELLA *et al.*, 2001; DUGGAN *et al.*, 1999). A técnica de hibridação em microarranjos é baseada no princípio da complementaridade de bases do DNA e sua capacidade de ligar-se especificamente, ou hibridar, ao DNA molde do qual foi gerado, ou em outro com a mesma seqüência de nucleotídeos. Em uma análise comparativa, diferentes cDNAs, gerados a partir de “pools” de RNAs extraídos de diferentes populações, marcados com diferentes

fluoróforos (moléculas fluorescentes acopladas a uma base nitrogenada) podem competir durante a hibridação com o DNA do microarranjo, e a intensidade da fluorescência em cada ponto de aplicação reflete o nível de expressão relativo daquele gene na amostra original (DIEHN; RELMAN, 2001). Portanto, os microarranjos de DNA permitem diferentes aplicações, como monitorar a expressão gênica em larga escala caracterizando o nível de transcritos e a identificação de conjunto de genes que são expressos em resposta a diversas condições fisiológicas. A possibilidade de identificar genes expressos e a sua magnitude em uma situação específica torna os microarranjos de DNA uma poderosa ferramenta que complementa as informações geradas através do seqüenciamento de DNA. Assim, o microarranjo de *Xf* 9a5c será utilizado neste trabalho para avaliar a variação da expressão de genes entre diferentes situações de densidade celular.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo identificar genes cuja expressão seja modulada em células de *Xf* 9a5c durante as condições de alta e baixa densidade celular. As análises foram feitas através da metodologia de hibridação competitiva em microarranjo de DNA, o qual possui seqüências representativas de aproximadamente 2200 genes mapeados no genoma desta bactéria.

3 MÉTODO

3.1 Manutenção do isolado de *Xylella fastidiosa*

A bactéria *Xylella fastidiosa* 9a5c foi cultivada em meio Periwinkle Wilt (PW), cuja composição é K₂HPO₄ (6,9 mM), KH₂PO₄ (7,3 mM), MgSO₄.7H₂O (1,6 mM), peptona de soja (4,0 g.L⁻¹), triptona (1,0 g.L⁻¹), hemina clorada (0,01 g.L⁻¹), vermelho de fenol (53,1 µM), H₂O deionizada, L-glutamina (27,4 mM) e BSA (6 g.L⁻¹).

Os sais K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, a peptona de soja, triptona, hemina clorada, vermelho de fenol, foram diluídos em H₂O deionizada e autoclavados por vinte minutos à temperatura de 120°C. Separadamente, a BSA foi dissolvida em água deionizada e mantida em agitação constante de 100 rpm, a 28°C, em um agitador orbital, até se obter uma mistura homogênea, enquanto a L-glutamina foi dissolvida em água deionizada, em banho-maria à 65°C, por quinze minutos. Tanto a solução de BSA quanto a de L-glutamina foram posteriormente esterilizadas por filtração em filtro de PVF com 0,22 µm diâmetro de poro (Millipore). Após autoclavagem e filtração os meios esterilizados foram submetidos à teste de esterilidade, mantidos a 28° C por 24 horas, para então serem adicionados um ao outro.

Culturas de *Xf* foram crescidas em 20 mL de meio PW (Davis *et al.*, 1981) e mantidas em agitação constante de 100 rpm, a 28°C, em um agitador orbital (Environ Shaker, Lab-Line). O crescimento bacteriano foi monitorado diariamente com três repetições em cada leitura, com base na turbidez do meio com o auxílio de um espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) pela absorbância a 600nm (DO₆₀₀). Para a construção da curva de crescimento, alíquotas da cultura em crescimento foram retiradas diariamente, com três repetições.

3.2 Extração do RNA Total

A extração do RNA total da bactéria *Xylella fastidiosa* 9a5c foi realizado conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Duas culturas com 400 mL cada (culturas sob condições de alta e baixa densidade celular) foram centrifugadas (16.900g por 10 minutos a 4° C) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 6 mL de água MilliQ e novamente centrifugado (6.000g por 5 minutos a 4° C). Foram utilizados 4 mL de água MilliQ para ressuspender novamente o precipitado formado. O sobrenadante foi descartado e foi adicionada, para cada condição, 0,002 g de lisozima (0,5 mg/ml) diluída em 2 mL de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e 400 µL de SDS 10% para a lise das células.

Após ressuspensão do material, foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 1M pH 5,2, e um volume de fenol pré-aquecido por dez minutos à 64° C. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 64° C por 6 minutos com posterior centrifugação (20.800g por 10 minutos a 4° C). A fase aquosa de cada condição foi recolhida e transferida para tubos novos. Um volume igual de clorofórmio foi adicionado e os tubos foram invertidos para homogeneizar a solução que posteriormente foi centrifugada (20.800g por 10 minutos a 4° C). O sobrenadante foi recolhido e colocado em tubos novos. Para a precipitação do material utilizou-se 40 µL de acetato de sódio (3 M), 1 µL EDTA (1mM), 880 µL de etanol 100 % gelado. Este material permaneceu durante a noite a 20° C. Após este período, o sobrenadante foi centrifugado (20.800g por 25 minutos a 4° C) e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 80%, com posterior centrifugação (20.800g por 5 minutos a 4° C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi seco a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água MilliQ e tratou-se com 1 µL de DNase RQ 1 (5U/µL de RNA) por 1 hora a 37° C.

Com adição de um volume de fenol saturado, um volume de fenol:clorofórmio (1:1 v:v) e um volume de clorofórmio, o RNA foi extraído novamente. Para a precipitação do material, foram adicionados 30 µL de acetato de sódio (3 M) e 660 µL de etanol 100% em cada condição e os tubos foram incubados a -70° C por 40 minutos. Foi utilizado 1 mL de etanol 100% para lavar o precipitado, que foi

centrifugado novamente, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50 μ L de água MilliQ.

A concentração do RNA total foi quantificada com a utilização do Nano Drop (Spectrophotometer ND-1000), através de absorbância a 260nm e 280nm. Os RNAs utilizados apresentavam uma razão A260/A280 entre 1,9 e 2,0. A verificação da integridade do RNA foi constatada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído a 1,2%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob a luz ultravioleta (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para a purificação do RNA utilizou-se o sistema Rneasy (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, ocorrendo purificação e seleção dos RNAs que possuam mais de 200 pb.

3.3 Síntese, Purificação e Marcação do cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado 30 μ g de RNA total de *Xf* 9a5c sob condições de alta e baixa densidade celular, e 20 ng de RNA de λ Q pela incorporação de dCTP acoplado a um fluoróforo (Cy3 ou Cy 5) na síntese da 2^a fita de cDNA (BOWTELL, D.; SAMBROOK, J., 2002). A este RNA foi acrescentado um controle positivo, o RNA de λ Q.

A síntese da 1^a fita de cDNA foi realizada através da reação:

- § 4 μ l de primer mix *Xf* (100 μ M)
- § 1 μ l de RNA de λ Q 20ng/ μ l (controle positivo externo)
- § 0,5 μ l primer antisense Q plus 10mM (5'TTTTTTTTTTTTTTTTGGGTTGGGTAAG 3').
- § 4 μ l RNA alvo (30 μ g)
- § 4,5 μ l de água RNase "free"

24 μ l total

O primer mix *Xf* (100 μ M), desenhados com auxílio do programa Primer 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi/bin/primer/primer3.cgi>), utilizado na reação acima,

contém 1µl de cada par de primers específico para o genoma de *Xf* 9a5c, como descrito por Costa de Oliveira *et al* (2002).

Para promover o anelamento dos primers, o material foi submetido as seguintes condições: 94° C por 1 minuto, 70° C por 2 minutos, 40° C por 2 minutos e 37° C por 2 minutos.

Posteriormente foram adicionados:

- § 6 µl de 5X First Strand Buffer (Invitrogen)
- § 3 µl de 0,1 M DTT
- § 0,6 µl de dNTPs (25mM de cada dNTP)
- § 1 µl de Superscript II RT (200 U/ µl) (Invitrogen)

A reação foi mantida a 42° C por 2,5 horas, com posterior incubação a 70° C por 10 minutos. Adicionou-se 1 µl de RNase (10 mg/mL) a 37° C para degradar o RNA molde. A purificação foi realizada em Microcon YM-30 (Millipore) e o volume ajustado para 22 µl.

Para a marcação da 2ª fita a reação foi incubada a 95° C por 5 minutos, a seguir foram adicionados:

- § 20 µl de 2,5 X solução de primers randômicos – BIOPRIME DNA Labelling System (Invitrogen)
- § 5 µl de mix dNTPs (24mM dATP, 24mM dTTP, 24mM dGTP, 12mM dCTP)
- § 2 µl de 25nmol Fluorolink™ Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP (Amersham)
- § 1 µl de Klenow (40U/µl) - BIOPRIME Labelling System (Invitrogen).

As reações foram incubadas a 37° C durante 2 horas. Utilizou-se o filtro Microcon YM –30 (Millipore) para a purificação, e para cada uma das 3 lavagens foram adicionados 400 µl de água autoclavada. O volume final de cada amostra foi ajustado para 15 µl.

3.4 Hibridação com o Microarranjo de *Xylella fastidiosa*

O microarranjo de *X. fastidiosa* 9a5c possui seis setores com réplica de cada setor, as quais são depositadas imediatamente abaixo do setor correspondente, formando duas cópias do genoma de *Xf* 9a5c em cada lâmina. O gene Q do fago λ foi amplificado e distribuído em pontos específicos da placa para funcionar como controle externo positivo e genes de outros microrganismos distintos aos de *Xf* 9a5c, cDNAs de células eucarióticas e amostras constituídas de tampão sem DNA foram utilizadas como controles negativos.

As amostras de cDNA marcados com Cy3 e Cy5 – dCTP, oriundas das duas condições testadas, foram misturadas em condições equimolares e ressuspensas em 70 μ l de solução de hibridação (6X SSC, 5X Solução de Denhardt's, 0.25 mg/ml de DNA de espermatozoides de salmão e 0,5% SDS).

A complementaridade de bases do DNA com sua capacidade de ligar-se especificamente ao DNA molde original é a base de hibridação em microarranjo, sendo assim a hibridação da solução contra o microarranjo foi realizada a 42° C por 14 a 16 horas em uma estação de hibridação Gene Tac (Genomic Solutions), onde ocorreu o processo de lavagem, com a realização de duas etapas de lavagens a 25°C em solução 0,05 X SSC, 0,01% SDS, 2 lavagens em solução 0,06X SSC, 0,01% SDS e duas lavagens finais com 0,06X SSC. Cada etapa de lavagem consistiu em 1 minuto de fluxo, seguida de 5 minutos de incubação sem agitação. Após este processo a lâmina hibridada foi seca por centrifugação durante 2 minutos a 1000 RPM. A intensidade do sinal fluorescente emitido de cada spot, representa a quantidade do cDNA correspondente. Um “scanner” óptico Affymetrix 418 detectará a emissão da fluorescência, produzindo uma imagem que será armazenada e posteriormente analisada, obtendo-se informações quantitativas da expressão gênica (Figura 06) (PEIXOTO *et al.*, 2006; STEARS *et al.*, 2003).

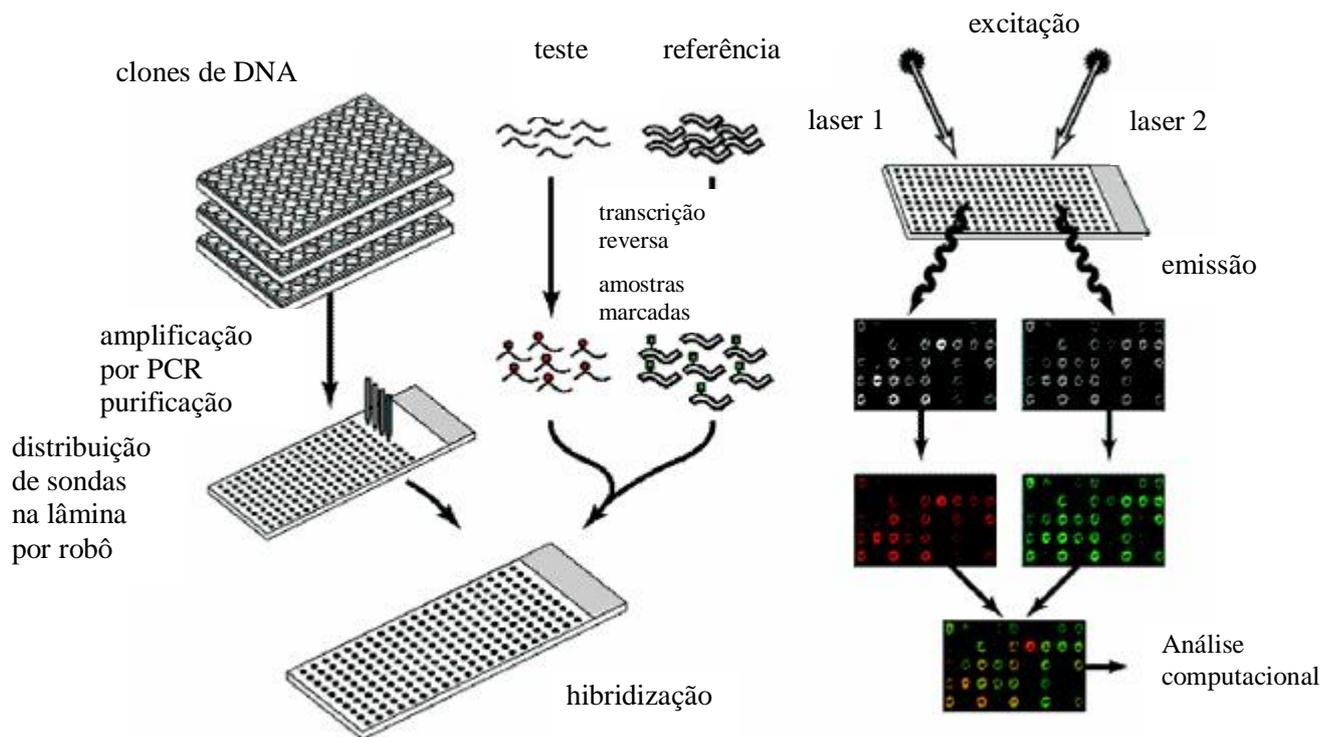


Figura 06 Esquema de Microarranjo de cDNA. A esquerda é mostrado o processo de preparação de sondas, que são primeiramente amplificadas por PCR e em seguida purificadas e distribuídas no suporte sólido. No centro da figura o RNA total de ambas as amostras (teste e referência) foi marcado com elementos fluorescentes (Cy-3 ou Cy-5 dUTP) e seguido da hibridação no microarranjo. No lado direito da figura é mostrado o laser excitando as amostras, as quais emitem um comprimento de onda captado por um “scanner”. Por fim ocorre a análise computacional dos dados obtidos. Figura modificada obtida de: DUGGAN *et al.*, 1999.

3.5 Análise de Imagens

Experimentos em duplicata foram realizados com amostras de RNA marcadas por inversão de fluoróforos (“Dye Swap”). A leitura da lâmina foi realizada por um “scanner” óptico Affymetrix 418, nos comprimentos de onda 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5), gerando imagens de hibridação para cada um dos fluoróforos independentemente. Uma vez que os genes de *X. fastidiosa* estão distribuídos em duplicatas no microarranjo, temos duas leituras de razão de Cy5/Cy3 para cada gene. Para minimizar o background e evitar saturação de sinal em diferentes “spots” do microarranjo, em cada leitura, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados. A figura 07 ilustra uma imagem obtida após leitura de lâmina hibridada com RNAs oriundos das duas condições testadas marcados com dois fluoróforos.

