

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

**ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE *Xanthomonas*  
*axonopodis* pv. *citri* IMPLICADOS NA PATOGÊNESE**

**Marcelo Luiz de Laia  
Engenheiro Florestal**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE *Xanthomonas  
axonopodis* pv. *citri* IMPLICADOS NA PATOGÊNESE**

**Marcelo Luiz de Laia**

**Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro**

**Co-orientador: Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

Laia, Marcelo Luiz de  
L185a Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri  
implicados na patogênese / Marcelo Luiz de Laia. – Jaboticabal, 2007  
xiii, 322 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientador: Jesus Aparecido Ferro.

Banca examinadora: Acelino Couto Alfenas, Shaker Chuck Farah,  
Eliana Gertrudes Macedo Lemos, Maria Helena de Souza Goldman

Bibliografia

1 - Genoma funcional. 2 - Xanthomonas. 3 - Citros. I. Título.  
II. Jaboticabal–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.3:631.523

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

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE *Xanthomonas axonopodis*  
pv. citri IMPLICADOS NA PATOGÊNESE**

**AUTOR: MARCELO LUIZ DE LAIA**

**ORIENTADOR: Dr. JESUS APARECIDO FERRO**

**Co-Orientador: Dr JULIO CEZAR FRANCO DE OLIVEIRA**

Aprovada como parte das exigências para a obtenção do Título de DOUTOR em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Prof. Dr. ACELINO COUTO ALFENAS

Prof. Dr. SHAKER CHUCK FARAH

Profa. Dra. MARIA HELENA DE SOUZA GOLDMAN

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES MACEDO LEMOS

Data da realização: 26 de fevereiro de 2007.

Presidente da Comissão Examinadora

**Dr. JESUS APARECIDO FERRO**

## ***Dados Curriculares do Autor***

**MARCELO LUIZ DE LAIA** – nascido aos dezoito dias do mês de outubro de 1969, em Toledo, PR, é Técnico Agropecuário pela ETAESG Prof. Edson Galvão, Itapetininga, SP, Engenheiro Florestal formado pela Universidade Federal de Viçosa, MG, em março de 1999 e mestre em Agronomia (Fitopatologia), também pela Universidade Federal de Viçosa, MG, em 18 de outubro de 2001.

*“Muito cedo descobri  
como o mundo é absurdo,  
violento, injusto.  
Eu acreditava que está  
à altura do homem  
reconstruir o mundo”*

***Celso Furtado***

*Aos meus filhos Inael e Marcella,  
à minha querida esposa Janaína,  
aos meus pais Geraldo e Maria,  
aos meus irmãos, Irene, Celso,  
Iliene, Marcos, Carlos e Ilzelena,*

**Dedico**

*Aos inconformados que buscam um mundo  
onde as diferenças sejam vibrantes  
emanações da igualdade. Aos pós-graduandos  
que sabem que o mundo é muito maior que  
suas teses, que fazem de sua Pós-graduação  
um tempo de luta por um mundo verdadeiramente  
democrático. Contudo, apenas aos que  
fazem do seu dia-a-dia uma reafirmação de  
suas idéias, aos que não negam, com a prática  
diária, os seus ideais,*

**Ofereço**



# *Agradecimentos*

Meus sinceros agradecimentos:

À Energia que mantém o mundo girando, ordenadamente, de modo que o Sol possa, além de alegrar-nos quando do seu nascimento e da sua morte diária, fornecer, na dose exata, os requisitos mínimos para organismos microscópicos produzirem seus próprios alimentos e, indiretamente, garantir os meus também.

À minha esposa que teve paciência para ouvir-me nos momentos mais difíceis e sabedoria para me confortar nos momentos de angústias, sempre dispondo do seu apoio incondicional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo financiamento deste trabalho, concedendo-me uma Bolsa de Doutorado (Processo 02/13862-6).

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” por permitir e por me dar condições de desenvolver esse estudo nas instalações de seu Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular, LBM, situado no Campus de Jaboticabal.

Ao Professor Jesus Aparecido Ferro que, além de me orientar cientificamente, deu-me a oportunidade de captar ensinamentos que serão úteis por toda a minha vida extra-laboratório.

À Professora Maria Inês Tiraboschi Ferro que, com sua sabedoria, aconselhou-me a tomar as decisões mais sensatas nos momentos de angústia e indecisão.

Ao colega e amigo Leandro Márcio Moreira pela imensurável ajuda na confecção do micro-arranjo de DNA, pelas sugestões, pelas valiosas “dicas” e pela disposição para algumas breves discussões (não mais que 2 h), mesmo que ao longo da madrugada, sempre que precisei.

Ao Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira pela amizade, ensinamentos, auxílios nos momentos difíceis e pelas sugestões durante a execução desta pesquisa.

Aos Professores membros da banca examinadora, Dr. Shaker Chuck Farah, Dr<sup>a</sup> Maria Helena de Souza Goldman, Dr<sup>a</sup> Eliana Gertrudes Macedo Lemos e Dr. Acelino Couto Alfenas pelas excelentes sugestões e críticas na direção de contribuir para a melhoria deste trabalho.

---

À Professora Aline Maria da Silva, do Instituto de Química da USP, pela colaboração na confecção do microarranjo de DNA.

À Professora Eliana Gertrudes Macedo Lemos por sempre ter um tempinho para sanar uma dúvida e por ter disponibilizado os equipamentos do seu laboratório, especificamente o “scanner” de microarranjos de DNA, sem o qual a minha tarefa teria sido muito mais árdua.

Aos colegas Rafael Homem, Lilian, Joice, Camila, Juliana Dezajacomo e Cristiano que em diversas situações colocaram a mão na massa junto comigo.

A todos os desenvolvedores, pesquisadores e usuários do projeto Bioconductor, um projeto de programas para computador de código e desenvolvimento abertos destinado à análises de dados genômicos, pelos esclarecimentos das mais diversas dúvidas que lá postei.

Ao grupo de usuários  $\text{L}^{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ ( $\text{T}_{\text{E}}\text{X}$ -br.org), onde aprendi uma nova e brilhante maneira de produzir textos de excelentes qualidade e formatação com programas de código aberto, na sua grande maioria gratuitos.

Aos membros do grupo  $\text{abnT}_{\text{E}}\text{X}$ , um pacote de classes  $\text{L}^{\text{A}}\text{T}_{\text{E}}\text{X}$  para a criação e formatação de documentos conforme as normas da ABNT.

Aos colegas que passaram pelo LBM e aos que continuam lá, Dani, Poliana, André, Flavia, Renata, Julinho, Cedral, Gisele, Gustavo, Ágda, Karina, Fabrício, Neli, Malu, Vanessa Morgan, Roseli, Juliana Vantini, Flavinha, Nidiane, Tiago e Elaine, e outros aqui não citados.

Aos meus primeiros mestres, Professora Elza Fernandes de Araújo e Professor Acelino Couto Alfenas, pois, não fossem eles eu não teria chegado até aqui .

À Lili, que com muita paciência mostrou-me como lavar as vidrarias utilizadas no laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos Filamentosos da UFV, em Viçosa, MG, ensinando-me, dessa maneira, os primeiros passos rumo aos estudos científicos.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente, intencional ou não, ajudaram-me a dar mais um passo na vida.

# *Sumário*

<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	p. v
<b>Lista de Figuras</b>	p. vii
<b>Lista de Tabelas</b>	p. x
<b>Resumo</b>	p. xii
<b>Abstract</b>	p. xiii
<b>1 Introdução Geral</b>	p. 1
1.1 Caracterização do problema . . . . .	p. 1
1.2 Cancro cítrico: O agente etiológico . . . . .	p. 3
1.3 Aspectos moleculares das interações planta-patógeno . . . . .	p. 4
<b>Identificação de genes potencialmente envolvidos na virulência de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri em citros</b>	<b>6</b>
<b>2 Introdução</b>	p. 7
<b>3 Objetivos</b>	p. 13
<b>4 Material e Métodos</b>	p. 14
4.1 Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo . . . . .	p. 14

---

4.2	Mutagênese <i>in vivo</i> . . . . .	p. 14
4.3	Teste de patogenicidade <i>in vivo</i> . . . . .	p. 15
4.4	Extração de DNA total de Xac . . . . .	p. 15
4.5	Identificação do gene mutado . . . . .	p. 16
4.5.1	Obtenção e clonagem dos fragmentos de DNA contendo a região mutada	p. 16
4.5.2	Transformação de <i>Escherichia coli</i> com o plasmídeo recombinante . . . .	p. 17
4.5.3	Extração de DNA plasmidial . . . . .	p. 18
4.5.4	Seqüenciamento do gene mutado . . . . .	p. 19
4.6	Validação da biblioteca de mutantes por Southern blotting . . . . .	p. 20
4.7	Determinação da curva de crescimento <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> . . . . .	p. 21
4.8	Complementação de mutantes com patogenicidade alterada . . . . .	p. 22
4.8.1	Amplificação e clonagem das ORFs em <i>Escherichia coli</i> . . . . .	p. 23
4.8.2	Clonagem das ORFs e transferência para mutantes de Xac . . . . .	p. 25
4.9	Análise da expressão gênica por meio de <i>Northern blot</i> reverso . . . . .	p. 28
4.9.1	Extração de RNA total de Xac . . . . .	p. 28
4.9.2	Tratamento de RNA total com DNase I . . . . .	p. 29
4.9.3	Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) . . . . .	p. 30
4.9.4	Preparo das sondas, marcação, hibridização e detecção dos sinais . . . .	p. 30
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	p. 34
5.1	Análise de mutantes e teste de patogenicidade <i>in vivo</i> . . . . .	p. 34
5.2	Determinação da curva de crescimento <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> . . . . .	p. 37
5.3	Complementação de mutantes com patogenicidade alterada . . . . .	p. 39
5.4	Análise da expressão gênica por meio de <i>Northern blot</i> reverso . . . . .	p. 42
<b>6</b>	<b>Discussão</b>	p. 52

---

<b>Conclusões</b>	p. 63
<b>Análise temporal global do transcrito de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri in planta e em meio indutor XAM1</b>	<b>64</b>
<b>7 Introdução</b>	p. 65
<b>8 Objetivos</b>	p. 71
<b>9 Material e Métodos</b>	p. 72
9.1 Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo . . . . .	p. 72
9.2 Inoculação e extração das células bacterianas de folhas de laranja . . . . .	p. 73
9.3 Confeção do microarranjo de DNA . . . . .	p. 74
9.3.1 Seleção dos clones . . . . .	p. 74
9.3.2 Micro-Preparação de DNA plasmidial para uso no seqüenciamento e em reações de PCR (Boiling-prep) . . . . .	p. 75
9.3.3 Amplificação por PCR das preparações de DNA plasmidial . . . . .	p. 76
9.3.4 Purificação dos produtos de PCR . . . . .	p. 76
9.3.5 Imobilização das seqüências nas lâminas de vidro . . . . .	p. 77
9.3.6 Pós-processamento dos microarranjos de DNA . . . . .	p. 78
9.3.7 Validação dos microarranjos de DNA . . . . .	p. 78
9.4 Extração de RNA total de Xac . . . . .	p. 79
9.5 Preparo dos alvos e hibridização . . . . .	p. 80
9.5.1 Produção e marcação do cDNA e hibridização das amostras . . . . .	p. 80
9.5.2 Hibridização das amostras . . . . .	p. 80
9.6 Análise estatística dos dados . . . . .	p. 82

---

<b>10 Resultados</b>	p. 84
10.1 Extração de RNA total de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri . . . . .	p. 84
10.2 Construção do microarranjo de DNA . . . . .	p. 87
10.2.1 Validação do microarranjo de DNA . . . . .	p. 90
10.3 Análise da expressão gênica de Xac em diferentes condições de cultivo . . . . .	p. 91
10.3.1 Análise da expressão gênica de Xac em meio de cultura XAM1 . . . . .	p. 93
10.3.2 Análise da expressão gênica de Xac cultivada em folhas de laranjeira por 24 horas . . . . .	p. 117
10.3.3 Análise da expressão gênica de Xac cultivada em folhas de laranjeira por 72 h . . . . .	p. 130
10.3.4 Análise da expressão gênica de Xac cultivada em folhas de laranjeira por 120 h . . . . .	p. 143
10.3.5 Análise comparativa da expressão gênica de Xac cultivada em meio de cultura XAM1 por 12 e por 24 h . . . . .	p. 155
10.3.6 Análise comparativa da expressão gênica de Xac cultivada em folhas de laranjeira por 24, 72 e 120 h . . . . .	p. 158
10.4 Análise temporal da expressão gênica de Xac <i>in planta</i> . . . . .	p. 263
10.4.1 Agrupamento de ORFs com padrão de expressão similar . . . . .	p. 263
10.4.2 Expressão gênica diferencial por gene, individualizado . . . . .	p. 270
<b>11 Discussão</b>	p. 274
<b>Conclusões</b>	p. 295
<b>Referências Bibliográficas</b>	p. 297
<b>Anexo A – Categorias gênicas definidas para <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri</b>	p. 318

## *Lista de abreviaturas e siglas*

<i>R</i>	Gene de Resistência,	p. 5
<i>avr</i>	Gene de Avirulência,	p. 5
<i>hpa</i>	<i>hrp</i> associado,	p. 10
<i>hrc</i>	<i>hrp</i> conservado,	p. 10
<i>hrp</i>	“Hipersensitivity response and pathogenicity,	p. 8
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas,	p. 7
AIA	Ácido Indolacético,	p. 304
BCCC	“Brazilian Clone Collection Center”, <a href="http://www.bcccenter.fcav.unesp.br">www.bcccenter.fcav.unesp.br</a> ,	p. 82
BSA	Albumina de Soro Bovino, do inglês “Bovine Serum Albumin”,	p. 18
CSDaV	“Citrus Sudden Death associated Virus”,	p. 1
CVC	Clorose Variegada dos Citros,	p. 1
DEPC	Dietil Pirocarbonato,	p. 32
DMSO	Dimethyl sulfoxide,	p. 85
DO	Densidade Óptica,	p. 22
DSF	Fator de Sinalização Difusível,	p. 74
Eca	<i>Erwinia carotovora</i> ssp. atroseptica,	p. 10
Ecc	<i>Erwinia carotovora</i> ssp. carotovora,	p. 10
FDR	Taxa de descobertas falsas, do inglês “False Discovery Rate”,	p. 90
fmol	ficomol,	p. 85
g	grama(s),	p. 79
h	hora(s),	p. 9
HR	Resposta Hipersensível,	p. 5
IQ–USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo,	p. 81
kb	kilobases,	p. 11
LBM	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular,	p. 16

M	Molar,	p. 80
m/v	Massa, em gramas, em relação ao volume, em mililitros,	p. 80
MCP	“Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins”,	p. 300
min	minuto(s),	p. 19
MSC	Morte Súbita dos Citros,	p. 1
OHHL	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone,	p. 10
ORF	Fase ou Quadro Aberto de Leitura,	p. 8
pb	pares de bases,	p. 23
PCR	Amplificação por polimerase em cadeia, do inglês, “Polymerase Chain Reaction”,	p. 83
pmoles	picomoles,	p. 88
Proteína PR	Proteína Relacionada à Patogênese,	p. 4
Psp	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola,	p. 9
Pss	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae,	p. 9
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato,	p. 9
PTS	“Phosphotransferase System”,	p. 301
rpm	Rotações por minutos,	p. 84
s	Segundo(s),	p. 88
SMIT	<i>Size Marker Identification Technology</i> ,	p. 13
SST4	Sistema de Secreção do Tipo IV,	p. 303
SSTD	Sistema de Secreção do Tipo Dois,	p. 75
SSTT	Sistema de Secreção do Tipo Três,	p. 8
Tat	<i>twin-arginine translocation</i> ,	p. 11
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro,	p. 16
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,	p. 16
URA	Umidade Relativa do Ar,	p. 85
UV	Luz ultra-violeta,	p. 85
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri isolado 306,	p. 1
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. campestris,	p. 3
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria,	p. 9



## *Lista de Figuras*

1.1	Maiores produtores mundiais de laranja no ano de 2004 (em mil toneladas). Fonte: (1, 2, 3) . . . . .	p. 2
1.2	Sintomas ocasionados por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri em folhas, ramos e frutos de citrus . . . . .	p. 4
4.1	Infiltração de suspensão celular de Xac em folhas de laranjeiras Pêra. . . . .	p. 22
4.2	Vetor de clonagem pHM1 . . . . .	p. 26
5.1	“Southern blot” de 96 mutantes de Xac . . . . .	p. 36
5.2	Diferentes sintomas apresentados por diferentes mutantes de Xac . . . . .	p. 37
5.3	Curva de crescimento <i>in vitro</i> . . . . .	p. 38
5.4	Curva de crescimento <i>in planta</i> . . . . .	p. 39
5.5	Perfil de amplificação de 27 ORFs de Xac . . . . .	p. 40
5.6	Preparação plasmidial do vetor pHM1 recombinante . . . . .	p. 41
5.7	Perfil de amplificação por PCR de quatro ORFs de Xac . . . . .	p. 41
5.8	Sintomatologia apresentada por mutantes de Xac complementados . . . . .	p. 42
5.9	“Northern blot” reverso de 15 genes de Xac . . . . .	p. 43
6.1	ORFs XAC3263 e XAC3285: sintomatologia apresentada e localização no genoma de Xac . . . . .	p. 61
6.2	ORF XAC1927: sintomatologia apresentada e localização no genoma de Xac . . . . .	p. 61
10.1	Perfil eletroforético de RNA total extraído com Trizol a partir de células cultivadas em meio sólido e líquido . . . . .	p. 85

