

**PAPEL DA CELULASE XF-0818 NA INTERAÇÃO *Xylella*  
*fastidiosa* X CITROS**

**LEONARDO SOUSA CAVALCANTI**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Janeiro - 2005

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**PAPEL DA CELULASE XF-0818 NA INTERAÇÃO *Xylella*  
*fastidiosa* X CITROS**

**LEONARDO SOUSA CAVALCANTI**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

**P I R A C I C A B A**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Janeiro - 2005

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cavalcanti, Leonardo Sousa  
Papel da celulase XF-0818 na interação *Xylella fastidiosa* x citros / Leonardo Sousa  
Cavalcanti. - - Piracicaba, 2005.  
101 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.  
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Clorose variegada dos citros 3. Enzima 4.  
Escherichia coli 5. Expressão gênica 6. Fruticultura 7. Genoma 8. Imunohistoquímica  
9. Xilema I. Título

CDD 634.3

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

Aos meus pais Severino e Ivanilde (*in memoriam*)

Aos meus irmãos Júnior, Sérgio, Cláudio, Sueli, Ricardo e Diego

Às minhas tias Maria José, Maria das Graças e Margarida

À Amanda, Daniel e Jane

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), pela possibilidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ-USP, pelos exemplos de profissionais realmente comprometidos com a educação e pesquisa, nesse país sempre carente de exemplos.

Ao professor Sérgio Florentino Pascholati, pela constante orientação, pelos ensinamentos transmitidos, oportunidades oferecidas e principalmente pela amizade, confiança e consideração sempre demonstradas de maneira tão sincera.

Ao pesquisador Nelson Arno Wulff, pela amizade, constante presença, apoio e orientação em todas as etapas do trabalho.

Aos professores Eduardo Alves, Jorge Rezende, Márcio Lambais, Ivan Bedendo, João Spotti, Flávio Tavares e Elliot Kitajima pela disponibilidade dos laboratórios e pelas sugestões e correções apresentadas.

À Keila pela amizade e pelo inestimável auxílio na etapa de produção de anticorpos.

A Cândido Athayde Sobrinho e Kátia Regiane Brunelli, pelo companheirismo em todos os momentos, e por terem tornado a palavra amizade insuficiente para abrigar nossa relação.

Ao amigo Paulo de Tarso de Oliveira Ferreira, pelo apoio, amizade e sinceridade demonstrados nesses anos de vivência sob o mesmo teto.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo, Patrícia, Paulo, Júlio, Nelson, Eduardo, Nívea, Renata, Solange, Maurício, André, Leonardo Toffano, Robson, Odair, Cris, Danilo, pela colaboração, solidariedade, união e crescimento conjunto.

Aos colegas e amigos de curso Ana Paula Melo, Adriana, Ana Paula Teixeira, Ana Carolina, Fátima, Alderi, Alexandre, Marissônia, Nilza Patrícia, Rodrigo, Sílvio, Gleiber, Cleci, José Segundo, Luiz Fernando, Ivan, Renato, Érica, Liliane, Marcel, Belasque, Célia, Renato, Rock, Mônica, Ângelo, Marília, Ricardo, Daniel, Andressa, Lílian e Kátia pelos momentos de tão agradável convivência.

À Heloísa pela amizade, dedicação e alegria sempre dispensada de forma tão desprendida.

A Jefferson, Marina, Silvia, Marise, Rodolfo, Fernanda, Edivaldo e Pedro Artuso, pela dedicação e empenho em oferecer as condições necessárias à realização do curso.

Aos amigos de futebol Alessandro, Simão, Paulo Nazareno, Winter, Julcemar, Paulo de Tarso, Luiz Fernando, Patrícia, Quelmo, Luciana, Luciano, Nelson, Leonardo, Leandro, Farias, Dyeme, Hudson, Jorge, Arlei, pelos momentos de alegria e descontração.

*Muitas vezes o teu sucesso depende daqueles que te rodeiam”*

*Benjamim Franklin*

**Os mais sinceros votos de agradecimento“**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 A cultura dos citros.....	4
2.2 A clorose variegada dos citros.....	6
2.3 A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	9
2.4 Disseminação e sobrevivência de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	11
2.5 Sequenciamento do genoma de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	13
2.5.1 Genes envolvidos no processo de adesão.....	14
2.5.2 Produção de toxinas.....	15
2.5.3 Produção de enzimas envolvidas no processo de ataque.....	16
2.6 Celulases em interações fitopatogênicas.....	18
2.7 Celulases de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 Verificação da presença do inserto e do plasmídeo.....	25
3.2 Avaliação da atividade de celulase <i>in vitro</i> .....	28
3.3 Expressão da proteína Xf-0818.....	28
3.4 Eletroporação de <i>E. coli</i> .....	29
3.5 Avaliação de diferentes combinações de indutores.....	30
3.6 Ultrafiltração.....	30



3.7 Purificação da proteína Xf-0818.....	31
3.8 Produção de anticorpos.....	32
3.9 Inibição da atividade de celulase.....	33
3.10 Microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica.....	33
3.10.1 Coleta das amostras.....	33
3.10.2 Preparo das amostras para imunocitoquímica.....	34
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Presença do inserto e do plasmídeo em <i>E. coli</i> .....	37
4.2 Avaliação da atividade de celulase <i>in vitro</i> .....	38
4.3 Expressão e purificação da proteína Xf-0818.....	38
4.4 Produção de anticorpos.....	46
4.5 Inibição da atividade de celulase.....	49
4.6 Microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica.....	49
5 DISCUSSÃO.....	54
5.1 Expressão da proteína Xf-0818.....	54
5.2 Ultrafiltração.....	58
5.3 Purificação da proteína Xf-0818.....	59
5.4 Produção de anticorpos.....	62
5.5 Imunocitoquímica.....	65
6 CONCLUSÕES .....	70
ANEXOS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
APÊNDICES.....	99

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 Seqüência do gene Xf-818 (endo-1,4- $\beta$ -glucanase de 60 kDa) ( <i>Xylella fastidiosa</i> Genome Project, 2003) .....	26
2 Plasmídeo pET 28b(+) com a região de clonagem/expressão evidenciada (Novagen, 2000) .....	27
3 Folhas de plantas de <i>Citrus</i> (var. Caipira) inoculadas e não inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> , utilizadas no preparo das amostras para imunocitoquímica.....	34
4 Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> . M=padrão de peso molecular (pb); 1= DNA plasmidial não clivado; 2 e 3=DNA plasmidial clivado com as enzimas de restrição <i>Hind</i> III e <i>Xba</i> I.....	37
5 Halo de degradação apresentado pelo clone de <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose.....	38
6 Halos de degradação apresentado pelo clone de <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, e induzido através da adição de lactose ou IPTG.....	40
7 Diâmetros dos halos de degradação apresentado pelo clone de <i>E. coli</i> , contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, sob diferentes indutores e combinações destes. Média de seis repetições. Tratamentos com mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade.....	40

- 8 Reação de quantificação de açúcares redutores liberados apresentada pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, sob diferentes indutores e combinações destes. B – controle negativo; coloração amarela mais intensa indica maior quantidade de açúcares liberada..... 41
- 9 Análise da reação de quantificação de açúcares redutores liberados apresentada pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, sob diferentes indutores e combinações destes. Média de três repetições. Tratamentos com mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade..... 41
- 10 Comparação entre as reações de quantificação de açúcares redutores liberados, apresentada pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo celulose carboximetilada, sob diferentes indutores..... 42
- 11 Eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante de amostras de proteínas produzidas por *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818. M=padrão de peso molecular (kDa); 1= Cultivo sem adição de indutor; 2= cultivo com adição de IPTG 1 mM e 3=cultivo com adição de lactose 1 %..... 42
- 12 Reação de quantificação de açúcares redutores liberados, apresentada pelas amostras obtidas na ultrafiltração. CN – Controle negativo, 1 – Extrato bruto, 2 – Fração não retida na membrana de ultrafiltração (proteínas < 50 kDa), 3 – Fração retida na membrana de ultrafiltração (proteínas > 50 kDa)..... 44
- 13 Atividade de celulase nas amostras após a etapa de ultrafiltração, avaliada através da quantificação de açúcares redutores (Lever, 1972). Média de três repetições. Tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade.... 44

- 14 Cromatograma da etapa de lavagem com a utilização de tampão de lavagem (fosfato de sódio 50 mM; NaCl 300 mM; pH 7,0). Escala e linha azuis indicam valores de absorbância a 280 nm, escala e linha vermelhas indicam valores de condutividade... 45
- 15 Cromatograma da etapa de eluição com a utilização de tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM; NaCl 300 mM; imidazol 150 mM; pH 7,0). Escala e linha azuis

- 21 Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros sadia obtida em ultramicrotomo, e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. x – vaso do xilema, px – parede dupla do vaso, o que indica se tratar de um vaso do xilema... 51
- 22 Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros infectada por *X. fastidiosa* obtida em ultramicrotomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. b – bactéria, x – vaso do xilema, px – parede dupla do vaso do xilema..... 52
- 23 Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros infectada por *X. fastidiosa*, obtida em ultramicrotomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão após a etapa de imunocitoquímica. b – bactéria, x – vaso do xilema, px – parede dupla do vaso do xilema ..... 52
- 24 Ampliação da Figura 23 para visualização das partículas de ouro coloidal (Setas brancas). b – bactéria, x – vaso do xilema ..... 53
- 25 Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros infectada por *X. fastidiosa*, obtida em ultramicrotomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão após a etapa de imunocitoquímica. Partículas de ouro coloidal (Setas brancas), b – bactéria, x – vaso do xilema, mp – membrana de pontuação intensamente degradada..... 53

## **PAPEL DA CELULASE XF-0818 NA INTERAÇÃO *Xylella fastidiosa* X CITROS**

Autor: LEONARDO SOUSA CAVALCANTI

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

### **RESUMO**

A partir do sequenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), estudos sobre os mecanismos de patogenicidade expressos durante a doença foram iniciados em projetos de genômica funcional, com o objetivo de confirmar a função das sequências gênicas identificadas no projeto Genoma de *X. fastidiosa*. Dentre esses mecanismos destacam-se as enzimas envolvidas no processo de ataque da bactéria. O presente trabalho teve como alvo de estudo a sequência gênica denominada Xf-0818, clonada em *Escherichia coli* através da inserção em plasmídeo pET 28b(+), que presumivelmente codifica uma celulase de cerca de 60 kDa, possivelmente envolvida na degradação de fibras de celulose presentes nas membranas dos vasos pontuados do xilema de plantas de citros. A degradação desta membrana permitiria a movimentação de células bacterianas entre os vasos do xilema, o que é determinante para o desenvolvimento dos sintomas da CVC. A proteína foi superexpressada em *E. coli* por meio de indução com lactose e purificada através de ultrafiltração associada à cromatografia de afinidade a metal. A enzima apresentou alta atividade sobre a celulose carboximetilada 1%, avaliada através da quantificação de açúcares redutores. A obtenção de anticorpos foi realizada mediante injeção da enzima

purificada em camundongos, os quais foram avaliados através de ELISA. A atividade da enzima sobre celulose carboximetilada foi reduzida após prévia incubação com os anticorpos. Esses anticorpos representam uma poderosa ferramenta em pesquisas visando à identificação das condições que favoreçam a expressão desta enzima “*in vivo*”. A presença de partículas de ouro coloidal em seções de tecido provenientes de plantas infectadas com *X. fastidiosa* indica a atuação da celulase durante a infecção, porém faz-se necessária a confirmação do papel da proteína Xf-0818, através de novas análises com imunolocalização, além de estudos utilizando linhagens mutantes de *X. fastidiosa* para o gene que codifica esta celulase

# **ROLE OF THE XF-0818 CELLULASE IN THE *Xylella fastidiosa* X CITRUS INTERACTION**

Author: LEONARDO SOUSA CAVALCANTI

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

## **SUMMARY**

From the genome sequencing of the bacteria *Xylella fastidiosa*, the agent responsible for the citrus variegated chlorosis (CVC), studies on the pathogenicity mechanisms expressed during the occurrence of the disease were started in genomic function projects, aiming to confirm the function of the genic sequences identified in the project *X. fastidiosa* Genome. Among these mechanisms, the enzymes involved in the bacterium attaching process are highlighted. The present study had, as a goal, the *orf* denominated Xf-0818, cloned in *Escherichia coli* by means of the insertion into pET 28b(+) plasmid, which codifies a cellulase of a size nearly 60 kDa, possibly involved in the degradation of cellulose fibers present in the membranes of the xylem vessels of citrus plants. The degradation of this membrane would allow for the movement of bacterial cells among the xylem vessels, which would be important for the development of CVC symptoms. The enzyme was over expressed into *E. coli* by means of their induction using lactose and purified using ultra-filtration associated to metal affinity chromatography. The enzyme presented high activity over 1%-carboximethyl cellulose (CMC), which was evaluated through quantification of released reduced sugars. The antibodies were obtained by injection of the purified enzyme into mice, which were



evaluated by using the ELISA. The enzyme activity over CMC was reduced after previous incubation with the antibodies. These antibodies represent a tool for the researches aiming the identification of conditions that favor the expression of this enzyme *in vivo*. The presence of gold particles on the citrus diseased tissue samples indicate the participation of this cellulase on the disease, but other studies using immunocytochemistry and mutants of *X. fastidiosa* are necessary to confirm this hypothesis.

## **1 INTRODUÇÃO**

Entre os produtos agrícolas brasileiros, os citrícolas encontram-se entre os principais, representando um faturamento da ordem de US\$ 1,33 bilhões somente no ano de 2003, gerando divisas e aproximadamente 400 mil empregos diretos e indiretos. O país é o maior produtor mundial de suco concentrado de laranja, com 1.086.000 toneladas métricas produzidas na safra 2002/2003, superando países como Estados Unidos, Espanha, Itália e México. É também o maior exportador de suco concentrado de laranja, com praticamente toda a produção vendida principalmente para Bélgica, Países Baixos, Estados Unidos, Espanha, Reino Unido, Japão, Coreia do Sul, Emirados Árabes e Portugal, entre outros. O Estado de São Paulo é o principal produtor de laranja do país e o maior exportador internacional de suco concentrado, com 1.342.417.648 de frutos colhidos em uma área de 582.452 hectares no ano de 2003 (FNP Consultoria, 2004).

A lucratividade do setor seria ainda maior caso as perdas devido ao ataque de patógenos não apresentasse tamanha magnitude. A redução destas perdas somente se dará com o maior conhecimento dos processos envolvidos no desenvolvimento das doenças. A cultura apresenta-se bastante propícia à ocorrência de epidemias devido a pouca variabilidade dos materiais utilizados, com predominância de apenas quatro variedades de copa de laranja doce, sendo sempre multiplicadas vegetativamente, à ocorrência de continuidade no tempo e no espaço, havendo sempre a presença do hospedeiro nos pomares, os quais ocupam uma área praticamente contínua, com intenso tráfego de pessoas e veículos.

O histórico de doenças da cultura é bastante variado e apresenta-se, para desespero dos produtores, em constante crescimento. Somente nas últimas três décadas

foram adicionadas a estas, doenças como a pinta preta, a clorose variegada dos citros, a morte súbita dos citros e o “greening”, unindo-se às mais antigas, mas não menos preocupantes cancro cítrico, leprose, tristeza, declínio, verrugose, gomose, sorose, exocorte e xiloporose.

A clorose variegada do citros foi constatada pela primeira vez no ano de 1987, em pomares da região noroeste paulista, e é atualmente a doença de maior impacto à citricultura nacional. Inicialmente, as suspeitas levavam a crer que se tratava de uma deficiência nutricional, que foi desacreditada com a identificação da bactéria *Xylella fastidiosa*, presente em vasos do xilema de plantas sintomáticas.

Os elevados níveis de incidência e prejuízos ocasionados pela doença nos pomares paulistas impulsionaram o sequenciamento do genoma da bactéria *X. fastidiosa*, o primeiro fitopatógeno a ter o código genético desvendado, o que representou o passo inicial para uma melhor compreensão dos diversos processos biológicos relacionados à patogênese deste microrganismo. Com base nas informações obtidas com o sequenciamento, os estudos biológicos necessários a uma melhor compreensão da interação *X. fastidiosa* x Citros puderam ser mais bem direcionados, possibilitando conseqüentemente, o desenvolvimento de novas tecnologias que resultem em medidas mais eficientes no manejo da clorose variegada dos citros.

Dentre os processos relacionados à patogênese, a movimentação lateral da bactéria através dos vasos do xilema representa uma etapa crucial no desenvolvimento da doença, resultando em grande oclusão dos mesmos. Essa movimentação lateral nos vasos do xilema só se torna possível devido à produção, pela bactéria, de fatores de patogenicidade, essenciais ao desenvolvimento e progresso da doença. Estes são compreendidos principalmente por enzimas, com destaque para as pectinases, proteases, celulasas e hemicelulasas. Informações obtidas no projeto genoma da *X. fastidiosa* indicaram a presença de seqüências gênicas que codificam um conjunto de celulasas, possivelmente envolvidas no processo de degradação das membranas presentes nos vasos do xilema de plantas de citros, passo primordial para o movimento lateral da bactéria.

Desta forma, a compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo pode possibilitar o desenvolvimento e a utilização de medidas de controle, capazes de colaborar para a redução, ou até mesmo o bloqueio do desenvolvimento da doença, de maneira eficiente, econômica e com reduzido impacto ambiental.

O presente trabalho apresentou como objetivo o estudo da função de uma destas enzimas, denominada de celulase Xf-0818, clonada em *Escherichia coli*. Para isto, procederam-se à expressão, a purificação e a produção de anticorpos e imunocitoquímica da enzima em tecidos de citros colonizados por *X. fastidiosa*.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A cultura dos citros**

As espécies cítricas encontram-se botanicamente agrupadas na família Rutaceae, tendo como provável centro de origem a região Sudeste do continente asiático, desde o centro da China ao Japão, se estendendo até o leste da Índia, Nova Guiné, Austrália e Ásia tropical. Dentre as diversas espécies cítricas destacam-se a cidra, a tangerina, o limão e a laranja. Em se tratando de importância econômica, a laranja é, sem dúvida, a mais importante. Quarenta ou cinquenta séculos depois da sua presumível domesticação a laranja tem seu maior volume de produção nas Américas, onde foi introduzida há 500 anos. Atualmente, os pomares mais produtivos, resultantes de uma citricultura estruturada, estão nas regiões de clima tropical e sub-tropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, México, China e África do Sul. São Paulo, no Brasil, e Flórida, nos Estados Unidos, são as principais regiões produtoras do mundo. Com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, o Brasil tornou-se, na década de 80, o maior produtor mundial (Hasse et al, 1987). A maior parte da produção brasileira de laranjas destina-se à indústria do suco, concentrada no estado de São Paulo, responsável por 70% das laranjas e 98% do suco que o Brasil produz. A aventura da laranja ganhou uma maior consistência com a derrocada da lavoura cafeeira em 1929. Nessa época, o maior movimento produtor e exportador já se concentrava em São Paulo. A partir da década de 30 do século passado, a laranja passou a fazer parte de um movimento de diversificação da pauta de exportações brasileiras e, em 1932, o negócio da laranja havia tomado tal vulto que empresas de outros setores se voltavam para ele. O rápido crescimento do setor cítrico brasileiro foi interrompido pela II Guerra Mundial, que fez

com que as exportações brasileiras para os países europeus fossem interrompidas, levando ao abandono dos pomares e conseqüente surgimento de doenças. Dentre estas, a tristeza dos citros, causada por um vírus, praticamente dizimou os pomares brasileiros. Com o fim da guerra, e recomeço das exportações, a citricultura brasileira iniciou uma forte recuperação. Porém, em meados dos anos 50, uma nova doença surgiria como um novo obstáculo à produção citrícola brasileira. A presença de lesões nos frutos, folhas e ramos denotavam o incurso da bactéria *Xanthomonas citri*, introduzida por meio de mudas trazidas clandestinamente do Japão. A doença denominada de cancro cítrico seria responsável pela destruição de enorme número de plantas. Na tentativa de erradicar o patógeno, o Ministério da Agricultura criou a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico. Até os dias de hoje, milhares de plantas são destruídas anualmente, imediatamente à identificação de um foco da doença. Somente no ano de 2004, esse número atingiu aproximadamente 370.000 plantas devidamente eliminadas e incineradas, sendo cerca de 213.000 destas em talhões comerciais, 140.000 em pomares não comerciais, e 15.000 em viveiros (Fundecitrus, 2004).

Na década de 60, a indústria brasileira de suco e outros subprodutos da laranja ganhou impulso. A motivação foi a grande geada que em 1962 destruiu grande parte da citricultura dos Estados Unidos. A falta de suco provocada pela geada transformou o Brasil em um promissor pólo alternativo para os mercados norte-americano e europeu. Foram sendo criadas então pequenas fábricas, quase experimentais, no interior paulista. As estatísticas oficiais registram algumas exportações experimentais de suco de laranja em 1961 e 1962. Mas para todos os efeitos, a indústria brasileira de cítricos, voltada para a exportação nasceu em 1963, quando exportou mais de 5 mil toneladas de suco, arrecadando pouco mais de 2 milhões de dólares (Hasse et al, 1987).

O Brasil, impulsionado pelo crescimento das exportações e pelo desenvolvimento da indústria citrícola é hoje o maior produtor mundial de laranjas e o Estado de São Paulo é responsável pela maior parte da produção nacional, com um volume que supera 327 milhões de caixas de 40,8 Kg (IEA, 2005).

Apesar dessa grande produção obtida, da alta tecnologia empregada, de um montante expressivo de divisas gerado, da enorme quantidade de empregos diretos e

indiretos criados, a citricultura nacional vem enfrentando o surgimento continuado de novas doenças, que além de onerar o custo de produção, compromete as exportações brasileiras. O aparecimento de doenças como a clorose variegada dos citros, a qual é objeto de nosso estudo, a morte súbita dos citros e o “greening” dos citros embora representem obstáculos a serem superados, têm motivado o desenvolvimento de pesquisas de grande impacto, capazes de gerarem potenciais medidas para o controle destas doenças e de outras doenças que venham a surgir, propiciando um manejo cada vez mais racional e lucrativo da cultura.

## 2.2 A clorose variegada dos citros

A clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como “amarelinho dos citros”, foi observada pela primeira vez em 1987, nos pomares da região noroeste do Estado de São Paulo, atacando as principais variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), independentemente do porta-enxerto utilizado, causando a redução da produção e do tamanho dos frutos (Rossetti & De Negri, 1990)

Posteriormente, a área afetada pela doença expandiu significativamente, existindo relatos da presença da bactéria nos Estados do Paraná, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Sergipe, Santa Catarina, Bahia e em todas as regiões produtoras do Estado de São Paulo. Atualmente, a incidência da doença encontra-se em constante progresso, atingindo cerca de 43,6% das plantas no parque citrícola do Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro (região nobre da citricultura), com um aumento da ordem de 5,3 pontos percentuais em relação ao ano de 2002 (Fundecitros, 2004)

O agente causal desta doença é uma bactéria gram-negativa denominada *Xylella fastidiosa*, a qual é limitada ao xilema das plantas e insetos vetores, possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo plantas mono e dicotiledôneas, sendo algumas de importância econômica (Weels et al., 1987). Hopkins (1989) relatou 28 famílias vegetais que seriam hospedeiras desta bactéria, incluindo plantas sintomáticas e assintomáticas.