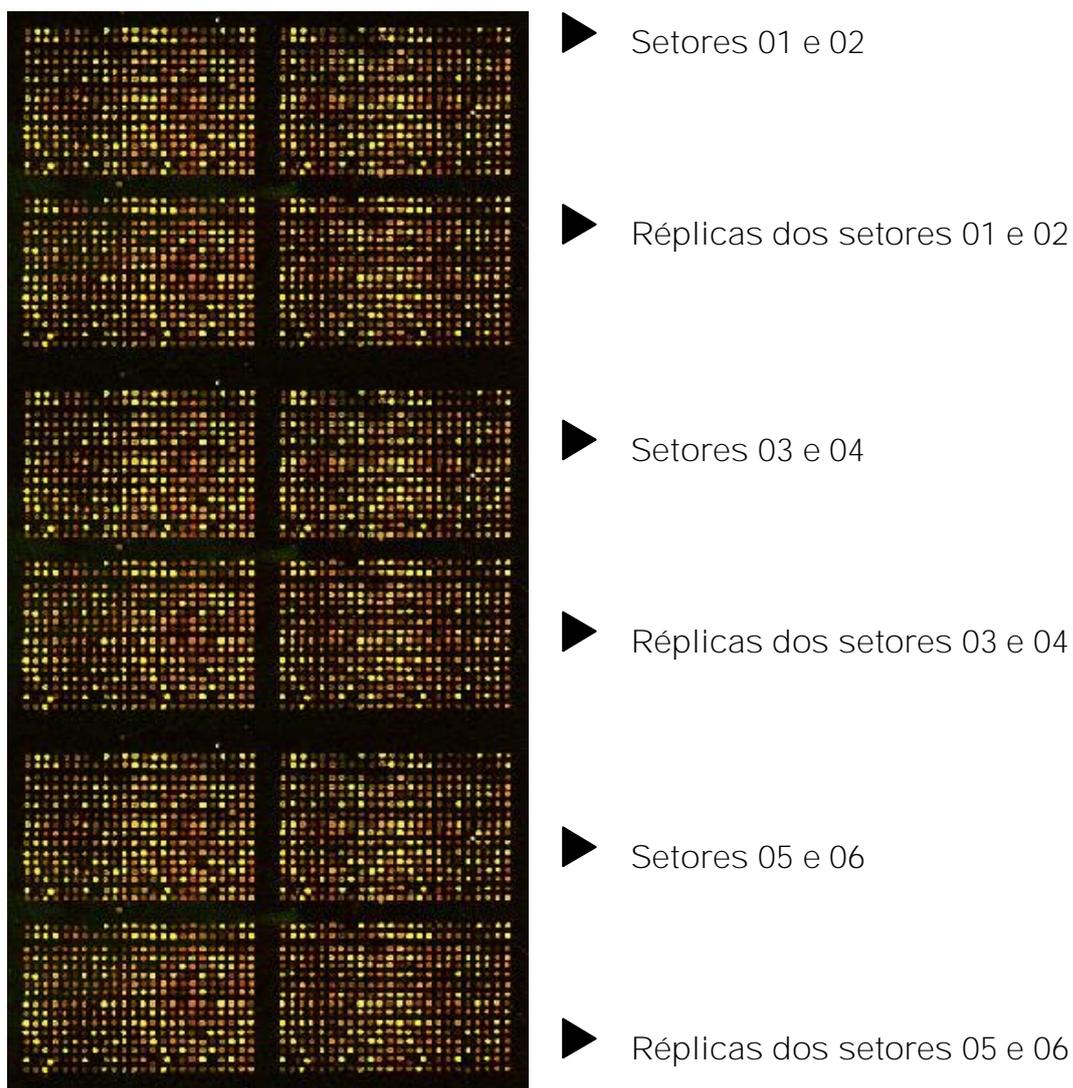


Figura 07 Imagem do biochip de *Xf 9a5c* obtida pelo “scanner” óptico. Representação de uma imagem obtida após leitura em “scanner” óptico depois de hibridação com cDNA de células de *Xf 9a5c*. Destaque para arquitetura do biochip, onde estão assinalados os setores em duplicata. Réplicas de cada setor foram depositadas abaixo do setor correspondente, formando duas cópias do genoma de *Xf 9a5c* em cada biochip.

3.6 Normalização e análise estatística dos dados obtidos

Com a utilização do programa TIGR Spotfinder v.2.2.4 iniciou-se a análise das imagens, com a delimitação das áreas dos “spots” a partir da imagem bruta. Em seguida foram identificados e quantificados os “pixels” pertencentes a cada “spot”, através de um algoritmo de segmentação de histograma, gerando para cada “spot”

um valor integrado de intensidade, já descontado os valores de “background” local. Todos os “spots” que possuíam valores de intensidade inferiores ao “background” local mais duas vezes o desvio-padrão foram excluídos das análises. Ao final desta análise o programa TIGR Spotfinder gera uma planilha com os dados relativos a cada experimento, salvos em extensão .mev, contendo informações referentes as intensidades das leituras e “background” local.

Através do programa TIGR Midas 2.19, com a utilização de transformações matemáticas, os dados gerados pelo programa TIGR Spotfinder, foram filtrados de maneira a excluir “spot” que possuíssem valores integrados inferiores a 10.000 unidades análogo-digitais. A normalização dos valores de intensidade obtidos em cada canal foi realizada pelo método de Lowess, um algoritmo matemático que utiliza fatores de normalização intensidade-dependentes para diferentes “spots”, de acordo com a intensidade de seus respectivos sinais.

Cada experimento gerou um arquivo .mev que foi posteriormente analisado pelo programa Multi-Experiment Viewer (MEV) v.3.1, ocorrendo 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. Através do site <http://www.tigr.org/software> pode-se ter acesso aos softwares empregados neste estudo como também a sua utilização.

3.7 Identificação de genes diferencialmente expressos

Utilizando algoritmos de clusterização hierárquica, como o “K-means”, os genes foram agrupados com o intuito de visualizar super e sub-regulação dos mesmos em condições de alta e baixa densidade celular. Todos os genes modulados nestas condições experimentais foram subdivididos em 20 “clusters”, após análise por meio do algoritmo “figura de mérito” (FOM), o qual determina a

quantidade ideal de “clusters”, facilitando assim a visualização dos diferentes padrões de expressão gênica nas condições experimentais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de condições de alta e baixa densidade celular para *Xylella fastidiosa*

Para definir quando a bactéria encontra-se em alta e baixa densidade celular, foi necessária a obtenção da curva - padrão de crescimento desta bactéria. Esta curva é a representação gráfica do aumento do número de indivíduos em um determinado volume, por tempo de crescimento. Deste modo construiu-se um gráfico representativo do progresso do crescimento, relacionando-se a DO pelo tempo em dias (Figura 08). Após o 2º dia de inoculação a cultura apresenta um aumento significativo na população, indicando que as bactérias estão adaptadas ao meio e iniciaram o crescimento exponencial, que se encerra ao 4º dia, iniciando a partir deste momento a fase estacionária, com declínio da população bacteriana. A partir dos dados gerados pela curva de crescimento desta bactéria estabeleceu-se que no 2º dia de inoculação a cultura encontra-se em baixa densidade celular e ao 4º dia encontra-se em alta densidade celular.

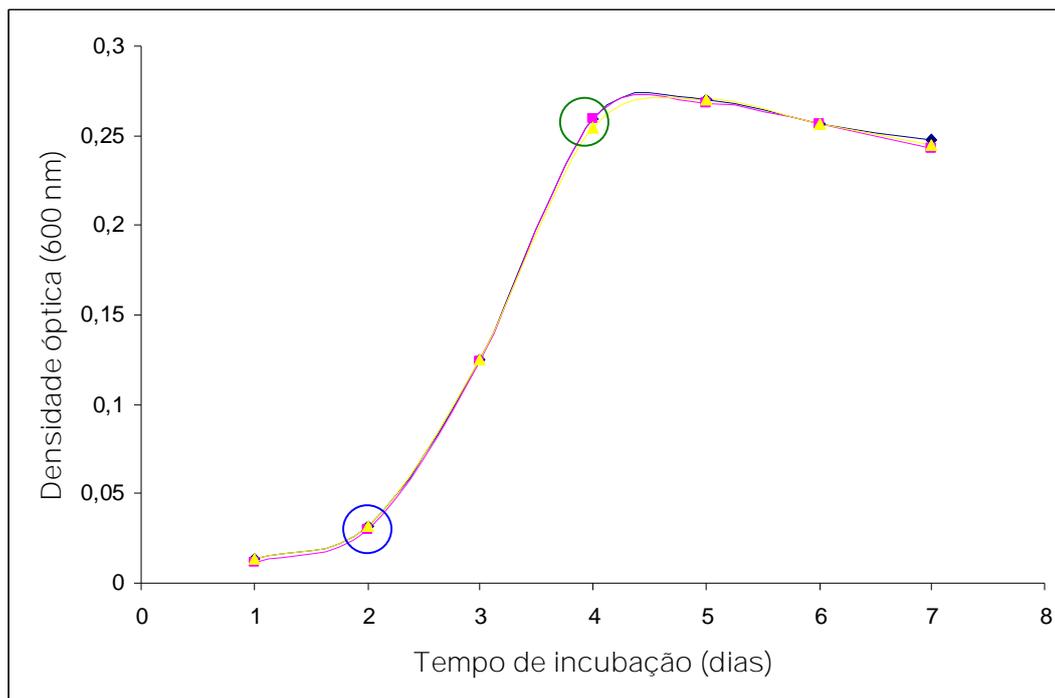


Figura 08 Curva de crescimento de *Xf 9a5c* cultivada em PW.

A cultura foi iniciada a partir de inóculo de células crescidas em meio PW, em fase exponencial de crescimento, na proporção de 1:15. Eixo das ordenadas indica a densidade óptica (DO), medida por absorbância a 600 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro. Eixo das abscissas indica as periodicidades das leituras realizadas, indicada em dias. Os dados são médias de três repetições. O círculo azul indica condição de baixa densidade celular, o círculo verde indica condição de alta densidade celular.

Estabelecida a definição das condições de baixa e alta densidade celular, extraiu-se o RNA total destas duas condições, sendo este RNA utilizado para a síntese de cDNA. As amostras de cDNA foram marcadas com fluoróforos (Cy3 e Cy5 – dCTP) e submetidas ao experimento de hibridação competitiva. Através de análises de programas computacionais pode-se observar a expressão diferencial de 870 genes nas duas condições testadas, sendo 506 genes significativamente induzidos na condição de alta densidade celular, e 364 genes significativamente induzidos na condição de baixa densidade celular.

4.2 Análise dos agrupamentos gênicos diferencialmente expressos

Com base nas informações obtidas no banco de dados de *Xylella fastidiosa*, os genes identificados como diferencialmente expressos foram distribuídos em diferentes categorias e grupos funcionais, permitindo uma análise mais detalhada dos dados obtidos (Figura 09) (ver tabela que constitui o anexo I neste trabalho).

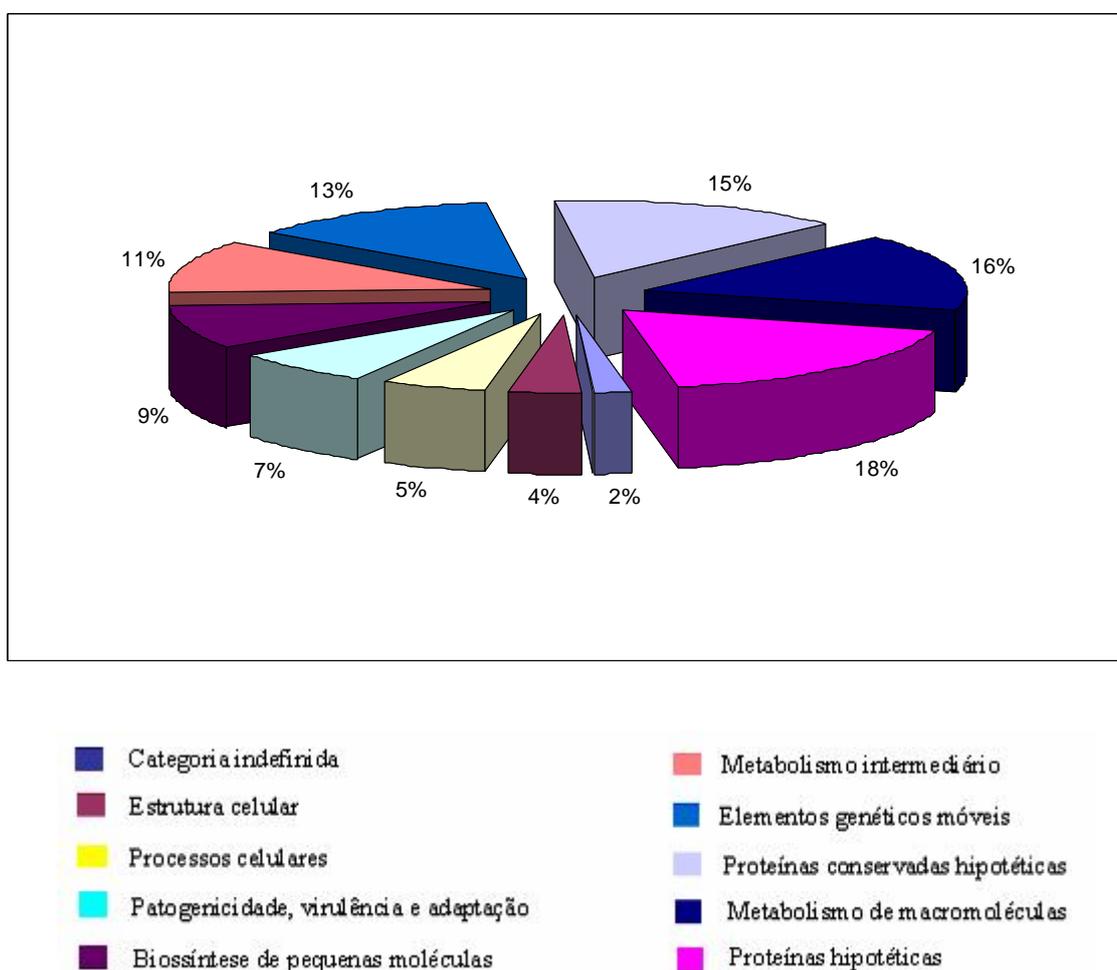


Figura 09 Distribuição funcional das 870 ORFs obtidas pela linhagem *Xf 9a5c* em condições de alta e baixa densidade celular. Categorização de acordo com SIMPSON *et al.*, 2000. Nature 406:151-157.

O número de genes com padrão de super expressão na condição de alta densidade celular é maior quando comparado à condição de baixa densidade celular, revelando assim que há uma coordenada mudança no padrão de expressão gênica em resposta a mudanças ambientais, neste caso o número de indivíduos na população bacteriana (Figura 10).