10.2 Perfil eletroforético de 1 $\mu$ g de RNA total, extraído com Trizol, de células de Xac multiplicadas em meio de cultura NA (MS) e de células de Xac extraídas de folhas de laranjeira 1 (1d), 2 (2d) e 3 (3d) dias após a inoculação. A posição dos RNAs ribossomais 23S e 16S é indicada. . . . .	p. 85
10.3 Perfil eletroforético de 5 $\mu$ L de RNA total de Xac, extraído com Trizol, imediatamente após ter sido purificado para eliminar o DNA contaminante, conforme seção 4.9.2. . . . .	p. 86
10.4 RNA total de Xac extraído com o conjunto de reagentes <i>RNAspin</i> e com o reagente Trizol . . . . .	p. 87
10.5 Esquema ilustrando os quatro tipos de insertos encontrados nas bibliotecas “shotgun” de Xac . . . . .	p. 89
10.6 DNA plasmidial contendo inserto de Xac a ser imobilizado em lâminas de vidro .	p. 90
10.7 DNA de Xac amplificado a partir de DNA plasmidial . . . . .	p. 91
10.8 DNA de Xac após purificação do produto da PCR . . . . .	p. 92
10.9 Imagem de uma lâmina de microarranjos de DNA de Xac hibridizado com DNA	p. 164
10.10 Imagem de uma lâmina de microarranjos de DNA de Xac hibridizado com cDNA	p. 165
10.11 Quantidade de genes diferencialmente expressos em XAM1 após 12 h de incubação	p. 166
10.12 Quantidade de genes diferencialmente expressos em XAM1 após 24 horas de incubação . . . . .	p. 166
10.13 Quantidade de genes diferencialmente expressos em Xac 24 h após a inoculação .	p. 167
10.14 Quantidade de genes diferencialmente expressos em Xac 72 h após inoculação . .	p. 167
10.15 Quantidade de genes diferencialmente expressos em Xac 120 h após a inoculação	p. 168
10.16 Densidade de genes diferencialmente expressos por categoria gênica . . . . .	p. 169
10.17 Grupos de ORFs de Xac com perfil de expressão gênica similar . . . . .	p. 263
10.18 Expressão gênica de Xac, ao longo do tempo, para cada uma das ORFs . . . . .	p. 271
10.19 Expressão gênica de Xac, ao longo do tempo, para cada uma das ORFs . . . . .	p. 272
10.20 Expressão gênica de Xac, ao longo do tempo, para cada uma das ORFs . . . . .	p. 273

- 
- 11.1 Padrão eletroforético de 5  $\mu$ L de uma suspensão contendo RNA de Xac . . . . . p.277
- 11.2 Diagrama de Venn mostrando a quantidade de genes diferencialmente expressos em Xac . . . . . p.278
- 11.3 Esquema ilustrando os cluster gênicos que Xac relacionados a flagelos e quimiotaxiap. 292
- 11.4 Diagrama indicando a disposição dos genes *virB* no genoma de Xac . . . . . p.293
- 11.5 Esquema ilustrando a via de regulação dos fatores de patogenicidade (genes *rpf*) de Xac . . . . . p.293
- 11.6 Proteínas constituintes do sistema de secreção do tipo três em Xac . . . . . p.294

## *Lista de Tabelas*

4.1	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação das respectivas ORFs de Xac, por meio de PCR, a serem utilizadas nos estudos de complementação de mutantes. . . . .	p. 24
4.2	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das ORFs de Xac utilizados para análise da expressão gênica pela técnica de “Northern blot” reverso .	p. 32
5.1	Mutantes de Xac e respectiva ORF mutada . . . . .	p. 44
10.1	ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac após 12 h de incubação em XAM1 . . . . .	p. 93
10.2	ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac após 24 h de incubação em XAM1 . . . . .	p. 106
10.3	ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac 24 h após inoculação <i>in planta</i> . . . . .	p. 118
10.4	ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac 72 h após a inoculação .	p. 131
10.5	ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac 120 h após a inoculação . . . . .	p. 143
10.6	ORFs cuja expressão diferencial foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac quando esta foi multiplicada em meio de cultura XAM1 . . . . .	p. 155
10.7	Quantidade de ORFs de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> que se mantém induzidas ou reprimidas durante todo o processo de infecção (de 1 a 120 h de infecção). Categoria: ver Anexo A . . . . .	p. 158
10.8	ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac infectando folhas de laranja . . . . .	p. 160
10.9	ORFs induzidas (i) e reprimidas (r) em Xac considerando os cinco experimentos .	p. 170

---

10.10 Grupo de ORFs de Xac com perfil de expressão gênica semelhantes . . . . . p.264

## *Resumo*

### **ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE *Xanthomonas axonopodis* pv. citri IMPLICADOS NA PATOGÊNESE**

**RESUMO**—*Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac) constitui um dos principais patógenos da citricultura mundial. Essa fitobactéria causa cancro em folhas, ramos e frutos de citros em geral, ocasionando grandes perdas econômicas anuais. A fim de estudar a interação dessa bactéria com seu hospedeiro empregou-se a análise de mutantes e da expressão gênica global por meio de microarranjos de DNA (transcriptoma). Na primeira parte do estudo foi obtida uma biblioteca de cerca de 10.000 mutantes do isolado 306 de Xac. Desses, 3.300 foram inoculados em folhas de limoeiro cravo e sua capacidade em causar cancro cítrico foi avaliada aos três dias da inoculação. Após quatro inoculações, 56 mutantes foram selecionados por apresentarem virulência alterada e suas ORFs interrompidas foram identificadas por meio de sequenciamento. Uma análise dessas ORFs mostrou que havia tanto ORFs que codificavam para genes relacionados com a patogenicidade em fitobactérias como possibilitou identificar novos genes associados à infecção, além de ORFs hipotéticas, para as quais ainda não foi atribuída nenhuma função. Dentre os genes previamente implicados na patogênese, pode-se citar o gene *hrpB4*, o qual participa do sistema de secreção do tipo três. Já o gene *hrtA*, que contribui na virulência de algumas bactérias patogênicas de animais, até o presente ainda não tinha sido relatado como tendo importância no processo de patogênese em fitobactérias. A ORF XAC0340 é um exemplo de uma proteína hipotética que interfere significativamente no processo infeccioso, uma vez que o mutante para esse locus não induziu sintomas da doença, assim como os demais mutantes citados acima. Na segunda parte deste trabalho, produziu-se um microarranjo de DNA contendo 6.912 sondas imobilizadas (2.673 ORFs, 87 ORFs repetidas, 312 controles negativos e 384 controles positivos, totalizando 3.456 pontos em duplicatas) e analisou-se a expressão gênica global de Xac cultivada por 12 h em meio de cultura indutor XAM1 e inoculada em folhas de laranjeira, por 12, 72 e 120 h. Os dados obtidos confirmam alguns grupos de genes envolvidos na patogênese, tal como os genes do sistema de secreção do tipo três, bem como apresenta novidades, como os genes *virB*, constituintes do sistema de secreção do tipo IV, que se encontram reprimidos em Xac quando cultivada em folhas de laranjeira.

**Palavras-Chave:** *Xanthomonas*, citros, genoma funcional

# *Abstract*

## **FUNCTIONAL GENOMIC ANALYSIS OF *Xanthomonas axonopodis* pv. citri**

**SUMMARY**—*Xanthomonas axonopodis* pv. citri constitutes one of the main and most damaging pathogen of the world-wide citriculture. This phyto-bacteria causes canker in leaves, branches and fruits of citrus, causing severe economic losses. In order to study the interaction of this bacterium with its citrus host, two approaches had been used to proceed a post-genomic functional analysis: whole genome mutagenesis and global expression analysis by cDNA microarrays technique. In the first part of this study a Xac 306 mutants library with ~10,000 mutants was obtained. From these, 3,300 were inoculated in mexican lemon tree leaves and its capacity to cause citrus canker was evaluated. After four inoculation cycles, 56 mutants had been selected as having modified pathogenicity. The interrupted ORFs were identified by DNA sequencing and analysis of these ORFs identified ORFs coding for genes previously known as related to pathogenicity process in phyto-bacterium as well genes not yet described as involved in pathogenicity, including hypothetical genes. Among the genes previously known as implied in pathogens attack, the *hrpB4* gene is one that was found, which participates of the type three secretion system. To the *hrtA* gene, whose participation in the virulence process has been described to some animal pathogenic bacteria but never yet as having a role in to pathogenicity process in phyto-bacteria, was found to be involved in the pathogenicity of Xac. The ORF XAC0340 is an example of hypothetical protein which presents great interference in the infectious process: the mutant for this gene does not induce any disease symptoms in citric leaves. In the second part of the present work, an cDNA microarray was produced and the global gene expression of Xac grown in different medium was evaluated: in inductive culture medium XAM1 for 12 and 24 h, and in orange leves for 24, 72 and 120 h. The results confirmed some groups of genes knowed previously as having importance in pathogenicity, such as genes coding for the TTSS, and presented new features as well, as the genes *virB*, constituent of the type IV secretion system, which were found to be downregulated in Xac cultivated in orange leaves.

**Keywords:** *Xanthomonas*, citrus, functional genomic

# ***1 Introdução Geral***

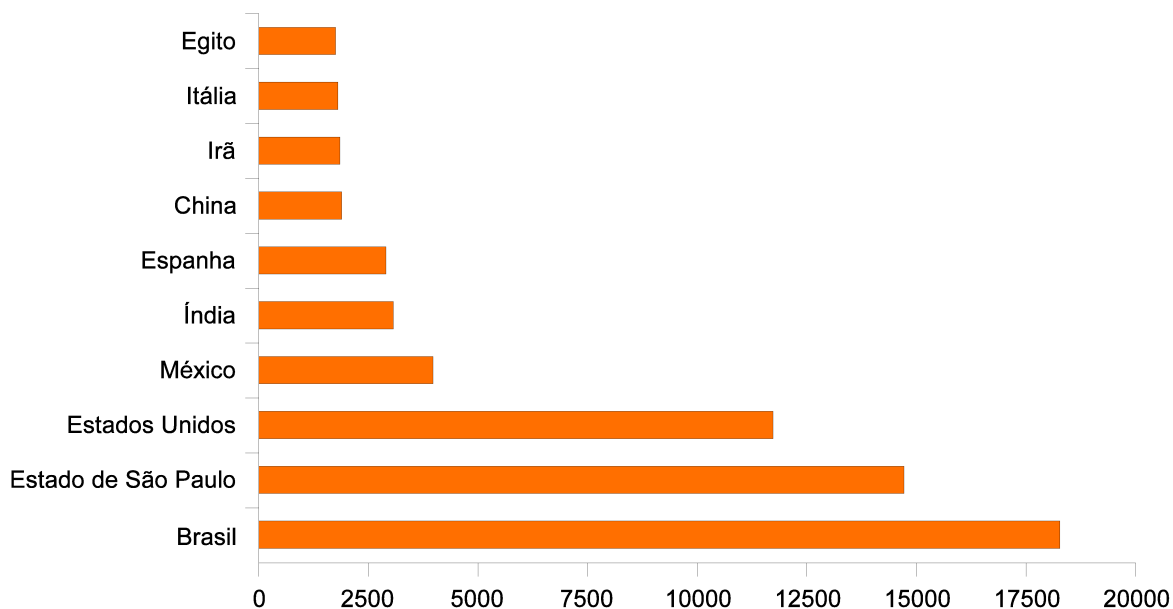
## **1.1 Caracterização do problema**

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 de laranja (1), sendo que o Estado de São Paulo produz mais que o segundo colocado, os Estados Unidos da América (Figura 1.1). A maior parte da produção brasileira destina-se à indústria do suco, que produziu cerca de 1,7 milhões de toneladas de suco concentrado em 2003, arrecadando, aproximadamente, 3,5 bilhões de reais naquele ano em divisas para o País (1). O Estado de São Paulo é responsável por 70% da produção de laranjas e de 98% da produção de suco concentrado (4). Com um movimento financeiro anual de cerca de cinco bilhões de reais, representando a segunda atividade rural em importância no Estado de São Paulo, menor apenas que a cana-de-açúcar, a citricultura gera 400 mil empregos diretos, com 3 mil frentes de trabalho simultâneas na colheita, e cerca de 3 milhões de empregos indiretos (5).

Apesar do grande potencial produtivo dos citros, que pode chegar a mais de 40 toneladas de frutos por hectare (6), esses são suscetíveis a um grande número de doenças, dentre as quais algumas com alto potencial de destruição, como a tristeza, a CVC causada pela bactéria *Xyllela fastidiosa* (7) e o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (8). Identificada em 2001, no município de Comendador Gomes, MG, uma doença denominada Morte Súbita dos Citrus (9), causada pelo vírus CSDaV (10), tem causado grandes perdas na citricultura paulista e do triângulo mineiro. Mais recentemente, uma nova doença conhecida como *Greening*, ou “huanglongbing” (HBL), causada por uma bactéria limitada ao floema, chamada provisoriamente de *Candidatus Liberibacter* spp., se apresenta como um novo e perigoso problema à citricultura brasileira (5).

O cancro cítrico, introduzido no Brasil na década de 50 por meio de mudas trazidas clandestinamente do Japão, constituiu uma ameaça à citricultura mundial. Isto se deve aos sérios danos causados, tanto na produção quanto na qualidade dos frutos, e ausência de medidas eficazes de controle (11, 12), obrigando os produtores a erradicarem as plantas infectadas, pois a bactéria se





**Figura 1.1:** Maiores produtores mundiais de laranja no ano de 2004 (em mil toneladas). Fonte: (1, 2, 3)

espalha rapidamente pelo pomar (5).

A incidência de Xac induz a abscisão precoce dos frutos e das folhas culminando com uma significativa queda na produção. Como exemplo, na safra 97/98 o mercado interno, que absorvera 110 milhões de caixas na safra anterior, pôde contar com apenas 51 milhões de caixas produzidas devido ao cancro cítrico. O processamento na indústria naquela safra caiu de 318 milhões de caixas para 279 milhões, o que significou cerca de 500 mil toneladas de suco a menos devido à incidência de Xac nos laranjais (5). Altamente contagiosa, *Xatn homonas axonopodis* pv. citri é resistente e consegue sobreviver em vários ambientes por mais de nove meses, sendo que nos frutos, folhas ou ramos contaminados sua sobrevivência é ainda maior. Além disso, trata-se de um fitopatógeno de fácil disseminação, sendo o homem o seu principal agente disseminador (5).

Analogamente à maioria das bacterioses, o cancro cítrico não possui controle curativo eficiente. A única maneira de eliminar a doença de um pomar é por meio da erradicação do material doente, processo que encarece substancialmente a produção, pois há a necessidade de eliminação de todas as plantas ao redor do foco em um raio de 30 m. Quando a porcentagem de plantas contaminadas exceder 0,5% do total, todo o talhão deverá ser eliminado, sendo proibido o cultivo de citrus no local pelos próximos dois anos. No entanto, a erradicação das árvores contaminadas não garante a eliminação da bactéria causadora do cancro (5). Além disso, Xac é praga quarentenária no Brasil

(13) e em vários países produtores e consumidores, constituindo-se numa das principais barreiras fitossanitárias ao livre comércio de frutas frescas, podendo limitar tanto o comércio internacional quanto o regional.

## 1.2 Cancro cítrico: O agente etiológico

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (14) é um procarioto em forma de bastonete, uniflagelado, gram negativo e aeróbico obrigatório, que forma colônias amarelas e mucóides em meios de cultura artificiais. Dos vários patótipos encontrados na natureza (A, B, C, D e E), a forma asiática (A), causadora da cancriose tipo A, é a mais amplamente difundida e severa, que infecta todas as variedades cítricas (15). No Brasil, a forma A também é a mais importante, sendo encontrada em praticamente todas as regiões onde já foi detectado o cancro cítrico (16).

Ao se depositar no hospedeiro, após disseminação por chuvas, restos de colheita, pessoas ou veículos transitando pela lavoura, a bactéria pode colonizar a superfície da planta de maneira epífita, sem causar doença (17). Assim que as condições ambientais lhe forem favoráveis e o hospedeiro apresentar uma porta de entrada (estômatos ou ferimentos), ela colonizará os espaços intercelulares pela ativação da expressão de genes ligados à patogenicidade.

Os sintomas característicos da doença envolvem a formação de lesões corticosas e salientes em ambos os lados da folha, que se manifestam de uma semana a dois meses após a inoculação (18), sendo a indução da formação de tecido hiperplástico (divisões mitóticas excessivas - calogênicas), que resulta em lesões do tipo cancro, a sintomatologia característica e essencial para o diagnóstico desta doença (19) (Figura 1.2).

Em 2002, da Silva (20) e colaboradores publicaram o seqüenciamento e a anotação do genoma completo das *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causadora do cancro cítrico e *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc), agente etiológico da podridão negra das crucíferas. O patovar *citri* revelou possuir 4.489 genes, dos quais 62,83% puderam ser associados a funções putativas. Dos demais genes, 29,49% são conservados entre os dois patovares e 331 (7,67%) são exclusivos de *citri*. Xac possui dois plasmídeos, que possuem um total de 115 genes, sendo que para 55 deles (47,82%) não foi proposta nenhuma função. Além disso, vários genes candidatos a estarem envolvidos no processo de patogenicidade foram constatados.



**Figura 1.2:** Sintomas ocasionados por *Xanthomonas axonopodis* pv. citri em folhas, ramos e frutos de citrus

### 1.3 Aspectos moleculares das interações planta-patógeno

A proteção contra a maioria dos fitopatógenos em vegetais é conseguida por meio de barreiras pré-formadas, tais como cutículas espessas e presença de compostos antimicrobianos (21).

Os mecanismos de defesa seguem uma rota básica de reconhecimento e transdução de sinais para ativar as respostas de defesas, tais como: geração de espécies ativas de oxigênio (22, 23), morte programada de células no sítio de infecção (HR) (24), deposição de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (25), lignificação da parede celular (26), síntese e acúmulo de fitoalexinas (27) e síntese de proteínas PR antimicrobianas (22).

Nos mamíferos, a maquinaria de defesa envolve um intrincado sistema imunológico, que é baseado em células altamente especializadas que se distribuem por um sistema circulatório. Em contraste, as células vegetais não se movem e as respostas de defesa são autônomas, de modo que cada célula possa detectar e responder ao ataque microbiano individualmente (28). Essas defesas são rápidas e coordenadas, permitindo que a planta torne-se resistente à invasão do patógeno (29).

Os mecanismos de defesa de plantas suscetíveis respondem mais lentamente e em menor in-

tensidade após a infecção. Assim, o tempo de reconhecimento a um microrganismo invadindo uma planta e a rápida resposta a esta invasão diferem as plantas resistentes das suscetíveis (30, 31).