Esta doença afeta todas as variedades de laranja doce (Pera, Natal, Hamlim, Valência, Folha Murcha, Baianinha, Barão, etc.) sobre diferentes porta-enxertos (limão Cravo, Trifoliata, tangerinas Cleópatra e Sunki, laranja Caipira, etc.). Não têm sido observados sintomas nas tangerineiras comerciais (Cravo, Poncan), tangor Murcote, limões verdadeiros (Siciliano, Eureka) e lima ácida Galego, mesmo quando as plantas estão localizadas em áreas altamente infectadas.

Os sintomas iniciais geralmente aparecem na parte superior da copa e posteriormente, por novas contaminações, no restante da planta. Em estádios avançados, a planta afetada brota pouco e tem o crescimento bastante reduzido em relação às plantas saudáveis. Frequentemente, apresentam sintomas de murcha, mesmo com disponibilidade de água no solo, isto ocorrendo, devido aos ramos afetados terem obstruído os vasos condutores de seiva para a parte aérea. Em consequência disto, as plantas perdem cerca de 60% da capacidade fotossintética, explicando-se assim, a baixa produção e os frutos miúdos (Ribeiro, 2002). O sintoma característico da CVC constitui-se de pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha, inicialmente não muito extensas. Estas cloroses correspondem, na face inferior, a manchas de coloração marrom avermelhadas. As manchas podem ser pontuais ou difusas, não sendo necróticas assemelhando-se mais a um extravasamento de gomas (Rossetti & De Negri, 1990). As manchas pontuais podem coalescer, formando áreas necrosadas estendendo-se até a borda do limbo foliar. Normalmente isso ocorre devido ao ataque de microrganismos secundários proporcionando maiores danos às folhas. Malavolta et al. (1990) confirmaram que os sintomas da CVC são semelhantes aos causados pela deficiência de zinco, sendo que a similaridade é restrita apenas à posição internerval dos sintomas. Em plantas afetadas pela CVC é comum a presença de desequilíbrios nutricionais, mas que não chegam a ser sintomas específicos (Laranjeira, 1997). As plantas altamente afetadas apresentam aspecto de debilidade com coloração amarelada, podendo ocorrer enfezamento, desfolha e morte de ramos apicais. Os ramos afetados apresentam entrenós curtos, conferindo-lhes aspecto envassourado (Laranjeira, 1997). Os sintomas nos frutos surgem sempre após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas em ramos afetados. Há tendência de frutificação em pencas, os frutos mostram-se pequenos e endurecidos,



com uma coloração típica de fruto maduro (Palazzo & Carvalho, 1992). Laranjeira & Palazzo (1999), mostraram que as características organolépticas dos frutos são bastante afetadas com aumento do teor de sólidos solúveis (TSS) e acidez, sendo apenas um efeito de concentração, pois a quantidade de suco diminui. Essas características são prejudiciais tanto para a produção do suco de laranja, quanto para a comercialização dos frutos *in natura*.

Embora os conhecimentos atuais sobre a doença tenham evoluído, atualmente o seu manejo baseia-se no plantio de mudas saudáveis, na poda dos ramos afetados e eliminação de plantas severamente afetadas e no controle dos insetos vetores. O controle da doença somente apresenta resultados satisfatórios se realizado de maneira integrada. Medidas isoladas pouco contribuem, podendo inclusive agravar os sintomas.

A utilização de mudas saudáveis, produzidas em viveiros livres de insetos vetores representa a primeira medida a ser implantada. Em 2003, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo editou as portarias CDAs Nº 14, 15 e 16 de 15 de outubro de 2003, tornando obrigatória a produção de mudas com a utilização de tela específica, de malha com abertura de, no máximo, 0,87mm x 0,30 mm, em viveiros e no transporte de mudas, que impede a entrada de cigarrinhas.

A poda para eliminação de ramos infectados é uma das mais importantes medidas de controle da CVC. É capaz de evitar a proliferação da bactéria na planta e eliminar as fontes de inóculo, nas quais as cigarrinhas poderiam adquirir a bactéria e posteriormente transmiti-la. Esta medida é altamente recomendada principalmente nos sintomas iniciais da doença. Os melhores resultados são obtidos em pomares com poucas árvores contaminadas. Árvores com sintomas severos apresentam a bactéria distribuída por uma maior área da planta, atingindo inclusive o tronco, o que dificulta a eliminação do patógeno. Nesses casos, a poda não atinge o objetivo de eliminar a bactéria, devendo-se então proceder à erradicação da planta (Fundecitrus, 2004).

O combate aos insetos vetores com a utilização de inseticidas sistêmicos, aplicados via tronco, podem ser utilizados para controle de pragas, principalmente insetos sugadores, sendo uma opção mais seletiva aos inimigos naturais, pelo modo de aplicação, e de efeito residual mais prolongado quando comparada à aplicação de copa,

sendo, portanto adequado ao manejo integrado de pragas dos citros (Yamamoto et al., 2000).

### **2.3 A bactéria *Xylella fastidiosa***

*X. fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa, não flagelada, aeróbia estrita, limitada aos vasos e espaços intercelulares do xilema, com células em forma de bastonete reto a ligeiramente curvo, variando de 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Apresenta reação positiva para teste de hidrólise de gelatina e reação negativa para os testes de indol,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\beta$ -galactosidase, amilase, lipase, fosfatase e coagulase (Wells et al., 1987). Não é facilmente cultivada em meios artificiais, necessitando meios de cultivo específicos para o seu desenvolvimento, sendo altamente exigente em aminoácidos, macro e micronutrientes. Um dos meios de cultivo mais utilizados é o meio PW (“Periwinkle wilt”; Davis et al., 1983), o qual embora proporcione vigoroso crescimento da bactéria possui constituintes indefinidos, o que dificulta a realização de estudos sobre requerimentos nutricionais de *X. fastidiosa*. Este fato tem estimulado o desenvolvimento de outros meios de cultivo com composição baseada em características identificadas na análise do genoma da bactéria, como os da série XDM (Lemos et al., 2003), ou da composição do fluído do xilema (Leite et al., 2004). Sua temperatura ótima de crescimento varia em torno de 26 a 28° C, pH ótimo entre 6,5 e 6,9, se desenvolvendo melhor em meio de cultivo líquido sob agitação (Davis et al., 1978).

Bactérias limitadas ao xilema foram relatadas em 1973, inicialmente, em associação com a doença de Pierce em videiras, sendo denominadas na ocasião de bactérias tipo rickettsia (Hopkins, 1985). A teoria de que esta doença era causada por vírus habitantes do xilema foi derrubada com o cultivo axênico da bactéria (Davis et al., 1978). Taxonomicamente, um novo gênero foi proposto relacionando todas as espécies de bactérias Gram-negativas com crescimento limitado ao xilema e fastidiosas, como pertencentes ao gênero *Xylella*. Assim, a bactéria está classificada como pertencente ao

Reino Bacteria, grupo Proteobacteria, sub-grupo Gammaproteobacteria, classe Xanthomadales, família Xanthomonadaceae, sendo o único representante do gênero *Xylella*. Recentemente, através de estudos comparativos entre seqüências de DNA e das regiões de separação intergênica conhecidas como ITS 16S-23S (do inglês “intergenic spacer“), extraídas de 26 cepas isoladas de 10 diferentes hospedeiros, a espécie *X. fastidiosa* foi dividida em três subespécies. *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, que agrupa as cepas isoladas de videira, alfalfa, amendoeira e bordo comum, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, agrupando aquelas isoladas de pereira, ameixeira, sicamore, olmo, e amendoeira e *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, proveniente de citros (Schaad et al., 2004).

Através da análise do genoma de *X. fastidiosa*, pode-se confirmar a grande proximidade ao gênero *Xanthomonas*, com grande número de seqüências codificando, presumivelmente, produtos com alta similaridade àqueles produzidos por *Xanthomonas* spp., em especial *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Dow e Daniels, 2000). Esta proximidade já havia sido denotada por Wells et al. (1987), quando da descrição do gênero *Xylella*. Muitos destes genes em *Xanthomonas* já foram identificados como essenciais à virulência ou, mais especificamente, à biossíntese do polissacarídeo extracelular, denominado de goma xantana. Esta alta relação entre seqüências dos dois organismos sugere a ocorrência de transferência horizontal, sendo estes genes ortólogos. Porém, quando se compara o tamanho do genoma, observa-se grande diferença entre *Xylella*, com cerca de 2,7 Mb e *Xanthomonas*, com aproximadamente 5,5 Mb. Dow & Daniels (2000) sugerem que *Xylella* pode na realidade ser um patógeno com o mínimo necessário de genes para causar doença, refletindo certas peculiaridades do gênero, tais como as diferentes formas de ataque ao hospedeiro, a capacidade de crescimento em meio de cultivo, o ambiente de crescimento na planta e dependência de insetos vetores.

*X. fastidiosa* apresenta movimentação entre os vasos condutores, que são estruturas compostas de celulose, hemicelulose, substâncias pécicas, lignina e proteínas. Desta forma, enzimas degradadoras destes componentes como celulasas, pectinases e proteases podem representar um papel fundamental na patogenicidade de *X. fastidiosa*, a exemplo do que ocorre em outras bactérias fitopatogênicas. As enzimas secretadas por bactérias fitopatogênicas, geralmente estão presentes em quantidades limitadas, sendo

necessário que ocorra a formação de um glicocálice, à base de polissacarídeos, que possibilita a agregação da bactéria em microcolônias e conseqüentemente, maior concentração de enzimas ao redor das estruturas de interesse.

#### **2.4 Disseminação e sobrevivência de *Xylella fastidiosa***

As cigarrinhas da Família Cicadellidae que, pelo tipo de aparelho bucal têm capacidade de atingir o xilema de plantas cítricas, são os vetores de *X. fastidiosa*. Ao se alimentarem nas brotações novas de plantas afetadas, esses insetos podem adquirir a bactéria que é, posteriormente, transmitida a laranjeiras sadias. Trabalhos vêm sendo executados visando determinar com exatidão o papel das cigarrinhas na transmissão de CVC, tanto de citros para citros quanto de outros possíveis hospedeiros para citros. Várias espécies de cigarrinhas são presença constante em nossos pomares e três espécies vêm sendo alvo de maiores estudos: *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia* sp. e *Oncometopia facialis* (Hill & Purcell, 1997; Almeida et al., 2001). Espécies como *Bucephalagonia xanthophis*, *Plesiommata corniculata*, *Sonesimia grossa*, *Homalodisca ignorata*, *Ferrariana trivittata*, *Macugonalia leucomelas*, *Parathona gratiosa*, e *Acrogonia virescens*, entre outras, também foram identificadas como capazes de transmitir a bactéria, embora pareçam ser de pouca importância para a disseminação (Fundecitrus, 2004). A dispersão do patógeno para médias e longas distâncias de um foco inicial é, em geral, feita através da comercialização de mudas contaminadas. Assim, o homem, mais uma vez, aparece como um eficiente agente disseminador.

Somado ao grande número de espécies de insetos que podem ser vetores da bactéria, esta apresenta uma ampla gama de hospedeiros, distribuídas em mais de 28 famílias botânicas, tanto mono e dicotiledôneas, o que torna praticamente impossível a sua erradicação (Leite et al., 1997).

A primeira doença causada por *X. fastidiosa* a ser relatada foi o mal de Pierce da videira (*Vitis* spp). A bactéria causa ainda doenças como a “Phony peach”, em pessegueiro (*Prunus persica*), escaldadura das folhas em ameixeira (*Prunus salicina*),

requeima em cafeeiro (*Coffea* spp.), além de atacar plantas de alfafa (*Medicago sativa*), pereira (*Pyrus pirifolia*), noqueira (*Carya illinoensis*), carvalho (*Quercus rubra*), olmo (*Ulmus americana*), sicamore (*Plantannus occidentalis*), amendoeira (*Prunus amygdalus*), seringueira (*Hevea brasiliensis*), entre outras (Beretta, 1997; Fonseca et al, 2001).

Mas não apenas plantas de grande importância agrícola como citros, videira, cafeeiro, pessegueiro e ameixeira podem ser infectadas por *X. fastidiosa*. A bactéria foi detectada em plantas invasoras e ornamentais como *Hypochoeris brasiliensis*, *Vernonia* sp., *Lolium multiflorum*, *Paspalum urvillei*, *Digitaria* sp., *Brachiaria plantaginea*, *Facelis retusa*, *Leonurus sibiricus*, *Penissetum clandestinum*, *Richardia* sp., *Taraxacum officinale*, *Sonchus oleraceus*, *Sorghum halapense* e *Hibiscus schizopetalus* (Leite et al., 1997; Kitajima et al., 2000). Embora hospedeiros alternativos possam ser infectados pela bactéria, esses não representam uma potencial fonte de inóculo, devido a baixa concentração de células de *X. fastidiosa*, o que dificultaria a aquisição por parte dos vetores (Lopes et al. 2003).

Espécies como *Catharanthus roseus* (Monteiro et al., 2001), *Nicotiana tabacum* (Lopes et al., 2000), *Partenocissus quinquefolia* (McElrone et al., 2001) e *Nerium oleander* (Wichman & Hopkins, 1999) podem ser, inclusive, utilizadas como hospedeiros experimentais, uma vez que expressam os sintomas da doença em um período extremamente curto em relação aos meses de espera quando da utilização de plantas como citros, cafeeiro ou videira.

Devido ao concurso de tantas espécies vectoras e o grande número de hospedeiros alternativos, somados à falta de consciência de muitas das pessoas envolvidas e dependentes do setor citrícola, a sobrevivência e a disseminação da bactéria parece estar assegurada por muitos anos.

## 2.5 Sequenciamento do genoma de *Xylella fastidiosa*

A edição de número 6792 da revista *Nature*, publicada no dia 13 de julho de 2000 trouxe como matéria de capa o sequenciamento do genoma de um organismo fitopatogênico, algo até então inédito no mundo científico. A novidade por si só já seria interessante, mas se tratava ainda de um trabalho realizado por pesquisadores brasileiros, o que colocava o país em destaque no meio científico. Era a primeira vez que uma pesquisa brasileira era destaque de capa em uma das revistas científicas mais importantes do mundo (Simpson et al., 2000).

O sequenciamento foi realizado através da estratégia de “shotgun”, onde o DNA do organismo a ser analisado é clivado em fragmentos, os quais são seqüenciados automaticamente, possibilitando uma ampla cobertura do genoma, com rapidez e eficiência.

Com a etapa de anotação concluída, ou seja, a comparação entre as seqüências obtidas no sequenciamento de *X. fastidiosa* e àquelas presentes em bancos de dados internacionais, e posterior determinação e categorização de tais seqüências, um mundo de informações surgiu e uma vasta série de hipóteses pôde ser teorizada.

As informações genéticas da bactéria encontram-se contidas em um cromossomo principal, com cerca de 2,67 Mb, e em dois plasmídeos, um mega plasmídeo, com aproximadamente 51150 pares de bases, e um mini plasmídeo, com cerca de 1300 pares de bases, num total de 2800 quadros abertos de leitura (“open reading frames”) (Simpson et al., 2000).

Dentre as seqüências obtidas, algumas apresentaram alta similaridade com genes relacionados a mecanismos de patogenicidade em outros microrganismos. A natureza dos sintomas da clorose variegada dos citros indica que *X. fastidiosa* é capaz de colonizar os vasos do xilema e promover um bloqueio nos mesmos, o que dificulta a translocação de seiva para as os ramos, folhas e frutos, ocasionando desta forma o aparecimento de sintomas tais como clorose, necrose, encurtamento de entrenós e ocorrência de frutos pequenos e endurecidos.

### 2.5.1 Genes envolvidos no processo de adesão

Possíveis genes relacionados à adesão bacteriana, tanto na planta como no vetor, foram identificados no genoma de *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000). A presença de uma matriz densa envolvendo a bactéria nos vasos do xilema e no aparelho bucal de cigarrinhas foi constatada através de análises de microscopia eletrônica (Alves, 2003). Adesinas e polissacarídeos são apontados como os principais constituintes desta matriz extracelular, essencial à colonização e concentração de nutrientes (Hopkins, 1985).

A formação de biofilme representa um importante fator para a patogenicidade em vários organismos (Costerton et al., 1999). O papel deste biofilme tem sido investigado em patógenos humanos, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa* (Costerton et al., 1995), e também em fitopatógenos, como *Ralstonia solanacearum* (Kang et al., 1999) e *X. campestris* pv. *campestris* (Katzen et al., 1998). Em *R. solanacearum*, o exopolissacarídeo é imprescindível para a rápida colonização sistêmica de plantas de tomateiro, enquanto em *X. campestris*, o mesmo é determinante de virulência de isolados do patógeno. A presença de seqüências envolvidas na síntese de açúcares precursores, de reguladores da produção de exopolissacarídeo e a ausência de três genes relacionados com a produção de goma em *X. campestris* pv. *campestris* no genoma de *X. fastidiosa*, indica a capacidade da mesma em produzir uma matriz diferenciada da goma xantana (Silva et al., 2001).

A goma produzida por *X. fastidiosa* provavelmente consiste de unidades repetidas de tetrasacarídeo polimerizado unido por seqüências de glicose-1-fosfato, glicose, manose e ácido glucurônico em carreador fosfato poliprenol. Esta goma pode estar relacionada diretamente a patogenicidade, estando envolvida na formação de biofilme, o qual é fundamental na adesão e sobrevivência da bactéria em ambientes de muita turbulência, seja nos vasos do xilema ou no aparelho bucal do tipo sugador das cigarrinhas (Silva et al., 2001).

O processo de adesão apresentado por *X. fastidiosa* também foi investigado por Leite et al. (2002), através de análise de microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-X. Os autores identificaram a presença de enxofre elementar tanto

em células *in vitro*, cultivadas em lâminas de vidro como também nos vasos do xilema de plantas de citros, que se apresentavam obstruídos pela goma, o que não ocorreu em vasos adjacentes não obstruídos. Associados ao enxofre foram identificados picos de cálcio e magnésio nos vasos, possivelmente envolvidos na formação de pontes de ligação entre os vasos do xilema e as células bacterianas. No modelo de adesão proposto pelos autores, evidencia-se ainda a participação da enzima metionina sulfóxido redutase (MsrA), envolvida na adesão de células bacterianas patogênicas a humanos (Brot & Weissbach, 2000), uma vez que a seqüência desta enzima foi identificada no genoma de *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000).

### **2.5.2 Produção de toxinas**

A produção de toxinas deve exercer papel decisivo na colonização pela bactéria e na expressão dos severos sintomas de clorose nas plantas hospedeiras. Entre os genes identificados no genoma de *X. fastidiosa*, alguns estão relacionados com a produção de toxinas, semelhante as hemolisinas, pertencentes à família das toxinas RTX (Simpson et al., 2000). Essas toxinas são formadoras de poros na membrana plasmática do hospedeiro, causando extravasamento dos componentes celulares. Em algumas bactérias patogênicas a animais são responsáveis pela ocorrência de apoptose nas células do hospedeiro. Não se identificou ainda a ocorrência de apoptose em células de plantas infectadas por *X. fastidiosa*, podendo estar essas toxinas envolvidas no bloqueio dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Lambais et al., 2000). Machado et al. (2001) ainda sugerem o envolvimento de genes relacionados à produção de toxinas em *X. fastidiosa* como uma arma na competição com outros organismos, além da expressão de genes relacionados à produção de compostos antimicrobianos que atuem como um mecanismo de defesa contra toxinas de outros organismos, no caso endofíticos, geralmente encontrados no xilema.



### 2.5.3 Produção de enzimas envolvidas no processo de ataque

A capacidade de invadir de maneira sistêmica os tecidos das plantas hospedeiras provavelmente está relacionada com a expressão de genes ligados à produção de enzimas que degradem a parede dos vasos do xilema. Tais enzimas permitiriam não somente a migração lateral como também possibilitariam a absorção de nutrientes, pela liberação de subunidades de carboidratos e/ou proteínas, a serem utilizados no metabolismo da bactéria. Exemplos destas enzimas extracelulares incluem enzimas depolimerizantes, como as celulases, pectinases, xilanases e proteases secretadas por bactérias fitopatogênicas, dentre estas *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas*.

As espécies de *Erwinia*, patógeno necrotrófico em espécies como tomate, pimentão, batata, fumo, matam rapidamente as células do hospedeiro através da secreção de grandes quantidades de enzimas extracelulares. A importância de pectinases produzidas por *E. chrysanthemi* foi determinada através da habilidade demonstrada pelas enzimas purificadas em provocar a maceração dos tecidos (Basham & Bateman, 1975). Em 1986, Reverchon e colaboradores sugeriram que os genes responsáveis pela produção de pectinases nesta bactéria estariam organizados em dois “clusters” gênicos no cromossomo principal (*pelA*, *pelD*, e *pelE*, *pelB* e *pelC*). Anos mais tarde, Kedada p1o o0(n.)-1p54

enzimas, como as endo- $\beta$ -1,4-xilanases,  $\beta$ -xilosidases and  $\beta$ -glucuronidases (Biely et al., 1997). A maioria das xilanases conhecidas até o momento são aquelas produzidas por microrganismos, principalmente fungos e bactérias, sendo os primeiros os mais potentes produtores dessas enzimas (Sunna & Antranikian, 1997). Estes produzem xilanases extracelularmente, evitando assim a necessidade de lise da célula. A obtenção destas enzimas em cultura é geralmente efetuada através da utilização de substratos como xilana, outros compostos ricos em hemicelulose e carboidratos de baixo peso molecular como xilose (Senior et al., 1989). Xilanases têm sido clonadas e purificadas a partir de um grande número de espécies bacterianas e fúngicas (Sunna & Antranikian, 1997), permitindo a realização de estudos detalhados sobre características bioquímicas das mesmas (Bastawade, 1992; Kulkarni et al., 1999). As xilanases fúngicas têm despertado especial interesse devido a possibilidade de utilização nas indústrias de papel e polpa (Viikari et al., 1994) e pelo papel na patogenicidade (Walton, 1994). Estudos detalhados sobre o papel de xilanases produzidas por *Exserohilum turcicum*, fungo causador de manchas foliares em plantas de milho, foram realizados por Degefu et al. (1995), Lubeck et al. (1997), Degefu et al. (2001) e Degefu (2003). Esses autores clonaram o gene e purificaram uma xilanase de *E. turcicum* com aproximadamente 22,5 kDa. Genes de xilanases foram identificados no genoma de bactérias fitopatogênicas, inclusive patógenos de citros. Em *X. citri*, além de uma endoglucanase, três liases do pectato e seis celulases, foram identificados cinco genes codificando xilanases (Brunings & Gabriel, 2003). No genoma de *X. fastidiosa*, três xilanases foram identificadas: uma esterase da acetilxilana com massa molecular em torno de 32,2 kDa, duas endoxilanases, sendo uma de 28,6 kDa e outra de 101,1 kDa, além de uma  $\beta$ -xilosidase de 95 kDa. Em conjunto com uma celobiohidrolase, três endoglucanases, uma poligalacturonase, uma liase do pectato e uma  $\beta$ -glucosidase formam o arsenal enzimático de *X. fastidiosa* (Wulff et al., 2003).