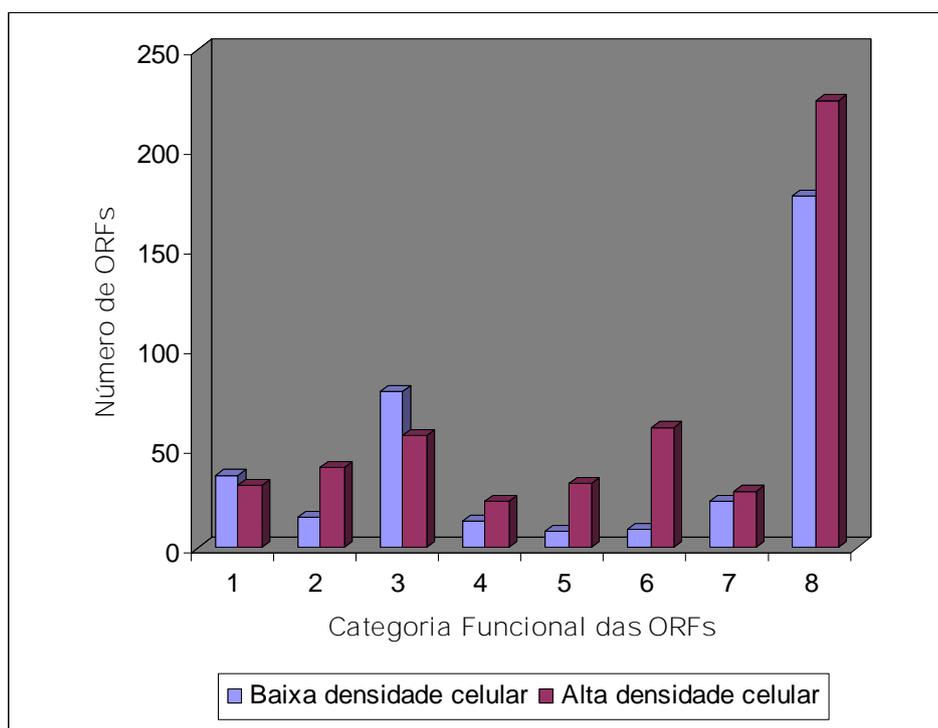


Figura 10 Distribuição funcional das ORFs com modulação estatisticamente significativa encontradas no cromossomo circular de *Xylella fastidiosa* 9a5c em condições de baixa densidade celular contra um RNA de referência obtido de células em condição de alta densidade celular. Os números no eixo da abscissa representam: 1- Metabolismo intermediário, 2- Biossíntese de pequenas moléculas, 3- Metabolismo de macromoléculas, 4- Estruturas celulares, 5- Processos celulares, 6- Elementos genéticos móveis, 7- Patogenicidade, virulência e adaptação, 8- ORFs com categorias indefinidas.

4.3 Resultado de hibridação competitiva em diferentes densidades populacionais

O agrupamento dos genes diferencialmente expressos em 20 grupos distintos, com o auxílio de algoritmos de clusterização hierárquica, como o “K-means, tornou possível a visualização dos conjuntos de genes que compartilham padrões de expressão (Figura 11). Esta distribuição auxiliou a destacar grupos que reúnem os genes mais intensamente expressos ou reprimidos nas condições de alta e baixa densidade celular. Dentre estes grupos, destacam-se os “clusters” 08 e 10 (destacados em azul na figura 09) que reúnem genes com padrão de super expressão em condições de baixa densidade celular, assim como também se destacam os “clusters” 04, 05 e 12 (destacados em amarelo na figura 09) que reúnem genes com padrão de super expressão em condições de alta densidade celular.

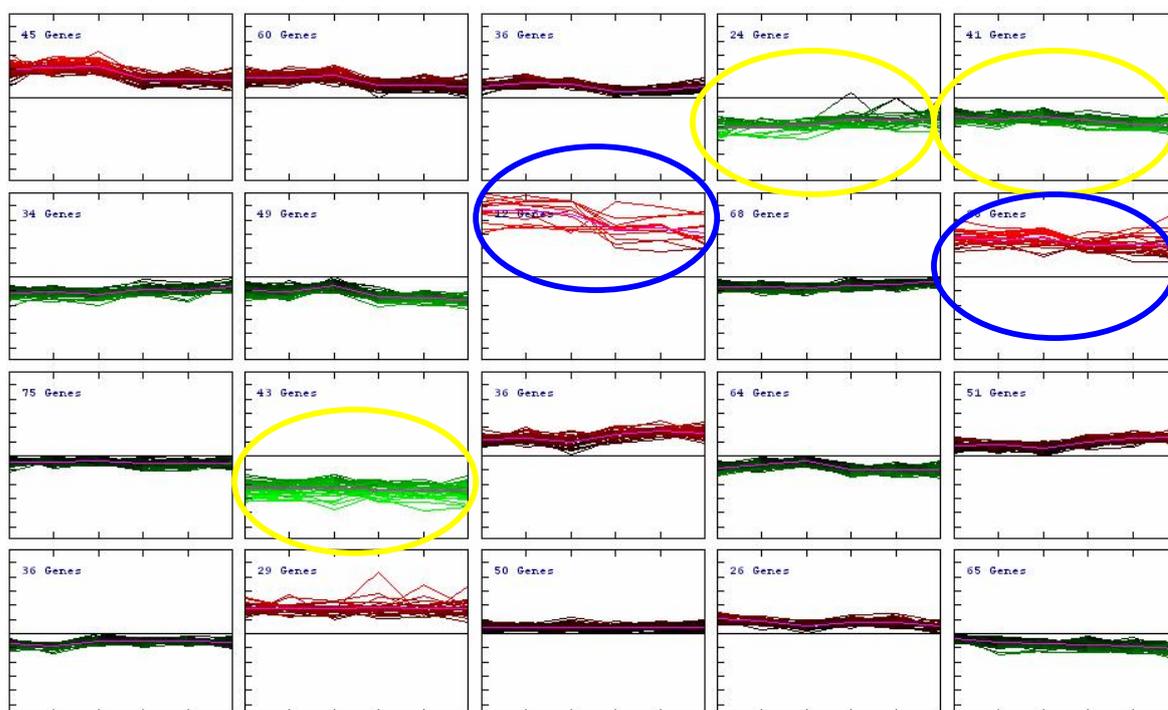


Figura 11 Clusterização a partir da semelhança na expressão dos genes nas condições de alta e baixa densidade celular, resultando em 20 agrupamentos com modulações estatisticamente significativas.

4.4 Genes diferencialmente expressos na condição de baixa densidade celular

O cultivo “*in vitro*” possibilita a bactéria um ambiente favorável para o seu crescimento, com nutrientes disponíveis e condições físicas necessárias ao seu desenvolvimento. Em cultura axênica, *X. fastidiosa* tem a possibilidade de sobreviver sem a necessidade de competição por nutrientes e espaço com microrganismos endofíticos. Além disso, nestas condições esta bactéria não sofrerá resistência da planta como resposta a invasão ao tecido hospedeiro, e conseqüente expressão dos sintomas. Sendo assim, em condições experimentais, provavelmente esta bactéria não estará sujeita a estímulos ambientais semelhantes ao encontrado no seu habitat natural, e conseqüentemente a sua resposta a modificações no ambiente diferirá da apresentada em condições ambientais naturais. Este fato explicaria o resultado apresentado na figura 10, onde genes relacionados a patogenicidade, virulência e adaptação nas condições de baixa e alta densidade celular possuem praticamente a mesma quantidade de genes super expressos.

Analisando a figura 10 podemos observar a super expressão de genes relacionados ao metabolismo de macromoléculas na condição de baixa densidade celular, devido às bactérias nesta fase estarem iniciando um rápido crescimento e um intenso processo de transcrição, produzindo as espécies de RNA que serão responsáveis pela síntese protéica, resultando em proteínas que serão utilizadas para a manutenção do metabolismo bacteriano (GRUNENFELDER *et al.*, 2001). Coincidentemente, os genes responsáveis pela codificação das proteínas ribossomais estão super expressos na condição de baixa densidade celular. A síntese de proteínas ocorre em três etapas: iniciação, alongação e terminação, e através da análise dos dados observou-se a super expressão do gene relacionado ao fator de iniciação (XF0235 – *InfB*). Este fator de iniciação age no reconhecimento do RNAm pelo subunidade menor do ribossomo, e também é responsável pelo deslocamento do ribossomo pelo RNAm. Os genes relacionados a fatores responsáveis pela alongação da proteína (XF2629 – fator de alongação G, XF2579 – fator de alongação Ts, XF2628 – fator de alongação Tu) também apresentaram super expressão nesta condição. Em *Escherichia coli*, o fator de alongação EF-Ts

participa da síntese de proteínas associado a outro fator de alongação, EF-Tu, que atua na ligação do aminoacil-RNAt ao complexo RNAm-ribossomo (CHAVES *et al.*, 2002). Sugerindo assim uma intensa síntese protéica para adaptação metabólica das bactérias ao novo ambiente, o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais encontradas pelas células e sendo assim há um aumento na síntese de proteínas ribossomais (Figura 12).

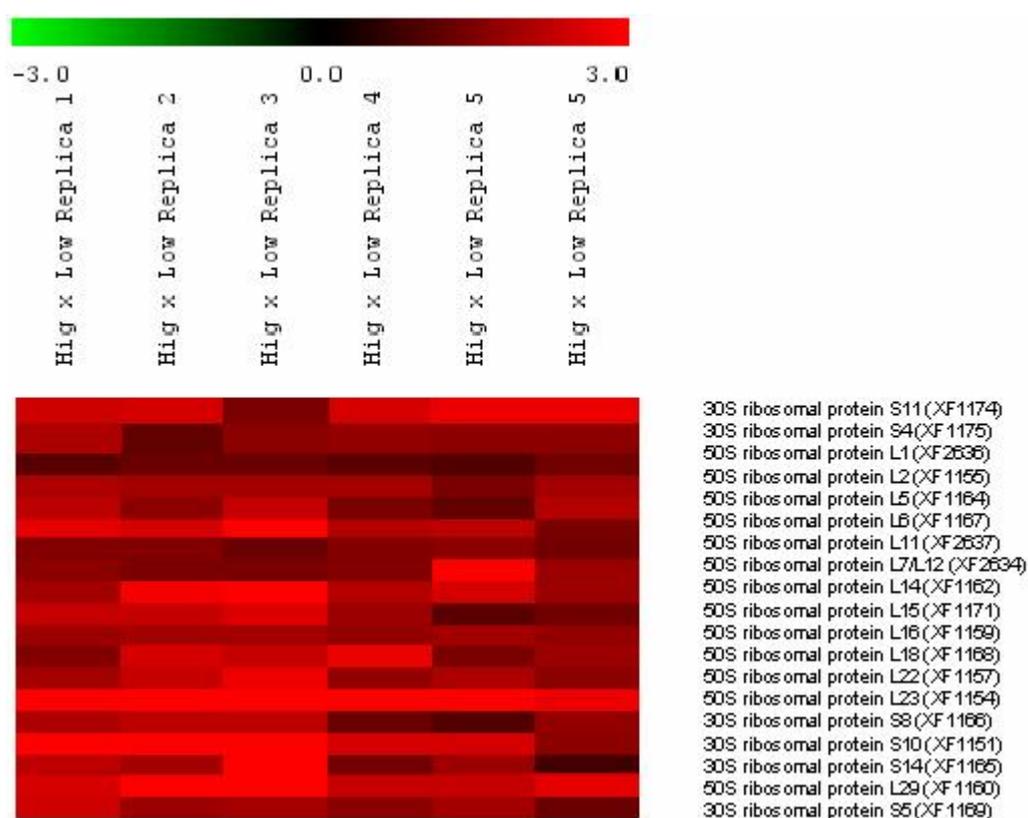


Figura 12 Padrão de super expressão de proteínas ribossomais identificadas como moduladas na condição de baixa densidade celular.

A análise dos resultados mostra a super expressão de genes envolvidos em metabolismo de monossacarídeos e degradação de carboidratos para produção de piruvato na condição de baixa densidade celular, o gene XF0274 (*pfkA* - 6-fosfofrutoquinase), que participa diretamente da conversão de frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, e o gene XF0457 (*gapA* - G-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), que catalisa a mudança de gliceraldeído-3-fosfato para 1,3-

bifosfoglicerato. Estes dados revelam assim que, com a disponibilidade de carboidrato, estes genes tem sua expressão aumentada para a continua produção deste intermediário do metabolismo central (FACINCANI *et al.*, 2003).

Ainda em baixa densidade celular observa-se a super expressão de genes relacionados a habilidade para formação de colônias aderentes a superfícies, *fim A* (XF 2539), esta proteína é uma adesina fimbrial do tipo IV, encontrada em inúmeras espécies bacterianas que infectam plantas como também animais e humanos (VAN DOORN *et al.*, 2001). Observa-se também a super expressão genes que codificam proteínas responsáveis pela formação e função de filamentos de fimbrias do tipo IV, XF0479 (*pilE*), XF1955 (*pilG*) e XF0450 (*pilH*), importantes para a adesão célula a célula, indicando que o desenvolvimento padrão da formação de biofilme está sendo iniciado através da expressão aumentada destes genes, sugerindo o início da agregação bacteriana (JENKINS *et al.*, 2005).

Além disso, no genoma de *X. fastidiosa* foi encontrada uma região contendo genes homólogos aos genes do operon responsável pela produção de um exopolissacarídeo (goma xantana) em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (SIMPSON *et al.*, 2000). Este operon *gum* de *X. fastidiosa* é composto por nove genes, dentre os quais quatro genes (*gumD*, *gumE*, *gum F* e *gumM*) apresentaram super expressão na condição de baixa densidade celular (ver tabela que constitui o anexo I neste trabalho). Os genes *gumD* (XF2367), *gumF* (XF2365) e *gum M* (XF2360) são genes homólogos a genes responsáveis pela síntese de açúcares precursores envolvidos na síntese da goma xantana, e o gene *gum E* (XF2366) é homólogo ao gene responsável pela exportação da goma em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (KATZEN *et al.*, 1998). Estes dados sugerem que após a adesão inicial a bactéria iniciaria a produção da goma fastidiana, responsável pela arquitetura do biofilme formado pela bactéria no interior dos vasos xilemáticos.

O gene XF2608 (*luxR/UHPA*) foi o único gene envolvido no mecanismo de percepção de quorum que apresentou aumento de expressão na condição de baixa densidade celular. Em *X. fastidiosa* não foram identificados genes homólogos aos genes da família *luxI*. (SIMPSON *et al.*, 2000). Mas foram encontrados dois genes (XF2608 -*luxR/UHPA* e XF0972 - *pluxR*) codificando proteínas homólogas à proteínas da família *luxR* de ativadores transcricionais (LAMBAIS *et al.*, 2000). A análise do genoma de *X. fastidiosa* sugere a existência de mecanismos de sinalização de *quorum* independentes de LHAs, sendo que as proteínas codificadas

por *luxR* e *luxR/UHPA* participam do mecanismo de percepção dessas moléculas sinalizadoras, sendo assim, provavelmente não ocorra alteração de expressão desses genes na condição de alta densidade celular (LAMBAIS *et al.*, 2000).

Em 2003, Scarpari e colaboradores realizaram experimentos onde propunham verificar se alguns genes de *X. fastidiosa* relacionados a patogenicidade seriam modulados pela densidade populacional. Utilizando as técnicas de RT-PCR (reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa) e “Northern blot” reverso verificaram que a expressão do gene XF2637 (*gumD*) foi detectada somente em condições de alta densidade celular, resultado contrário ao encontrado nos experimentos com microarranjo de DNA. Observou-se também que a expressão do gene XF2608 (*luxR/UHPA*) não foi detectada pela análise de “Northern blot” reverso, mas foi detectada por RT-PCR, sugerindo assim que seu nível de expressão está abaixo dos limites de detecção da metodologia utilizada. Os resultados obtidos no RT-PCR sugerem que sua expressão não é afetada pela densidade da população de *X. fastidiosa* em PW.

Algumas bactérias gram-negativas como *Vibrio harveyi* e *E. coli* produzem dois tipos de moléculas auto-indutoras, denominadas AI-1 (AHL -moléculas acil - homoserina lactona) utilizada na comunicação entre bactérias da mesma espécie e AI-2, codificada pelo gene *luxS* e também utilizada na comunicação entre bactérias da mesma espécie como também entre bactérias de diferentes espécies (SPERANDIO *et al.*, 2001). Como *X. fastidiosa* apresenta mecanismos de sinalização de *quorum* independentes de LHAs, fez-se uma análise preliminar do gene *luxS* de *V. harveyi*, através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), buscando por homologia entre seqüências de aminoácidos no Banco de Dados de *X. fastidiosa* e o resultado encontrado revela que não há nenhuma homologia do gene *luxS* de *V. harveyi* com o genoma de *X. fastidiosa*, sugerindo assim que como este fitopatógeno não possui *luxS*, não poderia sintetizar AI-2.