Geralmente, o processo de resistência hospedeiro-específico culmina com a morte rápida e localizada de células vegetais infectadas e adjacentes, denominado HR. Esta resposta é responsável pela contenção do patógeno no sítio inicial de infecção (21), conferindo, dessa maneira, resistência ao patógeno em questão. Análises genéticas revelaram que este tipo de resposta é determinado por pares de genes complementares denominados de gene de resistência (*R*), presente no hospedeiro, e de gene de avirulência (*avr*), presente no patógeno. Este tipo de defesa é conhecida como modelo de resistência do tipo gene-a-gene (32).

Os genes *avr*, por definição, têm a capacidade de induzir resistência à doença no hospedeiro que possua o correspondente gene *R* (33). Esta interação, do tipo gene-a-gene, é interpretada como um modelo do tipo “chave-fechadura”, onde o produto do gene *avr* pode se ligar, direta ou indiretamente, a um receptor correspondente na planta, a proteína do gene *R* (34). A análise de mutantes demonstrou, em diversos casos, que os genes *avr* fornecem uma vantagem seletiva ao patógeno na ausência do gene *R* correspondente (35, 36, 37, 38), o que explica a sua manutenção na população do patógeno. Conseqüentemente, postula-se que os genes *avr* poderiam agir, primeiramente, como fatores de virulência e que, durante a co-evolução do patossistema, foram alvejados pelos genes *R* da planta (39). Por outro lado, mesmo sendo importantes para o organismo, é freqüente a observação de mutações nos genes *avr* ocasionando o surgimento de novas raças virulentas do patógeno e a conseqüente quebra da resistência. Logo, estudos envolvendo a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri e seu hospedeiro podem resultar em conhecimentos importantes para a citricultura brasileira no tocante ao estabelecimento de novas alternativas do controle do cancro cítrico. Esses resultados poderão permitir a escolha de melhores alternativas de controle para outros patógenos semelhantes, citrícolas ou não, o que poderá trazer significativos benefícios ao país. Neste contexto, o presente trabalho objetivou estudar a interação de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri e citros, por intermédio da análise de mutantes e análise da expressão gênica global por meio de microarranjos de DNA (transcrissoma).

*Identificação de genes potencialmente  
envolvidos na virulência de Xanthomonas  
axonopodis pv. citri em citros*

## 2 *Introdução*

A principal característica dos microrganismos patogênicos é a sua habilidade em causar danos ao tecido invadido, tendo como consequência o estabelecimento da doença em seu hospedeiro. Por décadas os cientistas utilizaram-se de uma grande variedade de métodos para estudar como os microrganismos interagem com o hospedeiro e quais os mecanismos com os quais o hospedeiro se protege dos microrganismos. Estas informações têm sido úteis na indicação de diagnóstico, no emprego de medidas terapêuticas seguras e eficientes e na produção de vacinas seguras e eficazes (40).

A compreensão sobre as particularidades dos mecanismos de parasitismo de organismos patogênicos possibilita a obtenção de conhecimentos que visem o desenvolvimento de novas ferramentas para a prevenção ou para o gerenciamento de doenças. Dentro desta perspectiva, a identificação e caracterização do papel dos genes relacionados com a patogenicidade e virulência tornam-se obrigatória.

Com a descoberta dos transposons, elementos genéticos que podem mover-se dentro do genoma e afetar a regulação ou expressão de genes de maneira aleatória (41), os estudos da função gênica ficaram facilitados. Atualmente existem vários sistemas de mutagênese insercional aleatória (42, 43, 44, 45), os quais podem ser utilizados para gerar bibliotecas de mutantes que serão posteriormente analisadas por meio de mapeamento e localização das ORFs mutadas (41, 42, 45).

Estudos com mutantes de bactérias fitopatogênicas evidenciaram um agrupamento de genes denominado *hrp*, para os quais se tem verificado um papel tanto na patogenicidade em plantas suscetíveis, quanto na indução de HR em plantas hospedeiras contendo o gene de resistência (R) correspondente ou em plantas não-hospedeiras (46). A verificação de que os genes *hrp* são essenciais para a patogenicidade e indução de HR indica que a funcionalidade dos genes *avr* depende dos genes *hrp* (47). Algumas proteínas destes agrupamentos de genes mostraram homologia com vários componentes do sistema de secreção do tipo III de bactérias patogênicas de animais (*Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*), onde as proteínas codificadas por genes *hrp* formam uma estrutura tubular

do tipo *pilus* capaz de conectar as células bacteriana e animal. Deste modo, proteínas do patógeno relacionadas à virulência são translocadas, através das paredes e membranas plasmáticas, da própria bactéria e do vegetal, diretamente para o citoplasma da célula hospedeira (48).

O estudo do controle da expressão de genes *hrp*, tem revelado uma complexidade inerente à função indispensável que eles exercem para o estabelecimento tanto de interações compatíveis como de interações incompatíveis no confronto bactéria-planta. A modulação da expressão de genes *hrp* é dirigida por sinais da planta, como osmolaridade, pH e disponibilidade de nutrientes, sugerindo uma complexa gama de sinais aos quais a fitobactéria é confrontada nos diferentes estágios de seu desenvolvimento no interior do tecido vegetal (49).

Em *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, agente causal da mancha bacteriana em tomateiro e pimenteiro, os genes *hrp*, isolados ou em operons, estão distribuídos em 6 locos – *hrpA* a *hrpF* – e a análise das proteínas codificadas confirmou a homologia com proteínas do SSTT de bactérias patogênicas de animais (50, 51). A expressão destes genes ocorre de forma co-regulada, e pode ser induzida tanto no contato da bactéria com a planta como em meio sintético XVM2 (52, 53).

Badel (54) e colaboradores verificaram que mutantes de *Pseudomonas syringae* pv. tomato para uma região gênica onde se localiza o grupo de genes *hrp* são altamente afetadas quanto ao crescimento e formação de lesões em folhas de tomateiro. Eles verificaram que na região mutada se localizavam os genes *avrE1*, *hopM1* e *hopAA1-1*, os quais são conhecidos como prováveis efetores de virulência. A comparação gênica entre Pst, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* permitiu verificar que nessa região, no genoma dos três patovares, existem somente genes efetores. Estudos de mutantes defectivos para apenas um desses três genes mostrou que mutante AvrE1 têm sua habilidade para produzir lesões reduzida, mas não perde a sua habilidade para se multiplicar em células foliares de tomateiro. A expressão de *avrE1* sob promotor 35S *in planta* elicitou HR tanto em planta hospedeira quanto em planta não hospedeira. A análise de mutantes duplos *avrE1* e *hopM1* mostrou que deleções desses dois genes provocaram uma grande redução no crescimento e na formação de lesões, semelhante às células onde todo o grupo estava faltando. Os autores verificaram, ainda, que os mutantes duplos para esses dois genes elicitam HR em *Nicotiana tabacum* e que essas duas deleções não impedem a liberação de AvrPto em células de *N. tabacum* e de tomateiro nas primeiras 9 h de infecção. Os autores sugerem que AvrE1 age dentro das células do hospedeiro e promove a formação de lesões e que a combinação de AvrE1 e HopM1 é importante para o crescimento da bactéria no interior da planta hospedeira.

Em estudos com mutantes de Xcv foi possível verificar que a montagem do *pilus* Hrp depende

do SSTT funcional e que os componentes são codificados dentro do grupo gênico *hrp*. Entretanto, não foi possível conhecer quais genes são necessários para a montagem do *pilus* e nem qual o papel desempenhado pelos genes *hpa* e outros genes *hrp* não conservados. Nesse mesmo estudo, por meio da mutação polar, foi possível obter mutantes para os genes *hrpC*, *hrpB7*, *hrcL*, *hrpB4*, *hrcJ*, *hrpB2*, *hrpB1*, *hrcU*, *hrcV*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hpaA*, *hrcD*, *hrpD6*, *hpaB*, *hpaE*, e *hrpF*. Por meio de eletromicrografias, constatou-se que todos os mutantes *hpa* produziram *pilus* morfológicamente igual ao apresentado pelo selvagem. No entanto, o mutante *hpaA* produziu um *pilus* de tamanho reduzido. Todos os mutantes *hrp* e *hrc*, exceto para *hrpF*, não produziram *pilus*. Uma vez que, segundo os autores, a proteína *hrpF* age depois de *hrpE* durante o processo de translocação e secreção de proteínas efetoras, segundo os autores, estes concluem que nenhuma proteína pertencente a *hrp* ou *hrc* age antes de *HrpE* durante o processo de translocação (55).

Análises de mutantes *hrp* em *Xac* revelou que mutações no operon *hrpB* e *hrpD* e no gene *hrpF* impediram esses mutantes de produzirem cancro em citrus e HR em folhas de algodão e de outras plantas não hospedeiras (56). Nesse mesmo estudo, os autores realizaram, por meio de conjugação, a complementação do gene *hrpF* sob o controle do seu próprio promotor, e verificaram que a virulência foi restabelecida por completo.

Mutações em outros genes de bactérias patogênicas de plantas ou de animais também revelaram proteínas essenciais à patogenicidade ou que regulavam o processo de patogenicidade. Dentre esses estudos, por meio de análise genética e proteômica, em gel 2D-DIGE, de mutantes de *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Ecc) e *E. carotovora* ssp. *atroseptica* (Eca), Coulthurst (57) e colaboradores concluíram que mutações no gene *luxS*, requerido para a síntese de moléculas sinalizadoras do sistema de “quorum sensing”, afeta a constituição protéica intracelular e secretada, a motilidade e a virulência *in planta*.

Em *Erwinia* a produção de exoenzimas é bem controlada e está intimamente relacionada com a fase de crescimento e a produção de *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL), uma molécula sinal de *quorum sensing*, é necessária para a síntese da maioria dos fatores de virulência em quantidades satisfatórias para a completa virulência desse patógeno (58, 59). Estudos com mutantes de Eca defectivos para a produção de OHHL mostrou a existência de um novo repressor de virulência (VirR) nessa fitobactéria. Mutação no gene codificador de VirR restabeleceu a virulência em um mutante incapaz de produzir OHHL, ou seja, VirR previne a produção de fatores de virulência em baixas concentrações de células bacterianas no hospedeiro (60).

Recentemente, o sistema de translocação Tat começou a ser investigado em vários patógenos,



tais como: *Pseudomonas aeruginosa* (61), *Escherichia coli* (62) e *Agrobacterium tumefaciens* (63). Homólogos codificadores de membros das famílias TatA e TatC, requeridos para o sistema de transporte Tat, foram encontrados em genomas de vários patógenos, incluindo *A. tumefaciens*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *P. aeruginosa*, *P. syringae* e *Yersinia pestis* (64), sugerindo um papel para este sistema no processo de virulência de vários patógenos bacterianos (65).

A fim de verificar a contribuição desse sistema no processo de virulência e estabelecimento no hospedeiro, a fisiologia de mutantes *TatC* de Pst foi testada. Verificou-se que uma série de fenótipos foi alterado, incluindo perda de motilidade em placas de Petri contendo meio de cultura ágar *soft*, deficiência na síntese de sideróforos e na aquisição de ferro, sensibilidade ao cobre, perda de atividade fosfolipase extracelular e virulência atenuada em folhas do hospedeiro. Com relação à perda de virulência, os autores concluem que isso se deveu a um comprometimento na aptidão do mutante pelo hospedeiro, diminuição da eficiência do SSTT e da retenção dos fatores de virulência no citoplasma (65).

Por meio de mutagênese insercional, um operon de 13 kb compreendendo oito genes foi clonado e funcionalmente caracterizado em *Erwinia chrysanthemi* (66). Os autores demonstraram tratar-se de um segundo sistema de transporte de ferro nesta fitobactéria, composto pelos genes *acsF*, *acr*, *acsD*, *acsE*, *yhcA*, *acsC*, *acsB* e *acsA*. Sete genes estavam envolvidos na biossíntese (*acs*\_) e na liberação extracelular (*yhcA*) de acromobactina e um (*acr*) estava envolvido na produção de um receptor específico, presente na membrana externa, para o complexo férrico. O promotor desse operon foi negativamente regulado por ferro e em um mutante *fur* nulo os genes *acsD* e *acsA* foram expressos constitutivamente. Ensaio *in vitro* mostraram que a proteína repressora Fur se liga especificamente a região promotora do gene *acsF*, confirmando que a regulação desse operon é realizada diretamente por Fur. Em testes de patogenicidade, verificou-se que a produção de acromobactina contribui para a virulência de *E. chrysanthemi* (66).

Em *Vibrio cholerae*, um estudo de mutagênese ao acaso permitiu a caracterização de 16 mutantes com patogenicidade alterada, sendo que quatro possuíam mutações em genes já caracterizados como essenciais à patogenicidade e os demais carregavam inserções em genes conhecidos, mas não associados à patogenicidade até então, e em genes de função hipotética (42).

Em *Escherichia coli* foi possível identificar, rapidamente, genes que afetam a aptidão em diferentes condições de crescimento (67). Gehring (68), por meio de mutagênese *in vitro*, isolaram vários mutantes de *Streptomyces coelicolor* com fenótipos distintos, incluindo produção de pigmen-

tos alterada, sensibilidade à antibiótico aumentada e sistema de formação de hifas aéreas e um bloco de esporos prejudicados. Foram mapeadas 2.462 inserções diferentes, sendo 84% delas em genes codificadores.

Portanto, pode-se observar que a virulência é decorrência de processos multifatoriais e que ainda carece de muitos estudos para poder interrelacionar esses diversos processos entre si.

Com o seqüenciamento completo do genoma de várias fitobactérias (69, 70, 71, 72, 20, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79), as interações planta-patógeno, bem como as especificidades do fitopatógeno para com o hospedeiro, poderão ser elucidadas de maneira global, uma vez que, mesmo com o seqüenciamento completo desses genomas, estima-se que para 30 a 50% das ORFs identificadas não é possível atribuir uma provável função (80). Logo, ao término do processo de seqüenciamento completo do genoma, em vários casos, é iniciado um processo de análise funcional, que pode ser por meio da análise de bibliotecas de mutantes ou por meio da análise da expressão gênica global por meio de arranjos de DNA (81), ou ainda, por meio das duas técnicas em conjunto, além de uma análise proteômica.

Em *Rhodococcus erythropolis* foi construída uma biblioteca de mutantes, por meio do uso de mutagênese ao acaso, e a análise de 40 mutantes permitiu verificar que para todas as ORFs analisadas havia pelo menos um homólogo previamente caracterizado em *Rhodococcus* sp. RHA1 (82). Estudos semelhantes foram conduzidos em *Mycoplasma genitalium*, um patógeno humano cujo genoma tem aproximadamente 580 kb, compreendendo 482 genes, na tentativa de averiguar qual o genoma mínimo para uma bactéria sobreviver em meio de cultura. Em um total de 3.321 mutantes de *M. genitalium* analisados, para 74% foi gerada seqüência de DNA para mapeamento do sítio de inserção transposômica. Após seleção e testes, 100 genes não-essenciais a *M. genitalium* foram identificados. Logo, os demais 382 genes, 3 genes transportadores de fosfato e mais 43 genes codificadores de RNA estrutural compõem um grupo mínimo de genes necessários para um organismo sobreviver em um laboratório, segundo os autores. Desse total de genes, 28% codificam para proteínas com função desconhecida (83).

Duas bibliotecas de mutantes de *Staphylococcus aureus*, uma com aproximadamente 4.200 mutantes obtidos com o transposon Tn551 e outra consistindo de aproximadamente 2.400 mutantes obtidos com o transposon Tn917lac foram construídas e analisadas *in vivo*. Além dos transposons, Tn551 e Tn917lac, etiqueta marcada de DNA (*DNA size tags*), produzida a partir de DNA de esperma de salmão, e DNA SMIT, foram utilizadas na geração desses mutantes. A análise inicial de 6.300 mutantes *in vivo* revelou 339 (5,4%) com patogenicidade atenuada. Em uma segunda análise,

95 foram submetidos a novos testes. Finalmente, 24 mutantes atenuados tiveram a sua virulência caracterizada *in vivo* e o seu fenótipo de crescimento caracterizado *in vitro*. Mutantes foram isolados do baço, em infecção sistêmica animal, em quantidades até 1.200 vezes menor que o apresentado pelo selvagem nas mesmas condições e em até 4.000 vezes menor em infecções localizadas. A análise genética desses mutantes identificou 23 genes únicos, sendo que a maioria compreendem genes envolvidos no processo de biossíntese de pequenas moléculas, biossíntese de proteínas transmembrânicas e de superfície celular envolvidas na ligação e transporte de pequenas moléculas, transdução de sinais, produção de energia e proteínas desconhecidas. No geral, 10 codificavam para proteínas previamente conhecidas e 13 para proteínas desconhecidas ou com função predita. Os autores concluem que muitos dos produtos dos genes identificados nesse estudo representam novos e atrativos alvos para compostos anti-bactéria (84).

Recentemente, uma biblioteca de aproximadamente 10.000 mutantes, também obtidos por meio de inserção aleatória de transposon, foi construída para a fitobactéria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Os autores desse trabalho estavam interessados em verificar mutantes com efeitos pleiotrópicos sobre enzimas extra-celulares, uma vez que eles desejavam identificar novos fatores de regulação sobre essas enzimas. Após a análise de vários clones, oito mutantes defectivos para a produção de proteases foram identificados. Dos genes identificados, dois já eram conhecidos como sendo reguladores do processo de produção de enzimas extra-celulares em *E. carotovora*. No entanto, os outros seis genes ainda não tinham sido relatados como participantes desse processo regulatório. O mapeamento dos genes mutados permitiu verificar que a seqüência de aminoácidos predita possuía homologia com DNA helicase (*E. coli*), com provável sensor (*Salomonella enterica*), com provável fosfatase (*Yersinia enterocolitica*), com proteína desconhecida (*E. coli*), com provável glicosilase (*Y. pestis*) e com transportador de íon  $K^+$  (*Y. pestis*) (85).

### 3 *Objetivos*

O objetivo geral deste estudo foi o de identificar genes relacionados à patogenicidade e virulência em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri isolado 306 por meio da análise de mutantes *in planta*.