O papel de proteases em interações fitopatogênicas vem sendo muito investigado nas últimas décadas, havendo indicativos contra e a favor da importância destas enzimas como fator de virulência em patógenos bacterianos. Uma protease produzida por *E. carotovora* subsp. *carotovora* mostrou-se capaz de causar morte celular em tecidos

intactos de pepino, devido às alterações na permeabilidade da membrana plasmática das células do hospedeiro (Tseng & Mount, 1974). Um outro papel determinado para as proteases é a degradação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, o que foi evidenciado por Willis et al (1987), em plantas de tomate e tubérculos de batata infectados por *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Dow et al. (1990) relataram que paredes celulares de nabo funcionaram como eficientes indutores da atividade de proteases de *X. campestris* pv. *campestris*, quando adicionados em meio mínimo de cultivo. Fry (1993) não identificou a importância na patogênese de duas proteases produzidas por uma linhagem de *X. fastidiosa*, isolada de plantas de videira. Por outro lado, Hopkins (1995), também estudando uma linhagem da bactéria isolada de plantas de videira, não detectou a produção, em meio de cultura, de qualquer enzima capaz de degradar os componentes da parede celular vegetal.

## 2.6 Celulases em interações fitopatogênicas

A celulose é o principal polímero componente dos vegetais, sendo ainda o polissacarídeo mais abundante no planeta. É formado por cadeias de moléculas de glucopiranosil, unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Desempenha um papel primordial seja estruturalmente, como integrante da parede celular vegetal, seja como barreira mecânica à penetração de patógenos como bactérias, fungos e nematóides. Por outro lado, representa uma importante fonte de energia e nutrientes, para os organismos capazes de degradá-la.

A celulose forma feixes de fibras cristalinas que são geralmente muito resistentes à degradação. Existem, no entanto, muitas espécies de fungos e bactérias capazes de promover tal degradação. As enzimas secretadas por esses organismos atacam as fibras de celulose da parede celular vegetal. Estes organismos produzem uma série de diferentes celulases [endoglucanases e celobiohidrolases (CBHs)], que geralmente atuam sinergicamente, quebrando as ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas. O termo celulases compreende

o grupo de enzimas envolvidas na degradação completa das fibras de celulose, ou seja, até a liberação de monômeros estruturais, como a glicose.

A degradação da celulose é realizada através do concurso de um sistema multi-enzimático, constituído por três tipos principais de enzimas: as endoglucanases, que clivam cadeias de glucanas em sítios internos; as celobiohidrolases ou exoglucanases, responsáveis liberação de celobiose a partir das cadeias terminais; e as glicosidases ou celobiasas, que produzem monômeros de glicose a partir de celobiose (Pascholati & Leite, 1995).

São enzimas modulares, formadas de unidades distintas, denominadas de domínios ou módulos. Estes módulos apresentam-se distintos, funcional e estruturalmente (Henrissat et al., 1998). Estas enzimas são classificadas em famílias com base na similaridade das seqüências de aminoácidos de seus domínios catalíticos (Henrissat & Davies, 1997).

A atividade celulolítica do domínio catalítico é modificada por domínios acessórios capazes de suplementar ou alterar as características da enzima. O mais estudado desse tipo de domínio é denominado domínio de ligação à celulose (CBD, do inglês “cellulose binding domain”). Esses são atualmente classificados também com base na homologia entre as seqüências de aminoácidos (Tomme et al., 1995).

A hidrólise da celulose pode ocorrer segundo a ação de dois mecanismos: inversão ou retenção do carbono anomérico, sendo, em ambos os casos, catalisada por dois grupos carboxílicos localizados no sítio ativo da enzima. No primeiro caso, a hidrólise ocorre através de um mecanismo do tipo passo único, enquanto no segundo, ocorre pelo mecanismo de dois passos, com a formação de estado enzima-substrato intermediário.

A maioria dos trabalhos envolvendo a degradação de celulose foi realizada com fungos degradadores de madeira. Entre os organismos fitopatogênicos, fungos, bactérias e nematóides são capazes de degradar a celulose. Dentre os principais exemplos, figuram os fungos e bactérias agentes de podridões moles, “*damping-off*” e murchas vasculares como *Rhizopus*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Erwinia*, *Ralstonia* e *Fusarium oxysporum* e *Verticillium dahliae* (Pascholati & Leite, 1995).

O papel de celulases já foi comprovado em diversos patossistemas vegetais. Enzimas extracelulares, especialmente aquelas capazes de degradarem a parede celular vegetal, como celulases e pectinases são produzidas por várias linhagens de *Clavibacter michiganensis*. Estudos morfológicos sugerem que a secreção destas enzimas pode ainda ser determinante para a ocorrência de sintomas de murcha pelo ataque à estrutura dos vasos do xilema e a células do parênquima adjacente (Wallis, 1977; Benhamou, 1991). Na maioria das linhagens de *C. michiganensis* ssp. *michiganensis*, os genes que codificam endoglucanases se encontram em um plasmídeo nativo (Meletzus & Eichenlaub, 1991; Dreier et al., 1995). A introdução de um gene de *C. michiganensis* ssp. *michiganensis*, responsável pela produção de uma endoglucanase, em linhagens de *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*, patógeno pouco virulento a plantas de batata, além de aumentar a atividade de celulases, incrementou a virulência (Metzler et al., 1997), indicando que a produção desta enzima pode ser um fator de patogenicidade (Jahr et al., 1999).

Na interação entre *R. solanacearum* e plantas de tomateiro, evidências indicam a degradação de celulose e a correlação positiva entre virulência e atividade celulolítica. Celulases apresentam fundamental importância nas doenças vasculares devido à alteração do fluxo hídrico normal que ocasionam, pela liberação de oligômeros no interior dos vasos do xilema.

As celulases produzidas por espécies de *Erwinia* são provavelmente as melhores estudadas em interações fitopatogênicas. A espécie *E. chrysanthemi* produz uma bateria de enzimas hidrolíticas, muito eficientes na maceração de tecidos de plantas hospedeiras. Em estudo utilizando a celulose carboximetilada (CMC) e celulose tratada com ácido como substratos, Zhou & Ingram (2000) evidenciaram a atuação sinérgica de celulases, produzidas por diferentes genes (*CelY* e *CelZ*).

Em nematóides, o estudo destas enzimas também se encontra bastante avançado. A endoglucanase MI-ENG1, produzida por *Meloidogyne incognita*, um nematóide causador de galhas em grande diversidade de espécies vegetais, foi caracterizada bioquimicamente. Esta celulase apresentou massa molecular predita de 53,4 kDa, com atividade ótima em pH 5,0 e temperatura em torno de 50° C, a qual não foi inibida por

EDTA, um agente quelante de íons necessários ao funcionamento de enzimas, nem pela adição dos íons metálicos Fe, Co, Ni e Mn, conhecidos por produzirem efeitos inibitórios em algumas famílias de hidrolases. A adição dos íons Zn e Cu reduziu a atividade da enzima em 30 e 50%, respectivamente. A presença de açúcares simples como glicose e celobiose, capazes de inibir a atividade enzimática através do mecanismo conhecido como “*feed-back*”, ou seja, a inibição pelo excesso do produto, não apresentou qualquer tipo de efeito inibitório sobre a celulase MI-ENG1 (Bera-Maillet et al., 2000).

## **2.7 Celulases de *Xylella fastidiosa***

A migração lateral da bactéria representa uma etapa primordial para uma colonização eficiente do hospedeiro. Alves & Leite (2004) flagraram, através de investigações ao microscópio eletrônico de varredura, a passagem da bactéria através dos vasos do xilema. Porém, para que esta ocorra, o concurso de enzimas é indispensável para a degradação das membranas dos vasos pontuados (Purcell & Hopkins, 1996). Essas membranas são formadas por parede celular primária e lamela média adjacente, as quais são compostas por substâncias pécticas, como pectina e ácido péctico, celulosas e hemicelulosas. Somente com a degradação destas substâncias, a bactéria será capaz de se locomover de uma célula a outra, podendo-se então, se disseminar de forma radial dentro dos tecidos do hospedeiro (Wulff et al., 2003)

De acordo com Simpson et al. (2000), oito sequências gênicas relacionadas ao processo de degradação da celulose de citros foram identificadas na análise do genoma de *X. fastidiosa* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências gênicas identificadas no genoma de *Xylella fastidiosa*, possivelmente envolvidas na hidrólise da celulose

Sequência gênica <sup>1</sup>	Provável função <sup>2</sup>	Proteína			
		Família GH <sup>3</sup>	Tamanho (pb)	aa	kDa
XF 0810	endoglucanase	GH5	1698	565	61,6
XF 0818	endoglucanase	GH5, CBM2	1779	592	60,0
XF 2708	endoglucanase	GH5	1071	356	39,3
XF 1267	celobiohidrolase	GH6, CBM2	2052	683	70,9
XF 0846	$\beta$ -manosidase	GH2	2676	841	100,9
XF 0439	$\beta$ -glucosidase	GH3	2223	740	80,3
XF 0845	$\beta$ -xilosidase	GH3	2649	882	95,0
XF 2355	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase	GH3	1008	335	35,3

<sup>1</sup> Genoma de *Xylella* (Simpson et al., 2000)

<sup>2</sup> GenBank (NCBI)

<sup>3</sup> Henrissat & Davies, 1997

Estudos detalhados sobre a função dessas sequências gênicas foram realizados por Wulff (2002). Através da clonagem em vetor de clonagem pET20b (Novagen, 2000), foi possível a produção heteróloga da enzima, que apresentou habilidade de degradar celulose, confirmando o seu papel de endoglucanase. O plasmídeo pET20b utilizado codifica uma sequência de seis resíduos de histidina, imprescindível na etapa de purificação através de cromatografia de afinidade a metal. Somado a isto, o sistema de expressão em *Escherichia coli* apresenta vantagens, como o rápido crescimento desta bactéria em meio de cultivo simples, possibilitando a produção da enzima em quantidades satisfatórias em curto período de tempo, o que não acontece em *X. fastidiosa*. E ainda, o fato de *E. coli* não produzir endoglucanases, o que reduz a possibilidade de ocorrer a eluição de celulases contaminantes durante as etapas de purificação. O desenvolvimento de protocolos para purificação de proteínas através de afinidade a metais tem contribuído significativamente para o aumento na determinação de estruturas de proteínas por meio de técnicas, como a cristalografia de raios-X,

dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear. Seqüências de resíduos de histidina utilizados em conjunto com resinas com extremidades metálicas vêm sendo cada vez mais utilizadas para tal finalidade, apresentando alto desempenho, especificidade e reprodutibilidade (Hochulli, 1990; Nilsson, et al., 1997).

Além da Xf-0818, Wulff (2002) realizou a clonagem das seqüências Xf-0810 e Xf-2708, que presumivelmente também codificam endoglucanases. A enzima codificada pela seqüência Xf-0818 foi, dentre as três, a que demonstrou atividade sobre maior gama de substratos sendo capaz de liberar açúcares redutores a partir de celulose carboximetilada, celulose microcristalina, celulose tratada com ácido e de xilana, além de ser capaz de degradar oligossacarídeos derivados da celulose, como celotetraose e celopentaose. Apresentou atividade ótima em pH em torno de 5,2 e temperatura de 65° C, considerada elevada para um organismo mesófilo, ou seja, com crescimento ótimo a 28° C.

A endoglucanase Xf-0818 foi identificada como pertencente à família 5 das hidrolases glicosídicas, apresentando dois domínios estruturais, sendo um domínio catalítico na extremidade N-terminal pertencente à família 5, e outro domínio de ligação à celulose (CBD) do tipo II, com 83 aminoácidos. Este domínio de ligação ao substrato é constituído por cinco moléculas de triptofano, flanqueadas por cisteínas. Os dois domínios encontram-se unidos por uma seqüência conectora rica em glicina e serina, com função possivelmente relacionada com a obtenção de uma flexibilidade na conformação da proteína, sendo de extrema importância na catálise e ligação do CBD ao substrato (Wulff, 2002).

Este mesmo autor concluiu em seu trabalho, que tal enzima consiste na realidade em uma endoglucanase com atividade exoglicolítica, podendo ser um importante fator de virulência ou agressividade expresso pela bactéria no momento da degradação das membranas de pontuação, presentes nos vasos do xilema.

Outra evidência da participação de celulasas e hemicelulasas na degradação das membranas dos vasos pontuados foi demonstrada por Alves & Leite (2004) na colonização de plantas de laranja-doce, cultivar Pêra. Os autores, através de imunolocalização com anticorpo produzido contra hemicelulose de parede primária,



observaram em análise de microscopia eletrônica de transmissão, a alteração de tais membranas, evidenciando a degradação deste componente.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A sequência gênica que codifica uma celulase de *X. fastidiosa* (Figura 1) foi clonada através da inserção no plasmídeo pET 28b(+) (Figura 2) (Novagen, 1998; Wulff, 2002). Este plasmídeo possui, além de um sítio de resistência a antibiótico (sulfato de canamicina), regiões que codificam seis histidinas, denominada “His-tag”. Essa região tem fundamental importância para o processo de purificação da proteína de interesse. Através de cromatografia de afinidade a metal, esta região de histidina se liga a pontes metálicas presentes na resina de cromatografia, separando a proteína das demais que não possuem tal sequência. A proteína de interesse é então eluída, através da utilização de substâncias que apresentem maior afinidade ao metal que a histidina.

#### **3.1 Verificação da presença do inserto e do plasmídeo em *E. coli***

A fim de confirmar a presença do plasmídeo no clone de *E. coli* a ser utilizado, efetuou-se a extração do DNA plasmidial conforme protocolo utilizando lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979; Sambrook et al., 1989; Anexo A). O DNA plasmidial obtido foi clivado com as enzimas *Hin* d III e *Xba* I, sendo então submetido a eletroforese em gel de agarose, para verificação da presença do inserto (1779 pb) e do plasmídeo (5369 pb).

ATGTCGTTTTCCAAACACTTCGGCAAACATCATGTTGGCCACGTGCCTATCCTTATCTGCGGCACCAGTATTTCAGTTACA  
GCATCAGCCATGGGAAGGTCATTGATGACAAAGGCAACCAAATACAATTAAGGGCGGCAGCTGGTTTGGTTTTGAG  
ACCACAAATCACGTGGTACACGGGCTGTGGACACGCAATTGGAAAAGAATTCATCACACAGATACAGAGCATGGGATT  
GAACGCAGTGCCTACCGTTCTGCCAGCTAGTCTGAACAGCAACACATCACCGAGCAGCATCGATTACAACCGCAA  
TCCGGACTTACAAGGCTTGAGCTCGCTCCAAATCATGGACAAGGTGGTCAAAGAGCTGAGCGACCGAGGAATATATG  
TGCTGATGGATCACCATACGCCGACTGCGCAGCAATTTCTGAATTGGTACACGGACTCATAACAGCGAAAAACAGT  
GGATTGATGATCTACGCTTCGTGCGCACACCGTTACGCCAACGTACCCGGCGTCATCGGCTTGGACGTAAAGAATGAAC  
CACATGGCAGAGCCACTTGGGGCACCGGAGATCCAAAACTGATTGGAACACCGCAGTCGAGCATGCGGCAGCAGCG  
ATCTTGGAGGCCGCACAAAAATGGCTGATCGGAGTCGAGGGGATTGGAGAGAATCCCAGCTGCTCCAGCACCATTGG  
GCATTTCTGGGGCGAGAACCTGGAACCGATGGACTGTACGCCACTGAAAGTCCCTGCCGACCATTGCTATTGATACC  
ACACGTCTACGGCCAGATGTCTACGTACAGCCGACTTCAATAGTCCCATTCCCAAACAACATGGCAGCGATCTG  
GGATAAACTTCGGACATTTTGCAGAAAGCCGGCTACGCGATGGCGATTGGTGAGTTCGGTGGTAAGTACGGTGAAG  
GTGATCCACGCGATGTGCTTGGCAAACGCTCTGGTGGATTATCTAATCAGTATCGGTGTGACGGATACCTTCTATTG  
GTCCATAAACGCGAACAGCAGCGATACCGGTGGCTGTTTCGCGATGACTGGAATCACGTGCGCGAAGACAAGCTCA  
CCCTGCTGAAGAACTGTGGAATGGTAAAGATGGTTCCGGTGGTGGTGGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTG  
GTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTA  
GTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCT  
CCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGTGGCTCCGGTG  
GTGGTGGTGGCTCCGGTGGTGGTGGCTCCGGTGGTGGTGGTGGCTCCGGTGGCGGTAGTGGCTCCGGTGGTGGTAGT  
GCTCCGGTGGTGGTAGTGGTACCGTGGTGGTGGCTCCGATCCTACAAAGAGCAAGATTTCTGTTAATACCATCGTGG  
ACAGCGATTGGCATACTGGTTACTGCGAACGGATCCAAGTGACTAATATCAGCAACAGTCCCCTACCTGGACGGTGA  
CGATTCGATCAGGGGCAATATCCAGACCCTATGGAGCGCGTTGGTCAAGTGAAGGGTAACGCGCTACCGCTTCTG  
GTATGGACTGGAATAAGACGCTTGATCCGAAAGGCACGACTGAATTCGGGTCTGTTCAAACTATTGA

Figura 1 – Sequência do gene Xf-818 (endo-1,4-β-glucanase de 60 kDa) (*Xylella fastidiosa* Genome Project, 2003)

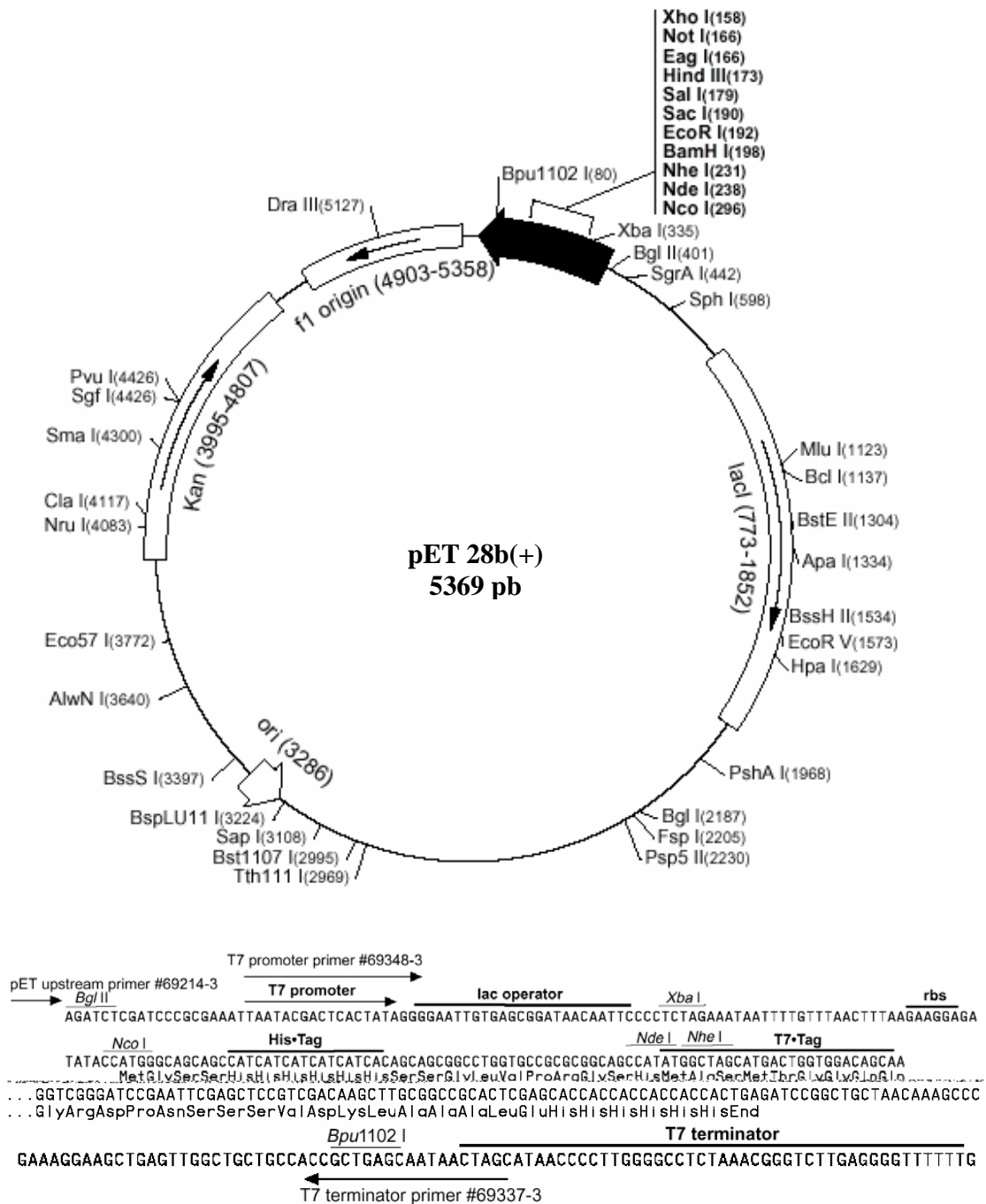


Figura 2 – Plasmídeo pET 28b(+) com a região de clonagem/expressão evidenciada (Novagen, 2000)

### 3.2 Avaliação da atividade de celulase *in vitro*

O clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo pET 28b(+) com o inserto do gene Xf-0818, foi cultivado em meio Luria-Bertani líquido (LB, triptona 1 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 0,5 %, pH 7,0), com antibiótico sulfato de canamicina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), durante 8 h a  $37^\circ \text{C}$ , sob agitação de 250 rpm. Após esse período, retirou-se o meio de cultura através de centrifugação a 9000 g durante 10 min, adicionando-se imediatamente novo meio LB contendo 1 mM de IPTG (isopropil tiogalactopiranosídeo), um análogo da lactose, sob a qual a expressão é fortemente induzida. As células bacterianas foram cultivadas por mais 2 h a  $37^\circ \text{C}$ , sendo então transferidos 20  $\mu\text{L}$  desta suspensão bacteriana para placa de Petri, contendo meio LB solidificado com ágar 1,5 % (m/v), e adicionado de 0,1 % (m/v) de carboximetilcelulose (CMCelulose). As placas foram mantidas a  $37^\circ \text{C}$  por 36 h, procedendo-se a avaliação da atividade de endoglicanase. Retirou-se as colônias bacterianas por meio de lavagem com água destilada, sendo adequadamente descartadas, procedendo-se a coloração do meio com vermelho congo 0,1 % durante 30 min e posterior lavagem com água destilada. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 15 min cada com NaCl 1 M. A atividade de endoglicanase foi então avaliada através da formação de halos de coloração amarela, apresentando forte contraste ao fundo vermelho.