4.5 Genes diferencialmente expressos na condição de alta densidade celular

A figura 10 mostra que, o Metabolismo intermediário, relacionado com a degradação de pequenas moléculas, para o metabolismo energético e a biossíntese de nucleotídeos, além de estar relacionado também com funções regulatórias, entre outros, na condição de alta densidade celular possui uma menor quantidade de genes super expressos, talvez devido ao meio de cultura começar a apresentar deficiência de nutrientes essenciais para a manutenção deste metabolismo.

Em situação de alta densidade celular observou-se grande quantidade de genes super expressos relacionados a biossíntese de aminoácidos, revelando assim que a capacidade de síntese de certos aminoácidos é necessária, pois o aumento na densidade celular tende a acarretar a depleção de nutrientes essenciais no meio. A análise dos dados revelou que há um aumento na expressão de genes relacionados à síntese dos aminoácidos glutamato, arginina e aspartato na condição de alta densidade celular (KURODA *et al.*, 2006).

A partir da análise dos dados verificou-se também que devido ao rápido crescimento bacteriano há a necessidade de uma maior demanda energética por parte das células, influenciando assim a super expressão de genes relacionados à respiração aeróbica na condição de alta densidade celular (ver tabela que constitui o anexo I neste trabalho). O produto dos genes XF0306 (*nuoB* - NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO6 subunit), XF0314 (*nuoJ* - NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO10 subunit) e XF0317 (*nuoM* - NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO13 subunit) interagem diretamente na cadeia transportadora de elétrons, sendo o produto destes genes responsável pelo início do transporte de elétrons através da remoção de um íon hidreto do NADH, e conversão deste íon em um próton e dois elétrons de alta energia. Durante a glicólise, a energia química gerada é armazenada em NADH, e durante a fosforilação oxidativa há a conversão de NADH a NAD, com a posterior produção de ATP. A super expressão destes genes, diretamente envolvidos com o transporte de elétrons e com o processo de fosforilação oxidativa tende a favorecer a produção de ATP, viabilizando a síntese

de diversos tipos de biomoléculas utilizadas na manutenção da taxa de crescimento celular.

Observa-se, a partir dos resultados obtidos, que genes responsáveis pela recombinação cromossômica estão super expressos em alta densidade celular, sendo necessário assim uma grande quantidade de ATP para realização deste processo. O gene XF1381, uma DNA helicase, responsável por percorrer a molécula de DNA abrindo a dupla hélice à medida que se move; o gene XF1425 (*xerD/xprB* - integrase/recombinase), uma integrase, responsável pela integração e excisão de fragmentos do DNA; os genes XF1483 (*Sss/xerC* - sítio-específico recombinase) e Xfa0019 (*rin* - sítio-específico recombinase) responsáveis pela recombinação sítio específica apresentam super expressão gênica em alta densidade celular, revelando a intensa troca de material genético entre as bactérias na condição de alta densidade celular. Além disso, genes responsáveis pelo reparo de DNA, como a remoção de regiões gênicas lesionadas[XF2426 (*uvrA* - excinuclease ABC subunit A), XF2022 (*sbcB* -exodeoxiribonuclease I), XF0071 (*mumM*- formamidopirimidina DNA glicosilase), XF1716 (*mutS* – proteína de reparo), XF2692 (*ung* - uracil-DNA glicosilase), XF2696 (*rhIB* - RNA helicase ATP-dependente)], também estão super expressos em alta densidade celular, denotando assim uma intensa produção de enzimas que corrigem as alterações prejudiciais que poderiam afetar a continuidade ou seqüência da molécula de DNA (COX, 1998).

O gene XF1379 (luciferase) que possui similaridade com a cadeia alfa da enzima luciferase de *Kryptophanaron alfredi*, bactéria que vive em associação simbiótica com peixes marinhos, também apresentou super expressão na condição de alta densidade celular. A bactéria *K. alfredi* quando em alta densidade celular emite luz, utilizada como camuflagem por estes peixes, e esta reação é catalizada pela enzima luciferase (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/home/>) (HAYGOOD, 1990). Este resultado sugere que assim como em *K. alfredi*, o gene responsável por codificar a enzima luciferase em *X. fastidiosa* altera sua expressão na condição de alta densidade celular.

Um grande número de genes relacionados a virulência e/ou patogenicidade foram detectados super expressos na condição de alta densidade celular. Um exemplo é o gene responsável pelo fator de regulação de patogenicidade XF0290 (*rpfA* -aconitase), que regula a expressão gênica de exopolissacarídeos, este resultado também foi observado em experimentos realizados por Scarpari e

colaboradores em 2003, onde a expressão de *rpfA* foi detectada apenas em condições de alta densidade celular. Quatro enzimas extracelulares responsáveis pela degradação de células da parede celular do hospedeiro [XF1823 (*pcr* – protease), XF1851 (serino-protease), XF 0818 (*engXCA* - endo-1,4 beta-glucanase)] reguladas por XF0290 e XF2395 (*axeA* - acetilxilan esterase) também apresentaram sua expressão aumentada nesta condição (ver tabela que constitui o anexo I neste trabalho). O gene XF0818 codifica uma enzima que possui atividade celulásica, degradando eficientemente a celulose, sugerindo ser um importante fator de virulência expresso pela bactéria no momento da degradação das membranas dos vasos pontuados, presentes nos vasos xilemáticos, possibilitando a locomoção da bactéria de uma célula para outra, podendo assim disseminar-se através do tecido hospedeiro (WULFF *et al.*, 2003).

Observou-se também que genes [XF1523 (*pefk* – proteína K da via geral de secreção) e XF1524 (*pefl* – proteína L da via geral de secreção)] envolvidos na secreção ou exportação de proteínas apresentaram super expressão na condição de alta densidade celular. Outro gene que apresentou super expressão nesta condição foi o gene XF1516 (*usp A1* – proteína de membrana), que através da codificação de uma proteína de membrana externa, é responsável pela fixação celular e possui homologia a *usp A1* de *Moraxella catharralis*, sendo UspA1 essencial para aderência desta bactéria ao tecido hospedeiro (LAFONTAINE *et al.*, 2000), assim como o gene responsável pela resistência do biofilme, XF2287 (*ton B*), e os genes que codificam proteínas associadas à virulência similares aos encontrados em *Dichelobacter nodosus*, XF0506 e XF2121 (*vap E* – proteína E associada a virulência) também apresentam super expressão em alta densidade (KATZ ME *et al.*, 1994).

Genes relacionados com toxinas também apresentaram super expressão na condição de alta densidade celular, como o gene XF2775 (*pspA* - proteína secretadora de hemaglutinina), responsável pela codificação de uma proteína hemaglutinina associada a adesão, e os genes XF1011 (*frpC*), XF0668 (*frpC*) e XF2759 (*frpC*) que codificam proteínas ligantes de cálcio - tipo hemolisina codificam hemolisinas causadoras de necrose ou apoptose, tendo também um caráter citotóxico, apesar de não ter sido identificada a ocorrência de apoptose em células de hospedeiros infectados por *X. fastidiosa*, evidenciando que estas toxinas estariam envolvidas na inibição dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LAMBAIS *et al.*, 2000), também apresentaram super expressão nesta condição. Outro gene

responsável pela codificação de uma hemolisina também apresentou super expressão na condição de alta densidade celular, o gene XF2407 (bacteriocina), que na fase exponencial codifica proteínas com ação antimicrobiana (bacteriocida), indicando que a escassez de nutrientes torna a competição muito importante para a sobrevivência da espécie, denotando a necessidade de eliminar os competidores (MASSEY *et al.*, 2004).

A observação destes dados indica que a alta densidade celular desencadeia vários fatores relacionados a mecanismos de virulência, apesar dos resultados obtidos através de análise com microarranjo de DNA divergirem dos resultados apresentados em 2003 por Scarpari e colaboradores, onde genes codificando celulase (XF0818) e protease-RE (XF1823) não tiveram a expressão afetada significativamente pela densidade celular, enquanto que a expressão de protease-serina (XF1851) foi suprimida significativamente sob condição de alta densidade celular. Nos resultados apresentados por Scarpari e colaboradores observou-se também que a expressão de *xpsK* (XF1523) e *xpsL* (XF1524) não foi afetada significativamente em função da densidade celular.

As ORFs identificadas como categoria indefinida correspondem aquelas que codificam proteínas hipotéticas e proteínas hipotéticas conservadas apresentaram uma maior expressão na condição de alta densidade celular (Figura 10), sendo consequência do maior número total de ORFs expressas nesta condição.

A análise do perfil de expressão gênica modulada em células de *Xf 9a5c* na condição de baixa densidade celular, feitas contra um RNA de referência, obtido de células na condição de alta densidade celular, mostrou uma proporção relativamente grande de ORFs identificadas como elementos que codificam proteínas hipotéticas, para as quais não foi encontrada homologia com nenhuma seqüência descrita (18% do total de genes expressos). Uma outra grande parcela (15% do total de genes expressos) corresponde a proteínas hipotéticas conservadas, que apresentam similaridade a proteínas de função desconhecida encontradas em outras bactérias. Este resultado apresentado é reflexo direto das características encontradas no genoma de *Xf9a5c*, onde 11,1% do genoma total são ORFs conservadas hipotéticas e 38,9% são ORFs hipotéticas, demonstrando que 50% do genoma desta bactéria possui funções ainda desconhecidas.

As ORFs identificadas como categoria indefinida, correspondem aquelas que codificam proteínas hipotéticas e proteínas hipotéticas conservadas apresentaram

uma maior expressão na condição de alta densidade celular (Figura 10), sendo consequência do maior número total de ORFs expressas nesta condição.

A expressão de ORFs que pertencem a elementos genéticos móveis foi maior na condição de alta densidade celular (Figura 13). Os resultados mostrados na figura 10 refletem que a expressão gênica destes elementos, como profagos, genes contidos em ilhas genômicas e plasmídeos, poderiam ser controlados por condições de crescimento e possivelmente por estímulos ambientais, neste caso a alta densidade celular (NUNES *et al.*, 2003).

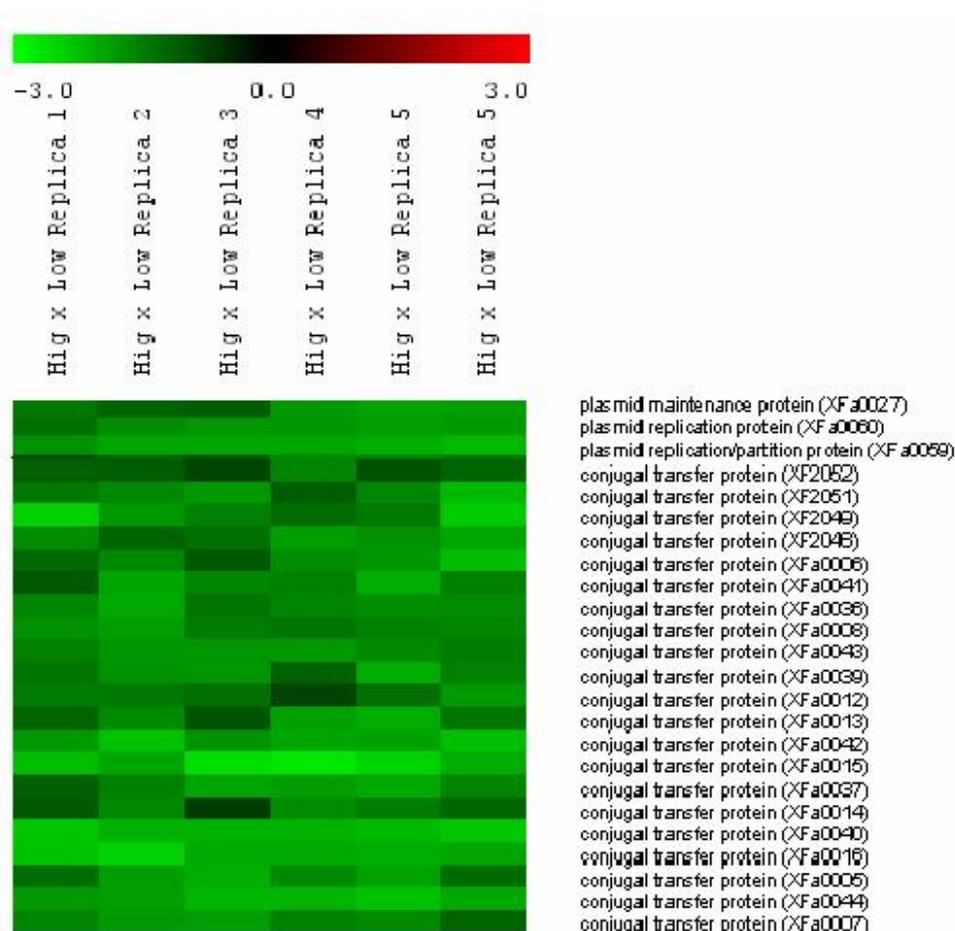


Figura 13 Padrão de modulação dos elementos genéticos móveis. A clusterização mostra aumento da expressão de genes relacionados a funções de plasmídeo na condição de alta densidade celular.

A análise dos resultados revelou que todos os profagos estão super expressos em alta densidade celular, denotando transcrição coordenada destes e

indicando que a expressão gênica destes elementos estaria respondendo a fatores externos, como a condição nutricional da bactéria e do meio em que esta se encontra, além da alta densidade celular que estimularia a transferência horizontal dos genes por esses elementos (Figura 14). Esta transferência horizontal gênica contribuiria para as consideráveis diferenças genômicas observadas em diversas linhagens de *X. fastidiosa*, sugerindo que esta transferência de material genético teria uma grande contribuição para a adaptação de *X. fastidiosa* a novos hospedeiros (NUNES *et al.*, 2003).

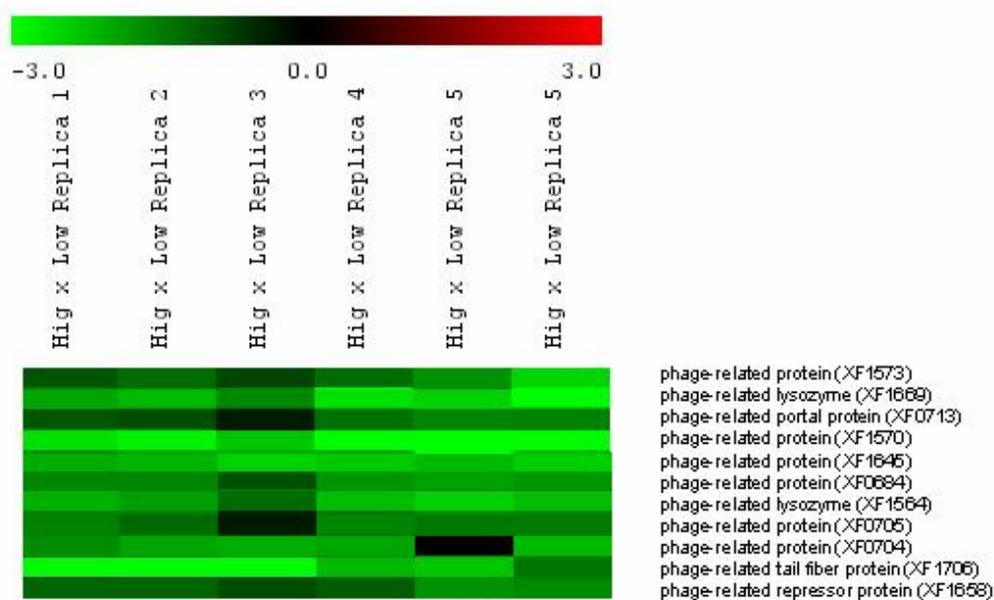


Figura 14 Padrão de modulação de profagos. A clusterização mostra aumento da expressão de genes relacionados ao profago na condição de alta densidade celular.