Os objetivos específicos incluíram:

1. Obtenção de uma biblioteca de mutantes;
2. Validação da biblioteca de mutantes por meio de Southern blot;
3. Análise de mutantes em folhas de citros;
4. Padronização de um método de extração de DNA de Xac em larga escala;
5. Caracterização dos genes mutados que afetaram a patogenicidade e/ou virulência;
6. Determinação das curvas de crescimento *in vivo* e *in vitro* de uma seleção de mutantes com patogenicidade e/ou virulência alterada;
7. Análise da expressão gênica *in vivo* e *in vitro* de uma seleção de mutantes com patogenicidade e/ou virulência alterada;
8. Complementação gênica em mutantes com patogenicidade alterada.

## 4 *Material e Métodos*

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

*Xanthomonas axonopodis* pv. citri, isolado 306 (20), foi cultivada em meio de cultura TSA (10 g de triptona, 10 g de sacarose, 1 g de Na<sup>+</sup> glutamato, 15 g de ágar e água destilada suficiente para 1 L) ou NA (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de ágar e água destilada suficiente para 1 L). O ágar somente foi utilizado em meio de cultura sólido. As células foram multiplicadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura líquido, sob agitação contínua (200 rpm) a 28 °C, ou em placas de Petri contendo meio de cultura sólido, nas mesmas condições, exceto agitação. Quando se fez necessário, 100 µg/mL de canamicina, ampicilina ou de espectinomicina foram adicionados ao meio de cultura para evitar possíveis contaminação.

### 4.2 **Mutagênese *in vivo***

Clones mutantes de Xac foram obtidos por meio de transformação de células eletrocompetentes com o kit EZ::TN <KAN-2> Insertion Kit fornecido pela Epicentre<sup>1</sup>, que contém o complexo transposase Tnp e transposon Tn5 (86, 87). Os procedimentos para geração dos mutantes foram realizados conforme recomendados pelo fabricante do conjunto de reagentes.

Selecionaram-se as colônias resistentes à canamicina em meio de cultura TSA sólido, correspondentes àquelas em que ocorreu o evento de transposição. Os mutantes obtidos foram repicados para placas de 96 poços contendo meio de cultura TSA líquido com canamicina acrescido de 20% de glicerol. A seguir, foram incubadas por 2 dias a 28 °C, sob agitação constante a 200 rpm. Após a fase de multiplicação, as culturas foram estocadas a –80 °C a fim de compor a biblioteca de mutantes.

---

<sup>1</sup><http://www.epicentre.com>

### 4.3 Teste de patogenicidade *in vivo*

Os mutantes foram multiplicados individualmente em meio de cultura TSA sólido, adicionado de canamicina, nas condições previamente descritas. Em cada placa de Petri de 14 cm de diâmetro, contendo meio de cultura sólido, foi possível multiplicar uma placa contendo 96 mutantes, utilizando-se um replicador de 96 pinos.

Após 72 horas de incubação, cada mutante foi individualmente coletado da placa e a concentração celular padronizada, em água bi-distilada, para uma densidade óptica de 0,3 a 600<sub>nm</sub>, equivalente a cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em seguida, a suspensão de bactérias foi infiltrada em dois pontos na parte abaxial, à esquerda da nervura central, de folhas jovens, completamente expandidas, de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck). No lado direito da nervura central inoculou-se a estirpe selvagem, na mesma concentração e nas mesmas condições, como controle positivo da doença.

As plantas inoculadas foram mantidas num laboratório de segurança concebido especialmente para a manipulação e inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (praga quarentenária), localizado nas dependências do LBM, da UNESP, Campus de Jaboticabal. Este local possui um sistema de filtragem absoluta do ar, um sistema para gerar pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente, além de manter condições ótimas de temperatura, luminosidade e umidade.

Aos três dias da inoculação avaliou-se a incidência da doença e os mutantes de interesse tiveram a sua sintomatologia registrada por meio de fotografia digital. Os mutantes selecionados nesta primeira avaliação foram re-inoculados por mais quatro vezes, a fim de comprovar os resultados.

### 4.4 Extração de DNA total de Xac

Clones mutantes de Xac foram multiplicados em placas de 96 cavidades contendo 1 mL de meio de cultura TSA líquido adicionado de 50 µg/mL de canamicina, por 48 horas a 28 °C, sob agitação contínua a 200 rpm. Após este período, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30 minutos a 4.000 rpm (centrífuga Rotanta 46R do fabricante Hettich, Alemanha) à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lavagem, submetidos a forte agitação e centrifugados por 15 minutos a 4.000 rpm a temperatura ambiente (centrífuga Rotanta 46R). Repetiu-se o passo anterior por mais uma vez. Após estas duas lavagens, as células foram ressuspensas, por meio de forte agitação, em 500 µL de tampão D

e mantidas em banho-maria a 65 °C por 1 hora. Decorrido o período de lise celular, 210  $\mu\text{L}$  do tampão P foram adicionados à solução. Em seguida, as amostras foram agitadas e centrifugadas por 30 minutos a 4.000 rpm à temperatura ambiente (centrífuga Rotanta 46R). Posteriormente, 550  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 cavidades e as amostras submetidas a uma centrifugação de 15 minutos a 4.000 rpm a temperatura ambiente (centrífuga Rotanta 46R). Após este procedimento, 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 cavidades do tipo Elisa, evitando-se transferir partes do precipitado. A fim de isolar o DNA da solução, 130  $\mu\text{L}$  de isopropanol previamente resfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram adicionados a cada amostra, as quais foram então incubadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min ou a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos a 4 °C (centrífuga Rotanta 46R) e lavadas com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, por duas vezes. Após cada processo de lavagem, a placa com as amostras foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos a 4 °C (centrífuga Rotanta 46R). Finalmente, os precipitados foram secos, ressuspensos em 40  $\mu\text{L}$  de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 mM pH 8,0) contendo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase A e incubados por 1 hora a 37 °C. A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% por meio de comparação visual com DNA de qualidade e concentração conhecidas.

O tampão de lavagem compõe-se de 10 mM de Tris-HCl pH 8,8, 3 mM de KCl e 1,25 mM de NaCl, preparado imediatamente antes do uso. Já o tampão D é composto por 25 mM de citrato de sódio pH 7,0, 0,5% (w/v) de sarcosil e 4 M de isotiocianato de guanidina. O tampão P compõe-se de 667 mM de Tris pH 7,5, 833 mM de NaCl e 83 mM de EDTA pH 8,0.

Esse protocolo de extração de DNA foi padronizado durante a execução do presente trabalho.

## 4.5 Identificação do gene mutado

### 4.5.1 Obtenção e clonagem dos fragmentos de DNA contendo a região mutada

A estratégia utilizada para a identificação do gene mutado em cada Xac mutante foi a digestão de DNA total com enzimas de restrição, clonagem no plasmídeo *pBlueScript II SK* (Stratagene), seleção do clone contendo o gene mutado para resistência a canamicina (presente apenas no transposon *Tn5*) e seqüenciamento utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o transposon e que direcionam a síntese de DNA saindo para fora das duas extremidades do mesmo, ou seja, em direção ao gene no qual ocorreu a inserção.

Dentre as diversas enzimas de restrição que possuem sítio de restrição único dentro da região de clonagem do plasmídeo *pBlueScript II SK* (Stratagene), selecionaram-se as enzimas *EcoR I*, *Sac I* e *Sac II* devido a estas enzimas não possuírem sítio de restrição no transposon utilizado na geração dos mutantes. Quando a combinação destas enzimas não possibilitou obter o resultado esperado, utilizou-se uma das enzimas *BamH I* ou *Xho I*, que possuem sítio de restrição na extremidade do transposon, combinada com a enzima *Sac I*.

A reação de clivagem do DNA total consistiu de 12,7  $\mu\text{L}$  de água bi-destilada estéril, 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão 10x que acompanha a enzima, 2,0  $\mu\text{L}$  de BSA 10 mg/ $\mu\text{L}$ , 0,15  $\mu\text{L}$  (3 U) de cada uma das enzimas de restrição, e 3,0  $\mu\text{L}$  ( $\sim 1,5 \mu\text{g}$ ) de DNA total. A reação de clivagem do DNA do vetor consistiu de 8,0  $\mu\text{L}$  de água bi-destilada estéril, 2,5  $\mu\text{L}$  do tampão 10x que acompanha a enzima, 2,5  $\mu\text{L}$  de BSA 10 mg/ $\mu\text{L}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  de cada uma das enzimas de restrição e 10,0  $\mu\text{L}$  ( $\sim 10 \mu\text{g}$ ) de DNA do vetor *pBlueScript II SK*. Quando nenhuma das enzimas não requeria BSA, esta foi suprimida da reação e o volume foi completado com água bidestilada estéril. Em ambos os casos, as clivagens (DNA genômico e vetor) foram executadas por 12 horas a 37 °C.

Desta maneira, dentre os diversos fragmentos de DNA genômico gerados haverá um fragmento contendo o transposon. As extremidades deste fragmento fazem parte do locus do gene mutado.

A clonagem dos fragmentos no vetor foi realizada em um tubo de microcentrífuga de 500  $\mu\text{L}$  contendo 3,5  $\mu\text{L}$  de água bi-destilada estéril, 1,0  $\mu\text{L}$  de tampão 10x que acompanha a enzima, 0,5  $\mu\text{L}$  (200 U) de enzima T4 DNA ligase, 2,0  $\mu\text{L}$  ( $\sim 150 \mu\text{g}$ ) do produto da clivagem do DNA total e 3,0  $\mu\text{L}$  ( $\sim 1,2 \mu\text{g}$ ) do produto da reação de clivagem do vetor. A reação de ligação foi mantida a 16 °C por 12 h. Os plasmídeos resultantes desta ligação foram utilizados para transformar *E. coli* DH10B.

#### 4.5.2 Transformação de *Escherichia coli* com o plasmídeo recombinante

Os plasmídeos recombinantes foram transformados em *Escherichia coli* DH10B eletrocompetentes (88) em equipamento BioRad modelo Gene Pulser II. Dez microlitros da reação de ligação foram adicionados a 40  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes e submetidos a um pulso elétrico de 1,8 kV sobre uma capacitância de 25  $\mu\text{F}$ . A frequência “low range” foi ajustada para 400 e a “high range” foi mantida no infinito.

Logo em seguida, adicionou-se ao tubo 1 mL de meio de cultura SOC (20 g de tripton, 5 g de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 25 mM de KCl, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ ,



20 mM de glicose) e manteve-se as células sob agitação constante a 200 rpm em shaker a 37 °C por uma hora. Decorridos este período, 200  $\mu$ L da solução foram semeados em placa de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g de ágar, água destilada suficiente para 1 litro), suplementado com 50  $\mu$ g/mL de canamicina, 100 mM de IPTG e 40 mg/mL de X-Gal (88). Após 12 h de crescimento a 37 °C, a presença de colônias brancas indicou sucesso no procedimento. Nos casos onde não foi possível obter colônias recombinantes, procedeu-se à clivagem do DNA genômico do mutante específico com outra combinação de enzimas de restrição, repetindo-se o processo.

### 4.5.3 Extração de DNA plasmidial

Uma colônia recombinante foi transferida para tubo de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido, enriquecido com 50  $\mu$ g/mL de canamicina, e mantido sob agitação constante a 200 rpm a 37 °C, por 12 h. Após o período de multiplicação das células, procedeu-se à extração do DNA plasmidial. A suspensão de células foi centrifugada por 5 min a velocidade máxima (Eppendorff 5415C) e o sobrenadante foi descartado. Duzentos microlitros da solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 50 mM de D-glicose) previamente resfriados foram adicionados às amostras, agitados até a completa solubilização das células, sendo que a suspensão obtida foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e os mesmos foram mantidos à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, 200  $\mu$ L da solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS) preparados pouco antes do uso foram adicionados às amostras. A solução foi cuidadosamente misturada por meio da inversão dos tubos algumas vezes e mantida no gelo por 5 min. Decorrido este período, 150  $\mu$ L da solução III (3 M de acetato de potássio, 2 M de ácido acético) foram acrescentados à solução. Os tubos foram gentilmente invertidos algumas vezes a fim de misturar a solução e mantidos por 5 min no gelo. As amostras foram, em seguida, submetidas a 5 min de centrifugação a velocidade máxima em uma centrífuga Eppendorf modelo 5415C à temperatura ambiente. Quinhentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e 500  $\mu$ L de fenol/clorofórmio 1:1 foram adicionados à solução. Após 2 min de homogeneização, procedeu-se a centrifugação das amostras por 5 min a velocidade máxima em uma centrífuga Eppendorf modelo 5415C a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e procedeu-se a uma extração com 1 volume de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas por 5 min a velocidade máxima (centrífuga Eppendorf modelo 5415C) à temperatura ambiente e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. O DNA foi precipitado por meio da adição de 700  $\mu$ L de etanol absoluto (temperatura ambiente) à solução. As amostras foram mistu-

radas e mantidas a temperatura ambiente por 5 min e a seguir centrifugadas à velocidade máxima por 5 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5415C) a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA lavado, por duas vezes, com 1 mL de etanol 70%, secado sob vácuo e ressuspendido em 30  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 mM pH 8,0) contendo RNase (1  $\mu$ g/mL). As amostras foram mantidas a 37 °C por 1 hora e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de verificar a qualidade do DNA e estimar a concentração por meio da comparação com amostras de DNA de concentração previamente conhecidas.

#### 4.5.4 Seqüenciamento do gene mutado

O DNA genômico clonado no vetor plasmidial foi submetido a uma reação de seqüenciamento. Uma vez que o transposon se encontra dentro do gene, seqüenciaram-se as duas extremidades de DNA que o flanqueiam. As reações de seqüenciamento constaram de 3,0  $\mu$ L de água bi-distilada estéril, 2,0  $\mu$ L de tampão de seqüenciamento, 2,0  $\mu$ L de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 2,0  $\mu$ L de DNA plasmidial e 1,0  $\mu$ L do oligonucleotídeo iniciador KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAA<sub>g</sub>CTCTCATCAACC-3') ou do oligonucleotídeo iniciador KAN-2 RP-1 (5'-gCAATgTAACATCAgAgATTTTgAg-3'). Estes oligonucleotídeos possuem complementaridade de bases nas extremidades do transposon e direcionam a síntese no sentido externo ao transposon. Desta maneira, as regiões do genoma que flanqueiam o transposon foram seqüenciadas.

Ao término da reação de seqüenciamento, que consistiu de 35 ciclos compostos por uma etapa a 96 °C por 10 s, uma etapa a 52 °C por 5 s e uma etapa de polimerização a 60 °C por 4 min, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento do uso. Em seguida, 80  $\mu$ L de isopropanol foram adicionados a cada amostra. Após 15 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich) em rotor para microplacas, por 45 min a 20 °C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200  $\mu$ L de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 15 min a 20 °C, na mesma centrífuga Rotanta 46R. As amostras foram secas a vácuo e submetidas ao seqüenciamento em um seqüenciador automático ABI 3100 conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram analisadas por bioinformática, a fim de remover possíveis partes do transposon, e alinhadas com o genoma da Xac para identificar o gene mutado. O processo de alinhamento destas seqüências foi realizado por meio do algoritmo BLASTn e BLASTx (89).

O resultado obtido com as duas reações de PCR realizadas com os dois oligonucleotídeos dife-

rentes, para cada um dos mutantes, deve ser igual no sentido de indicar a mutação em uma mesma ORF.

## 4.6 Validação da biblioteca de mutantes por Southern blotting

Com a finalidade de verificar a porcentagem de duplas inserções do transposon no genoma de Xac, utilizou-se a técnica de Southern blot. Para isso, selecionou-se, aleatoriamente, na biblioteca de mutantes, uma placa contendo 96 mutantes e procedeu-se a extração do DNA total conforme protocolo descrito anteriormente.

As amostras de DNA genômico de cada mutante foram clivadas com a enzima de restrição *EcoR* I e os fragmentos separados em gel de agarose 1% em tampão TBE por 12 h a 35 V. Ao final deste processo, o gel foi corado com brometo de etídeo e a sua imagem foi fotodocumentada. Em seguida, o gel foi submetido a uma depuração em solução de HCl 0,25 M, sob leve agitação, por 10 min, e procedido à transferência do DNA para membrana de náilon Hybond N+, de acordo com instruções do fabricante (Amersham Biosciences).

Uma alíquota de DNA do transposon utilizado no processo de mutagênese foi submetida à marcação não-radioativa utilizando o kit AlkPhos Direct RPN 3680 (Amersham Biosciences), que se baseia na ligação ao DNA de uma fosfatase alcalina. Esta enzima é capaz de catalisar a decomposição do substrato dioxetano levando à emissão de luz, e conseqüente impressão em filmes de raios-X. Todo o processo, desde a marcação da sonda até a lavagem da membrana após hibridização foi realizado utilizando o kit AlkPhos Direct RPN 3680 conforme as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). A detecção dos sinais emitidos pela sonda foi realizado com o kit Gene Images CDP-Star RPN 3510 (Amersham Biosciences) conforme instruções do fabricante.

Finalmente, a membrana foi colocada em contato com filme de Raio-X em suportes apropriados, armazenada a temperatura ambiente por 1 hora e o filme foi revelado utilizando o kit GBX (Kodak). A fotografia foi analisada visualmente sob transiluminador de luz branca.

Realizaram-se duas hibridizações independentes a fim de confirmar os resultados. Os mesmos mutantes foram multiplicados, independentemente, e o processo foi totalmente repetido.

## 4.7 Determinação da curva de crescimento *in vitro* e *in planta*

Escolheram-se oito mutantes com patogenicidade alterada (02H02, 03C01, 06H10, 11D09, 18C05, 18D06, 11D03, 10H02), mais a estirpe selvagem (Xac, isolado 306), para determinação de suas respectivas curva de crescimento, tanto *in vitro* quanto *in planta*. Esses mutantes possuem as ORFs Xac0410, Xac3839, Xac0789, Xac4040, Xac0340, Xac3673, Xac1201 e Xac0095, respectivamente, interrompidas pela inserção do transposon.