### 3.3 Expressão da proteína Xf-0818

Células de *E. coli* foram cultivadas inicialmente em 5 mL de meio LB contendo sulfato de canamicina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) durante 15 h, a 250 rpm, a uma temperatura de  $37^\circ \text{C}$ . Após este período, as mesmas foram transferidas para erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB, e incubadas nas mesmas condições, até atingir uma densidade ótica a 550 nm em torno de 0,8, o que ocorreu por volta de 5 h de incubação. Em seguida, foi adicionado indutor (IPTG a 1 mM), cultivando-se por mais 24 h. As células foram coletadas por meio de centrifugação a 5000 g durante 10 min, a  $4^\circ \text{C}$ . Efetuou-se a

ressuspensão das mesmas em solução de lavagem ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0) contendo inibidor de proteases (“Phenyl methyl sulfonyl fluoride”, PMSF 1 mM), adicionado no momento do uso. A suspensão de células foi então levada a sonicador marca Misonix, modelo Microson XL200 (03 ciclos de 20 s cada), para a lise das células, sendo o lisado centrifugado a 14000 g durante 20 min, a 4° C, recuperando-se o sobrenadante. As proteínas totais foram avaliadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970) (Anexo B), como também foram realizadas as determinações do conteúdo total de proteínas pelo método de Bradford (1976) (Anexo C). A atividade enzimática para celulase foi avaliada através da incubação de 50  $\mu\text{L}$  da amostra em 200  $\mu\text{L}$  de CMCelulose a 40° C, durante 02 h, e posterior quantificação de açúcares redutores liberados, pelo método de Lever (1972) (Anexo D).

### **3.4 Eletroporação de *E. coli***

Devido a baixa expressão obtida, uma das alternativas para a resolução deste problema foi a realização de nova inserção do plasmídeo em novas células competentes. Para isto, foram transferidas 50  $\mu\text{l}$  de células eletrocompetentes (Anexo E) para microtubo contendo 1  $\mu\text{l}$  de plasmídeo. A mistura foi transferida para cubeta de eletroporação, e em seguida realizou-se a aplicação de um pulso elétrico (1,8 kV; 200  $\Omega$ ; 5 ms), em equipamento eletroporador. Adicionou-se rapidamente 950  $\mu\text{L}$  de meio SOC (Bacto triptona 2 %, Extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,05%, com 20 mM de glicose), a 37° C, sendo as células transferidas para microtubo. As mesmas foram incubadas durante 01 h a 37° C, sob agitação (180 rpm). Realizou-se o plaqueamento de alíquota de 100  $\mu\text{L}$  em meio LB sólido contendo antibiótico sulfato de canamicina (50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), e posterior incubação por 15 h, a 37° C.

### **3.5 Avaliação de diferentes combinações de indutores**

A expressão da proteína Xf-0818 foi avaliada utilizando diferentes combinações dos indutores (IPTG ou lactose), na presença ou não de CMCelulose. A bactéria foi cultivada sob condições similares às aquelas citadas no item 3.2. Foram testados os seguintes tratamentos: a) sem adição de qualquer indutor; b) adição de IPTG 1 mM; c) adição de lactose 1 %; d) adição de CMCelulose 0,1 %; e) adição de IPTG a 1 mM + CMCelulose 0,1 %; f) adição de lactose 1% + CMCelulose 0,1 %; g) adição de IPTG 1mM + lactose 1 %; h) adição de IPTG 1 mM + lactose 1 % + CMCelulose 0,1 %. As células bacterianas foram cultivadas por mais 02 h a 37° C, sendo então transferidos 20 µL desta suspensão bacteriana para placa de Petri, contendo meio LB solidificado com ágar 1,5 % (m/v), e adicionado de 0,1 % (m/v) de CMCelulose, para avaliação da atividade de endoglicanase em placa de Petri. Outros 20 µL foram transferidos para erlenmeyers, contendo 100 mL de meio LB, onde foram cultivados e extraídas as proteínas totais conforme item 3.3, procedendo-se a avaliação da atividade de endoglicanase, através da liberação de açúcares redutores a partir da degradação da CMCelulose.

### **3.6 Ultrafiltração**

Antes de efetuar a purificação propriamente dita, o extrato protéico, obtido conforme item 3.3, foi concentrado por meio de ultrafiltração realizada em membrana de corte de peso molecular de 50 kDa (Millipore), através de centrifugação a 2500 g. Esta etapa objetivou além da concentração proteína de interesse, uma pré-purificação, com a eliminação de proteínas de baixo peso molecular, que poderiam interferir na afinidade da sequência de histidinas com o braço metálico da resina de cromatografia.





### 3.8 Produção de anticorpos

Os trabalhos referentes a esta etapa foram realizados no Departamento de Genética da ESALQ-USP. Para a obtenção de anticorpos, procedeu-se à injeção da proteína, purificada conforme item 3.6, em quatro camundongos. Foram realizadas sete injeções com intervalos de 15 dias entre cada injeção, em dois sítios por animal. À amostra de proteína (200 µg) foram adicionados tampão fosfato salino (PBS, 200 µL) e adjuvante completo de Freund (ACF, 400 µL). Foram realizadas coletas quinzenais de amostras de sangue dos camundongos, as quais foram incubadas durante 1 h a 37° C, para coagulação, procedendo-se em seguida a centrifugação por 4 min a 10000 g, e posterior coleta do soro.

A avaliação da produção de anticorpos pelos camundongos foi realizada através de DAS-ELISA, sendo testados três sistemas de revelação: enzima peroxidase com substrato *o*-phenilenediamina (OPD); enzima peroxidase com substrato tetrametilbenzidina (TMB); e enzima fosfatase alcalina com o substrato *p*-nitrofenil fosfato (PNPP). Inicialmente, foram isolados na placa de ELISA, os orifícios referentes aos controles negativos e positivos, a fim de se evitar posterior contaminação. Depositou-se 50 µL da proteína purificada (antígeno em concentração de 2 µg.mL<sup>-1</sup>) em cada orifício da placa, incubando-se durante uma hora e meia a 37° C, com posterior lavagem com tampão PBS. Em seguida, foi realizado o bloqueio através da deposição de 200 µL de tampão PBS contendo albumina de soro bovino (BSA) a 1 %, sendo a placa mantida em geladeira durante 15 h. Após a retirada da solução de bloqueio, foram depositados 50 µL de soro, em uma diluição de 1:500, sendo a placa incubada a 37° C, durante 1 h. Após nova lavagem com tampão PBS adicionado de Tween e gelatina, depositou-se 50 µL dos diferentes conjugados, ou seja, das enzimas peroxidase ou fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.), procedendo-se à incubação por 1 h a 37° C. Novamente foi realizada lavagem com tampão PBS + Tween + gelatina, sendo finalmente adicionado o substrato adequado para cada reação. Para as reações com peroxidase como sistema enzimático, as mesmas foram paralisadas por meio da adição

de ácido sulfúrico 5 %. A leitura dos valores de absorvância foi realizada em leitora de placa de ELISA, utilizando os filtros de 490 nm para o sistema peroxidase com substrato OPD e o de 410 nm para as reações com o sistema peroxidase com substrato TMB e para a fosfatase alcalina.

### **3.9 Inibição da atividade de celulase**

A fim de se avaliar a interação entre a proteína purificada e os anticorpos produzidos em camundongos, promoveu-se a ligação destes dois elementos, avaliando-se posteriormente a atividade da enzima sobre a CMCelulose. A reação consistiu da incubação de 50 µL de enzima purificada com 50 µL de anticorpo produzido nos camundongos, durante 1 h a 37° C, sob agitação constante. Concluído este período, uma alíquota de 50 µL da reação foi transferida para tubo de ensaio contendo 200 µL de CMCelulose a 1 % (m/v). Procedeu-se, então, à incubação durante 2 h, a 40° C, em banho-maria, com posterior quantificação de açúcares redutores liberados, por meio do método de Lever (1972).

### **3.10 Microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica**

#### **3.10.1 Coleta das amostras**

Para a observação da produção de celulases “*in situ*” através de imunocitoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, realizou-se a coleta de folhas de plantas de *Citrus*, variedade Caipira, apresentando sintomas característicos da clorose variegada dos citros, inoculadas artificialmente através de método de injeção, e de plantas sadias produzidas em viveiro (Figura 3), no Setor de Entomologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Esalq-USP.

### 3.10.2 Preparo das amostras para imunocitoquímica

Das folhas coletadas, sadias ou doentes, foram excisados os pecíolos, sendo os mesmos fragmentados e submetidos ao processamento. Os procedimentos adotados nesta etapa foram conduzidos conforme metodologia de Kitajima & Nome (1999). Inicialmente, realizou-se uma pré-fixação dos fragmentos do pecíolo através de imersão em solução fixadora (glutaraldeído 2,5 % + paraformaldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0 + cloreto de cálcio 0,001 M), durante 24 h. Posteriormente, os fragmentos foram submetidos a três lavagens, de 10 min cada, com tampão cacodilato 0,05 M, e desidratados através de imersão em soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 % e três vezes em etanol 100 %), por 10 min cada. Os fragmentos foram então imersos em mistura de etanol e resina LRWhite, na proporção de 1:1, durante 4 h, e em seguida com a resina pura, durante 15 h.

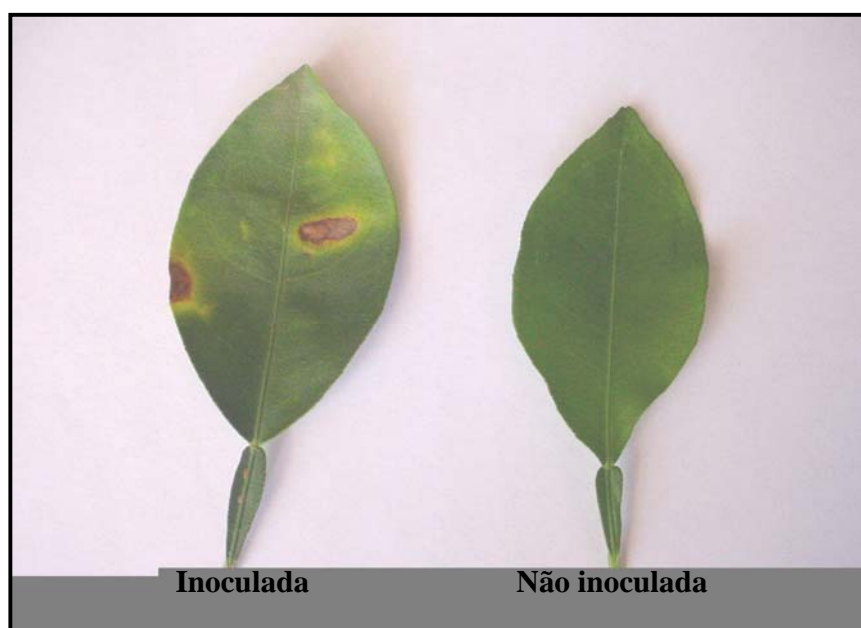


Figura 3 – Folhas de plantas de *Citrus* (var. Caipira) inoculadas e não inoculadas com *X. fastidiosa*, utilizadas no preparo das amostras para imunocitoquímica

Finalmente, procedeu-se o emblocamento através da imersão dos fragmentos em cápsulas de gelatina contendo a resina LRWhite, mantidas em estufa a uma temperatura de 70° C, durante 48 h, para completa polimerização da resina.

As cápsulas de resina contendo as amostras foram devidamente etiquetadas, sendo realizada a aparagem das mesmas em aparelho Trimmer (Leica) , a fim de facilitar a obtenção de seções ultrafinas quando da utilização do ultramicrotomo. Antes de iniciar os procedimentos para obtenção de cortes ultrafinos, realizou-se a observação em microscópio ótico, para a confirmação da presença de material de interesse, representado por vasos do xilema mostrando oclusão devido provavelmente à presença da bactéria. Somente após identificada o material de interesse, procedeu-se à realização dos cortes ultrafinos. As seções ultrafinas, com cerca de 90 nm de espessura (mais grossas do que de costume, devido a dificuldade em se obter maior contraste das membranas com a utilização de aldeídos para a fixação), foram obtidas utilizando navalha de diamante acoplada a ultramicrotomo. As seções foram cuidadosamente coletadas em grades metálicas de níquel cobertas com Formvar, para melhor fixação, evitando assim a retirada nas etapas de lavagem, a serem realizadas posteriormente. Para este tipo de análise, não devem ser usadas grades metálicas de cobre, pois podem ser afetadas pelas soluções utilizadas. Em seguida, as amostras presas às grades de níquel foram imersas em gotas (20 µL) de tampão PBS, contendo BSA 1 %, durante 30 min, a fim de efetuar o bloqueio de sítios de reação inespecíficos. Após a eliminação do excesso de tampão com auxílio de papel de filtro, procedeu-se a incubação propriamente dita, através da imersão das amostras em gotas (20 µL) de antisoro diluído (1:1000), durante 8 h. Nesta etapa, as amostras foram mantidas sobre filme de plástico (Parafilm), acondicionadas em câmara úmida obtida em placa de Petri vedada, a fim de se evitar a evaporação do antisoro. Após este período, foi realizada a lavagem das amostras com 20-25 gotas de tampão PBS, e posterior transferência para gotas de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal de 15 nm de diâmetro, diluída a 1:50 a partir de reagente comercial (Sigma Chemical Co.), sendo incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Neste estudo, foi dada preferência pelo emprego da proteína A, a qual reage com a fração Fc de qualquer anticorpo, uma vez que se tratava de anticorpos policlonais. Nova lavagem foi

então realizada, com a transferência sequencial para 20 gotas de tampão PBS, e outras 20 gotas de água destilada. Como o complexo antígeno-anticorpo pode se desfazer em condições de pH ácidos, o que ocorreria na etapa posterior de contraste com a imersão em acetato de uranila, realizou-se a transferência das amostras para solução aquosa de glutaraldeído a 1 %, sendo mantidas nesta durante 10 min, com posterior lavagem através de imersão sequencial em 25 gotas de água destilada.

A etapa de contrastação foi realizada com a imersão sequencial das amostras em soluções de acetato de uranila 3 % e citrato de chumbo 0,2 %, durante 5 min, sempre realizando lavagens em água destilada para a retirada do excesso de reagentes. Concluída tal preparação, as amostras estavam prontas para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Presença do inserto e do plasmídeo em *E. coli*

Através da análise, em gel de agarose, dos fragmentos presentes nas amostras de DNA plasmidial extraído de colônias de *E. coli* e submetido à reação de digestão com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xba* I, a serem utilizadas na etapa de expressão da proteína, para posterior purificação, obteve-se a confirmação da presença do inserto e do plasmídeo pET28b(+) (Figura 4). Este resultado assegura a confiabilidade das etapas posteriores.

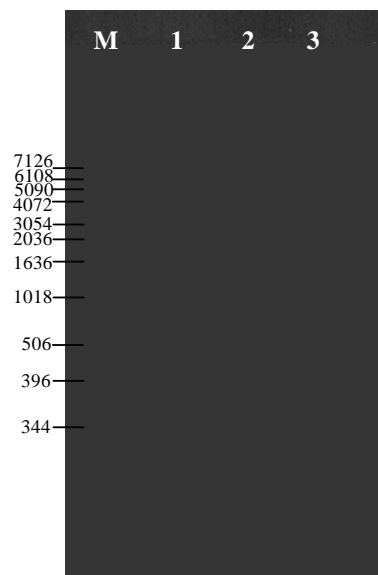


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial de *E. coli*. M=padrão de peso molecular (pb); 1= DNA plasmidial não clivado; 2 e 3=DNA plasmidial clivado com as enzimas de restrição *Hind* III e *Xba* I

## 4.2 Avaliação da atividade de celulase *in vitro*

A Figura 5 apresenta o resultado da reação de degradação da celulose carboximetilada, incorporada ao meio de cultivo LB solidificado com agar, em placa de Petri. O halo característico fortemente evidenciado indica a hidrólise da CMCelulose pelo clone de *E. coli* possuindo o plasmídeo pET 28b(+), no qual foi inserido a seqüência gênica XF-0818. Tal resultado confirma a produção de celulase por parte deste clone. Vale ressaltar que neste teste padrão, as colônias foram cultivadas por um período prolongado, durante 24 h, conforme descrito por Wulff (2002).



Figura 5 – Halo de degradação apresentado pelo clone de *E. coli* contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose

## 4.3 Expressão e purificação da proteína Xf-0818

Nos ensaios iniciais, a expressão da proteína de interesse, a Xf-0818, por parte dos clones de *E. coli* utilizados apresentou-se muito baixa, indistinguível em eletroforese em gel de poli-acrilamida, com baixíssima atividade em ensaios de atividade sobre a CMCelulose 1 %. Diante desses resultados, optou-se por realizar nova transformação

através de eletroporação, uma vez que o tempo de armazenamento como também repicagens sucessivas podem afetar a capacidade de produção de algumas proteínas por parte destas bactérias, mesmo quando da utilização de indutores específicos, como no caso o IPTG.

Após o crescimento das colônias submetidas à transformação, e confirmação da presença do inserto e do plasmídeo, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, os resultados de um novo ensaio para avaliar a expressão da proteína mantiveram-se inalterados, ainda com baixíssima produção da proteína de interesse. Diante disto, optou-se por analisar a expressão por meio da utilização de lactose ao invés do IPTG.

Na metodologia destinada à produção massal da proteína de interesse, o tempo de indução diverge significativamente daquele utilizado na avaliação por meio de degradação de CMCelulose em meio LB. A avaliação da indução da expressão da proteína, realizada pela medida do halo de degradação da CMCelulose em placa de Petri, mostrou a maior produção da proteína nos tratamentos contendo lactose como indutor, o que foi confirmado na eletroforese em gel de poliacrilamida e na quantificação de açúcares redutores liberados a partir da CMCelulose. A utilização de lactose induziu alta expressão da proteína Xf-0818, em comparação àquela obtida por meio da utilização de IPTG (Figura 6). A análise estatística do diâmetro dos halos, mostrada na Figura 7, evidencia que todos os tratamentos nos quais a lactose foi utilizada como indutor mostraram maiores halos de degradação, o que indica uma maior expressão da proteína Xf-0818. Tal fato foi confirmado pela análise da quantidade de açúcares redutores liberados após incubação das amostras em CMCelulose (Figuras 8, 9 e 10). A Figura 11 apresenta a análise das amostras através de eletroforese em gel de poliacrilamida, o qual também corrobora com os resultados supracitados. Baseado nestes resultados, em todos os ensaios posteriores, inclusive os destinados à produção massal da proteína de interesse, foi utilizado lactose como indutor, a uma concentração de 1 % (m/v).





Figura 6 – Halos de degradação apresentado pelo clone de *E. coli* contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCellulose, e induzido através da adição de lactose ou IPTG

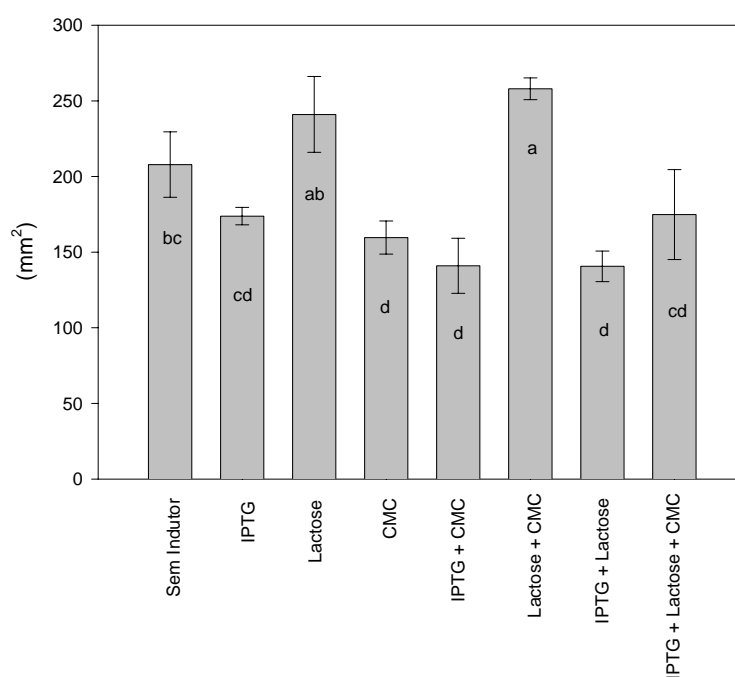


Figura 7 – Diâmetros dos halos de degradação apresentado pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCellulose, sob diferentes indutores e combinações destes. Média de seis repetições. Tratamentos com mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade



Figura 8 – Reação de quantificação de açúcares redutores liberados apresentada pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, sob diferentes indutores e combinações destes. B – controle negativo; coloração amarela mais intensa indica maior quantidade de açúcares liberada

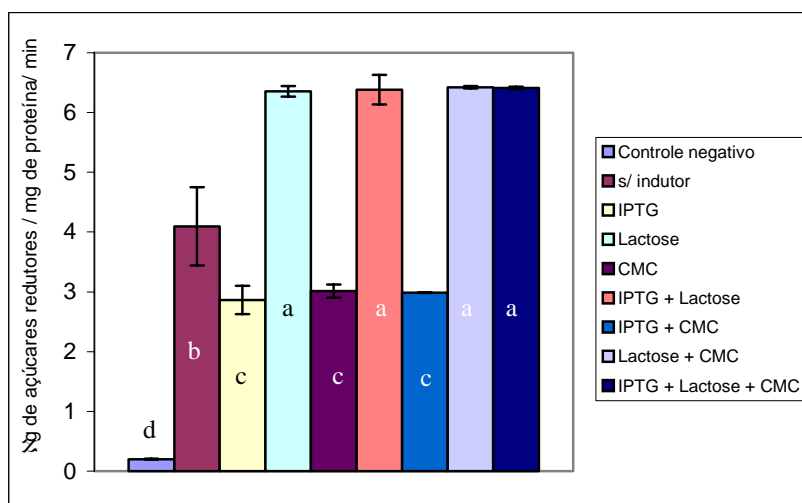


Figura 9 – Análise da reação de quantificação de açúcares redutores liberados apresentada pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, sob diferentes indutores e combinações destes. Média de três repetições. Tratamentos com mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade

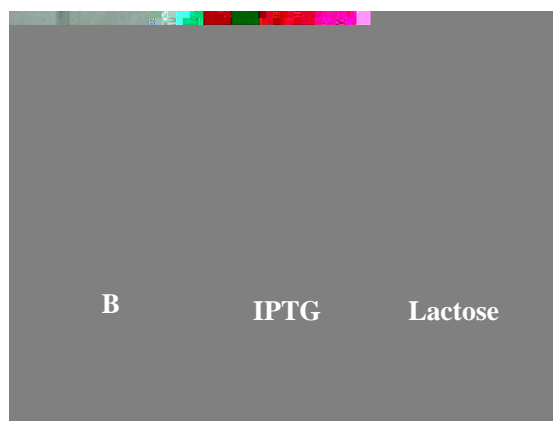


Figura 10 – Comparação entre as reações de quantificação de açúcares redutores liberados, apresentada pelo clone de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818, cultivado em meio contendo CMCelulose, sob diferentes indutores. B – controle negativo; coloração amarela mais intensa indica maior quantidade de açúcares liberada

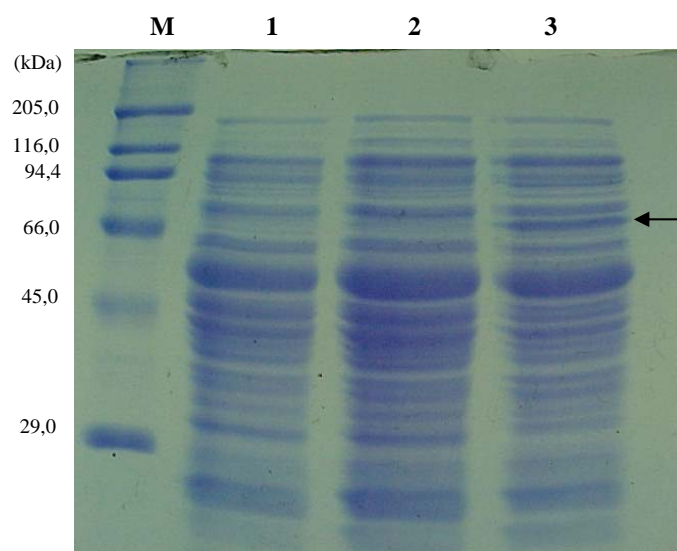


Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante de amostras de proteínas produzidas por *E. coli*, contendo o plasmídeo com o gene da proteína Xf-0818. M=padrão de peso molecular (kDa); 1= Cultivo sem adição de indutor; 2= cultivo com adição de IPTG 1 mM e 3=cultivo com adição de lactose 1 %

A utilização da técnica de ultrafiltração, a fim de aumentar a concentração da proteína de interesse na amostra, representou uma etapa fundamental para a obtenção de resultados satisfatórios, sendo altamente recomendável em estudos posteriores. Na Figura 12 pode ser observada a reação de quantificação de açúcares redutores liberados, juntamente com a análise destas reações (Figura 13). A mais intensa coloração obtida após a ultrafiltração, em comparação com a fração que não foi retida no filtro, referente às proteínas menores que 50 kDa, evidencia o aumento da concentração da proteína de interesse na fração retida no filtro. A etapa de cromatografia de afinidade a metal foi realizada com êxito, conforme apresentado nas Figuras 14 e 15. A Figura 14 representa a etapa de lavagem da resina, com tampão de lavagem, o qual não contém o competidor imidazol, enquanto a Figura 15 representa a etapa de eluição, com tampão semelhante ao tampão de lavagem, embora contendo imidazol a uma concentração de 150 mM, conforme recomendação do fabricante da resina Talon (Clontech, 2000). O pico apresentado na Figura 15 sugere alto grau de pureza da proteína, o que foi confirmado em eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentado na Figura 16. Esse resultado possibilita a utilização desta em estudos posteriores, tanto para a sua caracterização bioquímica, determinação de parâmetros cinéticos, avaliação de inibidores, como também em estudos avançados, como determinação de estrutura tridimensional, através de cristalografia de raios-X, determinação de dicroísmo circular, capacidade de transglicosilação, ou seja, formar açúcares de cadeia maior a partir de moléculas simples, como celobiose a partir de glicose, celotetrose a partir de celobiose, e assim por diante.