O progresso da evolução é determinado pela capacidade de adaptação do microrganismo, isto é, se este microrganismo possui características que aumentam sua sobrevivência e/ou sua transmissão a um organismo com específico nicho ecológico. Por essa razão, carregar uma ilha genômica pode disponibilizar uma vantagem seletiva sobre condições ambientais específicas, devido o aumento da transmissão microbiana, sobrevivência ou colonização dentro do nicho. Sendo assim observa-se que a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros, torna a bactéria *X. fastidiosa* um fitopatógeno bem sucedido (HACKER; CARNIEL, 2001).

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão gênica de *X. fastidiosa* em diferentes condições de densidade celular. Através da tecnologia de hibridação competitiva em microarranjo de DNA foi possível observar genes que apresentaram expressão diferenciada nas duas condições testadas.

Com o estudo da expressão gênica foi possível identificar genes relacionados a patogenicidade, virulência e adaptação nas condições de baixa e alta densidade celular. Em condições naturais, o aparecimento de sintomas da CVC só ocorre quando há uma alta densidade celular de *X. fastidiosa* no tecido hospedeiro.

Por outro lado, pode-se identificar a super expressão de elementos genéticos móveis apenas na condição de alta densidade celular, sugerindo assim que as condições ambientais apresentadas, como a proximidade das bactérias e a depleção de nutrientes seriam considerados como fatores determinantes para a transferência gênica horizontal, que contribuiria para as consideráveis diferenças genômicas observadas em diversas linhagens de *X. fastidiosa*, sugerindo que esta transferência de material genético teria uma grande contribuição para a adaptação de *X. fastidiosa* a novos hospedeiros.

Diante dos dados apresentados podemos considerar que, em etapas futuras, experimentos adicionais com células de isolamento primário, consideradas mais virulentas, possam apresentar padrão similar de crescimento dentro da planta, diferentemente de bactérias que foram submetidas a diversas repicagens em meio de cultura, em muitos casos perdendo assim sua virulência.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Dis.*, v.85, n.4, p.382-386, 2001.
- BENDER, C.L.; ALARCÓN, C.F.; GROSS, D.C. Pseudomonas syringae phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *MMBR.*, v.63, n.2, p. 266-292. 1999.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Diseases with a variable incubation period as a function of the host phenology. *Fitopatol. bras.*, v.27, n.6, p.561-565, 2002.
- BHATTACHARYYA, A.; STILWAGEN, S.; IVANOVA, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; LYKIDIS, A.; KAPATRAL, V.; ANDERSON, I.; LARSEN, N.; LOS, T.; REZNIK, G.; SELKOV, E. JR.; WALUNAS, T. L.; FEIL, H.; FEIL, W. S.; PURCELL, A.; LASSEZ, J.-L.; HAWKINS, T. L.; HASELKORN, R.; OVERBEEK, R.; PREDKI, P. F.; KYRPIDES, N. C. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.99, n.19, p.12403-12408, 2002.
- BOSGELMEZ-TINAZ G. *Quorum sensing* in gram-negative bacteria. *Turk J. Biol.*, v.27, n.2, p.85-93, 2002.
- BOWTELL, D.; SAMBROOK, J. DNA Microarrays. A Molecular cloning manual. v.Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2002.
- CAMPANHARO, JC.; LEMOS, MV.; LEMOS, EG. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microb.*, v.46, n.2, p.99-102, 2003.
- CAVICHIOLO, R. R. *Fingeriana dubia* gen. nov. and sp. nov. of Cicadellini (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae) from Southeast and South of Brazil. *Rev. Bras. Zool.*, v.20, n.2, p.247-249, 2003.
- CHAVES, A.L.S.; SILVA, J.A.; PECH, J.-C.; LATSHE, A.; BOUZAYEN, M.; ZEGZOUTI, H.; ROMBALDI, V. Caracterização de ER49, um fator de alongação da síntese de proteínas do tipo Ts, expresso durante a maturação do fruto de tomate. *Braz. J. Plant Physiol.*, v.14, n.1, p.21-30, 2002.

COSTA DE OLIVEIRA, R.; 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 Microbiol.Lett., v.216, n.1, p.15–21, 2002.

COX, M.M. A broadening view of recombinational DNA repair in bacteria. Genes to Cells. v.3, n.2, p.65–78, 1998.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. Phytopathology, v. 73, p. 1510-1515, 1981.

DE KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial *quorum sensing* in pathogenic relationships. Infect. Immunol., v.68,n.99, p.4839-4849, 2000.

DELISA, M.P.; WU, C.-F.; VALDES, J.J.; WANG, L.; BENTLEY, W.E. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v.183, n.18, p.5239-5247, 2001.

DE SOUZA, A. A.; 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. Mol. Plant- Microbe Interact., v.16, n.10, p.867-875, 2003.

DE SOUZA, A. A.; 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 plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett., v.237, n.2, p.341-353, 2004.

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

DOW J. M.; DANIELS M. J. *Xylella* Genomics and Bacterial Pathogenicity to Plants. Yeast, v.17, n.4, p.263-271, 2000.

DOW, J.M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y.Q.; FENG, J.X.; TANG, J.L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is

required for full virulence to plants. Proc Natl Acad Sci USA, v.100, n.19, p.10995–11000,2003.

DUGGAN, D.J.; CHEN, M.; MELTZER, P.; TRENT, J. Expression profiling using cDNA microarrays. Nature Genet., v.21, n.1, p.10-14, 1999.

FACINCANI, A.P.; FERRO, J.A.; PIZAURO, J.R.; MARTIN, J. Carbohydrate metabolism of *Xylella fastidiosa*: Detection of glycolytic and pentose phosphate pathway enzymes and cloning and expression of the enolase gene. Genet. Mol. Biol., v.26, n.2, p. 203-211, 2003.

FEDERLE, M.J.; BASSLER, B.L. Interspecies communication in bacteria. J Clin Invest., v.112, n.9, p.1291-9, 2003.

FEIL, H.; A. H. PURCELL. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. Plant Disease., v.85, n.12, p.1230-1234, 2001.

FUNDECITRUS, *Xylella fastidiosa*. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/>
Último acesso em: janeiro 2007

GERA, C.; SRIVASTAVA, S., *Quorum sensing* :The phenomenon of microbial communication. Current Science, v.90, n.5, p. 666-677, 2006.

GRUNENFELDER, B.; RUMMEL, G.; VOHRADSKY, J.; RODER, D.; LANGEN, H.; JENAL, U. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA., v.98, p.4681–4686, 2001.

HACKER, J.; CARNIEL, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep*, v. 2. n.5, p.376-381, 2001.

HAYGOOD, M. G. Relationship of the luminous bacterioid symbiont of the Caribbean flashlight fish, *Kryptophanaron alfredi* (family Anomalopidae) to other luminous bacteria based on bacterial luciferase (*luxA*) genes. Arch. Microbiol., v.154, n.5, p.496-503, 1990.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline

protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, v. 33, p. 924-929, 1995.

JENKINS, A.T.; BUCKLING, A.; MCGHEE, M.; AFFRENCH-CONSTANT, R.H. Surface plasmon resonance shows that type IV pili are important in surface attachment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Interface.*, v.2, n.3, p.255-9, 2005.

KAPLAN, H.B.; GREENBERG, E.P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol.*, v.163, n.3, p.1210-1214, 1985.

KATZ, M.E.; WRIGHT, C.L.; GARTSIDE, T.S.; CHEETHAM, B.F.; DOIDGE, C.V.; MOSES, E.K.; ROOD, J.I. Genetic organization of the duplicated vap region of the *Dichelobacter nodosus* genome. *J Bacteriol.*, v.176, n.9, p. 2663-9, 1994.

KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G., IELMINI, M.V.; BECKER, A.; PUHLER, A. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol.*, v.180, n.7, p.1607-17, 1998.

KURELLA, M.; HSIAO, L.; OSHIDA, T.; RANDALL, F. D.; CHOW, G.; SARANG, S.S.; JENSEN, R.V.; GULLANS, S.R. DNA Microarray Analysis of Complex Biologic Processes. *J Am Soc Nephrol.*, v.12, n.5, p.1072-1078, 2001.

KURODA, A. A polyphosphate-iron protease complex in the adaptation of *Escherichia coli* to amino acid starvation. *Biosci Biotechnol Biochem.*, v.70, n.2, p. 325-31, Review, 2006.

LAFONTAINE, E.R.; COPE, L.D.; AEBI, C. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells *in vitro*. *J Bacteriol.*, v.182, n. 5, p.1364-73, 2000.

LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.S ; CAMARGO, L.E.A.; GOLDMAN, G.H.. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *C. Opinion In Microbiology*, v.3, n.5, p.459-462, 2000.

LARANJEIRA, F. F. ; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Temporal dynamics of Citrus Variegated Chlorosis in three regions of São Paulo, Brazil. *Fitopatol. bras.*, v.28, n.5, p.481-488, 2003.

LEITE, B.; ANDERSEN, P.C.; ISHIDA, M.L. Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa*. FEMS Microbiol Lett, v.230, n.2, p. 283–290, 2004.

LEMOS, E.G.; ALVES, L.M.; CAMPANHARO, J.C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. FEMS Microbiol. Lett., v.219, n.1, p.39–45, 2003.

LI, W.B.; PRIA, W.D.; LACAVAL, Jr 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, n.8, p.953-958, 2001.

MAH T.-F.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microb., v.9, n.1, p.34-39, 2001.

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 Dis., v.86, n.66, p.633-638, 2002.

MASSEY, R.C.; BUCKLING, A.; FFRENCH-CONSTANT, R. Interference competition and parasite virulence. Proc Biol Sci., v.271, n.1541, p.785-8, 2004.

MCDOWELL, J.M.; DANGL, J.L. Signal transduction in the plant immune response. Trends Biochem. Sci. v.25, n.2, p.79-82, 2000.

MCDOWELL, J.M.; WOFFENDEN, B.W. Plant Disease Resistance Genes: Recent Insights and Potential Applications. Trends Biotech., v.21, n.4, p.178-183, 2003.

MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. *Quorum sensing* in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., v.55, p.165-199, 2001.

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

MOREIRA, L. M.; DE SOUZA, R. F.; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C. Jr.; OLIVEIRA, J. C.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; DA SILVA, A. C. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., v.42, p.163-184, 2004.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - GeneBank.
Disponível em: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/index.html). Último acesso em: janeiro 2007

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 Res.*, v.13, n.4, p. 570-578, 2003.

OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B. ; LEMOS, E.G.M. ; SOUZA, A.A. DE; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *Fems microbiology Letters*, v.236, n.2, p.313-318, 2004.

PAIVA, P.E.B.; BENVENGA, S.R.; GRAVENA, S. Biological aspects of the leafhoppers *Acrogonia gracilis* (Osborn), *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on *Citrus sinensis* L. *Osbeck*. *Neotrop. Entomol.*, v.30, n.1, p.25-28, 2001.

PEIXOTO, B.R.; VÊNCIO, R.Z.N; EGIDIO, C.M.; MOTA-VIEIRA, L.; VERJOVSKI-A, S.; REIS, E.M. Evaluation of reference-based two-color methods for measurement of gene expression ratios using spotted cDNA microarrays. *Bmc Genomics*, v.7, n.1, p.35, 2006.

READING, N.C.; SPERANDIO, V. *Quorum sensing: the many languages of bacteria*. *FEMS Microbiology Letters*, v.254, n.1, p.1-11, 2006.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.; BLUA, M.J.; MIZELL, R.F. 3RD; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol.*, v.49, p.243-70, 2004.

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

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. Clorose variegada dos citros: Revisão. *Laranja.*, v.11, n.1, p.1-14, 1990.

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

SCARPARI, L.M.; LAMBAIS, M.R.; SILVA, D.S.; CARRARO, D.M.; CARRER, H. Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. *Fems Microbiology Letters*, v.222, n.1, p.83-92, 2003.

SILVA, S. R.; OLIVEIRA, J. C.; STUCHI, E. S. Evaluation of mandarines, tangors and tangelos in relation to the citrus variegated chlorosis (CVC). *Rev. Bras. Frutic*, v.26, n.1, p.57-60, 2004.

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

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; KAPER, J.B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.*, v.183, n.17, p.5187-97, 2001.

STEARNS, R.L.; MARTINSKY, T.; SCHENA, M. Trends in microarray analysis. *Nature Med*, v.9, n.1, p.140-145, 2003.

SUGA, H.; SMITH, K.M. Molecular mechanisms of bacterial *quorum sensing* as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol*, v.7, n.55, p.586-591, 2003.

TIGR: The Institute for Genomic Research Disponível em:
<http://www.tigr.org/software>. Último acesso em: janeiro 2007.

VAN DOORN, J.; HOLLINGER, T.C.; OUDEGA, B. Analysis of the type IV fimbrial-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in Hyacinths. *Appl Environ Microbiol.*, v.672, n.2, p.598-607, 2001.

VISICK, K.L.; FOSTER, J.F.; DOINO, J.; MCFALL-NGAI, M.; RUBY, E.G. *Vibrio fischeri lux* Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *J. Bacteriol.*, v.182, n.16, p.4578-4586, 2000.

Xylella fastidiosa home page. Disponível em <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/home/>.
Último acesso em: Janeiro 2007.

WAGNER, V.E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L.; BROOKS, A.I.; IGLEWSKI, B.H. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effect of growth phase and environment. *J. Bacteriol.*, v.185, n.7, p.2080-2095, 2003.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. *Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.21, p.319–346, 2005.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.*, v.182, n.10, p.2675-2679, 2000.

WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H.-Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, B. J. *Xylella fastidiosa*, new-genus, new-species gram negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Syst. Bact.*, v.37, n.2, p.136-143, 1987.

WULFF, N.A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F. Cloning and expression of cellulase XF-818 of *Xylella fastidiosa*. *Scientia Ag.*, v.60, n.4, p.715-721, 2003.

YAMAMOTO, P.T.; PRIA JUNIOR, W.D.; ROBERTO, S.R. Population fluctuation of sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in young citrus groves. *Neotrop. Entomol.*, v.30, n.1, p.175-177, 2001.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JUNIOR, W.D. Species and population dynamics of sharpshooters in nursery citrus, located at Mogi-Guaçu, SP. *Rev. Bras. Frutic.*, v.24, n.2, p.389-394, 2002.

ANEXO I - Identificação e grupo funcional das 870 ORFs que apresentaram modulação de transcrição significativa em resposta ao crescimento de células cultivadas em meio PW em condição de baixa densidade celular feito contra um RNA de referência, obtido de células crescidas em meio PW em condição de alta densidade celular.