Para determinar a curva de crescimento *in vitro*, colônias isoladas de mutantes de Xac e do isolado selvagem foram multiplicadas em 5 mL de meio de cultura TSA líquido em tubo Falcon (50 mL) por 24 h a 28 °C sob agitação constante a 180 rpm. Nos tubos onde havia mutantes, acrescentou-se ao meio de cultura canamicina (50 µg/mL). Após 24 h de incubação, esse pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura TSA líquido e submetido à agitação constante nas mesmas condições anteriores. Após 12 h, retirou-se uma alíquota de 1 mL e diluiu-a em água bi-destilada estéril a fim de se obter uma DO a 600<sub>nm</sub> igual a 0,7. Subseqüentemente, 1 mL dessa suspensão bacteriana foi transferida para novos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura TSA, e, após leve agitação, aferiu-se a DO a 600<sub>nm</sub>, a qual representa o tempo zero na curva de crescimento. Os Erlenmeyers foram transferidos e mantidos a 28 °C sob agitação constante a 180 rpm. Novas medidas da densidade óptica foram realizadas após 8 h de incubação e, posteriormente, a cada 4 h até a 40<sup>a</sup> h, perfazendo um total de 10 leituras. Foram realizadas 5 repetições independentes.

Para a curva de crescimento *in planta*, os mutantes, bem como a estirpe selvagem, foram multiplicados em meio de cultura TSA sólido durante 48 h a 28 °C. Após incubação, transferiu-se uma porção de células para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada estéril. Após completa homogeneização das células, a DO a 600<sub>nm</sub> foi padronizada para 0,1 (aproximadamente 10<sup>4</sup> UFC/mL).

Com o auxílio de uma seringa de 1 mL sem agulha (Figura 4.1), uma folha de laranjeira Pêra foi totalmente infiltrada com cada uma dessas suspensões bacterianas, individualmente. As análises quantitativas foram realizadas a 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a inoculação. A quantificação do número de células por área foi determinada retirando-se três discos de 1 cm<sup>2</sup> de cada folha inoculada. Os discos foliares foram macerados em 1 mL de água bi-destilada estéril, com a ajuda de um pistilo. Em seguida, prepararam-se diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-7</sup> e 10 µL de cada uma dessas diluições foram semeados em meio de cultura TSA sólido contendo canamicina 100 µg/mL (exceto para o

isolado selvagem), segundo o método da micro-colônia (90). As placas foram mantidas a 28 °C por dois dias, quando as colônias isoladas foram contadas para cada uma das diluições. O experimento foi repetido duas vezes independentemente.

Para cada um dos tempos a ser analisado foi selecionada uma planta de laranjeira, a qual recebeu inoculações, em folhas individuais, de todos os mutantes e da estirpe selvagem (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Infiltração de suspensão celular de Xac em folhas de laranjeiras Pêra.

## 4.8 Complementação de mutantes com patogenicidade alterada

A fim de confirmar se a alteração na patogenicidade e/ou na virulência realmente teria sido ocasionada pela mutação na respectiva ORF de um dado mutante, procedeu-se a complementação do gene mutado e seu respectivo promotor. Para tal, estipulou-se, arbitrariamente, que oligonucleotídeos iniciadores seriam produzidos para amplificarem, além de toda a ORF em questão, mais 500 pb antes do início da mesma.

A partir do sítio de anotação do genoma de Xac disponível na internet<sup>2</sup> foi obtida a seqüência de nucleotídeos para cada uma das ORFs previamente escolhidas para a complementação. Estas

<sup>2</sup><http://genoma4.fcav.unesp.br/xanthomonas/>

seqüências foram utilizadas como molde para a obtenção dos oligonucleotídeos iniciadores pelo programa Gene Runner, de acordo com os seguintes parâmetros:  $T_m$  do oligonucleotídeo variando de 50–60 °C e porcentagem de GC variando de 45–60%. Os melhores pares de oligonucleotídeos iniciadores, segundo o programa, foram selecionados para cada ORF (Tabela 4.1).

#### 4.8.1 Amplificação e clonagem das ORFs em *Escherichia coli*

Procurou-se, na biblioteca genômica de Xac, por meio de ferramentas de bioinformática, clones de cosmídeos contendo as respectivas ORFs de interesse (cosmídeos que foram gerados e utilizados no projeto de seqüenciamento genômico da Xac e que estavam disponíveis no laboratório). Os cosmídeos foram multiplicados e o DNA cosmidial extraído conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis(88). As amostras de DNA foram submetidas a reação de PCR composta por 0,2  $\mu$ L de DNA cosmidial ( $\sim$ 50  $\mu$ g), 5,0  $\mu$ L de tampão 10x que acompanha a enzima, 1,0  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 1,0  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 2,5  $\mu$ L de cada um dos oligonucleotídeos, 37,5  $\mu$ L de água bi destilada estéril e 0,3  $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). Essa mistura foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min seguida de 35 ciclos, em termociclador PTC 100 (MJ Research), sendo que cada ciclo possui uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 s, uma etapa de pareamento de bases a 43 °C por 30 s e uma etapa de polimerização a 72 °C por 2 min. Ao final do total de ciclos foi aplicada sobre as amostras uma etapa de polimerização a 72 °C por 4 min e as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da sua retirada do equipamento.

Uma alíquota (5  $\mu$ L) do produto da amplificação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, o qual foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. A reação foi considerada positiva para uma respectiva ORF quando o produto obtido, em pares de bases, foi único e igual ao tamanho esperado (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação das respectivas ORFs de Xac, por meio de PCR, a serem utilizadas nos estudos de complementação de mutantes.

ORF	Tamanho (pb)	Oligonucleotídeo F*	Oligonucleotídeo R*
XAC0014	1.461	TTGAGTGGCGGCAAGTGTAG	TCCGATACACCCGACGAGTAG
XAC0102	660	ATCAGCTGCGGCAACAGGTG	AGCGGGTCAGTCTGAAGACACG
XAC0144	2.781	CGTACATGGCGGTATCCAC	TGCGGTGCGTCGTACAGATG
XAC0340	432	GTGTAGTTCTCGGTGTACCAGC	CCGCAATTGGCTTGAATCG
XAC0356	1.185	ACAACACATCCAGCCATTG	TTACGCAATCACCAATGCC
XAC0618	1.899	AGTGCCCTCAAGCGAATTAGAG	CTCAGATCAGCGACGGTTC
XAC0789	948	GAAC TGAAGAGCAGGAACGTC	TCACCGCTGGATCGCTGTAC
XAC0798	1.428	CGTTTCAAGCGGAGAGTACAC	TGCGGCGAGCTATTGCTG
XAC1201	813	TACGACTTGCCGATGATGTTT	CCTGCCAAGCTTAGTGCAGC
XAC1495	405	CAAAACAAGGAGATTGTGATGGG	ATTTGACTCGAGACGGATCAG
XAC1669	2.031	GCATCGCGCTTTGAGGAAAG	TGAATGTCGGTGCAGCCAG
XAC1927	1.179	GGACAGGCACCAAGGAAATCA	CCGGTACCCTCGAGTGTCAATG
XAC2047	1.224	TGGCATGGCATTGATCCC	AACGGAGAATTCATGCCCTGGG
XAC2053	2.361	GTGGTGCCTTACGGTTTCAG	CAGATCAGCCCATTACGACG
XAC2118	1.734	ATGCACGGCTTGAGTTCCG	AGCACACCGTCGAGTGAAG
XAC2126	627	CGGATGTGTTCTGCGGTGTC	ACCTGCGACAATCACTGCC
XAC2636	1.986	CCAATGAAGGCGGTTTCCC	ATGTCCTCGCTGCTGGTGAC
XAC2639	702	CGGTGCTGTGATTACAGCG	ACCTCCGTTGTGGCGAATG
XAC3225	1.278	GATTCCCGCACCAATTATTGATG	ATGCAGCCCTCGAGCGTACATC
XAC3245	4.533	CCCTATGCAATTGTCGCAATC	CCGCAACTGTGAAAGATAATGC
XAC3263	537	AACCACATCGCTTCTTCCC	TGGATCGTTTGTGACCGG
XAC3285	429	ATGGACTTCATGCACGACC	GAAC TGGAAACCTGGATGAGC
XAC3607	1.134	TGACCACCGCTTCTTCGCTG	TCGCAGAGTCGCCCTGAAAG
XAC3980	1.437	TTGGTGGCGGTGAGCTTCTG	TCGGTACAGAGCTCGTCAACG
XAC3984	345	CAGACAATGCCGAGGAAGTG	TGCCGTGGTGCCTGTTGTAC
XAC4040	993	TTGTTGGCCGCTCTAAGATG	CCGGTAAGCTCGTGTCTTTC
XAC4160	3.195	TGATCGCCCGACCATCC	GGTGGAGCAGAGTTACCTGG

\* F → oligonucleotídeo no sentido direto; R → oligonucleotídeo no sentido reverso; todos estão escritos da posição 5' para a 3'

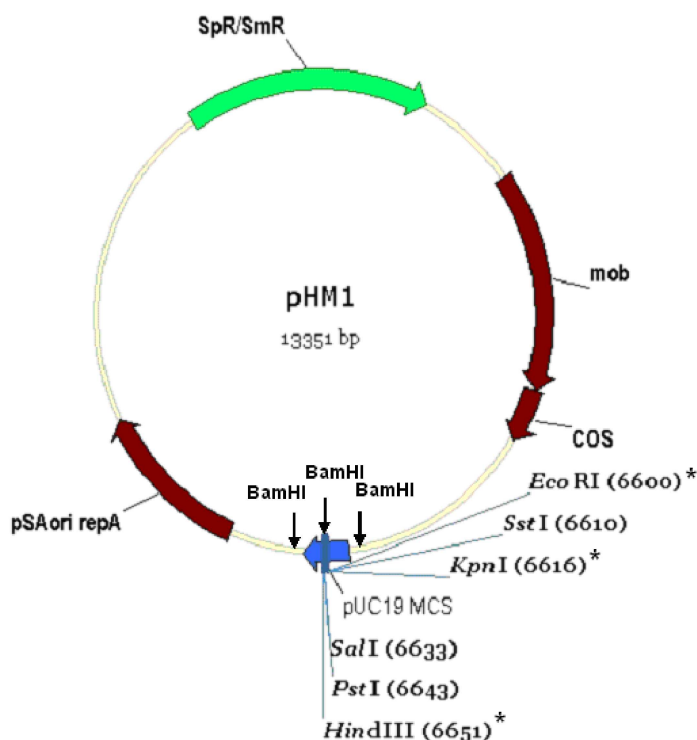
Os produtos da reação de PCR que se mostraram positivos, após análise eletroforética, foram clonados no vetor TOPO (Invitrogen) conforme sugestões do fabricante. Em seguida, os produtos da clonagem foram transformados em *E. coli* DH10B conforme descrito na seção 4.5.2, substituindo o antibiótico canamicina por ampicilina na mesma concentração. Após 12 horas de incubação a 37 °C, os transformantes, colônias brancas, foram selecionados e semeados em tubos de ensaio de vidro contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado de 50 µg/mL de ampicilina, mantidos a 37 °C, sob agitação constante a 150 rpm, por outras 12 horas. Decorridos o processo de multiplicação celular, uma alíquota de 500 µL de cada cultura de células transformadas foi misturada, sob condições assépticas, a igual volume de glicerol 50% previamente autoclavado, em um tubo de microcentrífuga esterilizado de 1,5 mL de capacidade, e armazenada a –80 °C em ultracongelador. As células bacterianas restantes de cada uma das culturas foram coletadas por centrifugação por 5 min a 5.000 xg, em tubos de microcentrífuga 1,5 mL e procedeu-se a extração dos plasmídeos recombinantes conforme descrito na seção 4.5.3. A concentração e a qualidade das preparações de DNA plasmidial foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos contendo os insertos foram clivados com a enzima de restrição *EcoR* I, conforme sugestões do fabricante da enzima. O produto da clivagem foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, contendo de brometo de etídio a 10 mg/mL, e visualizado sob luz ultra violeta. Os fragmentos de interesse foram purificados do gel com o auxílio do Kit CONCERT Rapid Gel Extraction System (Invitrogen).

#### 4.8.2 Clonagem das ORFs e transferência para mutantes de Xac

O vetor *pHM1* (Figura 4.2) (91) possui um gene que confere resistência ao antibiótico espectinomicina e se replica tanto em *Xanthomonas* quanto em *E. coli*. A fim de produzir esse plasmídeo em quantidade suficiente para a realização dos ensaios posteriores, procedeu-se a uma eletroporação do mesmo em *E. coli* DH5α, conforme protocolo padrão de transformação de *E. coli* descrito por Sambrook (88). As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB sólido contendo 100 µg/mL de espectinomicina. Após 16 horas, colônias isoladas foram transferidas para 3 mL de meio de cultura LB líquido, contendo 100 µg/mL de espectinomicina, e multiplicadas nas condições ideais de crescimento de *E. coli*. Decorridos esse período de multiplicação celular, uma alíquota de 500 µL foi misturada a igual volume de glicerol 50% autoclavado e armazenada em tubo de 1,5 mL a –80 °C em ultracongelador. O restante foi utilizado para extração plasmidial seguindo o protocolo descrito na seção 4.5.3. A concentração e a qualidade da preparação plasmidial





**Figura 4.2:** Esquema identificando os constituintes presente no vetor de expressão *pHM1*. Os sítios com asteriscos são sítios únicos presentes no vetor.

foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

Em seguida, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  ( $\sim 2 \mu\text{g}$ ) do vetor *pHM1* foi clivada com a enzima de restrição *EcoR I*, seguindo as orientações do fabricante da enzima (New England BioLabs), uma vez que esta enzima cliva esse vetor em um único ponto, deixando-o linearmente disposto. Após a clivagem, 5  $\mu\text{L}$  da reação de clivagem foram aplicados em gel de agarose 1%. A linearização do vetor foi verificada após a eletroforese por meio da coloração do gel com brometo de etídeo e visualização em transiluminador de luz ultravioleta.

Os fragmentos de DNA (ORF + promotor) clonados no vetor TOPO conforme descrito na seção 4.8.1 foram, isoladamente, liberadas desse vetor, por meio da clivagem com a enzima de restrição *EcoR I*, purificados após eletroforese do produto da reação de clivagem em gel de agarose 0,8%, e ligados ao sítio *EcoR I* do vetor *pHM1* linearizado. As reações de ligação consistiram de: 3,5  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril, 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão de ligase 10x, 3  $\mu\text{L}$  de vetor *pHM1* previamente clivado com a enzima *EcoR I*, 6  $\mu\text{L}$  do fragmento contendo a respectiva ORF + promotor, previamente purificada, e 1  $\mu\text{L}$  de enzima T4 DNA ligase (1 U/ $\mu\text{L}$ ). As reações foram mantidas por 14 horas a 14 °C.

Após o término das reações de ligação, 10  $\mu\text{L}$  de cada uma foram eletroporados em 40  $\mu\text{L}$  de suspensão de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, conforme descrito na seção 4.5.2, exceto para o antibiótico, o qual foi espectinomicina na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

As colônias que cresceram foram isoladas, semeadas em meio de cultura LB líquido contendo o antibiótico espectinomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas a 37 °C por 12 horas sob agitação constante a 200 rpm. Após a multiplicação das células, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada uma das preparações foi misturada a igual volume de glicerol 50% autoclavado e armazenada em tubo de 1,5 mL a -80 °C em ultracongelador. O restante foi utilizado para extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo descrito na seção 4.5.3. A concentração e a qualidade da preparação de DNA plasmidial foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

Para confirmar se os fragmentos estavam realmente inseridos nos vetores, foram realizadas reações de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada ORF em questão, conforme descrito na seção 4.8.1 com uma modificação: ao invés de utilizar o DNA cosmidial como molde, utilizou-se o DNA dos plasmídeos recombinantes.

Para cada uma das ORFs a ser complementada, foi produzido um lote de células competentes do respectivo mutante de Xac de acordo com protocolo sugerido por Yang (92) e colaboradores.

Os plasmídeos recombinantes (*p*HM1+ORF), que foram confirmados por PCR, foram transformados em células eletrocompetentes do respectivo mutante por meio de eletroporação em equipamento BioRad modelo Gene Pulser II. Dez microlitros da solução plasmidial foram adicionados a 40  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes e submetidos a um pulso elétrico de 1,8 kV sobre uma capacitância de 25  $\mu\text{F}$ . A frequência low range foi ajustada para 400 e a high range foi mantida no infinito. As bactérias eletroporadas foram incubadas por 1,5 horas a 28 °C e 200 RPM em 1 mL de meio SOC. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio TSA sólido acrescido de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antibiótico espectinomicina. Após 48 horas de incubação a 28 °C foi possível a visualização das colônias transformadas.

Cada um dos mutantes “complementados” foi multiplicado em meio de cultura TSA líquido acrescido de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do antibiótico espectinomicina por 24 horas, a 28 °C, sob agitação constante a 200 rpm. Após o processo de multiplicação, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada uma das culturas foi misturada a igual volume de glicerol 50% estéril e armazenada em tubo de 1,5 mL a -80 °C em ultracongelador. O restante foi utilizado para extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo descrito na seção 4.5.3. A concentração e a qualidade da preparação de DNA plasmidial foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos *pHM1* recombinantes de cada construção foram submetidos a reações de PCR para confirmação da inserção das ORFs. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nessas reações foram os mesmos utilizados para as amplificações iniciais das ORFs, bem como as condições de reação (seção 4.8.1). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação dos tamanhos dos fragmentos amplificados. As construções confirmadas por PCR foram submetidas a seqüenciamento automático conforme procedimentos descritos na seção 4.5.4, à exceção dos oligonucleotídeos utilizados, os quais foram substituídos pelos oligonucleotídeos específico à respectiva ORF a ser seqüenciada.

Os mutantes “complementados” foram inoculados em folhas de limoeiro cravo conforme procedimentos descritos na seção 4.3. Além do mutante “complementado”, foi inoculado o isolado selvagem de *Xac*, 306, o mutante e o mutante carregando somente o vetor *pHM1* sem nenhum inserto.

## **4.9 Análise da expressão gênica por meio de *Northern blot* reverso**

### **4.9.1 Extração de RNA total de *Xac***

Para obter RNA de células cultivadas em laranjeira, folhas de laranjeira Pêra plantadas em vasos de 20 litros foram completamente infiltradas com uma solução de células de *Xac* isolado 306 multiplicadas em placas de Petri, por 12 h, em meio de cultura NA, ajustada para uma DO a  $600_{nm}$  igual a 0,3. As células bacterianas foram multiplicadas *in planta* por 72 h.