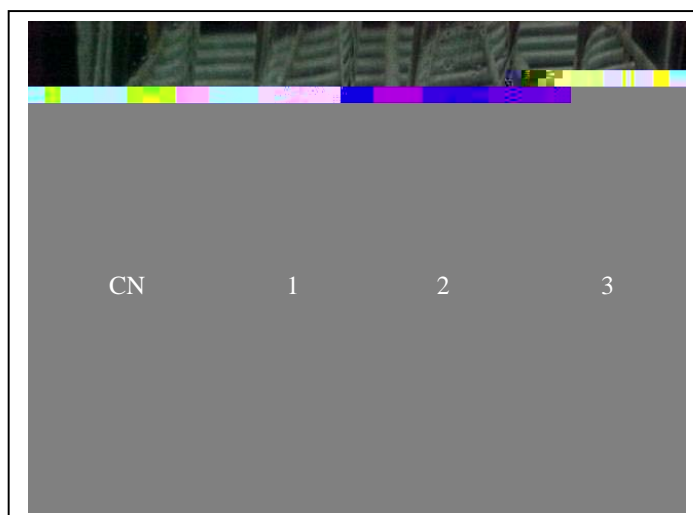


Figura 12 – Reação de quantificação de açúcares redutores liberados, apresentada pelas amostras obtidas na ultrafiltração. CN – Controle negativo, 1 – Extrato bruto, 2 – Fração não retida na membrana de ultrafiltração (proteínas < 50 kDa), 3 – Fração retida na membrana de ultrafiltração (proteínas > 50 kDa)

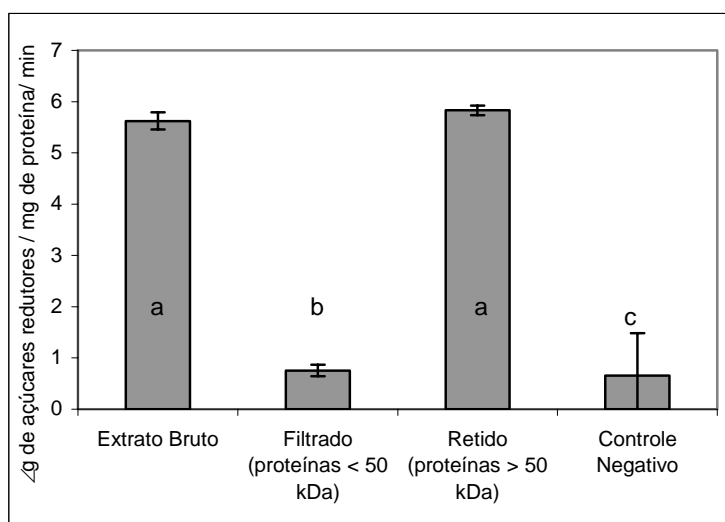


Figura 13 – Atividade de celulase nas amostras após a etapa de ultrafiltração, avaliada através da quantificação de açúcares redutores (Lever, 1972). Média de três repetições. Tratamentos seguidos de mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade

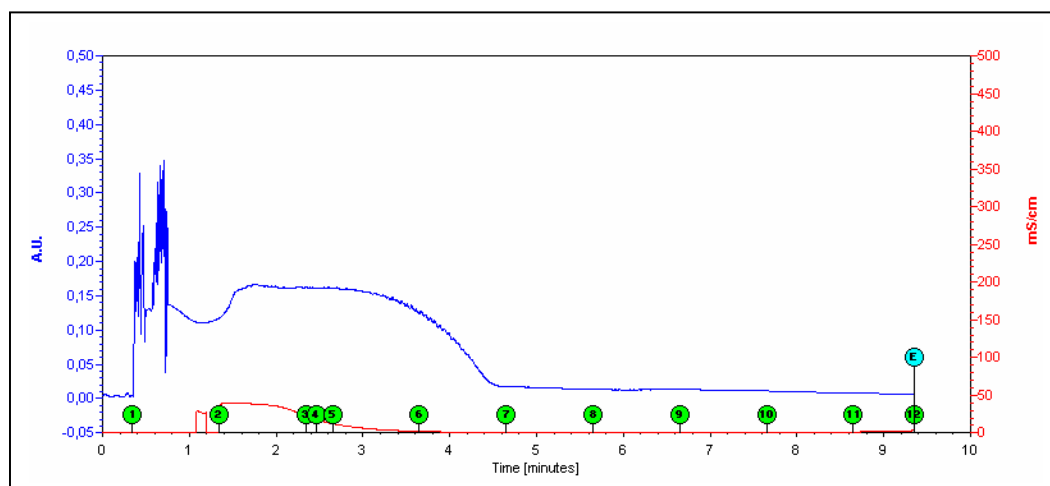


Figura 14 – Cromatograma da etapa de lavagem com a utilização de tampão de lavagem (fosfato de sódio 50 mM; NaCl 300 mM; pH 7,0). Escala e linha azuis indicam valores de absorbância a 280 nm, escala e linha vermelhas indicam valores de condutividade

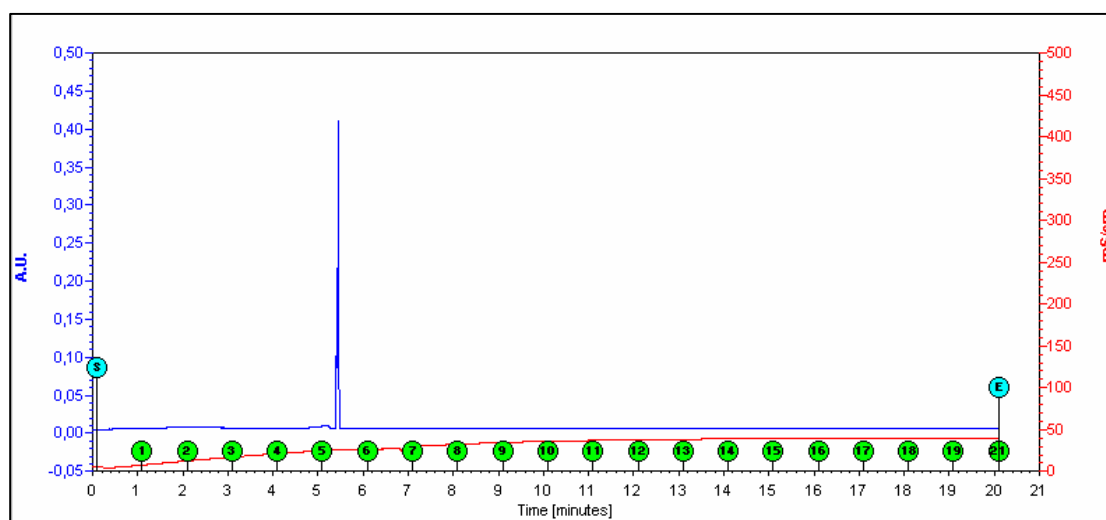


Figura 15 – Cromatograma da etapa de eluição com a utilização de tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM; NaCl 300 mM; imidazol 150 mM; pH 7,0). Escala e linha azuis indicam valores de absorbância a 280 nm, escala e linha vermelhas indicam valores de condutividade

#### 4.4 Produção de anticorpos

Os sistemas de conjugados com enzimas mais empregados nas técnicas de detecção imunológica são os que utilizam a enzima peroxidase e a fosfatase alcalina. Neste trabalho, dentre os três sistemas testados para a avaliação dos anticorpos produzidos em camundongos contra a celulase Xf-0818, foi selecionado o HRP utilizando como substrato o OPD, devido à alta correspondência nos resultados aliada ao mais baixo custo, quando comparado aos outros dois sistemas. A Figura 17 constitui a placa de ELISA quando da utilização do sistema HRP + OPD, com as reações do antígeno, no caso a proteína Xf-0818 purificada nas etapas anteriores a uma concentração de  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , com os anticorpos da segunda (S2), terceira (S3) e quarta (S4) coletas, produzidos nos quatro camundongos, em diferentes diluições.

Os gráficos mostrados na Figura 18 representam os valores da leitura da absorbância a 490 nm, das reações apresentadas na Figura 17. O antisoro extraído do camundongo 1 apresentou a titulação mais alta entre todos, com valores elevados mesmo em diluições maiores. O antisoro extraído do camundongo 4 apresentou grande uniformidade entre as diferentes coletas, com maior interação com o antígeno a partir da segunda coleta. Com base nesses resultados, foram selecionados os camundongos Ca1 e Ca4 para a obtenção dos anticorpos e utilização em imunocitoquímica.

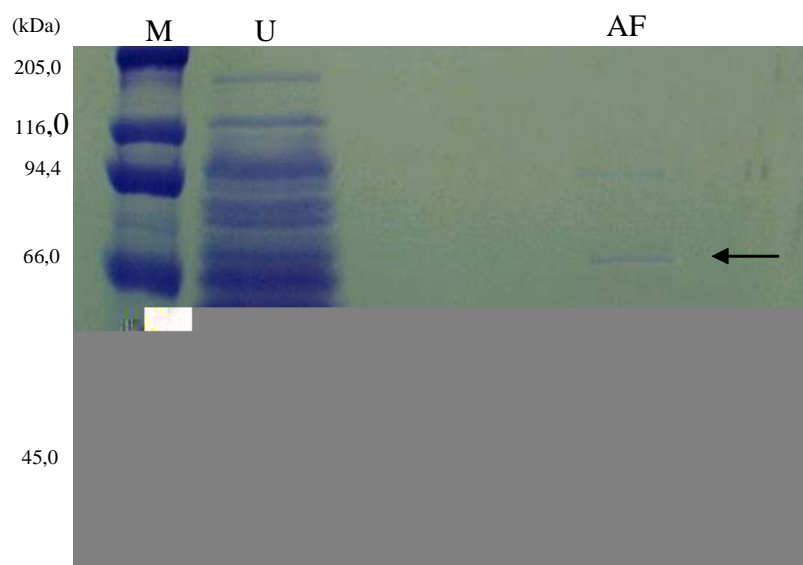


Figura 16 – Eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante de amostras de proteínas nas diferentes etapas do processo de purificação. M=padrão de peso molecular (kDa); UF, após a etapa de ultrafiltração; AF, após a etapa de cromatografia de afinidade a metal. (seta, proteína purificada)

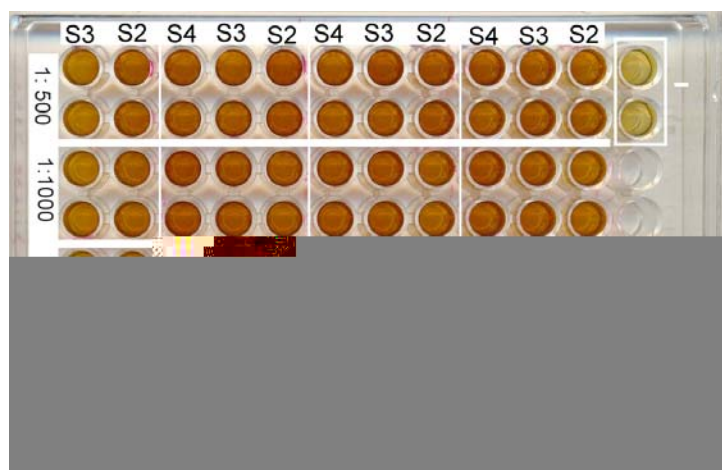


Figura 17 – Placa de ELISA com a reação da proteína Xf-0818 contra os anticorpos extraídos na segunda (S2), terceira (S3) e quarta (S4) coletas, em diferentes diluições. Ca indica o camundongo do qual o anticorpo foi extraído, + controle positivo; - controle negativo



Figura 18 – Titulação dos antissoros produzidos em camundongos através de imunização com a

#### 4.5 Inibição da atividade de celulase

Os anticorpos produzidos em camundongos apresentaram capacidade de inibir a atividade da enzima, provavelmente devido à habilidade de se ligarem ao domínio catalítico. A Figura 19 mostra a redução na atividade da enzima quando pré-incubada com os anticorpos em diferentes diluições. Isto evidencia a funcionalidade dos mesmos, possibilitando o emprego desses em estudos visando o desenvolvimento de tecnologias que utilizem a interação entre antígeno e anticorpo visando o bloqueio de enzimas produzidas por patógenos e que estejam envolvidas no processo de patogênese.

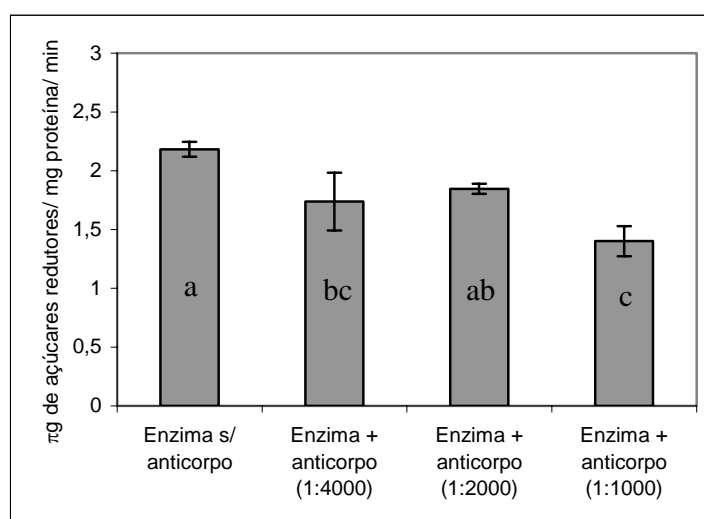


Figura 19 – Inibição da atividade enzimática da celulase Xf-0818, incubada com antissoro extraído de camundongos. Média de três repetições. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si a 5 % de probabilidade

#### 4.6 Microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica

A Figura 20 apresenta o estado geral dos vasos do xilema observados em microscópio óptico, antes da realização dos estudos de imunocitoquímica. As Figuras 20a e 20c são amostras de tecido provenientes de folhas saudáveis, de plantas não inoculadas e

mantidas em telado, protegidas do ataque de possíveis vetores da bactéria. Nestes vasos, identifica-se o estado normal dos mesmos sem a presença de qualquer tipo de bloqueio, estando os mesmos com a estrutura e forma absolutamente pertinentes à condição de sanidade que são relacionadas. As Figuras 20b e d representam tecido proveniente de folhas doentes, de planta doente infectada através de inoculação artificial. Observa-se claramente a ocorrência de vasos bloqueados, além de ruptura em alguns, provavelmente relacionados à infecção.

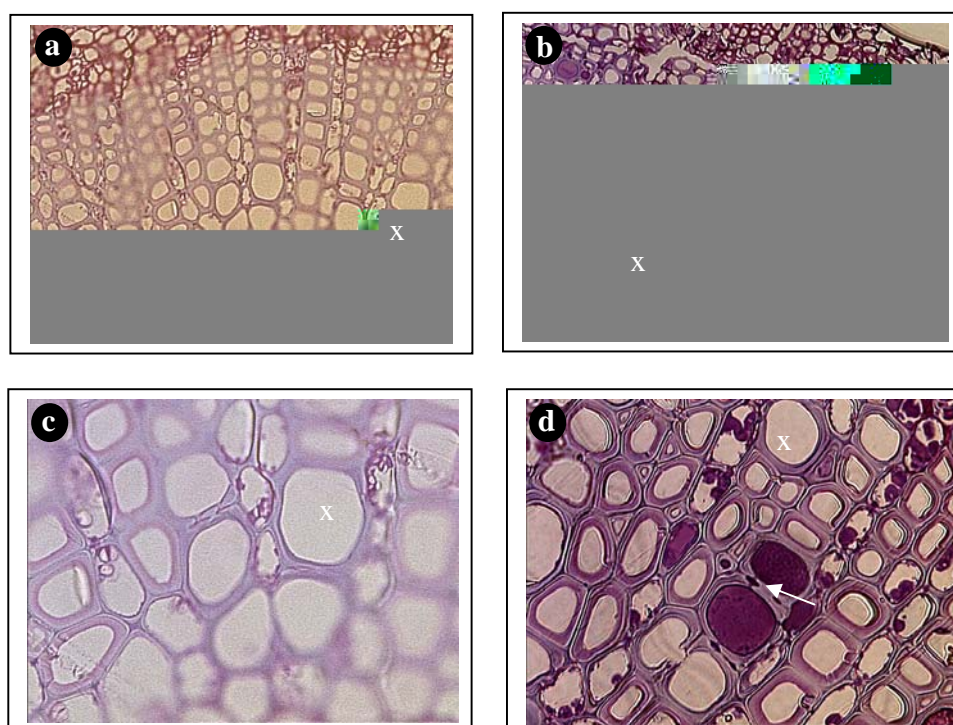


Figura 20 – Ultramicrografia de seções transversais de tecidos de citros obtidas em ultramicrotômo, e analisadas em microscópio ótico. x – vasos do xilema; seta indica a passagem de corante entre vasos adjacentes (a – planta sadia, aumento de 400X; b – planta infectada, aumento de 400X, c – planta sadia, aumento de 1000X; d – planta infectada, aumento de 1000X)

As Figuras 21 a 25 referem-se aos estudos de imunocitoquímica com a utilização dos anticorpos, incubados com proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal. A Figura 21 mostra um vaso do xilema de planta de citros sadia, sem quaisquer sinais da presença da bactéria, enquanto que a Figura 22 apresenta um vaso do xilema infectado,

onde podem ser visualizadas as células bacterianas de *X. fastidiosa*, próximas a membrana de pontuação parcialmente degradada. Grande concentração de células bacterianas pode ser observada na Figura 23, a qual foi ampliada e detalhadamente analisada, com o objetivo de visualizar partículas de ouro coloidal possivelmente ligadas a moléculas da celulase Xf-0818. Esta ampliação encontra-se na Figura 24, onde pode ser visualizada a presença das partículas de ouro coloidal, conforme realçado pelas setas brancas. Nas análises de imunocitoquímica das seções de tecidos provenientes de plantas saudáveis, não foi observada a presença de partículas de ouro coloidal.

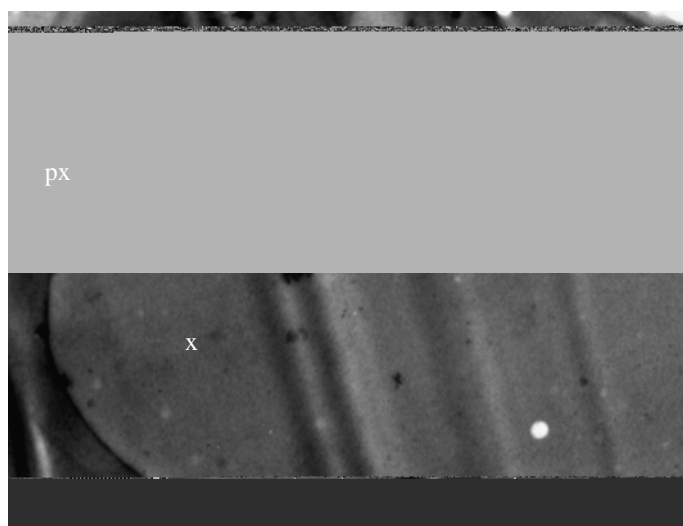


Figura 21 – Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros sadia obtida em ultramicrotomo, e analisada em microscópio eletrônico de transmissão. x – vaso do xilema, px – parede dupla do vaso, o que indica se tratar de um vaso do xilema

A Figura 25 mostra uma célula bacteriana presente em um vaso do xilema com a membrana de pontuação totalmente degradada, e a presença de partículas de ouro (setas brancas), que indica a possível participação da celulase Xf-0818. Não é possível afirmar de maneira definitiva que esta participação é determinante do processo de patogênese, fazendo necessária a realização de novos e detalhados estudos.