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
I. Intermediary Metabolism				
I.A. Degradation of small molecules				
	XF2395	axeA	Acetylxllyan esterase	-0.44
	XF1743	est	Esterase	0.81
	XF1064	glk	glucose kinase	-0.44
	XF1965	dhaA	Haloalkane dehalogenase	-0.61
	XF0781	estA	lipase/esterase	-1.02
	XF1825	cdh	NAD(P)H steroid dehydrogenase	-0.86
	XF2470	cbbZC	phosphoglycolate phosphatase	-0.54
I.B. Entner-Douderoff	XF1062	edd	6-phosphogluconate dehydratase	-0.51
I.C. Nucleotide interconversions				
	XF1288	pyrG	CTP synthetase	-0.60
	XF1058	pyrH	uridylate kinase	0.43
I.D. Pool, multipurpose conversions				
	XF0880	yadf	carbonic anhydrase	
	XF2268	glpK	glycerol kinase	-0.78
	XF0181	gcvH	glycine cleavage H protein	2.21
	XF0183	gcvT	glycine cleavage T protein	1.59
	XF1399	gloA	lactoylglutathione lyase	-0.80
I.E. Sugar-nucleotide biosynthesis, conversions				
	XF0609	gmd	mannose 4,6 dehydratase	1.17
	XF0260	xanA	phosphoglucomutase/phosphomannomutase	-0.55
I.F. Sulfur metabolism				
	XF1500	cysD	ATP sulfurylase, small subunit	-0.45
	XF0187	cysQ/amtA	sulfite synthesis pathway protein	0.77
I.G. Energy metabolism, carbon - Aerobic respiration				
	XF0347	dld1	D-lactate dehydrogenase	3.77
	XF2266	glpD	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-1.35
	XF0314	nuoJ	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO10 subunit	-0.37
	XF0317	nuoM	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO13 subunit	-0.39
	XF0306	nuoB	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO6 subunit	-0.58
I.H. Energy metabolism, carbon – Electron Transport				
	XF1360	coxD	cytochrome C oxidase assembly factor	0.45
	XF0547	ydgM	ferredoxin II	-0.91
I.I. Energy metabolism, carbon - Glycolysis				
	XF0274	pfkA	6-phosphofructokinase	2.34
	XF0457	gapA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.65
I.J. Energy metabolism, carbon - Oxidative branch, pentose pathway				
	XF1063	pgl	6-phosphogluconolactonase	0.66
I.K. Energy metabolism, carbon - TCA cycle				
	XF1549	sucB	dihydrolipoamide S-succinyltransferase	-0.89
	XF1554	fumC	fumarate hydratase	-0.63
	XF1211	mdh	malate dehydrogenase	1.63
	XF2548	sucD	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	0.82
	XF2547	sucC	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	0.55
I.L. Energy metabolism, carbon - ATP-proton motive force interconversion				
	XF1149	atpB/uncB/papD	ATP synthase, A chain	1.92
	XF1147	atpF/uncF	ATP synthase, B chain	1.79
	XF1143	atpD	ATP synthase, beta chain	1.06
	XF1146	atpH/uncH	ATP synthase, delta chain	2.18
	XF1142	atpC	ATP synthase, epsilon chain	1.03
I.M. Regulatory functions				
	XF1182	act	lipase modulator	0.92
	XF1843	glnB	nitrogen regulatory protein P-II	-0.75
	XF1275	phaF	poly(hydroxyalcanoate) granule associated protein	1.76
	XF2691	rpoH	RNA polymerase sigma-32 factor	0.43
	XF1407		sigma-54 modulation protein	0.92
	XF0767	hlyU	transcriptional regulator (ArsR family)	-0.85
	XF2608	gacA	transcriptional regulator (LuxR/UhpA family)	1.46
	XF1730	yafC	transcriptional regulator (LysR family)	1.17
	XF1354	yybA	transcriptional regulator (MarR family)	0.60
	XF1996	C2	transcriptional regulator (PbsX family)	-0.72
	XF1920	trpR	Trp operon transcriptional repressor	1.82
	XF1133		tryptophan repressor binding protein	0.79
	XF1733		tryptophan repressor binding protein	1.06

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF0389	popP/feP/ phoP	two-component system, regulatory protein	1.07
	XF0450	pilH	two-component system, regulatory protein	0.80
	XF1626	algR	two-component system, regulatory protein	-0.49
	XF1848	glnG/ntrC/glnT	two-component system, regulatory protein	-0.78
	XF2578	actR	two-component system, regulatory protein	1.04
	XF1625	algZ	two-component system, sensor protein	-0.69
II-Biosynthesis of Small Molecules				
II.A. Amino acids biosynthesis - Glutamate family nitrogen assimilation	XF1003	asl	argininosuccinate lyase	0.89
	XF1004		glutamate 5-kinase	-1.01
	XF2709	gltD/aspB	glutamate synthase, beta subunit	-0.80
	XF1842	glnA	glutamine synthetase	-0.61
	XF1002		N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-0.93
	XF0998	argF	ornithine carbamoyltransferase	-1.08
	XF2712	proC	pyrroline-5-carboxylate reductase	-1.15
	XF1427	argM/astC/cstC	succinylornithine aminotransferase	-0.58
II.B. Amino acids biosynthesis - Aspartate family, pyruvate family	XF2272	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	-0.91
	XF2396	aspC	aminotransferase	-0.56
	XF2100	aspH	aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	-0.36
	XF1116	lysA	bifunctional diaminopimelate decarboxylase/aspartate kinase	-0.68
	XF1999	ilvE	branched-chain amino acid aminotransferase	-0.72
	XF1105	dapB	dihydrodipicolinate reductase	-0.58
	XF2465		homoserine O-acetyltransferase	-0.45
II.C. Amino acids biosynthesis - Aromatic amino acid family	XF2324	aroE	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	-0.42
	XF0212	trpD	anthranilate phosphoribosyltransferase	-0.60
	XF1914	trpE	anthranilate synthase component I	0.65
	XF0036	tyrB	aromatic-amino-acid aminotranferase	-0.61
	XF1141		chorismate mutase	1.25
	XF2338		chorismate mutase	-0.52
	XF0026	aroG	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	-0.84
	XF1335	aroK	shikimate kinase	-0.61
II.C. Nucleotides biosynthesis- Purine ribonucleotides	XF0560		GMP synthase	-0.43
	XF0458	ndk	nucleoside diphosphate kinase	1.47
	XF2644	prsA/prs	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	0.79
	XF2672	purE	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit	1.04
	XF0205	purC	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	-0.61
	XF1423	purL/purI	phosphoribosylformylglycinamide synthetase	-0.93
II.D. Nucleotides biosynthesis- Pyrimidine ribonucleotides	XF0988	pyrC	dihydroorotase	-1.48
II.E. Nucleotides biosynthesis - Salvage of nucleosides and nucleotides	XF0150	Dut/dnaS/s of	dUTPase	0.92
	XF2354	hpt	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	0.53
	XF2353		purine nucleoside phosphorylase	0.40
II.F. Sugars and sugar nucleotides biosynthesis	XF1297		gluconolactonase precursor	1.79
II.G. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Pantothenate	XF0231	panD	aspartate 1-decarboxylase precursor	0.93

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product		
II.H. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Pyridine nucleotides	XF1924		L-aspartate oxidase	-0.51	
	XF1925	nadC	nicotinate-mononucleotide pyrophosphorylase	-0.78	
II.I. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Thiamin	XF1048	dxr	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	-0.54	
II.J. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Riboflavin	XF1992	ribA	riboflavin biosynthesis protein	-0.53	
	XF2419	ribF	riboflavin biosynthesis protein	-0.92	
	XF0950	ribD/ribG	riboflavin-specific deaminase	-0.75	
	XF0952	ribe	riboflavin synthase alpha chain	-0.55	
II.K. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Thioredoxin, glutaredoxin, glutathione	XF2595	grxC	glutaredoxin	1.90	
	XF2394		glutaredoxin-like protein	-0.64	
II.L. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Menaquinone, ubiquinone	XF2471	ubiG/pufX	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	-0.77	
II.M. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Heme, porphyrin	XF2302	hemL	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	-0.50	
	XF1512	hemK	protoporphyrinogen oxidase	-0.59	
II.N. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Cobalamin	XF1886	pgmA	phosphoglycerate mutase	0.61	
II.O. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Biopterin	XF0193	ygcm	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase	-0.31	
II.P. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis - Others	XF1916		coenzyme F390 synthetase	1.23	
II.Q. Fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis	XF0572	fabA	beta-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase	0.99	
	XF0048	accB/fabE	biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxilase	-0.49	
	XF1087		cardiolipin synthase	-0.81	
	XF1209	Cls/nov	cardiolipin synthase	0.59	
	XF1049	cdsA/cds	phosphatidate cytidyltransferase	-0.41	
II.R. Polyamines biosynthesis	XF1539	speD	S-adenosyl methionine decarboxylase proenzyme	-0.53	
III. Macromolecule Metabolism					
III.A. DNA metabolism -Replication	XF1229		ATP-dependent helicase	-0.74	
	XF0001	dnaA	chromosomal replication initiator	1.01	
	XF0005	gyrB	DNA gyrase subunit B	0.99	
	XF2556	ligA/lig/dnaL/pdeC/lop	DNA ligase	-0.87	
	XF0002	dnaN	DNA polymerase III, beta chain	1.47	
	XF2178	holA	DNA polymerase III, delta subunit	-0.74	
	XF2025	traC	DNA primase	-0.80	
	XF2689	priA	primosomal protein N'	-0.48	
	XF0361	dnaB/groP/grpA	replicative DNA helicase	0.90	
	XFa0061		single-strand binding protein	-1.48	
	XFa0003		topoisomerase I	-2.12	
	XF1353	parC	topoisomerase IV subunit	0.43	
	III.B. DNA metabolism - Structural DNA binding proteins	XF1190	Hbs/hbsU	histone-like protein	1.22
		XF1558	ssb	single-stranded DNA binding protein	-1.67
XF1644		ssb	single-stranded DNA binding protein	-1.65	
III.C. DNA metabolism - Recombination	XF1381		DNA helicase	-0.70	
	XF0003	recF/uvrF	DNA replication and repair RecF protein	1.14	
	XF0425	recD	exodeoxyribonuclease V alpha chain	-1.08	
	XF0423	recB/rorA	exodeoxyribonuclease V beta chain	-0.53	
	XF1425	xerD/xprB	integrase/recombinase	-0.61	
	XF2437	himD	integration host factor, beta subunit	0.76	
	XF0123	recA	recombination protein RecA	1.63	
	XF1483	Sss/xerC	site-specific recombinase	-0.71	
	XFa0019		site-specific recombinase	-2.03	

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	
III.D. DNA metabolism - Repair	XF1262	mutX	7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase	1.60
	XF2426	uvrA	excinuclease ABC subunit A	-0.63
	XF0967	uvrB	excinuclease ABC subunit B	0.28
	XF2022	sbcB/xonAc peA	exodeoxyribonuclease I	-0.51
	XF0071	mutM/fpg	formamidopyrimidine DNA glycosylase	-0.35
	XF1905	ruvC	holliday junction resolvase, endodeoxyribonuclease	0.46
	XF1716	mutS	mismatch repair protein	-0.50
	XF2692	ung	uracil-DNA glycosylase	-0.69
III.E. DNA metabolism - Restriction, modification	XF2297		DNA methylase	-0.69
	XF1968	kpnIM	methyltransferase	-0.38
	XF1804	sphIM	site-specific DNA-methyltransferase	0.83
	XF0297		type I restriction-modification system DNA methylase	-0.69
III.F.RNA metabolism - Ribosomal proteins	XF1151	rpsJ	30S ribosomal protein S10	2.67
	XF1174	rpsK	30S ribosomal protein S11	2.40
	XF1173	rpsM	30S ribosomal protein S13	2.40
	XF1165	rpsN	30S ribosomal protein S14	1.92
	XF0238	rpsO/secC	30S ribosomal protein S15	1.35
	XF2580	rpsB	30S ribosomal protein S2	0.69
	XF2421	rpsT	30S ribosomal protein S20	0.65
	XF0434	rpsU	30S ribosomal protein S21	0.31
	XF1158	rpsC	30S ribosomal protein S3	1.21
	XF1175	rpsD	30S ribosomal protein S4	1.64
	XF1169	rpsE/spc	30S ribosomal protein S5	1.85
	XF2561	rpsF	30S ribosomal protein S6	0.97
	XF1166	rpsH/rps8	30S ribosomal protein S8	1.74
	XF2636	rplA/rpl1	50S ribosomal protein L1	1.18
	XF2635	rplJ	50S ribosomal protein L10	0.23
	XF2637	rplK/reiC	50S ribosomal protein L11	1.48
	XF1162	rplN	50S ribosomal protein L14	2.40
	XF1171	rplO	50S ribosomal protein L15	1.93
	XF1159	rplP	50S ribosomal protein L16	1.86
	XF1168	rplR	50S ribosomal protein L18	2.08
	XF1155	rplB	50S ribosomal protein L2	1.87
	XF1157	rplV	50S ribosomal protein L22	2.07
	XF1154	rplW	50S ribosomal protein L23	3.26
	XF2643	rplY	50S ribosomal protein L25	0.78
	XF1206	rpmB	50S ribosomal protein L28	2.07
	XF1160	rpmC	50S ribosomal protein L29	2.69
	XF1207	rpmG	50S ribosomal protein L33	2.69
	XF1164	rplE/rpl5	50S ribosomal protein L5	1.83
	XF1167	rplF	50S ribosomal protein L6	2.36
XF2634	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	1.91	
III.G.RNA metabolism -Ribosomes - maturation and modification	XF2532	rimK	ribosomal protein S6 modification protein	-0.73
	XF0236	rbfA	ribosomal-binding factor A	0.92
III.H.RNA metabolism - Aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification	XF1856	aspS	aspartyl-tRNA synthetase	-0.63
	XF1338	glnS	glutaminyl-tRNA synthetase	-0.69
	XF1112	lysU	lysyl-tRNA synthetase	-0.64
	XF0927	fnt	methionyl-tRNA formyltransferase	-0.49
	XF0549	metG	methionyl-tRNA synthetase	-1.04
	XF0742	pheT	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	-0.80
	XF2781	rnpA	ribonuclease P	0.78
	XF1314	queA	S-adenosylmethionine: tRNA ribosyltransferase-isomerase	0.72
	XF2286	serS	seryl-tRNA synthetase	-0.55
	XF0109	trmD	tRNA (guanine-N1-)-methyltransferase	-0.47
	XF0169	tyrS	tyrosyl-tRNA synthetase	1.26

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	
III.I. RNA metabolism - RNA synthesis, modification, DNA transcription	XF2696	rhlB/mmrA	ATP-dependent RNA helicase	-0.50
	XF0234	nusA	N utilization substance protein A	0.96
	XF0227	pcnB	polynucleotide adenyltransferase	-0.34
	XF2633	rpoB/groN/nitB/rif/ron	RNA polymerase beta subunit	0.47
	XF1502	rpoZ	RNA polymerase omega subunit	0.72
	XF2638	nusG	transcription antitermination factor	1.44
	XF2699	Rho/nitA/psuA/msC/tsu	transcription termination factor Rho	-0.67
	XF1108	greA	transcriptional elongation factor	-0.70
III.J. RNA metabolism - RNA degradation	XF0239	pnp	polynucleotide phosphorylase	1.00
	XF2615		ribonuclease	1.41
III.K. Protein metabolism - Translation and modification	XF1834		disulphide isomerase	-0.75
	XF2629	fusA	elongation factor G	0.83
	XF2473	efp	elongation factor P	-0.60
	XF2579	tsf	elongation factor Ts	1.00
	XF2628	tufA	elongation factor Tu	1.01
	XF0235	infB	initiation factor IF-2	0.83
	XF2417	lpsA	lipoprotein signal peptidase	0.12
	XF0174	prfC	peptide chain release factor 3	0.76
	XF2642	pth	peptidyl tRNA hydrolase	1.02
	XF1191	ppiD	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.98
	XF1212	ppiB/ppi	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.48
	XF1605		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.42
	XF2585	pcm	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	-1.10
XF0353		translation initiation inhibitor	1.71	
III.L. Protein metabolism - Chaperones	XF0616	groES/htpA	10kDa chaperonin	0.97
	XF0615	mopA/groEL	60kDa chaperonin	1.30
	XF1186	tig	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.41
III.M. Protein metabolism - Protein degradation	XF2260		alanyl dipeptidyl peptidase	-0.90
	XF1189	Lon/capR/deg/muc/lopA	ATP-dependent serine proteinase La	1.12
	XF2704	ctpA	carboxyl-terminal protease	-0.54
	XF0015		dipeptidyl-peptidase	-0.45
	XF1484	hsIV/htpO	heat shock protein	0.44
	XF0452	hflK/hflA	integral membrane protease	0.42
	XF0453	hflC	integral membrane proteinase	4.00
	XF2241	mucD	periplasmic protease	-0.50
	XF0220	pepQ	proline dipeptidase	-0.68
	XF1026	pspB	serine protease	-1.70
	XF1851		serine protease	-0.38
	XF1823	Prc/tsp	tail-specific protease	-0.60
III.N. Other macromolecules metabolism - Polysaccharides	XF2714	fucA1	alpha-L-fucosidase	-0.85
	XF2278	dpm1	dolichol-phosphate mannosyltransferase	-1.00
III.O. Other macromolecules metabolism - Phospholipids	XF1031	plsB	glycerol-3-phosphate acyltransferase	-0.52
IV. Cell Structure				
IV.A. Membrane components - Inner membrane	XF2780		60kDa inner-membrane protein	0.96
	XF0340	dsbB	disulfide bond formation protein B	1.64
	XF1979	ampE	transmembrane protein	-0.78
	XF1140	glmU	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	0.65
IV.B. Membrane components - Outer membrane constituents	XF1024		outer membrane protein H.8 precursor	0.48
	XF0872	ompW	outer membrane protein	1.00
	XF1123		outer membrane protein	0.43
	XF0343	mopB	outer membrane protein	1.58