Decorrido o período de multiplicação, as folhas inoculadas foram coletas e, imediatamente, fracionadas em tiras bem finas e colocadas em um Becker esterilizado contendo água destilada e mantido em banho de gelo. Para cada planta foi utilizado um Becker diferente. No meio aquoso, há a exsudação de células bacterianas a partir dos cortes gerados nas tiras de folhas. Para facilitar esse processo, o banho de gelo foi mantido sob agitação suave por 5 min. Em seguida, os restos foliares foram separados por filtração em gaze e as células foram recuperadas por centrifugação a 5.000 xg por 5 min a 4 °C.

Para obter RNA total de *Xac* cultivada em meio de cultura, células bacterianas foram multiplicadas em placa de Petri contendo meio de cultura NA por 12 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Após esse período de incubação, 1 mL da suspensão de células nama DO igual a 0,3

foi semeado em um Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura NA líquido. A suspensão celular foi multiplicada por 48 h conforme descrito anteriormente. Após o período de cultivo, as células foram coletas em frascos de vidro corex de 30 mL por meio de centrifugação.

Ao precipitado de células foram adicionados 4,3 mL de Trizol (Invitrogen). O pélete de células foi agitado até a completa suspensão, sendo, então, deixado em repouso por 5 min em temperatura ambiente para a completa lise das células. Em seguida, 1,7 mL de clorofórmio foi adicionado à solução e esta foi cuidadosamente homogeneizada antes de ser distribuída em 4 tubos Phase Lock Gel de 2 mL (Eppendorf). As amostras permaneceram em repouso por 3 min à temperatura ambiente, sendo, em seguida, submetidas à centrifugação a 10.000 xg por 10 min (Eppendorf 5415C). Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um tubo novo de microcentrífuga de 1,5 mL e o RNA foi precipitado pela adição de 500  $\mu$ L de álcool isopropílico em cada tubo. A solução foi gentilmente homogeneizada por inversão dos tubos, mantida a temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 12.000xg por 10 minutos (Eppendorff 5415C). Removido o sobrenadante, o sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 10.000xg por 5 min a 4 °C. Esta lavagem com etanol 75% foi repetida por mais uma vez. Finalmente, o RNA foi seco, solubilizado em H<sub>2</sub>O livre de RNA (água bi-destilada tratada com Dietil Pirocarbonato - DEPC - 0,01%), mantido em banho-maria a 65 °C por 15 min e analisado em Biofotômetro (Eppendorf), observando as relações entre as absorvâncias 260/280<sub>nm</sub> e 260/230<sub>nm</sub>. Para um RNA de boa qualidade, a primeira relação deve estar entre 1,8 e 2,0, enquanto que a segunda deve ser maior que 2,0.

As amostras foram divididas em alíquotas de 35  $\mu$ g, peletizadas e armazenadas a -80 °C até o uso.

#### 4.9.2 Tratamento de RNA total com DNase I

Antes do uso, cada alíquota de RNA foi solubilizada em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC e, em seguida, submetida ao tratamento com DNase I, a fim de eliminar possível contaminação por DNA. Para tanto, foi preparado uma reação em tubo de 1,5 mL contendo: 200  $\mu$ g de RNA total pré ressuspenso em água tratada com DEPC, 10  $\mu$ L de tampão de DNase (5x), 10  $\mu$ L de DNase 100 U/ $\mu$ L (Invitrogen), 2  $\mu$ L de Rnase Out 40 U/ $\mu$ L (Invitrogen), 1,5  $\mu$ L de DTT 0.1 M e água tratada com DEPC q.s.p 100  $\mu$ L.

Essa reação foi mantida a 37 °C por 30 min. Em seguida, completou-se o volume para 500  $\mu$ L com água DEPC, seguido de um acréscimo de outros 500  $\mu$ L de fenol pH 5,2, previamente

equilibrado com água. A amostra foi homogeneizada por meio de seguidas inversões do tubo e submetida à centrifugação a 5.000xg por 5 min. Ao final da centrifugação, o sobrenadante ( $\pm 800 \mu\text{L}$ ) foi transferido para um novo tubo isento de RNase e adicionado de 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. A amostra foi novamente homogeneizada da mesma maneira que anteriormente e submetida à centrifugação como no passo anterior. O sobrenadante ( $\pm 800 \mu\text{L}$ ) foi transferido para um novo tubo isento de RNase ao qual fora adicionado 50  $\mu\text{L}$  de NaOAc 3 M pH 5,2 e 1 mL de etanol absoluto. A amostra foi submetida à centrifugação a 10.000xg por 10 min. Após descarte do sobrenadante, 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados ao pélete, seguindo-se uma mistura por inversão e uma nova centrifugação a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi seco à temperatura ambiente por 10 min. Depois de seco, adicionaram-se 40  $\mu\text{L}$  de água DEPC pré aquecida a 50 °C à amostra e a mesma foi mantida em banho maria por 10 min a 50 °C. Logo após, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose, quantificada e armazenada em ultracongelador a -80 °C.

### **4.9.3 Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)**

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o conjunto de reagentes “SUPERS-CRIPT™ Preamplification system for first strand cDNA synthesis” (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Partiu-se de 35  $\mu\text{g}$  de RNA total de cada amostra, 100 ng dos hexaoligonucleotídeos iniciadores aleatórios e água tratada com DEPC para volume final de 12  $\mu\text{L}$ . A solução foi aquecida à 70 °C por 10 min e resfriada em gelo por 1 min. Adicionou-se, então, tampão que acompanha a enzima para 1 $\times$ ,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, dNTPs 500  $\mu\text{M}$  e DTT 10 mM. As amostras foram incubadas por 5 min à 25 °C e, em seguida, adicionaram-se 200 U de transcriptase reversa “Superscript II” e mantece a mostra por 10 min à 25 °C, 120 min à 42°C e, em seguida, as enzimas foram inativadas à 70 °C por 15 min. A estas foram adicionadas 2 U de RNase H às reações e manteve-se por 20 min à 37 °C, para a degradação das fitas de RNA remanescente nos híbridos cDNA:RNA. As soluções de cDNA foram armazenadas à -20 °C até o momento do uso.

### **4.9.4 Preparo das sondas, marcação, hibridização e detecção dos sinais**

Com o intuito de realizar a amplificação de 15 ORFs de Xac para as quais havia sido detectado algum tipo de deficiência quanto à patogenicidade/virulência, após terem sido mutadas conforme seção 4.2, 15 pares de oligonucleotídeos foram desenhados (Tabela 4.2). O produto da amplificação de material genético de Xac por meio do uso desses oligonucleotídeos foi utilizado na técnica

de “Northern blot” reverso, conforme descrito a seguir, com o objetivo de verificar uma possível expressão gênica diferencial nestes mutantes.

Procurou-se, na biblioteca de cosmídeos de Xac do laboratório e utilizada no projeto de seqüenciamento do genoma da bactéria, clones contendo as respectivas ORFs de interesse e procedeu-se a sua multiplicação e posterior extração de seu DNA, conforme já descrito na seção 4.5.3. As amostras de DNA foram então utilizadas em uma reação de PCR composta por uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min seguida de 35 ciclos, sendo que cada ciclo possui uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 s, uma etapa de pareamento de bases a 43 °C por 30 s e uma etapa de polimerização a 72 °C por 2 min. Ao final do total de ciclos foi aplicada sobre as amostras uma etapa de polimerização a 72 °C por 4 min, após o que as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento do uso.

A reação de amplificação foi composta de 0,2  $\mu$ L de DNA cosmidial, 5,0  $\mu$ L de tampão 10x que acompanha a enzima, 1,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1,0  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 2,5  $\mu$ L de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 37,5  $\mu$ L de água bi-destilada estéril e 0,3  $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

Uma alíquota (5  $\mu$ L) do produto da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. A reação foi considerada positiva para um respectivo gene quando o produto obtido, em pares de bases, foi único e igual ao tamanho esperado.

Uma alíquota de 400 ng de cada um dos produtos das ORFs positivas foi desnaturada por meio da adição de um volume de NaOH 0,4 N e aquecimento a 70 °C por 10 min. Em seguida, a solução foi colocada em gelo por 5 min e adicionou-se igual volume de acetato de amônio 2 M pH 7,0 gelado.

Paralelamente, as membrana de náilon carregadas positivamente (Hybond-N+ Amersham Biosciences), pré-equilibrada em SSC 6x (NaCl 0,9 M, citrato de sódio 90 mM) por 30 minutos, foram montadas em um sistema para a confecção de dot blot (Bio-Dot Apparatus BioRaid).

**Tabela 4.2:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das ORFs de Xac utilizados para análise da expressão gênica pela técnica de “Northern blot” reverso

<b>ORF</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Oligonucleotídeo F*</b>	<b>Oligonucleotídeo R*</b>
XACb0024	447	AGGATGCACATATGCCATAAT	ATTTATGACGGATCCTTTCAT
XAC0340	432	GATACCCCATATGAATGCCGAT	CAGGCCCAAGCTTATGCCATG
XAC0789	948	TCTTGCACATATGCCCTGATTC	CTGCCGTGAATTCATTCGCGGC
XAC0095	222	AGGAGAGCCATATGCACGACG	TTGCATCGAATTCAGTGCCTT
XAC1201	813	GATCATGCATATGGAGGCGTT	CCTGCCCAAGCTTAGTGCAGC
XAC1495	405	ATATCCTCATATGTCCAAATC	ATTTGACTCGAGACGGATCAG
XAC1927	1.179	GGAGTCTCATATGCTGACGCG	CCGGTACCCTCGAGTGTCTATG
XAC2047	1.224	GGATGGGCATATGGCAAGCAG	AACGGAGAATTCATGCCCTGCC
XAC3225	1.278	TCGGGTGTCATATGATCATGC	ATGCAGCCCTCGAGCGTACATC
XAC3457	648	CGGCATTCATATGACTCCCTT	CATCTGCCGATCCACATTACT
XAC3704	1.437	CAAGCGACATATGTTTCAGCG	TGTGGCGCTCGAGTTCCTATC
XAC3839	1.635	TCCAACTTCATATGGGACAAG	GGCGATGGAGCTCATGTGGGT
XAC3980	1.437	AATCCGTTCATATGCCGACCCGCT	TCGGTACAGAGCTCGTCAACG
XAC4040	993	GGAGCCTTCATATGGCCCAACC	CAGGCCGAGCTCTCAGCCGTG
XAC4160	3.195	AGGGGCTTCATATGCTGACCA	TGCATCCTCGAGACGCCCGCT

\* F → oligonucleotídeo no sentido direto; R → oligonucleotídeo no sentido reverso; todos estão escritos da posição 5' para a 3'

Para assegurar a desnaturação do DNA, um volume de 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,4 N foi aplicado, sob vácuo, em cada cavidade do aparato de transferência. Em seguida, as amostras de DNA representando as ORFs de interesse, previamente desnaturadas, foram transferidas, sob vácuo, para a membrana. Estas foram lavadas em SSC 2x rapidamente e o DNA foi fixado em um forno ultravioleta “crosslinker” (UVP CL-1000), conforme recomendação do fabricante da membrana (Amersham Biosciences). Posteriormente, a membrana foi acondicionada em um saco plástico, lacrada e mantida em geladeira até a hora do uso.

Após a síntese da primeira fita de cDNA, conforme seção 4.9.3, esta foi marcada, individualmente, com fosfatase alcalina utilizando-se o conjunto de reagentes alkphos direct labelling kit (Amersham Biosciences) conforme instruções do fabricante.

A membrana foi pré-hibridizada, hibridizada e procedido às lavagens de pós-hibridização utilizando o mesmo conjunto de reagentes conforme instruções do fabricante.

A detecção foi realizada com o reagente CDP-Star (Amersham Biosciences), mantendo-se por 5 min a temperatura ambiente. Após drenagem do excesso de reagente, a membrana foi exposta a um filme de raio-X (Kodak) por 1 hora. Em seguida, o filme foi revelado e a imagem digitalizada por meio de equipamento apropriado.

Foram preparadas duas membranas iguais, as quais foram utilizadas para a repetição do experimento. Em uma delas, primeiramente se hibridizou a condição de cultivo em meio de cultura e depois a condição de cultivo *in planta* com três dias de crescimento. Já para a outra membrana, realizou-se exatamente o contrário: primeiramente hibridizou-se a condição de cultivo *in planta* com três dias de crescimento e depois a condição de cultivo em meio de cultura.

Em ambas as situações, a remoção dos alvos da membrana por adição à mesma de uma solução de SDS a 0,1% em ebulição, sendo que a membrana permaneceu nesta solução até o seu completo resfriamento à temperatura ambiente.



## 5 *Resultados*

### 5.1 *Análise de mutantes e teste de patogenicidade in vivo*

Para identificar e caracterizar genes envolvidos nos processos de patogenicidade e virulência em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri isolado 306, construiu-se uma biblioteca com cerca de 10.000 mutantes obtidos por meio de inserção aleatória do transposon *Tn5*.

A fim de verificar se a inserção do transposon afetou a habilidade de Xac em causar doença, 3.300 mutantes dessa biblioteca foram inoculados em mudas de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Dentre os mutantes obtidos, 122 induziram algum tipo de variação na sintomatologia.

A região onde o transposon se inseriu foi determinada para 106, dos 122 mutantes selecionados inicialmente (Tabela 5.1), pois em 16 deles não foi possível identificar a seqüência de nucleotídeos, visto que os cromatogramas se apresentaram característicos de seqüências múltiplas. A análise dos cromatogramas obtidos para estes 106 mutantes possibilitou verificar que em 98 deles o transposon se inseriu na região codificadora, em 8 a inserção ocorreu na região 5' da ORF, provavelmente na região promotora, e em 1 mutante a inserção se deu numa região intergênica distante do início da ORF adjacente (Tabela 5.1). Além disso, 11 ORFs foram alvejadas em dois mutantes independentes, sendo que em dois deles, 17B07 e 19H08, cuja ORF mutada foi a XAC4291, a inserção ocorreu na região 5'. Em um caso, ORF XAC3265, a mutação ocorreu tanto na região 5' (mutante 10E12) como na região codificadora da ORF (mutante 19D09). Em dois casos, uma mesma ORF foi alvejada em três mutantes diferentes: ORF XAC2047, nos mutantes 10H09, 11A04 e 11H07, e ORF XAC2072, nos mutantes 18H02, 18H11 e IIA11. Em todos os casos, os mutantes apresentaram o mesmo fenótipo, obtido por avaliações independentes e em épocas diferentes sem se ter o conhecimento prévio das seqüências alvejadas.

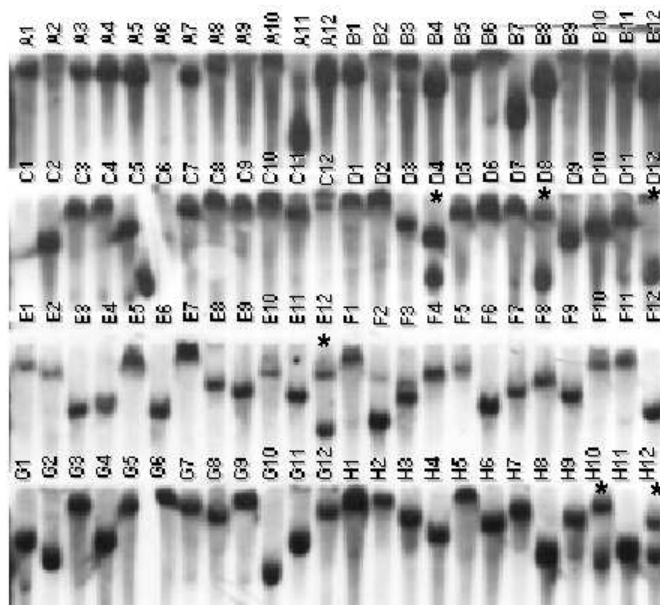
Com base na classificação proposta pelo TIGR (<http://www.tigr.org>), os genes mutados presentes nas ORFs se distribuem em diversas categorias: três são classificados como pertencentes à biossíntese de aminoácidos; quatro pertencem à classe biossíntese de cofatores, grupos prostéticos

e mensageiro; três estão envolvidos com o envelope celular; quatro participam de processos celulares, tais como patogenicidade (*xrvA*) e motilidade e quimiotaxia (*tsr* e *uptC*); dois fazem parte do metabolismo intermediário central; dois fazem parte do metabolismo de DNA; oito participam do metabolismo energético; quatro fazem parte da biossíntese de ácidos graxos e de fosfolípidios; oito foram classificados como proteínas hipotéticas; dois são constituintes de elementos genéticos móveis; para catorze não existem informações suficientes para poder classificá-los; sete participam do endereçamento de proteínas, tais como o gene *hrpB4* e *xpsD*, cuja proteína está envolvida no processo de secreção de peptídeos e proteínas, dentre outros envolvidos na síntese protéica (*prmA*), na degradação de proteínas, peptídeos e glicoproteínas e envolvidos no enovelamento e estabilização de proteínas; um participa da síntese protéica (*prmA*); seis participam de funções regulatórias (regulador transcricional, quinase serina/treonina, proteína híbrida de resposta à histidina quinase, proteína relacionada à transcrição, proteína hipotética conservada e uma histidina quinase); um codifica uma DNA polimerase (XAC3704), relacionada ao reparo de DNA; um classificado como proteína de patogenicidade, virulência e adaptação; nove estão relacionados ao transporte de proteínas; oito não classificadas e uma possui função desconhecida (Tabela 5.1). Além disso, verifica-se que em três mutantes houve mutagênese em três ORFs relacionadas a produção de RNA ribossomal e uma inserção transposômica não afetou nenhuma ORF. Desse modo, verifica-se que dentre os 106 mutantes existem 91 ORFs distintas mutadas (Tabela 5.1).

Após o término do seqüenciamento e mapeamento da região de inserção do transposon, todos os 106 mutantes, previamente selecionados por apresentarem desvios quanto à sintomatologia padrão do cancro cítrico quando inoculados *in planta*, foram novamente multiplicados em meio de cultura e inoculados em mudas de limoeiro cravo por mais duas vezes, a fim de garantir a repetibilidade dos resultados preliminarmente obtidos. Ao final da quarta inoculação, 56 mutantes foram confirmados como defectivos para a virulência ou deficientes na elicitação da sintomatologia padrão da doença, sendo que os demais reverteram ao fenótipo selvagem.