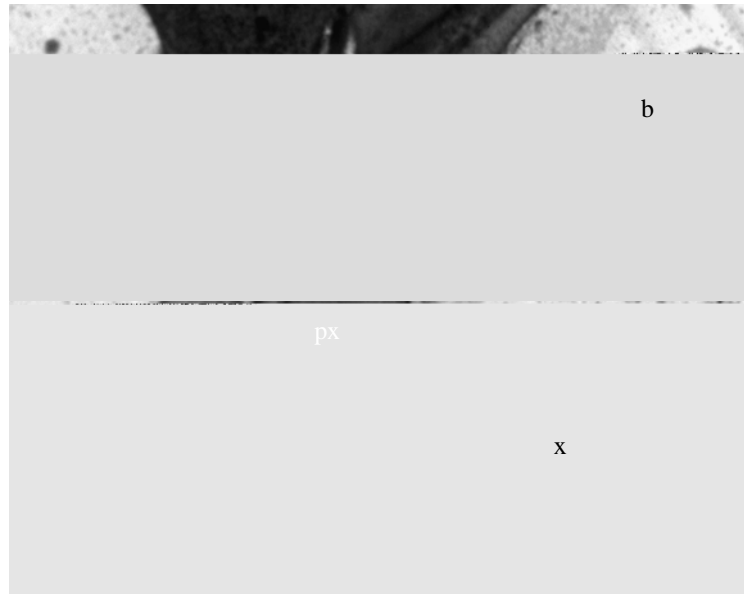


Figura 22 – Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros infectada por *X. fastidiosa* obtida em ultramicrotomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. b – bactéria, x – vaso do xilema, px – parede dupla do vaso do xilema

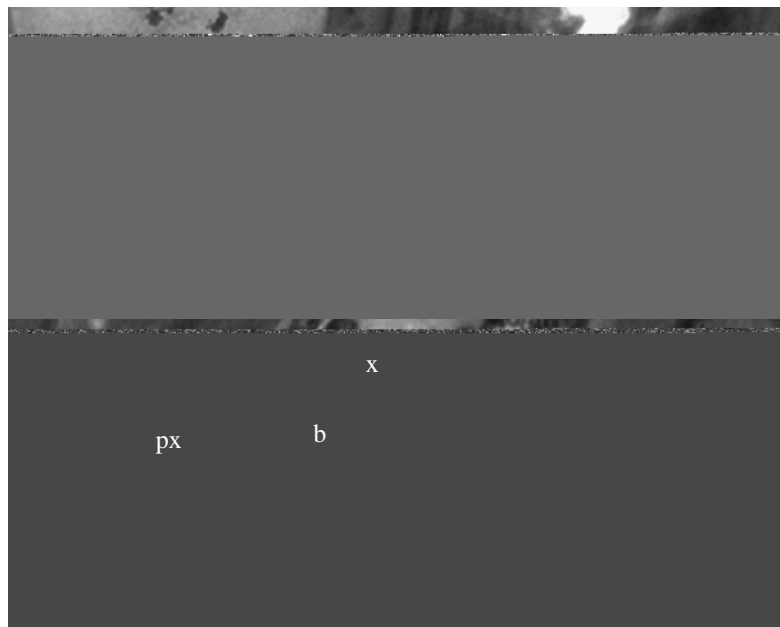


Figura 23 – Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros infectada por *X. fastidiosa*, obtida em ultramicrotomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão após a etapa de imunocitoquímica. b – bactéria, x – vaso do xilema, px – parede dupla do vaso do xilema

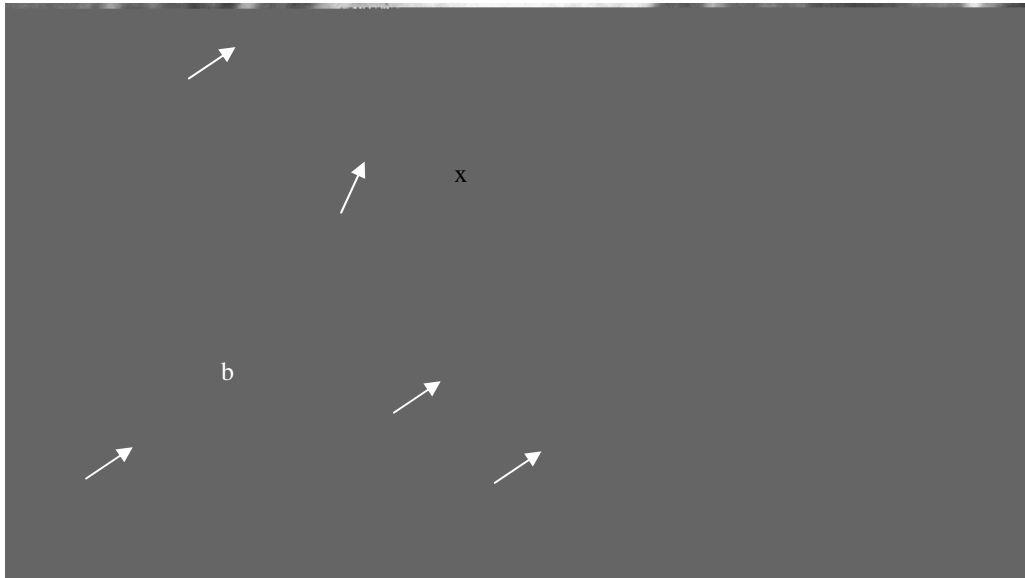


Figura 24 – Ampliação da Figura 23 para visualização das partículas de ouro coloidal (Setas brancas). b – bactéria, x – vaso do xilema

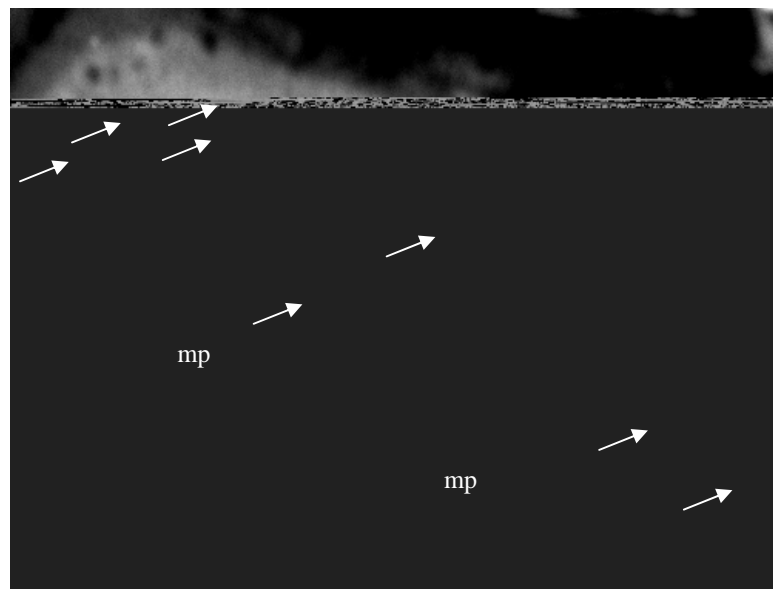


Figura 25 – Ultramicrografia de seção transversal de planta de citros infectada por *X. fastidiosa*, obtida em ultramicrotomo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão após a etapa de imunocitoquímica. Partículas de ouro coloidal (Setas brancas), b – bactéria, x – vaso do xilema, mp – membrana de pontuação intensamente degradada

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 Expressão da proteína Xf-0818**

O sequenciamento do genoma da bactéria *X. fastidiosa*, atualmente um dos mais importantes patógenos para a cultura dos citros no Brasil, realizado pela rede ONSA, com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), publicado como reportagem de capa da revista Nature em julho de 2000 representa não apenas um marco na pesquisa brasileira, mas também a consolidação da maturidade científica do país, podendo, sem sombra de dúvida, ser considerado como sendo um dos maiores feitos da ciência brasileira. Os benefícios diretos relacionados aos próprios conhecimentos gerados acerca de características desse importante fitopatógeno envolvidas nos mais diversos processos como patogenicidade, adaptação, sobrevivência, produção de metabólitos, entre outros, a reestruturação de laboratórios e a formação de um corpo de pesquisadores altamente especializados qualificam esse projeto entre os de maior impacto e contribuição à pesquisa nacional até o presente momento.

Antes da elucidação do genoma completo, muito pouco era conhecido sobre os mecanismos moleculares de patogenicidade de *X. fastidiosa*, sendo esse provavelmente, dentre todos os organismos que tiveram o genoma completamente sequenciado, o de menor caracterização biológica. A análise genética realizada por tão inovador projeto, não só determinou as características metabólicas e reprodutivas básicas da bactéria, mas também vários potenciais mecanismos de patogenicidade. A ocorrência de alguns destes nunca haviam sido postulados para acontecer em fitopatógenos anteriormente,

representando novas perspectivas ao conhecimento dos processos envolvidos na patogenicidade desses organismos. As informações geradas possibilitaram assim o direcionamento dos estudos a serem realizados para a dissecação experimental e racional das interações entre *X. fastidiosa* e seus hospedeiros, podendo em um futuro próximo, resultar em medidas eficientes baseadas em um profundo conhecimento científico para o controle da clorose variegada dos citros.

Porém, a exclusiva obtenção de seqüências de um determinado organismo, não explica por si só o papel das proteínas codificadas e identificadas nos projetos de sequenciamento de genomas de organismos, fornecedores de tão extenso acervo de informações. Esses necessitam de projetos dirigidos para a análise funcional das diversas seqüências originadas, para que, de maneira integrada e racional, possam proporcionar um grau de aprofundamento condizente com os altos custos e expectativas, gerados por tão desafiadores e inovadores projetos.

Desta forma, o genoma funcional da *X. fastidiosa* representa a busca por respostas a perguntas e confirmações de hipóteses oriundas do enorme volume de informações geradas pelo projeto de sequenciamento do genoma dessa bactéria. Para a realização de muitos dos projetos visando o estudo funcional a partir de qualquer genoma, um ponto determinante é a produção das proteínas de interesse em sistemas de alta confiabilidade, que possibilitem o isolamento das mesmas. Entre os diferentes sistemas disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, o sistema de expressão que utiliza a bactéria *E. coli* representa um dos mais atrativos e interessantes devido a características como o rápido crescimento em meios de cultivo simples, a sua genética e fisiologia profundamente conhecidas, e a grande quantidade e variedade de vetores de clonagem e linhagens mutantes disponíveis comercialmente (Baneyx, 1999). Embora apresente algumas desvantagens, como o fato de *E. coli* não secretar proteínas no meio e a possibilidade de ocorrer precipitação das proteínas produzidas em grandes quantidades dentro de agregados insolúveis denominados corpos de inclusão, este sistema permanece sendo um dos mais confiáveis e com alto grau de adequação às diferentes peculiaridades concernentes às pesquisas biológicas.



Atualmente, um dos sistemas de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* mais utilizados é o que compreende a série de vetores pET (Novagen, 2000), o qual baseia-se no promotor da polimerase do RNA T7 (Studier et al., 1990). A expressão de proteínas recombinantes usando esses plasmídeos quando induzida, produz altos níveis de transcritos e grande quantidade de proteínas, apresentando alta especificidade, uma vez que a sequência desse promotor é rara, e não ocorre reconhecimento de outras sequências de DNA como promotoras (Dubbendorf & Studier, 1991). A indução da expressão de proteínas é obtida com a adição de compostos capazes de ativar a transcrição do promotor da polimerase do RNA T7, como isopropiltiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose, amplamente utilizado na ativação desse promotor, ou a própria lactose (Yan et al., 2004; Howhan & Pornbanlualap, 2003; Liu et al., 1999).

A utilização de lactose, em substituição a indutores comumente utilizados, como o IPTG, em protocolos visando à purificação de proteínas heterólogas produzidas em *E. coli*, e que utilizem o sistema da série de vetores pET, conforme ocorrido no presente trabalho, deve ser considerado sobre alguns aspectos importantes. Inicialmente, do ponto de vista econômico, representa uma significativa redução nos custos, uma vez que a lactose é muitas vezes mais barata que o seu análogo IPTG. Um grama de IPTG custa atualmente US\$ 26.69, enquanto um grama de lactose apenas US\$ 0.018 (Sigma Aldrich, 2004). Além disto, a lactose apresenta ainda baixa toxicidade à célula bacteriana, sem ocasionar uma explosão metabólica na mesma, podendo ainda contribuir para um aumento da fração solúvel da proteína a ser purificada, sem comprometimento do nível de expressão (Monteiro et al., 1999).

Um dos grandes problemas no uso do IPTG como indutor é a toxicidade por este apresentada à célula bacteriana, principalmente quando da utilização dos vetores da série pET. Esta toxicidade é decorrente da alta produção de mRNA, que pode acarretar na destruição dos ribossomos e morte celular, além de que a expressão defeituosa do RNA da T7 polimerase pode ocasionar instabilidade do plasmídeo na célula (Miroux & Walker, 1996). Conforme Baneyx (1999), este problema pode ser evitado pelo uso de lactose como indutor, ou ainda pela utilização de variantes termosensíveis, nos quais a expressão de proteínas recombinantes encontra-se sob controle de promotores induzidos

por meio de indução térmica, com a alteração da temperatura. Um dos mais bem caracterizados promotores ativados pela variação de temperatura em *E. coli* é denominado de CspA (do inglês “cold-shock protein”) (Phadtare et al., 1999).

Yan et al. (2004) evidenciaram ainda a dificuldade do IPTG em acessar a célula bacteriana, o que só ocorre com o concurso da enzima permease, que auxilia na entrada deste composto na célula, conforme proposto por Miao & Kompala (1992). Por outro lado, a lactose entra facilmente na célula, onde é convertida a alolactose (6-O-β-D-galactopiranosil-D-glucose) pela β-galactosidase, estando hábil a induzir o promotor *lac* T7, além de poder ser utilizada como fonte de carbono pela bactéria, proporcionando um maior crescimento e portanto um maior número de células na cultura, o que resultaria em um aumento da produção da proteína recombinante. A alolactose, mas não a lactose, é conhecida como sendo um indutor natural do *lac*, inclusive apresentando afinidade de ligação ao repressor deste operon semelhante ao IPTG. Dados de equilíbrio de ligação mostraram que a taxa de associação do IPTG com a proteína repressora do operon *lac* é  $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  enquanto para a alolactose é  $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Muller-Hill et al., 1964).

Howhan & Pornbanlualap (2003), comparando a produção de uma nucleosídeo difosfato quinase mediante a indução por IPTG ou lactose, sugeriram a possibilidade de utilização da lactose como substituto do IPTG. Os autores observaram uma mais rápida produção da proteína recombinante, obtida pela utilização do IPTG, que apenas com uma h após a adição do composto, já se apresentava em quantidade significativa. Tal produção manteve-se crescente até cinco horas após a indução, quando atingiu um nível máximo. Na indução por lactose, a produção da nucleosídeo difosfato quinase ocorreu de maneira mais lenta, encontrando-se em quantidade muito baixa, duas horas após a indução. No entanto, cinco horas após a adição do composto, a quantidade da proteína havia atingido praticamente o mesmo nível daquela observada quando da utilização do IPTG.

Wulff (2002), em estudo com celulases de *X. fastidiosa*, utilizou IPTG a 0,4 mM, com posterior cultivo a temperatura de 32° C e extração das proteínas 12 h após a adição do indutor, obtendo uma expressão satisfatória das proteínas Xf-2708, Xf-0810 e Xf-0818, identificadas no projeto Genoma da *Xylella*, sendo a última objeto do presente



extremamente importante a sua realização, devido à baixa expressão obtida, mesmo quando da utilização de lactose como indutor. A combinação da técnica de ultrafiltração com técnicas de separações cromatográficas pode representar um incremento à eficiência dos protocolos de purificação, solucionando problemas devido a uma baixa expressão da proteína recombinante ou de alta diluição desta ao final da etapa de cromatografia.

### 5.3 Purificação da proteína Xf-0818

A necessidade de metodologias eficientes para a purificação de proteínas apresenta-se cada vez maior, impulsionada pela demanda crescente gerada pelo grande número de estudos visando à identificação funcional de genes descritos nos programas de sequenciamento de genoma, como o projeto Genoma da *Xylella fastidiosa*, o projeto Genoma Humano, entre outros.

A modificação de proteínas pela adição de uma sequência de resíduos de histidina (geralmente em número de seis) representa uma atrativa ferramenta para a purificação de proteínas recombinantes expressas em *E. coli* (Crowe et al., 1994). Esta metodologia, denominada cromatografia de afinidade a metal, foi desenvolvida por Porath et al. (1975), e é atualmente uma das modalidades de purificação de proteínas por afinidade mais utilizadas. Baseia-se na interação entre cadeias de certos aminoácidos, principalmente histidinas, presentes na superfície da proteína, e íons metálicos imobilizados em resinas de cromatografia. As seqüências de ligação consistem de resíduos consecutivos de histidina capazes de se ligarem de maneira seletiva a íons metálicos como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  (Kasher et al., 1993). Um grande número de vetores da série pET apresentam como característica, a presença de seqüência de resíduos de histidina (“6xHis-tag”), que possibilitam a purificação de proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade a metal (Crowe et al., 1994).

O volume de trabalhos utilizando a cromatografia de afinidade a metal apresenta-se cada vez maior. Apenas citando alguns exemplos, Wizemann & von Brunn (1999), purificaram uma proteína do nucleocapsídeo do vírus da hepatite B, enquanto Jain et al.

(2004) conseguiram purificar uma GFP utilizando cromatografia de afinidade a metal, ambos através da utilização de resina contendo o íon níquel como metal imobilizado.

Uma das vantagens apresentadas pela cromatografia de afinidade a metal utilizando seqüência de resíduos de histidina (His<sub>6</sub>) é a possibilidade de purificação de proteínas sob condições denaturantes. Isto auxilia na purificação de proteínas agregadas em corpos de inclusão, os quais podem ser dissolvidos pela utilização de agentes denaturantes como uréia e guanidina-HCl, não se fazendo necessário a realização de várias etapas utilizando diferentes técnicas cromatográficas, como cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca aniônica ou imobilização em géis. Esta característica permitiu que Vincent et al. (2004) obtivessem, em cromatografia de afinidade a metal em passo único, uma proteína receptora, altamente purificada, envolvida no transporte entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático em *Arabidopsis*, clonada e expressa em *E. coli*. Uma outra vantagem da utilização da seqüência de resíduos de histidina é que a inserção da mesma não afeta a estrutura ou a função da proteína recombinante, podendo inclusive atuar como um epítopo a ser reconhecido em técnicas de detecção que utilizem anticorpos monoclonais ou ainda no sistema de detecção tradicional através de conjugados enzima-ácido nitrilotriacético-níquel (Ramos et al., 2004).

Em estudo realizado por Wulff (2002), o autor trabalhando também com proteínas de *X. fastidiosa*, clonadas e expressas em *E. coli*, tentou realizar a purificação da proteína Xf-0818 através de cromatografia de afinidade a metal, com resina contendo como metal imobilizado o íon níquel. No entanto, a purificação via passo único não foi possível, somente sendo obtida a proteína purificada após uma série de procedimentos como precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica, cromatografia de afinidade a metal e por fim, filtração em gel. Apesar de apresentar sucesso, tal protocolo demanda elevado tempo, além de reduzir significativamente a quantidade de proteína produzida, em decorrência de perdas durante as etapas.

No presente trabalho, após tentativas sem sucesso de purificação da proteína Xf-0818, através da utilização de resina contendo o íon Ni<sup>2+</sup> imobilizado, optamos por lançar mão do uso da resina Talon (Clontech, 2000), que apresenta como íon

imobilizado o  $\text{Co}^{2+}$ . Diferentes sistemas de purificação geralmente apresentam especificidades diferentes em relação às condições experimentais da purificação, os plasmídeos e linhagens bacterianas utilizadas, podendo ocorrer variações devido ao “background” genético, determinando de maneira significativa na produção tanto da proteína de interesse como também sobre a expressão de proteínas indesejáveis, que possam vir a interferir na interação entre a seqüência de resíduos de histidina e o metal imobilizado, conforme sugerido por Wulff (2002), que apresentou resultados muito satisfatórios, representando uma importante ferramenta na obtenção da proteína Xf-0818 purificada.

O emprego da resina Talon, manufaturada pela empresa Clontech, se faz cada vez mais presente em importantes projetos visando a purificação de proteínas a partir de seqüências identificadas no genoma, para a identificação funcional das mesmas. Os exemplos encontrados na literatura são inúmeros. A purificação de proteínas identificadas no projeto Genoma Humano (Braun et al., 2002), a purificação de uma proteína apresentando propriedades alergênicas da formiga *Solenopsis invicta* (Schmidt et al., 2003), de uma proteína inibidora do transporte de cálcio, responsável pela secreção seminal em camundongos, expressa em baculovirus (Phan et al., 2003), e de uma proteína multifuncional, denominada Nef, codificada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV tipo 1), caracterizada como um fator determinante tanto *in vitro* como *in vivo*, para a progressão da replicação viral e patogênese (Finzi et al., 2003), são apenas alguns exemplos da utilização desta resina na atualidade.

Em *X. fastidiosa*, Campoy et al. (2002) também utilizando a resina de purificação de afinidade com cobalto como metal imobilizado, obtiveram êxito na purificação de uma proteína denominada LexA, envolvida no sistema de reparo de DNA em bactérias. Os autores identificaram a capacidade de ligação desse gene com o seu próprio promotor na bactéria *X. fastidiosa*, e que a expressão do mesmo é fortemente induzido por danos ocorridos no DNA. A purificação dessa proteína possibilitou evidenciar a ocorrência de diferenças na composição das seqüências em comparação com a mesma proteína LexA de outros gêneros bacterianos.

#### 5.4 Produção de anticorpos

A utilização de técnicas baseadas no reconhecimento entre antígeno e anticorpo em fitopatologia vem desde a década de 70, quando foram introduzidas na detecção de vírus de plantas nos mais variados tecidos como folhas, caules, sementes, material de propagação vegetativa e insetos vetores. Uma das mais difundidas técnicas de sorologia desde a sua introdução, por Clark & Adams (1977), é a técnica mundialmente conhecida como ELISA (do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”). Para a fitovirologia, a técnica representa uma grande economia em espaço e tempo, uma vez que pode substituir o diagnóstico por meio do uso de plantas indicadoras, que requerem instalações apropriadas e um longo período desde a produção de mudas, inoculação e aparecimento dos sintomas.

Em patógenos bacterianos, técnicas como ELISA representam poderosas ferramentas na diagnose, através da utilização de anticorpos produzidos contra exopolissacarídeo. Embora apresente algumas desvantagens como menor sensibilidade, quando comparada a outras técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), apresenta vantagens significativas como o menor custo, possibilidade de análise de um maior número de amostras, além da possibilidade de avaliação quantitativa.

Porém, o uso de anticorpos não representa uma poderosa ferramenta apenas como mera técnica de detecção. Vislumbra-se em curto espaço de tempo, e testemunha-se no presente momento, um número cada vez maior de possibilidades para o uso destes na pesquisa visando à identificação do papel de uma determinada proteína no processo de patogenicidade. Os processos iniciais de infecção e as proteínas envolvidas nesses podem ser investigados sobre diferentes interesses, através da conjugação do inóculo com anticorpos para determinadas enzimas. Esta metodologia vêm sendo utilizada para inibir enzimas como cutinases, lipases e outras enzimas degradadoras da parede celular vegetal, a fim de se identificar e ratificar o papel dessas enzimas na patogenicidade.