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
IV.C Murein sacculus, peptidoglycan.	XF2646	lolB	outer membrane lipoprotein precursor	0.74
	XF1896	Pal/ompP6	outer membrane protein P6 precursor	1.60
	XF0884	ponB	penicillin-binding protein 1B	-0.61
	XF1312	mrdA/pbp2	penicillin-binding protein 2	-0.74
	XF2185	rlpA	rare lipoprotein A	-0.95
	XF0276	mpl	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	-0.65
	XF1118	murD	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	-0.28
	XF0793	murE	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	-0.73
IV.D. Surface polysaccharides, lipopolysaccharides, and antigens	XF1638		dolichyl-phosphate mannose synthase related protein	-0.61
	XF0258	rbcC	dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase	
	XF1082	lpxK	lipid A 4'-kinase	-0.95
	XF0104	htrB/waaM	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	-0.73
	XF0778	oafA	O-antigen acetylase	-0.92
	XF1413	kpsF	polysialic acid capsule expression protein	-1.08
	XF1045	lpxD/firA/ssc	UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase	-0.53
	XF1646	lpxd/firA	UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase	-2.26
IV.E. Surface structures	XF1043	lpxA	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	-0.54
	XF2538	pilC	fimbrial assembly protein	-1.20
	XF2539		fimbrial protein	0.91
	XF0487		fimbrillin	
	XF0538		fimbrillin	-0.49
	XF1955	pilG	pilus protein	0.89
	XF0029	pilV	pre-pilin leader sequence	-0.37
	XF0479	pilE	type IV pilin	2.71
V. Cellular Processes				
V.A Transport - Amino acids, amines	XF2207		cationic amino acid transporter	-0.98
V.B Transport - Anions	XF1346	cysW	ABC transporter sulfate permease	-0.82
V.C. Transport - Carbohydrates, organic acids, alcohols	XF2267	glpF	glycerol uptake facilitator protein	-0.67
	XF1402	phbl	phosphotransferase system enzyme I	-0.44
	XF0320	CITN	Mg ⁺⁺ /citrate complex transporter	0.81
	XF1403	phbH	phosphotransferase system HPr enzyme	0.94
V.D. Transport - Cations	XF0395	Bfr	bacterioferritin	2.41
	XF1426		ion transporter	-0.079
	XF0900	corA	magnesium and cobalt transport protein	-0.89
	XF1401	mgtE	Mg ⁺⁺ transporter	-0.74
	XF0901	ybex	polar amino acid transporter	-0.87
	XF1903	Kup/trkD	potassium uptake protein	0.36
V.E. Transport - Protein, peptide secretion	XF2455	ccmA	heme ABC transporter ATP-binding protein	-0.63
	XF2261		oligopeptide transporter	-1.20
	XF1913	mttc	type V secretory pathway protein	0.62
V.F Transport - Other	XF1081	msbA	ABC transporter ATP-binding protein	-0.93
	XF1223	yadG	ABC transporter ATP-binding protein	0.64
	XF1475	ynhD	ABC transporter ATP-binding protein	-0.51
	XF2695	ftsE	ABC transporter ATP-binding protein	-0.75
	XF1476		ABC transporter membrane protein	-0.61
	XF1604	btuE	ABC transporter vitamin B12 uptake permease	-1.01
	XF0406	ygjT	export protein	1.48
	XF0039	mcsL	large-conductance mechanosensitive channel	-0.61
V.G. Cell division	XF1322	minC	cell division inhibitor	-0.85
	XF1320	minE	cell division topological specificity factor	0.72
	XF1657	Fic	cell filamentation protein	-1.45
	XF1084	parA	partition protein	-0.68
	XF1321	minD	septum site-determining protein	-0.58
VI.A Phage-related functions and prophages	XF0724	gpJ	phage-related baseplate assembly protein	-1.22
	XF2492	gpV	phage-related baseplate assembly protein	-0.58

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio	
VI. Mobile Genetic Elements	XF0727	fiR2	phage-related contractile tail sheath protein	-1.03	
	XF2485	fiR2	phage-related contractile tail sheath protein	-0.56	
	XF1642	int	phage-related integrase	-2.44	
	XF2288	int	phage-related integrase	0.99	
	XF1564	lycV	phage-related lysozyme	-2.03	
	XF1669	lycV	phage-related lysozyme	-2.31	
	XF0713	gp4	phage-related portal protein	-1.11	
	XF0684		phage-related protein	-1.59	
	XF0686		phage-related protein	-0.65	
	XF0704		phage-related protein	-1.62	
	XF0705		phage-related protein	-1.26	
	XF0707		phage-related protein	-1.05	
	XF1555		phage-related protein	-1.40	
	XF1570		phage-related protein	-2.96	
	XF1573		phage-related protein	-1.45	
	XF1645		phage-related protein	-2.27	
	XF1864		phage-related protein	1.54	
	XF1869		phage-related protein	1.27	
	XF1875		phage-related protein	0.50	
	XF2127		phage-related protein	-0.74	
	XF2132		phage-related protein	-0.54	
	XF2479		phage-related protein	-0.44	
	XF2522		phage-related protein	-0.45	
	XF2526		phage-related protein	0.37	
	XF0500	racR	phage-related repressor protein	1.24	
	XF1658	Cl	phage-related repressor protein	-1.29	
	XF1706	Gp37	phage-related tail fiber protein	-2.57	
	XF2480	gpX	phage-related tail protein	-0.70	
	XF2481	gpU	phage-related tail protein	-0.70	
	XF2487	gpl	phage-related tail protein	-0.44	
	XF0508	Gp2	phage-related terminase large subunit	-0.61	
	VI.B. Plasmid-related functions	XF2046	trbL	conjugal transfer protein	-1.62
		XF2048	trbJ	conjugal transfer protein	-0.68
		XF2049	trbI	conjugal transfer protein	-1.81
		XF2051	trbG	conjugal transfer protein	-1.62
		XF2052	trbF	conjugal transfer protein	-1.13
		XFa0005	trbC/virB2	conjugal transfer protein	-1.65
		XFa0006	traA/virB3	conjugal transfer protein	-1.60
		XFa0007	traB/virB4	conjugal transfer protein	-1.60
		XFa0008	traC/virB5	conjugal transfer protein	-1.59
		XFa0012	traE/virB8	conjugal transfer protein	-1.36
		XFa0013	traO/virB9	conjugal transfer protein	-1.51
		XFa0014	traF/virB10	conjugal transfer protein	-1.30
		XFa0015	traG/virB11	conjugal transfer protein	-2.34
		XFa0016	traG/virD4	conjugal transfer protein	-2.12
		XFa0036	trbN	conjugal transfer protein	-1.65
		XFa0037	trbL	conjugal transfer protein	-1.67
XFa0039		trbJ	conjugal transfer protein	-1.59	
XFa0040		trbI	conjugal transfer protein	-2.18	
XFa0041		trbH	conjugal transfer protein	-1.62	
XFa0042		trbG	conjugal transfer protein	-1.98	
XFa0043		trbF	conjugal transfer protein	-1.65	
XFa0044		trbE	conjugal transfer protein	-2.03	
XF1759			conserved plasmid protein	0.33	
XFa0047		taxC	nickase	-1.49	
XFa0027		pemK	plasmid maintenance protein	-1.54	
XFa0060		incC	plasmid replication protein	-1.71	
XFa0059			plasmid replication/partition protein	-1.96	
XF2031			plasmid stabilization protein	-1.27	
XF2032			plasmid stabilization protein	-1.27	
XFa0029		parE	plasmid stabilization protein	-1.22	
XF1574			plasmid-related protein	-2.28	
VI.C. Transposon- and intron-related functions.		XF2063	rin	DNA-invertase	-1.01
		XF0325	OrfA	transposase OrfA	3.08

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF0535	OrfA	transposase OrfA	-0.87
	XF0326	OrfB	transposase OrfB	1.78
	XF0536	OrfB	transposase OrfB	-0.26
VII. Pathogenicity, Virulence, and Adaptation				
VII.A. Toxin production and detoxification				
	XF1726	linC	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase	0.72
	XF2385	yegN	acriflavin resistance protein D	-0.60
	XF2407		bacteriocin	-1.01
	XF0263	cvaA	colicin V precursor	2.21
	XF1216	cvaA	colicin V secretion protein	1.70
	XF2416	lytB	drug tolerance protein	-0.6
	XF0993	tetV	drug:proton antiporter	-0.7
	XF1890	gpo	glutathione peroxidase-like protein	-1.86
	XF1210	gst	glutathione S-transferase	0.73
	XF2398	hlyD	hemolysin secretion protein D	-0.94
	XF0668	frpC	hemolysin-type calcium binding protein	-0.68
	XF1011	frpC	hemolysin-type calcium binding protein	-1.19
	XF2759	frpC	hemolysin-type calcium binding protein	-0.61
	XF1732	ncr	NAD(P)H-dependent 2-cyclohexen-1-one reductase	0.41
	XF2586	tolC/mtcB/mukA/refl	outer membrane export factor	-0.56
	XF2550	hecB	outer membrane hemolysin activator protein	-0.97
	XF0619	cutA/cycY/cutA1	periplasmic divalent cation tolerance protein	1.05
	XF1131	pmbA/tldE	PmbA protein	-0.45
	XF2614	sodA/sod	superoxide dismutase [MN]	1.07
	XF2287	tonB	TonB protein	-0.55
	XF1739		outer membrane protein	0.41
VII.B. Host cell wall degradation				
VII.C. Exopolysaccharide				
	XF0818	engXCA	endo-1,4-beta-glucanase	-0.51
	XF2367	gumD	GumD protein	0.48
	XF2366	gumE	GumE protein	0.34
	XF2365	gumF	GumF protein	0.82
	XF2360	gumM	GumM protein	0.82
VII.D. Surface proteins				
	XF2775	pspA	hemagglutinin-like secreted protein	-0.51
	XF1516	uspA1	surface-exposed outer membrane protein	-1.14
VII.E. Adaptation, atypical conditions				
	XF0285	htrA/degP/p td	heat shock protein	0.41
	XF2625	htpX	heat shock protein	0.84
	XF2234	hspA	low molecular weight heat shock protein	1.55
	XF1379		luciferase	-0.89
	XF0837	Imp/ostA	organic solvent tolerance precursor	-0.64
	XF0785	sac1	sulfur deprivation response regulator	-0.58
	XF2622	tapB	temperature acclimation protein B	2.86
VII.F. Other				
	XF0290	rpfA	aconitase	-0.57
	XF1523	pefK	general secretory pathway protein K	-0.69
	XF1524	pefL	general secretory pathway protein L	-0.31
	XF1987	vacB	VacB protein	-0.75
	XF0591		virulence factor	-0.94
	XF2420	mviN	virulence factor	-0.29
	XF0506	vapE	virulence-associated protein E	-0.79
	XF2121	vapE	virulence-associated protein E	-0.50
VIII Hypothetical				
VIII-Conserved Hypothetical Protein				
	XF0006		conserved hypothetical protein	0.76
	XF0066		conserved hypothetical protein	1.84
	XF0072		conserved hypothetical protein	1.29
	XF0086		conserved hypothetical protein	0.38
	XF0102		conserved hypothetical protein	0.72
	XF0139		conserved hypothetical protein	-0.59
	XF0166		conserved hypothetical protein	0.95
	XF0178		conserved hypothetical protein	1.16
	XF0184		conserved hypothetical protein	1.11
	XF0186		conserved hypothetical protein	0.76
	XF0196		conserved hypothetical protein	0.78
	XF0233		conserved hypothetical protein	0.78

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF0240		conserved hypothetical protein	0.77
	XF0241		conserved hypothetical protein	0.89
	XF0338		conserved hypothetical protein	0.90
	XF0339		conserved hypothetical protein	4.29
	XF0363		conserved hypothetical protein	1.04
	XF0393		conserved hypothetical protein	1.42
	XF0405		conserved hypothetical protein	2.72
	XF0472		conserved hypothetical protein	-0.91
	XF0496		conserved hypothetical protein	0.95
	XF0497		conserved hypothetical protein	1.63
	XF0510		conserved hypothetical protein	-0.67
	XF0550		conserved hypothetical protein	0.61
	XF0553		conserved hypothetical protein	-0.92
	XF0554		conserved hypothetical protein	-0.54
	XF0556		conserved hypothetical protein	-0.62
	XF0568		conserved hypothetical protein	1.44
	XF0590		conserved hypothetical protein	-0.82
	XF0593		conserved hypothetical protein	1.02
	XF0597		conserved hypothetical protein	-0.60
	XF0718		conserved hypothetical protein	-1.15
	XF0729		conserved hypothetical protein	-0.83
	XF0744		conserved hypothetical protein	-0.58
	XF0748		conserved hypothetical protein	-0.59
	XF0757		conserved hypothetical protein	-0.58
	XF0789		conserved hypothetical protein	-0.43
	XF0919		conserved hypothetical protein	-0.48
	XF0929		conserved hypothetical protein	-0.054
	XF0994		conserved hypothetical protein	-1.67
	XF1021		conserved hypothetical protein	-0.74
	XF1074		conserved hypothetical protein	0.72
	XF1178		conserved hypothetical protein	2.13
	XF1222		conserved hypothetical protein	1.28
	XF1278		conserved hypothetical protein	1.07
	XF1300		conserved hypothetical protein	-0.78
	XF1304		conserved hypothetical protein	-0.46
	XF1382		conserved hypothetical protein	-0.78
	XF1405		conserved hypothetical protein	-0.59
	XF1438		conserved hypothetical protein	-0.67
	XF1447		conserved hypothetical protein	-0.46
	XF1470		conserved hypothetical protein	-0.71
	XF1477		conserved hypothetical protein	-0.77.
	XF1482		conserved hypothetical protein	-0.54
	XF1514		conserved hypothetical protein	-0.48
	XF1533		conserved hypothetical protein	-0.71
	XF1552		conserved hypothetical protein	-0.89
	XF1560		conserved hypothetical protein	-0.62
	XF1571		conserved hypothetical protein	-2.91
	XF1596		conserved hypothetical protein	-0.41
	XF1641		conserved hypothetical protein	-0.65
	XF1649		conserved hypothetical protein	-2.38
	XF1702		conserved hypothetical protein	-2.51
	XF1708		conserved hypothetical protein	-2.23
	XF1713		conserved hypothetical protein	1.75
	XF1717		conserved hypothetical protein	-0.60
	XF1735		conserved hypothetical protein	0.74
	XF1737		conserved hypothetical protein	0.75
	XF1711		conserved hypothetical protein	0.58
	XF1747		conserved hypothetical protein	0.98
	XF1762		conserved hypothetical protein	1.61
	XF1795		conserved hypothetical protein	-0.47
	XF1838		conserved hypothetical protein	-0.41
	XF1894		conserved hypothetical protein	0.47
	XF1901		conserved hypothetical protein	1.05
	XF1978		conserved hypothetical protein	-0.45
	XF1984		conserved hypothetical protein	-0.77
	XF1995		conserved hypothetical protein	-0.88