Com base nos sintomas apresentados por cada um dos mutantes, estes foram agrupados em nove classes: ausência de encharcamento com leve hiperplasia sem necrose (*ws0*, *hyp-*, *nec0*); hiperplasia diminuída com necrose diminuída (*hyp-*, *nec-*); hiperplasia diminuída com necrose (*hyp-*, *nec*); ausência de hiperplasia com necrose (*hyp0*, *nec*); hiperplasia diminuída (*hyp-*); elicitação de necrose leve (*nec-*); cancro levemente branco (“light tan canker”) e ausência total de sintomas (*ats*) (Figura 5.2).

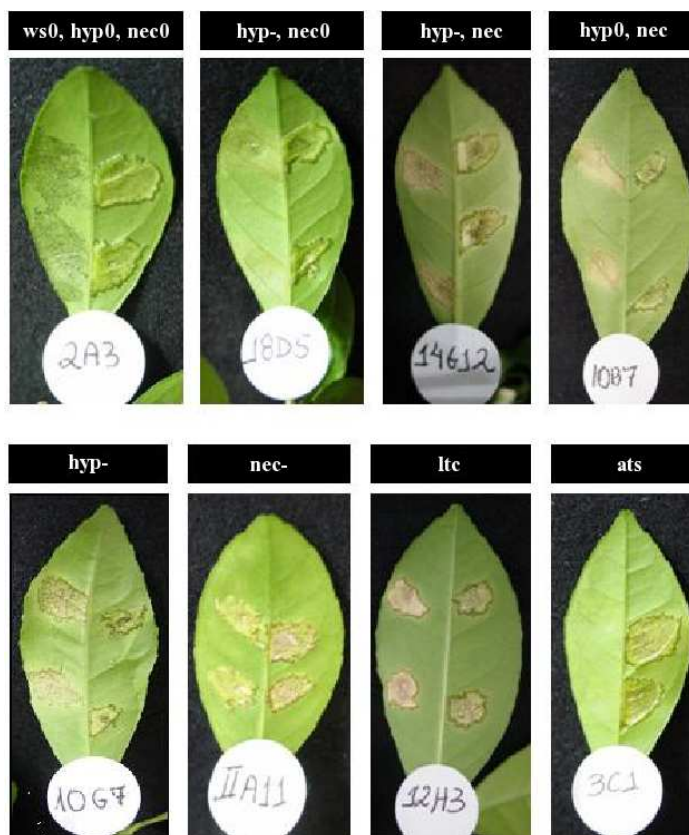
Dentre os 56 mutantes confirmados como tendo algum tipo de deficiência na patogenicidade ou



**Figura 5.1:** “Southern blot” de 96 mutantes de *Xac* tomados ao acaso na biblioteca. O DNA isolado de cada mutante foi clivado com *EcoR* I e a membrana foi hibridizada com seqüência do transposon *Tn5* marcado com o conjunto de reagentes AlkPhos Direct RPN 3680 (Amersham Biosciences), conforme seção 4.6. Mutantes com dupla inserção estão destacados por um asterisco

na elicitação da sintomatologia padrão da doença, a inserção do transposon ocorreu em 44 ORFs distintas. As ORFs XAC2047 (*phaE*) e XAC2072 (*ugpC*) foram afetadas em três mutantes distintas cada uma. Já as ORFs XAC4291, XAC3263, XAC0014 (*cls*), XAC3245, XAC3607 (*uptC*), XAC1201, XAC1927 (*aslB*) e XAC2616 (*virB2*) foram afetadas em dois mutantes diferentes cada uma, sendo que na ORF XAC4291 a inserção do transposon ocorreu na extremidade 5’ dessa ORF nos dois mutantes.

A análise por “Southern blot” (Figura 5.1) de 96 clones da biblioteca de mutantes, tomados ao acaso, possibilitou estimar que o número de clones de *Xac* com inserções duplas no genoma é de aproximadamente 6 mutantes a cada 96 mutantes constituintes da biblioteca, ou seja, apenas 6,25% dos clones apresentam inserção dupla. Nenhum dos mutantes com patogenicidade alterada confirmada possui inserções duplas, uma vez que as duas seqüências obtidas para cada mutante (a partir de cada uma das extremidades do transposon) se complementam, não deixando dúvidas tratar-se de inserção em uma única ORF específica.



**Figura 5.2:** Diferentes sintomas apresentados por diferentes mutantes de Xac: ausência de encharcamento com leve hiperplasia sem necrose (ws0, hyp-, nec0); hiperplasia diminuída com necrose diminuída (hyp-, nec-); hiperplasia diminuída com necrose (hyp-, nec); ausência de hiperplasia com necrose (hyp0, nec); hiperplasia diminuída (hyp-); elicitação de necrose leve (nec-); cancro levemente branco (ltc) e ausência total de sintomas (ats)

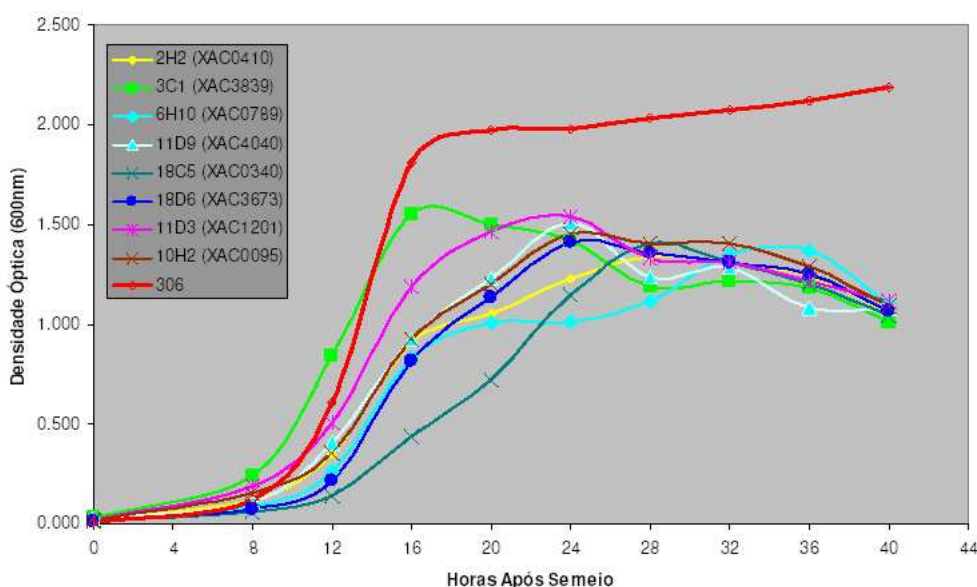
## 5.2 Determinação da curva de crescimento *in vitro* e *in planta*

A estirpe selvagem (306), *in vitro*, apresentou uma curva de crescimento com as três fases, lag, log e estacionária, bem definidas (Figura 5.3). A fase logarítmica começou após oito horas de cultivo e a fase estacionária iniciou-se após 16 horas. Entre o início (tempo 0) e 8 horas após o início das avaliações, os mutantes 03C01, 11D03 e 10H02 apresentaram crescimento ligeiramente superior ao do isolado selvagem, sendo que o 03C01 continuou com crescimento superior até um pouco mais de 12 horas de cultivo. Todos os mutantes apresentaram uma fase lag característica, mas, as demais fases destoam do apresentado pelo 306, exceto para o 03C01, o qual apresenta as fases lag e log muito parecidas com a do isolado selvagem.

Entre 16 e 24 horas de cultivo, a maioria dos mutantes apresentou incremento no crescimento,

exceto o mutante 03C01, o qual atingiu o seu crescimento máximo próximo a 16 horas, iniciando, a partir dali, um processo de queda do crescimento evidenciado por uma queda na densidade óptica. Interessante notar que, a partir de 24 horas há uma tendência de queda na densidade óptica medida para todos os mutantes, indicando que a multiplicação celular foi inibida ou cessada, acompanhada por reduzida morte celular.

Dentre todos os mutantes, o 03C01 foi o que apresentou o ponto máximo (OD igual a 1.500) e mínimo (OD igual a 1.000) de crescimento. Já o mutante 18C05 apresentou as menores densidades ópticas do início até um pouco mais de 20 horas de cultivo (Figura 5.3), sendo, portanto, o que se multiplicou mais lentamente nesse período.

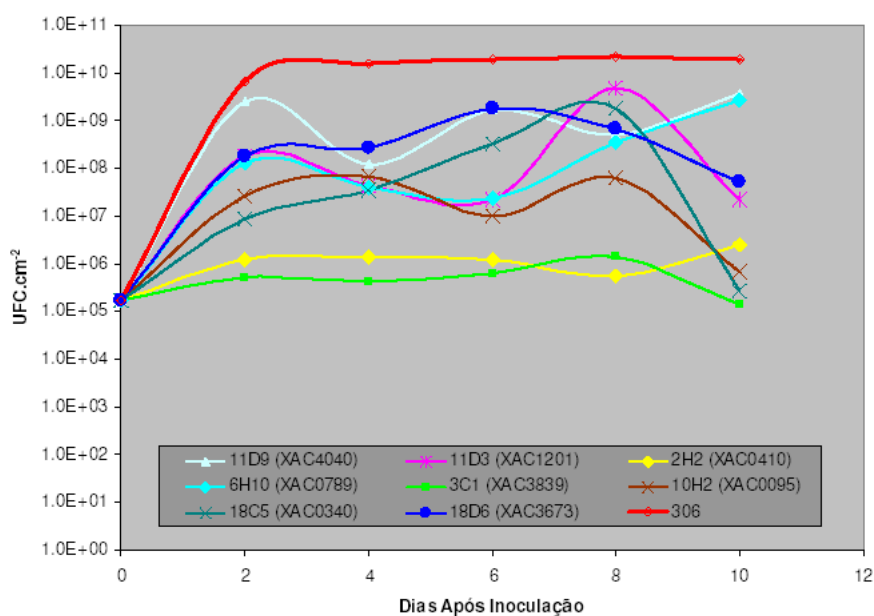


**Figura 5.3:** Curva de crescimento *in vitro* apresentada por oito mutantes de Xac e pela estirpe selvagem durante 40 horas de cultivo em meio de cultura TSA.

Apesar de todos os mutantes terem sido inoculados com a mesma quantidade de células, inclusive a estirpe selvagem, com dois dias de crescimento é possível observar diferenças entre si quanto à concentração celular (Figura 5.4). O isolado 306 selvagem apresentou incremento celular acentuado entre zero e dois dias e crescimento lento entre dois e quatro dias, sendo que a partir desse ponto a curva de crescimento *in planta* permaneceu constante até o 10º dia e próxima a  $1 \times 10^{10}$  células por  $\text{cm}^2$  de área foliar. Os mutantes 03C01 e 02H02 passaram de  $1 \times 10^5$  para aproximadamente  $10^6$  células por  $\text{cm}^2$  de área foliar entre zero e dois dias, mantendo, a partir daí, a densidade celular constante até o 8º dia, quando então o mutante 03C01 que cai para o valor inicial de  $1 \times 10^5$  e o mutante 02H02 apresenta um ligeiro acréscimo.

Assim como *in vitro*, o mutante 18C05 apresentou uma curva de crescimento distinta dos demais. A curva deste mutante mostra uma taxa de incremento celular constante até o oitavo dia após a inoculação, muito parecida com uma reta do tipo  $y = a + bx$ , com  $a$  e  $b$  positivos. A partir do oitavo dia a concentração celular decresce rapidamente chegando muito próximo do valor mínimo observado para o mutante 03C01.

Observa-se que os mutantes 11D09, 06H10 e 02H02 são os únicos que apresentam tendência de incremento na concentração celular após o oitavo dia, sendo que todos os outros apresentam exatamente o inverso. A curva apresentada pelo mutante 11D09 é similar ao isolado selvagem até o segundo dia, quando então começa a flutuar, como sobe e desce até o 10º dia.



**Figura 5.4:** Curva de crescimento *in planta* apresentada por oito mutantes de Xac e pela estirpe selvagem durante 10 dias em folhas de laranjeira Pêra.

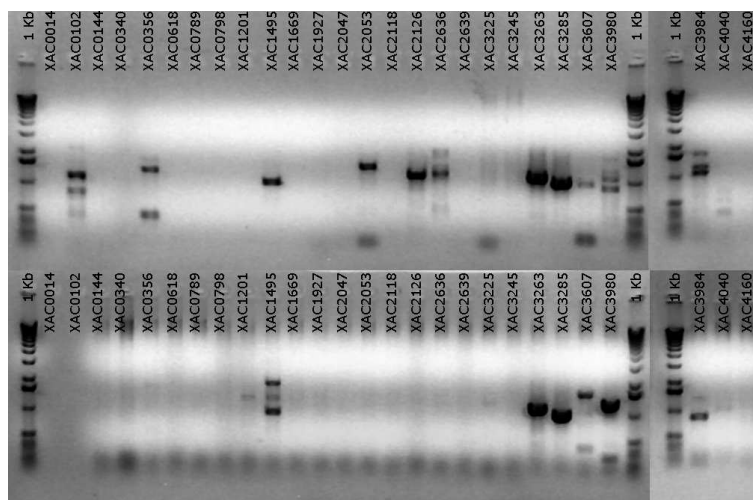
### 5.3 Complementação de mutantes com patogenicidade alterada

Não foi possível realizar as amplificações das 27 ORFs (Tabela 4.1) selecionadas numa mesma condição (temperatura de pareamento de bases, concentração de DNA molde, dentre outros) não foi possível. A Figura 5.5 mostra o resultado de uma amplificação onde é possível verificar a presença e ausência de produto amplificado, bem como amplificações de fragmentos inespecíficos. A produção de múltiplas bandas foi resolvida por meio de purificação da banda de tamanho desejado e posterior execução de uma PCR aninhada (amplificação de um fragmento de DNA previamente amplificado

por PCR e isento de contaminantes), quando houve necessidade. Algumas outras somente foram amplificadas a partir de DNA extraído de cosmídeo (XAC2053 e XAC2126), enquanto que outras somente a partir de DNA total (XAC3607 e XAC3980) (Figura 5.5).

A temperatura de pareamento de bases entre os oligonucleotídeos e o DNA molde também variou, desde 41 a 46 °C.

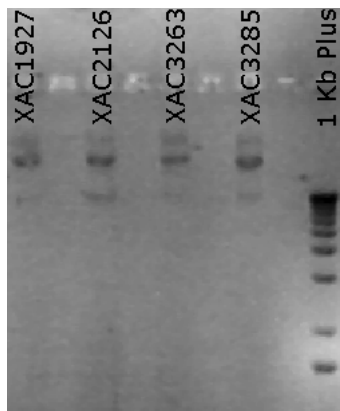
A concentração de DNA também influenciou os resultados das ampliações. Em geral, concentrações em torno de 50 ng/ $\mu$ L foi suficiente, mas, em raras ocasiões, uma concentração em torno de 200 ng/ $\mu$ L foi requerida. Desse modo, dentre as ORFs amplificadas, escolheram-se quatro (ORFs XAC1927, XAC2126, XAC3263 e XAC3285), as quais codificam para Fe-S oxidoreductase, proteína hipotética conservada, proteína hipotética e proteína hipotética, respectivamente.



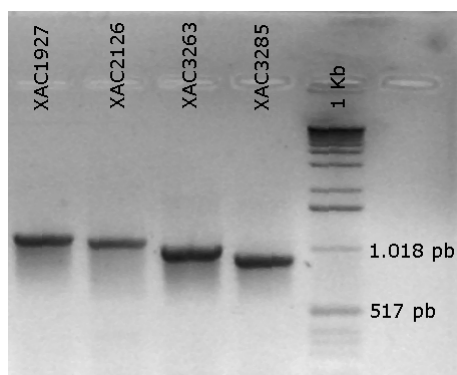
**Figura 5.5:** Perfil de amplificação por PCR de 27 ORFs completas (ORF + região promotora) de *Xac*. A parte superior da figura mostra o padrão de amplificação quando se utilizou DNA de clones de cosmídeos como DNA molde. A parte de baixo mostra o padrão quando o DNA molde utilizado foi DNA genômico de *Xac*. Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o DNA ladder de 1,0 Kb (Invitrogen).

Cada um destes quatro fragmentos de DNA (ORF e respectivo promotor) foi clonado no vetor *pHM1* (91) (Figura 5.6), conforme descrito na seção 4.8, o qual se replica tanto em *E. coli* quanto em bactérias do gênero *Xanthomonas*. A migração em gel de agarose dos respectivos fragmentos de DNA, amplificados por PCR a partir do vetor *pHM1* carregando os insertos, indica que cada um dos insertos possui o tamanho esperado para os quatro fragmentos de DNA, contendo a ORF e o seu respectivo promotor, (Figura 5.7). Observa-se que a posição do fragmento amplificado está acima da posição esperada para o tamanho da respectiva ORF, fato este que se deve à clonagem não apenas da ORF, mas também de seu promotor (região de aproximadamente 500 pb). Uma vez confirmado

por PCR, os insertos presentes no vetor *pHM1* foram seqüenciados, fato este que confirmou os resultados obtidos por meio de PCR.



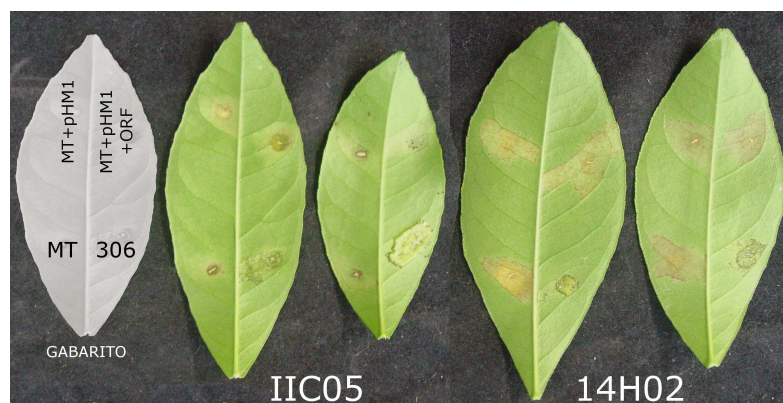
**Figura 5.6:** Preparação plasmidial do vetor *pHM1* transformado com ORFs de *Xac* após eletroforese em gel de agarose 1,0%. Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o DNA ladder de 1,0 kb (Invitrogen).