Anticorpos produzidos contra lipases do fungo *Botrytis cinerea*, patógeno importantíssimo para diversas culturas agrícolas principalmente em pós-colheita, foram efetivos em inibir a colonização em folhas de tomateiro que apresentavam a cutícula

intacta (Commenil et al., 1998). A mesma exigência foi observada para a redução da infecção do fungo *Alternaria brassicicola* em plantas de couve-flor, também através da utilização de anticorpos contra lipases (Berto et al., 1999). As lipases são acilhidrolases de triacilgliceróis que ocorrem naturalmente não só nos animais e nas plantas, mas também em microrganismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Elas atuam preferencialmente na interface água/óleo para converter glicerídeos insolúveis em água Vorderwulbecke et al. (1992). Os microrganismos são os produtores, por excelência, de lipases extracelulares. No grupo dos fungos filamentosos os melhores produtores são as espécies do gênero *Rhizopus*, enquanto que no grupo das leveduras são as espécies do gênero *Rhodotorula* e, na classe das bactérias, as melhores produtoras de lipases são as *Pseudomonas* (Rapp & Backhaus, 1992). No genoma de *X. fastidiosa*, duas lipases foram identificadas sendo a função dessas, presumivelmente relacionada ao metabolismo de carbono, como fonte alternativa de carbono e energia (Simpson et al., 2000).

Embora os anticorpos produzidos contra liases do pectato não tenham apresentando quaisquer efeitos sobre a germinação, crescimento do tubo germinativo ou formação de apressórios de esporos de *Colletotrichum*, os mesmos interferiram no desenvolvimento da doença. O desenvolvimento dos sintomas causados por este patógeno, em frutos de abacate, manga e banana foram inibidos por meio da utilização de anticorpos policlonais misturados aos conídios, os quais bloquearam a ação de uma liase do pectato do fungo (Wattad et al. 1997). Duas liases do pectato, uma induzida na presença de hospedeiros vegetais e outra através da utilização de pectato como substrato, foram identificadas como fatores primários de patogenicidade no fungo *Nectria hematococca*, por meio da utilização de anticorpo, o qual inibiu a infecção, confirmando os dados obtidos em mutantes (Rogers et al., 2000).

A redução na atividade da celulase Xf-0818, através da incubação prévia com os anticorpos produzidos em camundongos, observada no presente estudo, além de ser um forte indicativo da função desta enzima no processo de patogênese, faz com que seja vislumbrada a possibilidade da utilização de estratégia semelhante para o desenvolvimento de uma moderna medida de controle do patógeno, merecendo estudos



mais detalhados sobre o tema, com a realização de experimentos específicos para tal propósito.

Sobre este tema, é cada vez mais crescente o número de estratégias de controle de patógenos através da resistência baseada na expressão de anticorpos. A clonagem de genes codificando anticorpos originou os denominados “plantibodies”. Desde o desenvolvimento da tecnologia do hibridoma em 1975, por Kohler & Milsten, os anticorpos monoclonais vêm sendo amplamente utilizados para a diagnose e terapia de doenças. A criação de plantas transgênicas capazes de expressar estes anticorpos ou fragmentos destes (Hiatt et al., 1989), os quais inativariam proteínas de patógenos, representa atualmente uma estratégia moderna, mas ainda carente de estudos mais profundos. Esta estratégia embora, na maioria dos casos, não tenha sido efetiva no controle das doenças avaliadas, têm proporcionado, em alguns casos, a redução nos sintomas de doenças causadas por vírus e fitoplasmas. Apesar de ser essencialmente nova e carente de confirmações experimentais, a utilização de “plantibodies” pode representar uma ferramenta potencial e eficiente em estudos visando a determinação do papel de proteínas secretadas durante os primeiros passos da infecção, como também podem propiciar algum nível de controle de doenças. O potencial do uso dessas moléculas para o estudo dos processos ocorrentes *in planta* pode ser exemplificado através do emprego dos “plantibodies” contra ABA e gibberelina, onde as respostas fenotípicas ocorrem de forma consistente com aquelas comumente conhecidas como papel desses hormônios (Gold et al., 2001). Esses podem ainda contribuir no desenvolvimento e introdução em plantas via transformação, de peptídeos antimicrobianos sintéticos, uma outra tecnologia recente que vem ganhando espaço nas pesquisas envolvendo o controle de doenças de plantas (Blondelle & Lohner, 2000). Um exemplo da utilização dessa tecnologia no controle de doenças de plantas é a geração de plantas transgênicas expressando um peptídeo transgênico sintético, apresentando atividade antifúngica *in vitro*, que se mostraram altamente resistentes à colonização por *C. destructivum* (Cary et al., 2000). Esses autores sugerem, baseados nesses resultados que peptídeos produzidos em plantas podem atingir a sua molécula-alvo, tendo dessa

forma, um efeito biológico, desde que tenham uma meia-vida suficiente para tal e se encontrem em localização adequada.

Desta forma, não se trata de utopia imaginar que, em um futuro não muito distante, o controle da clorose variegada dos citros venha a ocorrer mediante o emprego de anticorpos produzidos contra enzimas específicas envolvidas na patogênese, como celulasas, xilanases e proteases, ou ainda através da expressão de anticorpos contra essas e outras enzimas, em plantas transgênicas, e sim de uma meta a ser almejada.

Outra interessante possibilidade da utilização de anticorpos consiste nas técnicas que combinam os princípios da sorologia com o amplo alcance das técnicas de microscopia eletrônica. A união dessas poderosas ferramentas permite a detecção de patógenos sistêmicos, a detecção da presença de moléculas componentes do tecido vegetal e a visualização da ação de enzimas no interior das células de hospedeiros. No presente trabalho, estas técnicas foram utilizadas com o objetivo de visualização da degradação das membranas dos vasos pontuados pela ação da celulase Xf-0818.

## **5.5 Imunocitoquímica**

A imunocitoquímica compreende um grupo de técnicas que podem ser utilizadas para localizar antígenos dentro das células através do emprego de anticorpos específicos. A imunofluorescência, a imunoperoxidase, o sistema avidina-biotina e a marcação com

fitopatologia. Em medicina, Selzer et al., (1999) puderam avaliar o efeito inibitório de anticorpos produzidos contra uma cisteína protease de *Leishmania major*, um protozoário que causa a doença conhecida como Leishmaniose, que ocorre de forma endêmica em regiões tropicais da América, da África, e no subcontinente indiano, como também em regiões subtropicais do Sudeste da Ásia e Mediterrâneo, acometendo milhões de pessoas.

Em microbiologia, Lorito et al., (1998) utilizando essa técnica identificaram a atividade de uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* transferida através de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* para plantas de fumo cv. Samsun NN e cv. Xhantii e batata cv. Desiree. A técnica possibilitou evidenciar que as plantas transgênicas foram capazes de expressar a enzima principalmente em folhas e caules, sendo encontrada também em raízes e flores, e que o acúmulo da enzima ocorreu extracelularmente.

Em estudos relacionados à fitopatologia, embora em número limitado, existem alguns relatos interessantes utilizando imunocitoquímica, principalmente na identificação da localização subcelular de sítios de atuação de enzimas e do acúmulo de compostos, envolvidos no processo de ataque e defesa, na complexa interação entre plantas e patógenos.

Estudos utilizando imunocitoquímica revelaram que uma proteína presumivelmente envolvida no movimento do vírus da mancha anelar do tomateiro (TomRSV), na infecção de plantas de *Nicotiana clevelandii* somente foi encontrada em células infectadas e imediatamente adjacentes aos tecidos necróticos. Essa proteína estava associada a estruturas tubulares contendo partículas virais ou se encontrava próxima à parede celular vegetal. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese de que essa proteína estaria envolvida no movimento célula a célula do vírus, induzindo a formação de estruturas tubulares (Wieczorek & Sanfacon, 1993).

A utilização da técnica de imunocitoquímica possibilitou que Carzaniga et al., (2002) identificassem a localização de melanina, um importante fator de patogenicidade e de sobrevivência de fungos patogênicos a plantas e animais, em conídios de *Alternaria alternata*, um importante fitopatôgeno em diversas culturas como tomate, batata e fumo.

Através do uso de um anticorpo designado M1, os autores puderam mostrar que a melanina estava localizada no septo e nas paredes externas de conídios da linhagem de *A. alternata* selvagem, mas não naquelas da linhagem AKT88-1, um mutante albino de *A. alternata*. Os autores enfatizam, com base nos resultados obtidos, que a utilização de anticorpo M1 representa uma nova ferramenta para a detecção de estruturas melanizadas em tecidos de plantas e animais sob o ataque de patógenos.

Varet et al., (2003) utilizando imunofluorescência e imunocitoquímica, revelaram a localização na membrana plasmática em células de *Arabidopsis* de uma proteína denominada NHL3-HA. Essa proteína é membro da família NHL e está envolvida no processo de defesa ao ataque de patógenos. Plantas transgênicas superexpressando essa proteína, embora não tenham produzido uma maior quantidade de transcritos de proteínas relacionadas à patogênese ou o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, apresentaram um aumento na resistência a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, ficando evidente a correlação entre o nível de transcritos de NHL3 e a resistência. A presença dessa proteína na membrana plasmática pode representar um sítio inicial de reconhecimento entre patógeno e planta, possibilitando a interceptação de sinais derivados do patógeno, conforme proposto por Grant & Mansfield (1999).

Em plantas de *Citrus*, Gowda et al. (2000) usando imunocitoquímica com anticorpos contra a proteína p20 observaram forte ligação a corpos de inclusão presentes em células infectadas com o vírus da Tristeza dos citros (CTV). Essa proteína foi inicialmente detectada através da utilização anticorpos policlonais, e têm aproximadamente 22-23 kDa, acumulando-se em altos níveis em plantas infectadas pelo CTV, mas não em plantas saudáveis.

No presente trabalho, a imunocitoquímica foi utilizada buscando visualizar as partículas de ouro coloidal conjugadas com proteína-A e associadas aos anticorpos produzidos em camundongos contra a celulase Xf-0818, identificada no projeto Genoma da *X. fastidiosa*, e clonada em *E. coli* por Wulff (2002). Embora possam ser visualizadas partículas de ouro em algumas seções de tecidos infectados por *X. fastidiosa*, faz-se necessário à realização de novas análises, em um maior número de plantas infectadas, para se confirmar o papel da enzima, uma vez que não ficou evidente a degradação das

membranas dos vasos pontuados das plantas de *Citrus* analisadas. Além disto, somente com a corroboração de dados provenientes de estudos utilizando linhagens mutantes de *X. fastidiosa*, será possível a conclusiva determinação do papel da celulase Xf-0818. Poder-se-à, então, afirmar que a mesma está envolvida na degradação das membranas dos vasos pontuados, sendo, portanto, um fator determinante de patogenicidade, contribuindo de forma substancial para a movimentação lateral da bactéria, e conseqüentemente, para uma maior distribuição no hospedeiro, conforme hipotetizado neste trabalho.

Mutantes de *X. fastidiosa* foram obtidos através da construção de plasmídeos contendo uma parte ou todo o sítio de origem da replicação no cromossomo de *X. fastidiosa* (*oriC*), e mais um sítio de resistência ao antibiótico canamicina sob o controle de um promotor de rRNA de *X. fastidiosa*, com posterior integração dos plasmídeos por recombinação homóloga (Monteiro et al., 2001). Lançando mão desses mutantes, Gaurivaud et al. (2002) conseguiram bloquear a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em *X. fastidiosa*. Através de mutagênese utilizando transposons e posterior eletroporação, Guilhabert et al. (2001) e Koide et al. (2004) também produziram mutantes de *X. fastidiosa*.

Trabalhos recentes vêm contribuindo para a confirmação da hipótese de degradação pela bactéria das membranas dos vasos pontuados, como por exemplo, àquele realizado por Newman et al. (2003). Através da utilização de mutantes de *X. fastidiosa* expressando o gene repórter *gfp* (do inglês “green fluorescent protein”), os autores observaram a passagem de células de *X. fastidiosa*. Essa passagem, conforme os autores, não se tratou de um encontro ocasional das células bacterianas com vasos apresentando membranas anteriormente danificadas, uma vez que todos os vasos adjacentes à colônia de *X. fastidiosa* apresentaram células em trânsito através desses. Vale ressaltar que a passagem por membranas intactas só ocorre por partículas menores que 20 nm de diâmetro, conforme evidenciado por Choat et al. (2003), em estudo realizado com diferentes espécies vegetais. A célula de *X. fastidiosa* apresenta diâmetro entre 200 e 400 nm (Wells et al., 1987), muito superior ao valor supracitado.

Estudos utilizando mutantes para o gene da celulase Xf-0818 representa, portanto, o próximo passo a ser dado visando a determinação definitiva do papel desta enzima na degradação das membranas dos vasos pontuados. Associado a isso, novos estudos utilizando os anticorpos gerados no presente trabalho podem fornecer um maior número de informações e conhecimento sobre os mecanismos de ataque e as condições favoráveis à expressão destes, sendo capazes de gerar novas possibilidades de controle dessa importantíssima doença que acomete tão significativa e estratégica fonte geradora de divisas e empregos, que é a cultura dos citros.

## 6 CONCLUSÕES

- A utilização de lactose, em substituição ao seu análogo isopropiltiogalactosídeo (IPTG) mostrou-se superior na produção da proteína Xf-0818 pelo clone utilizado nas condições empregadas neste estudo;
- A concentração da proteína através de ultrafiltração representou uma etapa importante, sendo crucial para a posterior purificação;
- A cromatografia de afinidade a metal utilizando resina Talon (Clontech) com cobalto como íon imobilizado apresentou resultados satisfatórios na purificação da proteína recombinante com seqüência de resíduos de histidina na extremidade N-terminal;
- Os anticorpos policlonais produzidos em camundongos apresentaram alta capacidade de reconhecimento da proteína purificada, reduzindo a atividade da mesma sobre celulose carboximetilada;
- Embora possam ser observadas partículas de ouro coloidal em seções de tecido provenientes de plantas infectadas com *X. fastidiosa*, faz-se necessária a confirmação do papel da proteína Xf-0818, através de novas análises com imunocitoquímica, além de estudos utilizando linhagens mutantes de *X. fastidiosa* para o gene que codifica esta presumida celulase.

## **ANEXOS**



**Anexo A. Extração de DNA de plasmídeo usando lise alcalina**

1. Crescer a bactéria de interesse, individualmente em cinco mL de meio LB contendo antibiótico de seleção ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de canamicina) por 15 h com agitação a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Centrifugar em microcentrífuga por 1 min, desprezando o sobrenadante (em água sanitária).
3. Ressuspender o precipitado em  $200 \mu\text{L}$  da Solução I, agitando em agitador tipo vortex, mantendo por 10 min à temperatura ambiente.
4. Adicionar  $200 \mu\text{L}$  da Solução II e misturar por inversão. Incubar no gelo por 5 min.
5. Adicionar  $150 \mu\text{L}$  da Solução III e misturar por inversão. Incubar no gelo por 5 min.
6. Centrifugar por 5-10 min.
7. Transferir o sobrenadante (contendo o DNA plasmidial) para outro microtubo.
8. Adicionar  $500 \mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitando em aparelho tipo vortex, e centrifugar por 5 min. Obs: Cuidado ao manusear fenol e clorofórmio, pois são muito cáusticos.
9. Coletar a fase superior aquosa e transferir para um novo microtubo.
10. Adicionar  $500 \mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitar em aparelho tipo vortex e centrifugar por 1 minuto. Coletar a fase aquosa superior e transferir para um outro microtubo.
11. Adicionar 1 mL de etanol absoluto (100%), misturar por inversão e incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 30 min.
12. Centrifugar a suspensão por 5 min. Decantar o etanol e adicionar  $500 \mu\text{L}$  de etanol 70%. Agitar em aparelho vortex e centrifugar por 5 min. Decantar o etanol e secar o precipitado ao ar ou sob vácuo.
13. Ressuspender o DNA em  $50 \mu\text{L}$  de Tampão TE, contendo  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  RNase A.

## SOLUÇÕES

### Solução I:

Componente	Quantidade	Concentração Final
Glucose	0,9 g	50 mM glucose
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	2,5mL	25 mM Tris-HCl, pH 8,0
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	2,0 mL	10 mM Na <sub>2</sub> ·EDTA

Água ultra pura destilada para 100 mL

Autoclavar por 20 min a 121°C

Armazenar em geladeira

Opcional: Adicionar 2 mg.mL<sup>-1</sup> de Lisozima imediatamente antes do uso.

### Solução II:

Componente	Quantidade	Concentração Final
NaOH 1N	2 mL	0,2 M NaOH
SDS 10% p/v	1 mL	1,0% SDS
Água ultra pura destilada	para 10 mL	

Fazer essa solução imediatamente antes de uso; não autoclavar

### Solução III:

3 M KOAc, pH 5,5

### TE:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM Na<sub>2</sub>·EDTA, pH 8,0

Autoclavar

Adicionar RNase A na concentração final de 50 µg.mL<sup>-1</sup> imediatamente antes do uso.

## Anexo B. Eletroforese denaturante em gel descontínuo de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram preparados na concentração indicada, seguindo as proporções abaixo descritas, conforme Alfenas et al. (1998).

### Gel Concentrador:

Reagentes	Concentração Acrilamida + Bisacrilamida	
	4 % T	4,5 % T
Tris-HCl pH 6,8 0,617 M	0,5 mL	0,5 mL
Acrilamida 30 % (m/v)	0,66 mL	0,75 mL
SDS <sup>a</sup> 10 % (m/v)	66 µL	66 µL
APS <sup>b</sup> 10 % (m/v)	33 µL	33 µL
TEMED	4 µL	4 µL
Água ultrapura	3,74 mL	3,65 mL
Volume (mL)	5	5

a – dodecilsulfato de sódio

b – persulfato de amônio

### Gel Separador:

Reagentes	Concentração Acrilamida + Bisacrilamida		
	10 % T	12,5 % T	15 % T
Tris-HCl pH 8,9 3,778 M	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Acrilamida 30 % (m/v)	3,34 mL	4,17 mL	5,0 mL
SDS 10 % (m/v)	66 µL	66 µL	66 µL
APS 10 % (m/v)	33,4 µL	33,4 µL	33,4 µL
TEMED	4 µL	4 µL	4 µL
Água ultrapura	4,96 mL	4,13 mL	3,32 mL
Volume (mL)	10	10	10

Após polimerização, as canaletas foram lavadas com água destilada e preenchidas com tampão de corrida. A eletroforese foi efetuada em equipamento vertical Protean II ou mini-protean II (Bio-Rad, Califórnia – USA) em câmara fria, sob 4°C.

Após o corante azul de bromofenol ter migrado para fora do gel pela superfície inferior, o gel foi retirado da forma e corado com Azul de Coomassie.

**Bis/Acrilamida (30 %; m/v)**

Acrilamida .....	30 g
N'N' metileno bis-acrilamida .....	0,8 g
Água ultra pura (Milli-Q) q.s.p. ....	100 mL
Filtrar em filtro Millipore 45 µm e armazenar a 4° C.	

**Tampão da amostra para proteínas desnaturadas (SDS – PAGE)**

Fosfato de sódio pH 7,0 .....	62,5 mM
Glicerol (v/v) .....	10 %
SDS (m/v) .....	2 %
β-mercaptoetanol (v/v) .....	5 %
azul de bromofenol (m/v) .....	0,001 %

**Tampão do Tanque/Corrida**

Tris .....	52 mM
Glicina .....	53mM
SDS (m/v) .....	0,1 %
pH 8,9	
armazenar em refrigerador (4 °C)	

### **Anexo C. Quantificação de proteínas conforme método de Bradford (1976)**

1. Adicionar 800  $\mu\text{L}$  da amostra a 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford concentrado (Sigma Chemical Co.) em tubos de ensaio devidamente identificados;
2. Misturar gentilmente a reação e aguardar 5 min a temperatura ambiente;
3. Fazer a leitura da absorbância a 595 nm;
4. Calcular a quantidade de proteínas contra uma curva padrão de albumina de soro bovina (BSA)

Obs: Este reagente é utilizado para mensuração de amostras com cerca de 0 a 20  $\mu\text{g}$  (25  $\mu\text{g}$  no máximo) de proteína. Amostras com uma massa maior de proteínas devem ser diluídas previamente à adição do corante.

**Anexo D. Quantificação de carboidratos conforme método de Lever (1972)**

1. Adicionar 250  $\mu\text{L}$  da amostra a 750  $\mu\text{L}$  do reagente de Lever em tubos de ensaio devidamente identificados;
2. Incubar por 5 min a 100  $^{\circ}\text{C}$ ;
3. Resfriar a mistura a  $\pm 25$   $^{\circ}\text{C}$ ;
4. Fazer a leitura da absorbância a 410 nm;
5. Calcular a quantidade de carboidratos contra uma curva padrão de glicose

**Preparo do reagente de Lever:**

- A hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (PAHBAH) é preparada a 5 % (p/v) em HCl 0,5 M. Esta solução é diluída com NaOH 0,5 M, produzindo uma solução 1 % de hidrazida em álcali.

para 100 mL de reagente

- PAHBAH .....	1 g
- HCl 0,5 M .....	20 mL
- NaOH 0,5 M .....	80 mL

**Anexo E. Preparação de Células de *Escherichia coli* eletrocompetentes (Sambrook, et al., 1989).**

1. Inocular uma colônia da linhagem de *E. coli* (DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) ou BL21(DE3)pLysS) crescida previamente em meio sólido, em 2,5 mL de meio de cultura LB. Incubar por 15 horas, a 37 °C e 180 rpm;
2. Inocular estes 2,5 mL de cultura em 250 mL de meio LB aquecido a 37°C, em Erlenmeyer de 1 L. Crescer esta cultura (37°C, 220 rpm) até que a mesma apresente OD<sub>550nm</sub> entre 0,4 a 0,6, o que geralmente ocorre após 2 a 3 h;
3. Transferir o meio de cultura para tubos de centrífuga esterilizados e manter no gelo. Centrifugar a 700 g por 5 minutos, a 4°C;
4. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 30 volumes de glicerol 10 % estéril gelado;
5. Centrifugar a 700 g por 5 minutos, a 4°C. Repetir as etapas d) e e) no mínimo 2 vezes;
6. Ressuspender o precipitado em 1 a 2 gotas de glicerol 10 % estéril gelado e aliquotar em microtubos novos e esterilizados, previamente resfriados a – 75°C, colocando 50  $\mu$ L em cada tubo. Congelá-las em nitrogênio líquido e armazenar a – 75°C. As células competentes devem ser testadas quanto a contaminação e eficiência de transformação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Vicosa: Universidade Federal de Vicosa, 1998, 574p.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, p.382-386, 2001.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa* - adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. Piracicaba, 2003. 122p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ALVES, E.; LEITE, B. Aspects of *Xylella fastidiosa* xylem vessel colonization of sweet orange (*Citrus sinensis* (L. Osbeck) cultivar “Pêra”, revealed by electron microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v.10 (Supl. 2), p.1452-1453, 2004.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.411–421, 1999.