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF2008		conserved hypothetical protein	-0.78
	XF2024		conserved hypothetical protein	-0.62
	XF2037		conserved hypothetical protein	-0.61
	XF2170		conserved hypothetical protein	-0.57
	XF2209		conserved hypothetical protein	-0.76
	XF2349		conserved hypothetical protein	0.72
	XF2453		conserved hypothetical protein	-0.63
	XF2472		conserved hypothetical protein	-0.73
	XF2551		conserved hypothetical protein	-0.85
	XF2588		conserved hypothetical protein	-0.90
	XF2705		conserved hypothetical protein	-0.61
	XF2713		conserved hypothetical protein	-0.84
	XF2715		conserved hypothetical protein	-1.07
	XF2718		conserved hypothetical protein	-1.25
	XF1293		conserved hypothetical protein	-0.67
	XF2186		conserved hypothetical protein	-0.42
	XF2088		conserved hypothetical protein	1.30
	XF1495		conserved hypothetical protein	0.41
	XFa0022		conserved hypothetical protein	-1.53
	XFa0023		conserved hypothetical protein	-1.48
	XFa0025		conserved hypothetical protein	-1.67
	XFa0032		conserved hypothetical protein	-1.34
	XFa0045		conserved hypothetical protein	-1.59
	XFa0050		conserved hypothetical protein	-1.78
	XFa0055		conserved hypothetical protein	-1.88
IX Hypothetical Protein	XF0004		hypothetical protein	1.85
	XF0025		hypothetical protein	1.23
	XF0035		hypothetical protein	1.31
	XF0037		hypothetical protein	-1.53
	XF0038		hypothetical protein	-1.17
	XF0052		hypothetical protein	2.48
	XF0057		hypothetical protein	0.93
	XF0062		hypothetical protein	0.59
	XF0065		hypothetical protein	1.80
	XF0067		hypothetical protein	1.68
	XF0069		hypothetical protein	2.08
	XF0070		hypothetical protein	1.67
	XF0135		hypothetical protein	1.22
	XF0158		hypothetical protein	1.95
	XF0162		hypothetical protein	1.43
	XF0180		hypothetical protein	.56
	XF0195		hypothetical protein	-0.44
	XF0198		hypothetical protein	0.90
	XF0209		hypothetical protein	0.46
	XF0219		hypothetical protein	0.99
	XF0221		hypothetical protein	-0.65
	XF0222		hypothetical protein	-0.59
	XF0249		hypothetical protein	0.76
	XF0272		hypothetical protein	1.98
	XF0279		hypothetical protein	1.24
	XF0302		hypothetical protein	-0.72
	XF0342		hypothetical protein	3.55
	XF0345		hypothetical protein	4.87
	XF0357		hypothetical protein	-0.85
	XF0358		hypothetical protein	-0.56
	XF0328		hypothetical protein	1.15
	XF0362		hypothetical protein	0.63
	XF0364		hypothetical protein	1.22
	XF0365		hypothetical protein	1.22
	XF0382		hypothetical protein	1.66
	XF0383		hypothetical protein	1.67
	XF0385		hypothetical protein	1.49
	XF0386		hypothetical protein	1.73
	XF0388		hypothetical protein	1.51
	XF0391		hypothetical protein	1.66
	XF0394		hypothetical protein	1.22

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF0396		hypothetical protein	1.31
	XF0397		hypothetical protein	1.22
	XF0415		hypothetical protein	1.23
	XF0417		hypothetical protein	1.73
	XF0427		hypothetical protein	-0.61
	XF0447		hypothetical protein	1.23
	XF0456		hypothetical protein	2.22
	XF0462		hypothetical protein	0.79
	XF0463		hypothetical protein	1.41
	XF0491		hypothetical protein	1.43
	XF0493		hypothetical protein	1.60
	XF0494		hypothetical protein	1.46
	XF0502		hypothetical protein	1.10
	XF0515		hypothetical protein	-0.51
	XF0518		hypothetical protein	-0.74
	XF0519		hypothetical protein	-0.60
	XF0523		hypothetical protein	-0.60
	XF0526		hypothetical protein	-0.55
	XF0546		hypothetical protein	-1.07
	XF0551		hypothetical protein	0.80
	XF0582		hypothetical protein	-0.95
	XF0600		hypothetical protein	0.88
	XF0602		hypothetical protein	0.77
	XF0605		hypothetical protein	1.19
	XF0607		hypothetical protein	0.80
	XF0613		hypothetical protein	1.56
	XF0614		hypothetical protein	1.48
	XF0626		hypothetical protein	-1.99
	XF0629		hypothetical protein	1.03
	XF0634		hypothetical protein	0.81
	XF0636		hypothetical protein	1.55
	XF0639		hypothetical protein	0.54
	XF0679		hypothetical protein	1.69
	XF0689		hypothetical protein	-0.92
	XF0690		hypothetical protein	-1.41
	XF0692		hypothetical protein	-0.75
	XF0693		hypothetical protein	-0.86
	XF0698		hypothetical protein	-1.00
	XF0702		hypothetical protein	-1.63
	XF0703		hypothetical protein	-0.80
	XF0708		hypothetical protein	-0.69
	XF0709		hypothetical protein	-0.96
	XF0712		hypothetical protein	-1.31
	XF0726		hypothetical protein	-0.80
	XF0735		hypothetical protein	-0.48
	XF0747		hypothetical protein	-0.70
	XF0750		hypothetical protein	0.48
	XF0827		hypothetical protein	-0.64
	XF0828		hypothetical protein	-0.55
	XF0865		hypothetical protein	-0.71
	XF0871		hypothetical protein	0.42
	XF0885		hypothetical protein	-0.89
	XF0891		hypothetical protein	-0.98
	XF0892		hypothetical protein	-0.72
	XF0894		hypothetical protein	-1.17
	XF0895		hypothetical protein	-0.95
	XF0896		hypothetical protein	-1.31
	XF0916		hypothetical protein	1.08
	XF0921		hypothetical protein	-0.35
	XF0945		hypothetical protein	-0.47
	XF0951		hypothetical protein	0.90
	XF0958		hypothetical protein	0.66
	XF0971		hypothetical protein	-0.69
	XF0985		hypothetical protein	1.34
	XF0992		hypothetical protein	-0.32
	XF0996		hypothetical protein	-1.11

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF1006		hypothetical protein	-1.22
	XF1008		hypothetical protein	-0.89
	XF1009		hypothetical protein	-1.19
	XF1019		hypothetical protein	-0.61
	XF1028		hypothetical protein	1.02
	XF1056		hypothetical protein	4.45
	XF1057		hypothetical protein	1.54
	XF1060		hypothetical protein	1.15
	XF1083		hypothetical protein	-0.64
	XF1091		hypothetical protein	-1.16
	XF1100		hypothetical protein	0.60
	XF1109		hypothetical protein	-0.91
	XF1117		hypothetical protein	-0.44
	XF1138		hypothetical protein	1.72
	XF1139		hypothetical protein	2.55
	XF1150		hypothetical protein	1.46
	XF1180		hypothetical protein	1.49
	XF1184		hypothetical protein	1.17
	XF1185		hypothetical protein	0.88
	XF1204		hypothetical protein	0.79
	XF1205		hypothetical protein	1.36
	XF1208		hypothetical protein	2.07
	XF1215		hypothetical protein	0.87
	XF1219		hypothetical protein	2.47
	XF1221		hypothetical protein	2.05
	XF1226		hypothetical protein	1.52
	XF1232		hypothetical protein	1.31
	XF1235		hypothetical protein	1.21
	XF1239		hypothetical protein	1.62
	XF1240		hypothetical protein	2.18
	XF1245		hypothetical protein	0.69
	XF1249		hypothetical protein	1.26
	XF1255		hypothetical protein	2.64
	XF1256		hypothetical protein	1.44
	XF1266		hypothetical protein	1.53
	XF1271		hypothetical protein	1.16
	XF1277		hypothetical protein	0.99
	XF1279		hypothetical protein	1.82
	XF1285		hypothetical protein	-0.64
	XF1287		hypothetical protein	3.38
	XF1306		hypothetical protein	4.67
	XF1307		hypothetical protein	2.29
	XF1323		hypothetical protein	-1.03
	XF1330		hypothetical protein	-0.53
	XF1370		hypothetical protein	1.20
	XF1380		hypothetical protein	-0.50
	XF1411		hypothetical protein	-0.49
	XF1471		hypothetical protein	-0.53
	XF1478		hypothetical protein	-0.58
	XF1480		hypothetical protein	1.31
	XF1513		hypothetical protein	-0.50
	XF1542		hypothetical protein	-1.72
	XF1556		hypothetical protein	-1.04
	XF1559		hypothetical protein	-0.78
	XF1561		hypothetical protein	-1.95
	XF1563		hypothetical protein	-0.83
	XF1566		hypothetical protein	-2.27
	XF1568		hypothetical protein	-1.36
	XF1569		hypothetical protein	-2.05
	XF1575		hypothetical protein	-2.14
	XF1576		hypothetical protein	-2.90
	XF1577		hypothetical protein	-2.63
	XF1578		hypothetical protein	-1.87
	XF1579		hypothetical protein	-2.02
	XF1580		hypothetical protein	-2.04
	XF1581		hypothetical protein	-1.10

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product	Ratio
	XF1583		hypothetical protein	-2.56
	XF1585		hypothetical protein	-2.27
	XF1587		hypothetical protein	-1.33
	XF1588		hypothetical protein	2.21
	XF1592		hypothetical protein	-2.13
	XF1593		hypothetical protein	-2.28
	XF1594		hypothetical protein	-2.26
	XF1598		hypothetical protein	-1.73
	XF1600		hypothetical protein	-0.94
	XF1622		hypothetical protein	1.20
	XF1629		hypothetical protein	1.15
	XF1643		hypothetical protein	-2.25
	XF1647		hypothetical protein	-2.72
	XF1648		hypothetical protein	-2.89
	XF1651		hypothetical protein	-2.00
	XF1653		hypothetical protein	-1.86
	XF1654		hypothetical protein	-1.47
	XF1659		hypothetical protein	-1.52
	XF1665		hypothetical protein	-0.76
	XF1666		hypothetical protein	-1.49
	XF1667		hypothetical protein	-2.45
	XF1687		hypothetical protein	-1.68
	XF1695		hypothetical protein	1.39
	XF1698		hypothetical protein	1.36
	XF1699		hypothetical protein	-2.30
	XF1700		hypothetical protein	-2.12
	XF1704		hypothetical protein	-2.59
	XF1707		hypothetical protein	-1.78
	XF1761		hypothetical protein	0.40
	XF1771		hypothetical protein	0.35
	XF1772		hypothetical protein	0.95
	XF1777		hypothetical protein	1.35
	XF1788		hypothetical protein	0.71
	XF1793		hypothetical protein	1.22
	XF1803		hypothetical protein	2.78
	XF1853		hypothetical protein	2.08
	XF1865		hypothetical protein	1.65
	XF1868		hypothetical protein	1.22
	XF1872		hypothetical protein	1.04
	XF1880		hypothetical protein	1.23
	XF1881		hypothetical protein	0.67
	XF1907		hypothetical protein	1.58
	XF1912		hypothetical protein	0.46
	XF1917		hypothetical protein	1.26
	XF1918		hypothetical protein	1.04
	XF1958		hypothetical protein	1.11
	XF1989		hypothetical protein	-0.52
	XF1997		hypothetical protein	-0.72
	XF2004		hypothetical protein	-0.56
	XF2005		hypothetical protein	-0.81
	XF2011		hypothetical protein	1.43
	XF2020		hypothetical protein	-0.69
	XF2023		hypothetical protein	-0.92
	XF2033		hypothetical protein	-1.27
	XF2034		hypothetical protein	-0.34
	XF2044		hypothetical protein	-0.93
	XF2047		hypothetical protein	-1.51
	XF2079		hypothetical protein	0.82
	XF2111		hypothetical protein	0.47
	XF2114		hypothetical protein	-0.65
	XF2119		hypothetical protein	-0.42
	XF2125		hypothetical protein	-0.74
	XF2128		hypothetical protein	0.56
	XF2129		hypothetical protein	1.79
	XF2130		hypothetical protein	-1.40
	XF2169		hypothetical protein	-0.41

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product
	XF2173	hypothetical protein	-0.60
	XF2192	hypothetical protein	-1.04
	XF2194	hypothetical protein	-0.65
	XF2265	hypothetical protein	-0.77
	XF2296	hypothetical protein	0.41
	XF2316	hypothetical protein	-0.75
	XF2351	hypothetical protein	0.55
	XF2373	hypothetical protein	0.90
	XF2387	hypothetical protein	-0.59
	XF2410	hypothetical protein	-2.01
	XF2412	hypothetical protein	0.49
	XF2464	hypothetical protein	-0.53
	XF2468	hypothetical protein	-0.77
	XF2478	hypothetical protein	-0.53
	XF2494	hypothetical protein	-0.63
	XF2517	hypothetical protein	-0.72
	XF2519	hypothetical protein	-1.55
	XF2529	hypothetical protein	-1.15
	XF2540	hypothetical protein	1.33
	XF2543	hypothetical protein	0.97
	XF2549	hypothetical protein	1.11
	XF2589	hypothetical protein	-0.46
	XF2616	hypothetical protein	0.93
	XF2626	hypothetical protein	1.53
	XF2627	hypothetical protein	1.20
	XF2662	hypothetical protein	0.74
	XF2663	hypothetical protein	1.21
	XF2664	hypothetical protein	1.55
	XF2665	hypothetical protein	0.82
	XF2670	hypothetical protein	0.61
	XF2673	hypothetical protein	1.29
	XF2675	hypothetical protein	0.49
	XF2688	hypothetical protein	-0.50
	XF2702	hypothetical protein	-0.65
	XF2734	hypothetical protein	-0.71
	XF2738	hypothetical protein	0.41
	XF2745	hypothetical protein	-0.51
	XF2746	hypothetical protein	-0.64
	XF2747	hypothetical protein	-0.49
	XF2755	hypothetical protein	-0.77
	XF2758	hypothetical protein	-0.43
	XF2762	hypothetical protein	-1.40
	XF2765	hypothetical protein	-1.78
	XF2767	hypothetical protein	-1.18
	XF2773	hypothetical protein	-0.51
	XF2777	hypothetical protein	-0.44
	XF2779	hypothetical protein	0.89
	XFa0017	hypothetical protein	-1.38
	XFa0020	hypothetical protein	-2.23
	XFa0024	hypothetical protein	-2.33
	XFa0026	hypothetical protein	-2.17
	XFa0028	hypothetical protein	-1.86
	XFa0030	hypothetical protein	-2.31
	XFa0031	hypothetical protein	-1.89
	XFa0033	hypothetical protein	-1.25
	XFa0048	hypothetical protein	-1.30
	XFa0049	hypothetical protein	-1.37
	XFa0051	hypothetical protein	-1.46
	XFa0053	hypothetical protein	-1.14
	XFa0054	hypothetical protein	-1.87
	XFa0056	hypothetical protein	-1.08
	XFa0058	hypothetical protein	-1.53
	XFa0062	hypothetical protein	-1.38
	XFa0063	hypothetical protein	-1.33
	XFa0064	hypothetical protein	-1.70
	XF0511	hypothetical protein	-0.56

(continua na próxima página)

Tabela 1 - continuação

Functional Group	ORF number	Gene name	Gene product
	XF0507	hypothetical protein	-0.63
	XF1766	hypothetical protein	0.51
	XF2152	hypothetical protein	1.07
IX. ORFs with undefinid category			
	XF2149	ApaG protein	1.15
	XF1120	bifunctional DGTP-pyrophosphohydrolase/thiamine phosphate synthase	0.22
	XF0063	competence protein F	0.54
	XF1078	DNA uptake protein	-0.84
	XF1213	GTP-binding elongation factor protein	0.95
	XF2641	GTP-binding protein	1.10

Dados baseados em *Xylella* database (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>).

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](#)