- BASHAM, H.G.; BATEMAN, D.F. Relationship of cell death in plant tissue treated with a homogeneous endo-pectate lyase to cell wall degradation. **Physiological Plant Pathology**, v.5, p.249–262, 1975.
- BASTAWADE, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.353-368, 1992.
- BEAULIEU, C.; BOCCARA, M.; VAN GIJSEGEM, F. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.197–202, 1993.
- BENHAMOU, N. Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: localization of some polysaccharides and hydroxyproline-rich glycoproteins in infected host leaf tissue. **Physiological Plant Pathology**, v.38, p.15–38, 1991.
- BERETTA, M.J.G.; BARTHE, J.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S. Survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by Citrus Variegated Chlorosis and Citrus Blight in Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.1196-1198, 1997.
- BERTO, P.; COMMENIL, P.; BELINGHERI, L.; DE-HORTER, B. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, p.183–189, 1999.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.286-290, 1985.
- BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v.57, p.151–166, 1997.

- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v.7, p.1513-1523, 1979.
- BLONDELLE, S.E.; LOHNER, K. Combinatorial libraries: a tool to design antimicrobial and antifungal peptide analogues having lyric specificities for structure-activity relationship studies. **Biopolymers**, v.55, p.74–87, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAUN, P.; HU, Y.; SHEN, B.; HALLECK, A.; KOUNDINYA, M.; HARLOW, E.; LABAER, J. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. **Proceedings of National Academy Science**, v.99, p.2654–2659, 2002.
- BROT, N.; WEISSBACH, H. Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. **Biopolymers**, v.55, p.288-296, 2000.
- BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.141–157, 2003.
- CAMPOY, S.; MAZÓN, G.; FERNANDEZ DE HENESTROSA, A.R.; LLASGOSTERA, M.; MONTEIRO, P.B.; BARBÉ, J. A new regulatory DNA motif of the gamma subclass *Proteobacteria*: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiology**, v.148, p.3583-3597, 2002.

- CARY, J.W.; RAJASEKARAN, K.; JAYNES, J.M.; CLEVELAND, T.E. Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth *in vitro* and *in planta*. **Plant Science**, v.154, p.171–181, 2000.
- CARZANIGA, R.; FIOCCO, D.; BOWYER, P.; O'CONNELL, R.J. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.216-224, 2002.
- CHOAT, B.; BALL, M.; LULY, J.; HOLTUM, J. Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. **Plant Physiology**, v.131, p.41-48, 2003.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p.475–483, 1977.
- CLONTECH, **BD TALON Metal affinity resins**: user manual. BD Biosciences Clontech: 2002. 47p.
- COMMENIL P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.52, p.1–14, 1998.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

- CROWE, J.; DOBELI, H. ; GENTZ, R.; HOCHULI, E.; STUBER, D.; HENCO, K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. **Methods in Molecular Biology**, v.31, p.371–387, 1994.
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevine: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, p.75-77, 1978.
- DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the causal bacteria associated with phony peach disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, p.309-314, 1981.
- DAVIS, M.J.; RAJU, B.C.; BRLANSKY, R.H.; LEE, R.H.; TIMMER, I.W.; NORRIS, R.C.; MCCOY, R.E. Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. **Phytopathology**, v.73, p.1510-1515, 1983.
- DEGEFU, Y. Cloning and characterization of xylanase genes from phytopathogenic fungi with a special reference to *Helminthosporium turcicum*, the cause of northern leaf blight of maize. Helsinki, 2003. 85p. Thesis (Ph. D.) - University of Helsinki.
- DEGEFU, Y.; FAGERSTRÖM, R.; KALKKINEN, N. Purification and partial characterization of xylanase from the fungal maize pathogen *Helminthosporium turcicum* Pass. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.291-299, 1995.
- DEGEFU, Y.; PAULIN, L.; LÜBECK, P.S. Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the maize pathogen *Helminthosporium turcicum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.457-465, 2001.

- DOW, J.M.; CLARKE, B.R.; MILLIGAN, D.E.; TANG, J.L.; DANIELS, M.J. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2994-2998, 1990.
- DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella fastidiosa* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v.17, p.263-271, 2000.
- DREIER, J.; BERMPOHL, A.; EICHENLAUB, R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, v.85, p.462-468, 1995.
- DUBENDORFF, J.W.; STUDIER, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. **Journal of Molecular Biology**, v.219, p.45-59, 1991.
- FINZI, A.; CLOUTIER, J.; COHEN, E.A. Two-step purification of His-tagged Nef protein in native condition using heparin and immobilized metal ion affinity chromatographies. **Journal of Virological Methods**, v.111, p.69-73, 2003.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p.264-268: Citros: Laranja
- FONSECA, H.S.; FURTADO, E.L.; KURAMAE, E.E.; MACHADO, S.R.; MINHONI, M.A.T.; NOZAKI, D.N. Seringueira, um novo hospedeiro de *Xylella fastidiosa* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.323, 2001/ Apresentado ao 33. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, 2001 – Resumo/
- FRY, S.M. Studies with *Xylella fastidiosa*, causal agent of Pierce's disease of grapevine. North Carolina, 1993. 89p. Thesis (Ph. D.) - North Carolina State University.

FUNDECITRUS. **Estatísticas Cancro cítrico**. <<http://www.fundecitrus.com.br>> (5 nov. 2004)

FUNDECITRUS. **Estatísticas CVC**. <<http://www.fundecitrus.com.br>> (15 maio 2004)

GAURIVAUD, P.; SOUZA, L.C.A.; VIRGÍLIO, A.C.D.; MARIANO, A.G.; PALMA, R.R.; MONTEIRO, P.B. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4658-4665, 2002.

GHOSH, R.; CUI, Z.F. Purification of lysozyme using ultrafiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.191-203, 2000.

GOLD, S.E.; GARCÍA-PEDRAJAS, M.D.; MARTÍNEZ-ESPINOZA, A.D. New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.337–365, 2001.

GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; DAVIS, C.L.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTI, M.R.; MAWASSI, M.; VALKOV, N.; BAR-JOSEPH, M.; MORENO, P.; DAWSON, W.O. The p20 gene product of Citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. **Virology**, v.274, p.246-254, 2000.

GRANT, M.; MANSFIELD, J. Early events in host-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.312–319, 1999.

GUTTERER, J.M.; DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J.; HAMPRECHT, B. Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum, and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. **Journal of Neurochemistry**, v.73, p.1422–1430, 1999.

- HARRIS, E.L.V. Concentration of the extract. In: HARRIS, E.L.V; ANGAL, S. **Protein Purification Methods**, a practical approach. Oxford: IRL Press. 1989. p.125–174.
- HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. **Protein purification methods, a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989. 317p.
- HASSE, G. **A Laranja no Brasil**. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987.
- HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v.7, p.637-644, 1997.
- HENRISSAT, B.; TEERI, T.T.; WARREN, R.A.J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**, v.425, p.352-354, 1998.
- HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. **Nature**, v.342, p.76-78, 1989.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. **Phytopathology**, v.87, p.1197-1201, 1997.
- HOCHULI, E. Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. **Genetic Engineering**, v.12, p.87–98, 1990.
- HOPKINS, D. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, v.75, p.713-717, 1985.

- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOWHAN, P.; PORNBANLUALAP, S. Cloning and effective induction of *Escherichia coli* nucleoside diphosphate kinase by lactose. **ScienceAsia**, v.29, p.347-353, 2003.
- IEA. **Levantamento Subjetiva Estado de São Paulo**. <[http:// www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br)> (10 jan. 2005)
- JAHN, H.; BAHRO, R.; BURGER, A.; AHLEMEYER, J.; EICHENLAUB, R. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. **Environmental Microbiology**, v.1, p.113–118, 1999.
- JAIN, S.; TEOTIA, S.; GUPTA, M.N. Purification of green fluorescent protein overexpressed by a mutant recombinant *E.coli*. **Protein Expression and Purification**, v.36, p.76-81, 2004.
- KANG, Y.; SAILE, E.; SCHELL, M.A.; DENNY, T.P. Quantitative immunofluorescence of regulated *eps* gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2356-2362, 1999.
- KASHER, M.S.; WAKULCHIK, M.; COOK, J.A.; SMITH, M.C. One-step purification of recombinant human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product. **Biotechniques**, v.14, p.630–641, 1993.
- KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; IELMINI, M.V.; BECKER, A.; PHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1607-1617, 1998.



- KELEMU, S.; COLLMER, A. *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isoenzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1756–1761, 1993.
- KITAJIMA, E.W.; COLLETA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; NOVAES, Q.S. Escaldadura das folhas em *Hibiscus schizopetalus* associada à infecção por *Xylella fastidiosa* em Brasília, DF. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.323, 2000/Apresentado ao 32. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, 2000 – Resumo/
- KITAJIMA, E.W.; NOME, C.F. Microscopia electronica en virologia vegetal. In: DOCAMPO, D. M.; LENARDÓN, S. L. **Métodos para detectar patógenos sistémicos**. Córdoba: Instituto de Fitopatologia y Fisiologia Vegetal, 1999. 178p.
- KOEHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p 495–497, 1975.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.411-456, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.S.; CAMARGO, L.E.A.; GOLDMAN, G.H. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.459-462, 2000.
- LARANJEIRA, F.F. Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros. Piracicaba, 1997. 144p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.



- LOPES, S.A.; MARCUSSI, S.; TORRES, S.C.Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S.C.; FERNANDES, N.G.; LOPES, J.R.S. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v.87, p.544-549, 2003.
- LOPES, S.A.; RIBEIRO, D.M.; ROBERTO, P.G.; FRANÇA, S.C. *Nicotiana tabacum* as experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, v.84, p.827-830, 2000.
- LORITO, M.; WOO, S.L.; FERNANDEZ, I.G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G.E.; PINTOR-TORO, J.A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C.B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; FELICE SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of National of Academy of The Science**, v.95, p.7860-7865, 1998.
- LÜBECK, P.S.; PAULIN, L.; DEGEFU, Y.; LÜBECK, M.; ALEKHINA, I.; BULLAT, S.A.; COLLINGE, D.B. PCR cloning, DNA sequencing and phylogenetic analysis of a xylanase gene from the phytopathogenic fungus *Ascochyta pisi* Lib. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, p.377-389, 1997.
- MACHADO, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A., KURAMAE, E.E. O projeto genoma da *Xylella fastidiosa*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.63-77, 2001.
- MALAVOLTA, E.; MALAVOLTA, M.L.; CABRAL, CP.; PRATES, H.S.; VITTI, G.C. Nova anomalia dos citros: estudos preliminares. **Laranja**, v.11, p.15-38, 1990.
- McELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effect of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, p.1160-1164, 2001.

- MELETZUS, D.; EICHENLAUB, R. Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.184–190, 1991.
- METZLER, M.C., LAINE, M.J., DE BOER, S.H. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 1–8, 1997.
- MIAO, F.; KOMPALA, D.S. Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter. Batch cultures and kinetic modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.787–96, 1992.
- MIROUX, B.; WALKER, J.E. Over-production of protein in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of Molecular Biology**, v.260, p.289-298, 1996.
- MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVELILLARD, S.; AYERS, A.J.; GARNIER, M.; BOVE, J.M. *Cantharanthus roseus*, an experimental host plant for citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, p.246-251, 2001.
- MONTEIRO, P.B.; TEIXEIRA, D.C.; PALMA, R. R.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with *oriC* plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2263-2269, 2001.
- MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v.447, p.283-286, 1999.

- MULLER-HILL, B.; RICKENBERG, H.V.; WALLENFELS, K. Specificity of the induction of the enzymes of the *lac* operon in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v.10, p.303-318, 1964.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7319-7327, 2003.
- NILSSON, J.; STÄHL, S.; LUNDEBERG, J.; UHLÉN, M.; NYGREN, P.-A. Affinity fusion strategies for detection, purification and immobilization of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v.11, p.1-16, 1997.
- NOVAGEN. **pET 28a-c(+) vectors**. Darmstadt: EMD Biosciences, 1998. 2p. (Technical Bulletin, 74)
- PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina, SP. **Laranja**, v.13, p.489-502, 1992.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. **Hospedeiro: mecanismos de resistência**. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Eds.). Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995, v.1, cap.22, p.417-454.
- PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold-shock response and cold-shock proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.175-180, 1999.

- PHAN, T.C.A.; NOWAK, K.J.; AKKARI, P.A.; ZHENG, M.H.; XU, J. Expression of caltrin in the baculovirus system and its purification in high yield and purity by cobalt (II) affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v.29, p.284–290, 2003.
- PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSOM, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v.258, p.598-599, 1975.
- RAMOS, C.R.R.; ABREU, P.A.E.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1103-1109, 2004.
- RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, p.938-943, 1992.
- REVERCHON, S.; VAN GIJSEGEM, F.; ROUVE, M.; KOTOUJANSKY, A.; ROBERT-BAUDOY, J. Organization of a pectate lyase gene family in *Erwinia chrysanthemi*. **Gene**, v.49, p.215–224, 1986.
- RIBEIRO, R.V. Influência da temperatura na fotossíntese de laranja 'Pêra' com clorose variegada dos citros. Piracicaba, 2002. 58p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ROGERS, L.M.; KIM, Y.K.; GUO, W.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; LI, D.; KOLATTUKUDY, P.E. Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proceedings of National Academy of Science**, v.97, p.9813–9818, 2000.

- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros: revisão. **Laranja**, v.11, p.1-14, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITISCH, E.F.; MANIATIS, J. **Molecular cloning**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659p.
- SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.; CHANG, C.J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.290-300, 2004.
- SCHMIDT, M.; MCCONNELL, T.J; HOFFMAN, D. R. Immunologic characterization of the recombinant fire ant venom allergen Sol i 3. **Allergy**, v.58, p.342, 2003.
- SELZER, P.M.; PINGEL, S.; HSIEH, I.; UGELE, B.; CHAN, V.J.; ENGEL, J.C.; BOGYO, M.; RUSSELL, D.G.; SAKANARI, J.A.; MCKERROW, J.H. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target. **Proceedings of National of Academy of Science**, v.96, p.11015–11022, 1999.
- SENIOR, D.J.; MAYERS, P.R.; SADDLER, J.N. Production and purification of xylanases. In: LEWIS, N.G.; PAICE, M.G. **Plant cell wall polymers biogenesis and biodegradation**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 644-653. (ACS symposium Series, 399)
- SIGMA ALDRICH. **Produtos e Reagentes** <<http://www.sigma-aldrich.com.br>> (15 dez. 2004).
- SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, p.165-171, 2001.

- SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-157, 2000.
- SPECTOR, D.L.; GOLDMAN, R.D.; LEINWAND, L.A. **Cells: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998. 2136p.
- STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v.185, p.60-89, 1990.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.17, p.39-67, 1997.
- TARDY, F.; NASSER, W.; ROBERT-BAUDOY, J.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.2503-2511, 1997.
- TOMME, P.; WARREN, R.A.J.; MILLER, R.C.; KILBURN, D.G.; GILKES, N.R. Cellulose-binding domains: classification and properties. **ACS Symposium Series**, v.618, p.143-163, 1995.
- TSENG, T.C.; MOUNT, M.S. Toxicity of endopolygalacturonate trans-eliminase, phosphatidase and protease to potato and cucumber tissue. **Phytopathology**, v.64, p.229-236, 1974.



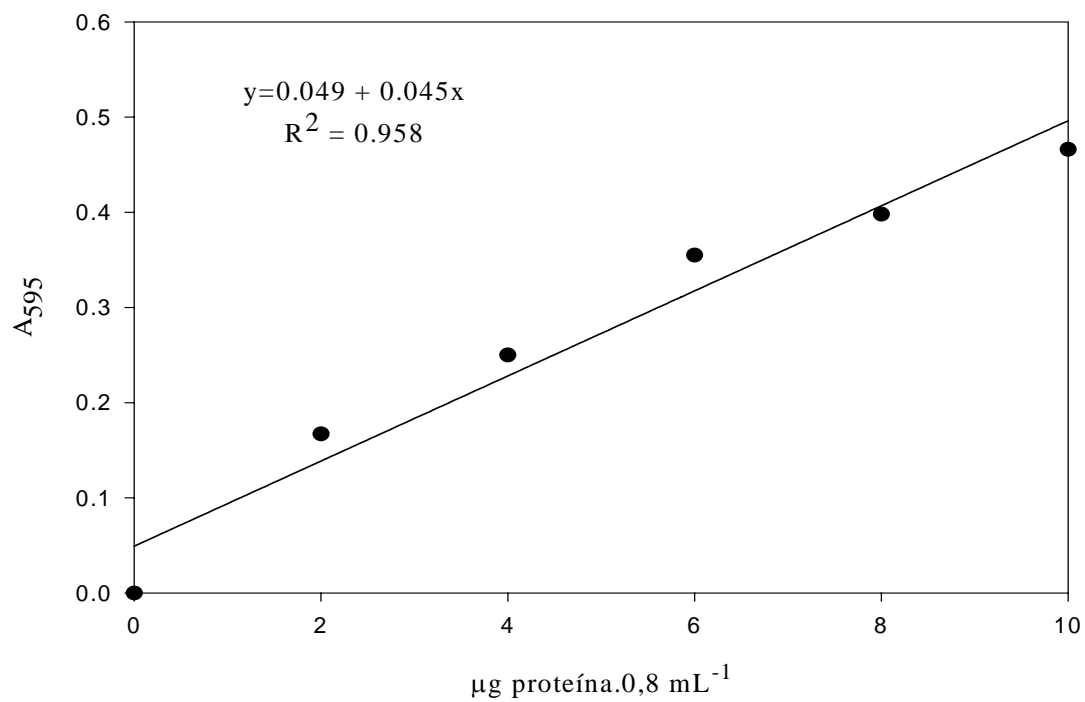
- VARET, A.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; SCHEEL, D.; LEE, J. The Arabidopsis NHL3 gene encodes a plasma membrane protein and its overexpression correlates with increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Plant Physiology**, v.132, p.2023-2033, 2003.
- VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanase in bleaching: from an idea to industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p.335-350, 1994.
- VINCENT, P. ; DIERYCK, W.; MANETA-PEYRET, L.; MOREAU, P.; CASSAGNE, C.; SANTARELLI, X. Chromatographic purification of an insoluble histidine tag recombinant Ykt6p SNARE from *Arabidopsis thaliana* over-expressed in *E. coli*. **Journal of Chromatography B**, v.808, p.83-89, 2004.
- VORDERWULBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANN, H. Comparison of lipases by different assays. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, p.631-639, 1992.
- WALLIS, F.M. Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. **Physiological Plant Pathology**, v.11, p.333-342, 1977.
- WALTON, J.D.; CERVONE, F. Endopolygalacturonase from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.351-359, 1990.
- WATTAD, C.; KOBILER, D.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Pectase lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.197-212, 1997.

- WELLS, J. M.; RAJU B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa*, new-genus, new-species gram negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.
- WICHMAN, R.L.; HOPKINS, D.L. Pathogenic groups of *Xylella fastidiosa* strains with whole-cell. **Plant Disease**, v.86, p.875-879, 1999.
- WIECZOREK, A.; SANFACON, H. Characterization and subcellular localization of tomato ringspot nepovirus putative movement protein. **Virology**, v.194, p.734-42, 1993.
- WILLIS, J.M.; ENGWALL, J.K.; LEACH, J.E.; CHATTERJEE, A.K. Extracellular protease of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: characterization and involvement in soft-rot pathogenesis. **Phytopathology**, v.77, p.1736, 1987.
- WIZEMANN, H.; VON BRUNN, A. Purification of *E. coli*-expressed HIS-tagged hepatitis B core antigen by Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography. **Journal of Virological Methods**, v.77, p.189-197, 1999.
- WULFF, N.A. Caracterização enzimática das celulasas XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressas em *Escherichia coli*. Piracicaba, 2002. 196p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- WULFF, N.A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S.F. Cloning and expression of cellulase XF-818 of *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Scientia Agricola**, v.60, p.715-721, 2003.
- Xylella fastidiosa* GENOME PROJECT. **XF0818** <<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>> (23 dez. 2003).

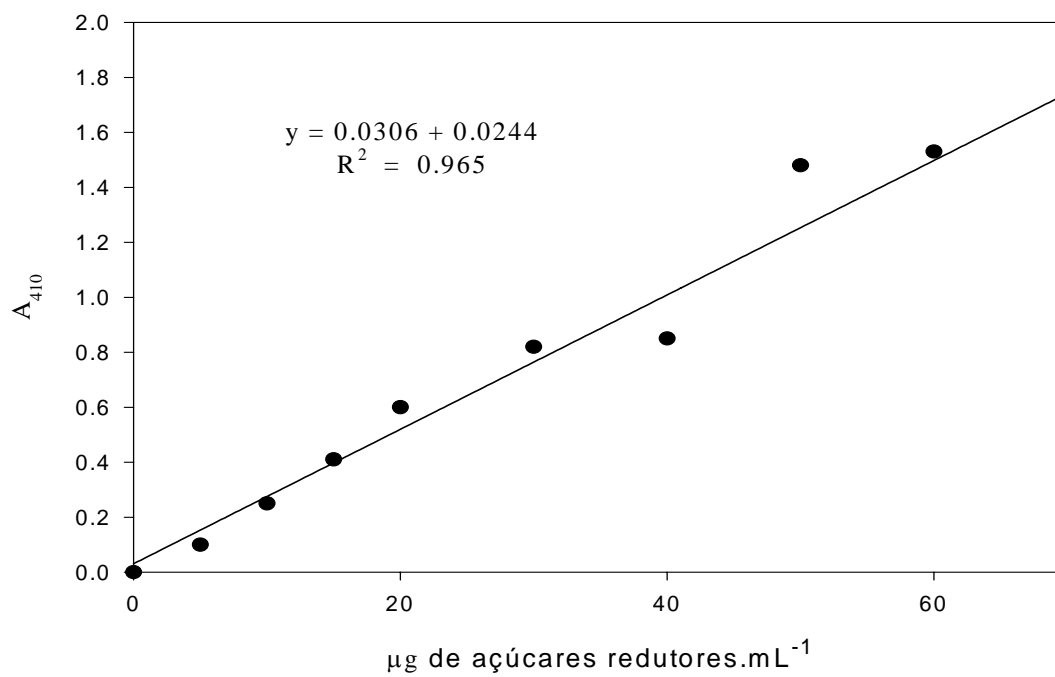
YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; DALLA PRIA JR., W. Inseticidas sistêmicos aplicados via tronco para controle de *Oncometopia facialis*, *Phyllocnistis citrella* e *Toxoptera citricida* em citros. **Scientia Agricola**, v.57, p. 415-420, 2000.

YAN, J.; ZHAO, S.F.; MAO, Y.F.; LUO, Y.H. Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, p.1755-1758, 2004.

## **APÊNDICES**



APÊNDICE 1 - Curva padrão para dosagem de proteínas conforme Bradford (1976), utilizando reagente concentrado (Sigma Chemical Co.)



APÊNDICE 2 – Curva padrão para dosagem de açúcares redutores conforme Lever (1972), utilizando a hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico

# 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](#)