**Figura 5.7:** Perfil de amplificação por PCR de quatro ORFs, mais a região promotora, de *Xac*, utilizando como DNA molde preparações plasmidiais do vetor *pHM1* previamente transformados com as respectivas ORFs. ORF Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o DNA ladder de 1,0 kb (Invitrogen)

Apesar de todo o esforço e das várias tentativas até se obter o mutante transformado com o plasmídeo *pHM1* recombinante, a complementação destas quatro ORFs, infelizmente, não apresentou os resultados esperados. Em dois mutantes complementados, 10F02 (*XAC3285*) e 10G07 (*XAC3263*), todas as inoculações (mutante original, mutante carregando *pHM1* sem inserto, mutante carregando *pHM1* com a respectiva ORF clonada e isolado selvagem 306) apresentaram sintomatologia característica de *Xac* (resultado não mostrado), indicando uma nítida contaminação com o isolado selvagem. Já para os outros dois (IIC05, *Xac2126*, e 14H02, *Xac1927*), somente o isolado selvagem apresentou sintomas (Figura 5.8).

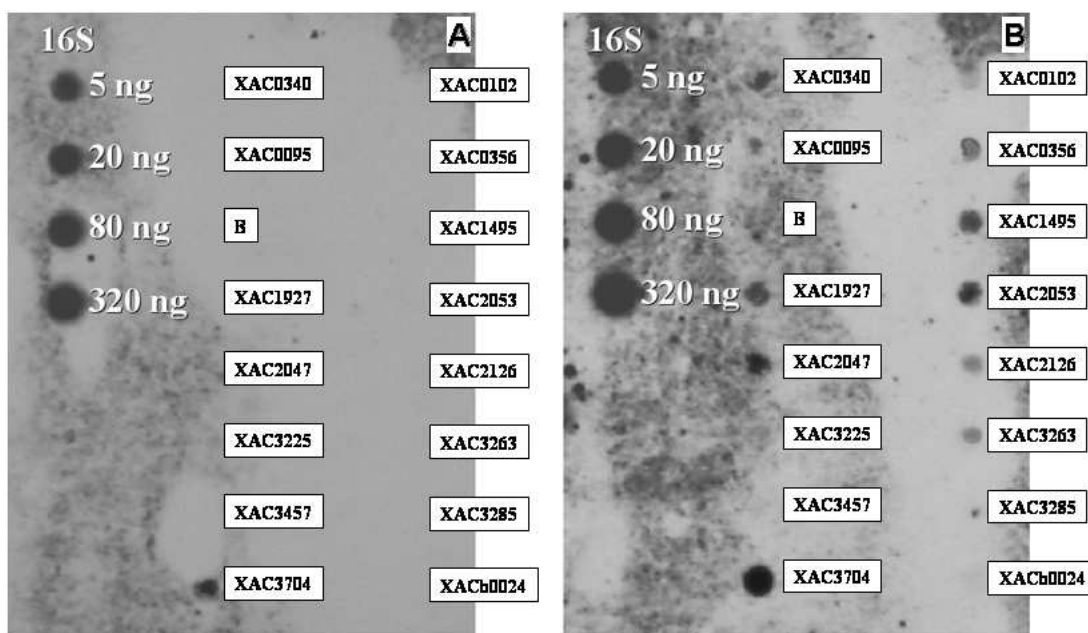




**Figura 5.8:** Sintomatologia apresentada por mutantes (IIC05 e 14H02) de Xac e pelo isolado selvagem (306). 306 = local inoculado com o isolado selvagem; MT = local inoculado com o respectivo mutante; MT+pHM1 = local inoculado com o respectivo mutante transformado com o vetor *pHM1*; MT+pHM1+ORF = local inoculado com o respectivo mutante transformado com o vetor *pHM1* carregando a respectiva ORF intacta.

## 5.4 Análise da expressão gênica por meio de *Northern blot* reverso

As ORFs XAC0102, XAC0356, XAC1495, XAC2053, XAC2126, XAC3263, XAC3285, XACb0024, XAC0340, XAC0095, XAC1927, XAC2047 e XAC3225 somente são expressas quando Xac é multiplicada em folhas de laranjeira Pêra, não sendo possível identificar expressão dessas ORFs quando a bactéria foi multiplicada em meio de cultura. Uma única ORF, XAC3457, não apresentou expressão sensível ao método de detecção utilizado em nenhuma das duas condições avaliadas (*in vitro* e *in vivo*). Já a ORF XAC3704 foi expressa tanto em meio de cultura quanto *in vivo*. No entanto, a expressão em meio de cultura, visualmente, foi menor que *in planta* (Figura 5.9). Este mesmo resultado foi observado nas duas repetições independentes deste experimento.



**Figura 5.9:** “Northern blot” reverso de 15 genes de *Xac* envolvidos na patogenicidade por meio do uso de mutagênese ao acaso. A) expressão gênica dessas ORFs quando *Xac* foi multiplicada em meio de cultura por 24 h. B) expressão gênica dessas ORFs quando *Xac* foi multiplicada em folhas de laranja Pêra por 3 dias.

**Tabela 5.1:** Mutantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri isolado 306 e provável proteína codificada pela ORF mutada, bem como o respectivo fenótipo elicitado em plantas de limoeiro cravo

Mutante	Locus <sup>1</sup>	Gene	Nome Comum	Pos. 5' <sup>2</sup>	Pos. 3' <sup>3</sup>	Categoria Principal <sup>4</sup>	Fenótipo <sup>5</sup>
05F10	NS <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-
08G02	NS	-	-	-	-	-	-
10A01	NS	-	-	-	-	-	-
10B06	NS	-	-	-	-	-	-
10E08	NS	-	-	-	-	-	-
10F11	NS	-	-	-	-	-	-
11A03	NS	-	-	-	-	-	-
11B03	NS	-	-	-	-	-	-
11B11	NS	-	-	-	-	-	-
11E08	NS	-	-	-	-	-	-
11F07	NS	-	-	-	-	-	-
12H12	NS	-	-	-	-	-	-
19H09	NS	-	-	-	-	-	-
CD07	NS	-	-	-	-	-	-
XD04	NS	-	-	-	-	-	-
XD07	NS	-	-	-	-	-	-
18H01	NS	-	-	-	-	-	-
19H06	XAC3893	-	RNA ribossomal	4579561	4576684	-	-
17B07* <sup>8</sup>	XAC4291	-	RNA ribossomal	5070843	5069300	-	hyp -, nec
19H08*	XAC4291	-	RNA ribossomal	5070843	5069300	-	hyp -, nec
32F06	XAC0059	asn	proteína semelhante a asparagina sintase	74228	72303	Biossíntese de aminoácidos	-
33E07	XAC0336	metE	5-metiltetrahidropteril-triglutamato-homocisteína metiltransferase	401371	402399	Biossíntese de aminoácidos	-

Continua na próxima página

Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
15H10	XAC3457	leuD	3-isopropilmalato desidratase subunidade menor	4080114	4079467	Biossíntese de aminoácidos	hyp 0, nec
04E01	XAC0387	bioF	8-amino-7-oxononoato sintase	458687	457482	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e mensageiro	–
10E09	XAC2762	ispA	geraniltransferase	3234631	3235506	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e mensageiro	–
14B12	XAC3589	–	proteína de membrana integral	4255195	4256640	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e mensageiro	–
11D09	XAC4040	hemB	ácido delta-aminolevulínico desidratase	4733187	4732195	Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e mensageiro	ausência de sintomas
10H01	XAC2730	–	proteína hipotética conservada	3192399	3193904	Desconhecida	–
10F08	XAC3320	–	transposase ISxac3	3907810	3907004	Elementos genéticos móveis	hyp 0, nec
12H03	XACb0067	–	transposase <i>Tn5045</i>	–	–	Elementos genéticos móveis	light tin canker
02H02	XAC0410	hrpB4	Proteína HrpB4	480399	481028	Endereçamento de proteína	ausência de sintomas
29H4	XAC0669	prc	protease específica para cauda	793114	795297	Endereçamento de proteína	–
18H09	XAC1085	ppiD	isomerase cis-trans peptidil-profil	1238644	1240614	Endereçamento de proteína	–
16D03	XAC3534	xpsD	proteína D do sistema geral de secreção	4180846	4178555	Endereçamento de proteína	–

Continua na próxima página

Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
19E12	XAC3898	–	proteína hipotética conservada	4583700	4585118	Endereçamento de proteína	–
19B06	XAC3980	htrA	protease DO	4673409	4674845	Endereçamento de proteína	ausência de sintomas
23G12	XAC3987	–	leucina aminopeptidase	4678747	4680129	Endereçamento de proteína	–
29C08	XAC3987	–	leucina aminopeptidase	4678747	4680129	Endereçamento de proteína	–
17F10	XAC0024	–	proteína hipotética conservada	27117	25882	Envelope celular	–
19D08	XAC0046	rffM	transferase UDP-N-acetil-D-manosamina	57200	56424	Envelope celular	–
18F08	XAC0677	–	proteína hipotética conservada	803053	803868	Envelope celular	–
18H03	XAC0671	–	regulador transcricional	796213	797118	Funções regulatórias	–
16D06	XAC1171	stkXac1	quinase serina/treonina	1333193	1332144	Funções regulatórias	–
18H08	XAC1669	–	proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta	1925794	1927824	Funções regulatórias	hyp -, nec
12G12	XAC2053	tex	proteína relacionada à transcrição	2396350	2398710	Funções regulatórias	hyp 0, nec
12G07	XAC3288	–	proteína hipotética conservada	3868212	3867874	Funções regulatórias	–
18D06	XAC3673	–	histidina quinase	4350149	4351885	Funções regulatórias	ausência de sintomas
19C02	XAC0014	cls	cardiolipina sintetase	16228	14768	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios	hyp -, nec
IC02	XAC0014	cls	cardiolipina sintetase	16228	14768	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios	hyp -, nec
19H07	XAC0521	cdsA	Fosfotidato citidiltransferase	611816	612748	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios	–

Continua na próxima página

Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
14C03	XAC2048	phbC	sintase poli (ácido 3-hidroxi-buti-rico)	2392784	2393860	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios	-
14C10	XAC3486	phbB	redutase acetoacetil-CoA	4119840	4120580	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios	-
14D11	XAC3486	phbB	redutase acetoacetil-CoA	4119840	4120580	Metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídios	-
17F02	XAC2639	-	DNA-metiltransferase sítio específico	3105074	3104373	Metabolismo de DNA	hyp 0, nec
18E09	XAC4110	polA	DNA polimerase I	4817927	4815123	Metabolismo de DNA	-
11G01	XAC0356	pobA	hidroxilase hidroxibenzoato	424556	425740	Metabolismo energético	hyp -, nec
18H12	XAC0446	pdhA	piruvato desidrogenase E1 subunidade alfa	532846	531758	Metabolismo energético	-
10B07	XAC0798	amy	alfa-amilase	948664	947237	Metabolismo energético	hyp 0, nec
33F08	XAC1258	cyoA	citocromo O oxidase subunidade II	1435886	1436821	Metabolismo energético	-
09A10	XAC1852	-	proteína hipotética conservada	2148695	2148291	Metabolismo energético	-
14H02	XAC1927	aslB	Fe-S oxidoreductase	2251490	2252668	Metabolismo energético	hyp 0, nec
25D11	XAC1927	aslB	Fe-S oxidoreductase	2251490	2252668	Metabolismo energético	hyp 0, nec
10H09	XAC2047	phaE	PHA synthase subunit	2391564	2392787	Metabolismo energético	hyp 0, nec
11A04	XAC2047	phaE	PHA synthase subunit	2391564	2392787	Metabolismo energético	hyp 0, nec
11H07	XAC2047	phaE	PHA synthase subunit	2391564	2392787	Metabolismo energético	hyp 0, nec

Continua na próxima página

Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
34G10	XAC3211	ostA	trehalose-6-phosphate synthase	3781628	3782995	Metabolismo energético	–
18G05	XAC0279	–	proteína hipotética conservada	333341	334003	Metabolismo diário central	–
09E08	XAC3819	gst	glutathione transferase	4494481	4493858	Metabolismo diário central	–
18C05	XAC0340	–	proteína hipotética conservada	407014	407445	Não classificado	ausência de sintomas
06H10	XAC0789	–	DGTP-pyrophosphohydrolase	937190	938137	Não classificado	ausência de sintomas
11C09	XAC1201	–	proteína hipotética conservada	1370688	1371500	Não classificado	hyp 0, nec
11D03	XAC1201	–	proteína hipotética conservada	1370688	1371500	Não classificado	hyp 0, nec
03C01	XAC1266	hrpXct	HrpX protein	1446457	1447887	Não classificado	ausência de sintomas
17C08*	XAC2536	–	proteína hipotética conservada	2988543	2986186	Não classificado	–
14B07*	XAC3136	exsG	two-component system sensor protein	3688884	3687877	Não classificado	hyp 0, nec
18D05	XAC3225	mltB	transglycosylase	3800263	3798986	Não classificado	hyp -, nec -
14G01	XAC3245	–	RhsD protein	3823370	3827902	Não classificado	hyp -, nec
14G12	XAC3245	–	RhsD protein	3823370	3827902	Não classificado	hyp -, nec
11B08	XACb0015	pthA3	avirulence protein pthA	–	–	Patogenicidade, virulência e adaptação	hyp -, nec
14H05	XAC0618	hrpM	periplasmic glucan biosíntese protein	732370	734268	Processos celulares	ws 0, hyp -, nec 0
08B07	XAC1495	xrvA	virulence regulator	1727260	1727664	Processos celulares	ws 0, hyp -, nec 0
12D06	XAC1902	tsr	chemotaxis protein	2225985	2223874	Processos celulares	–
13D10	XAC3607	uptC	type II secretion system protein-like protein	4278514	4279647	Processos celulares	hyp -, nec

Continua na próxima página

Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
14D01	XAC3607	uptC	type II secretion system protein-like protein transport protein	4278514	4279647	Processos celulares	hyp -, nec
32B11	XAC0057	hetA		71480	69732	Proteína de ligação e transporte	-
14E06	XAC0144	iroN	TonB-dependent receptor	169510	172290	Proteína de ligação e transporte	hyp 0, nec
11G08	XAC0756	kdpA	potassium-transporting ATPase A chain	896674	898467	Proteína de ligação e transporte	hyp -, nec
18H02	XAC2072	ugpC	sugar ABC transporter ATP-binding protein	2421193	2422281	Proteína de ligação e transporte	nec -
18H11	XAC2072	ugpC	sugar ABC transporter ATP-binding protein	2421193	2422281	Proteína de ligação e transporte	nec -
IIA11	XAC2072	ugpC	sugar ABC transporter ATP-binding protein	2421193	2422281	Proteína de ligação e transporte	nec -
34H11	XAC3368	-	proteína hipotética conservada	3967496	3968215	Proteína de ligação e transporte	-
34C02	XAC3444	btuB	TonB-dependent receptor	4058551	4055705	Proteína de ligação e transporte	-
16B05	XAC3471	dctA	C4-dicarboxylate transport protein	4102327	4100954	Proteína de ligação e transporte	-
18A01	XAC3600	wzt	ABC transporter ATP-binding protein	4272891	4271662	Proteína de ligação e transporte	hyp -
02A03	XAC4160	czcA	cation efflux system protein	4892560	4889366	Proteína de ligação e transporte	ws 0, hyp -, nec 0
16G10	XAC0102	-	proteína hipotética conservada	117721	118380	Proteínas hipotéticas	light tin canker
17E05	XAC2118	-	proteína hipotética conservada	2474506	2476239	Proteínas hipotéticas	hyp -, nec
05F12	XAC2273	-	proteína hipotética	2657818	2659290	Proteínas hipotéticas	-

Continua na próxima página



Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
12H07	XAC2731	-	proteína hipotética con-servada	3194578	3193958	Proteínas hipotéticas	-
08D06	XAC3364	-	proteína hipotética con-servada	3960118	3962004	Proteínas hipotéticas	-
05B12	XAC3795	-	proteína hipotética con-servada	4465141	4464083	Proteínas hipotéticas	-
17F01*	XACb0024	-	proteína hipotética	-	-	Proteínas hipotéticas	hyp -, nec
18E08	XACb0057	-	proteína hipotética	-	-	Proteínas hipotéticas	-
10H02*	XAC0095	-	proteína hipotética con-servada	111406	111185	Sem Dados	hyp -, nec
25D8	XAC0259	-	proteína hipotética con-servada	309167	311827	Sem Dados	-
28C4	XAC0732	-	proteína hipotética	872669	873469	Sem Dados	-
30F6	XAC1491	-	proteína hipotética	1723743	1724402	Sem Dados	-
IIC05	XAC2126	-	proteína hipotética con-servada	2482216	2482842	Sem Dados	hyp -, nec
13B01	XAC2616	virB2	VirB2 protein	3082394	3081984	Sem Dados	ws 0, hyp -, nec 0
13C02	XAC2616	virB2	VirB2 protein	3082394	3081984	Sem Dados	ws 0, hyp -, nec 0
19A09	XAC2636	-	proteína hipotética	3099741	3101726	Sem Dados	hyp 0, nec
10G07	XAC3263	-	proteína hipotética	3843458	3842922	Sem Dados	hyp -
10G09	XAC3263	-	proteína hipotética	3843458	3842922	Sem Dados	hyp -
10E12*	XAC3265	-	proteína hipotética	3845045	3844566	Sem Dados	-
19D09	XAC3265	-	proteína hipotética	3845045	3844566	Sem Dados	-
10F02	XAC3285	-	proteína hipotética	3865523	3865951	Sem Dados	hyp -, nec
17B04	XAC3294	-	proteína hipotética	3872655	3873014	Sem Dados	hyp -, nec
17E10	XAC3723	-	proteína hipotética	4398965	4399333	Sem Dados	-
26E1	XAC3815	-	proteína hipotética con-servada	4487859	4489103	Sem Dados	-
15H07	XAC3984	-	proteína hipotética	4676560	4676216	Sem Dados	hyp -

Continua na próxima página

Tabela 5.1 – continuação da página anterior

Mutante	Locus	Gene	Nome Comum	Pos. 5'	Pos. 3'	Categoria Principal	Fenótipo
18H10	XAC0526	prmA	ribosomal protein L11 methyltransferase	616949	616029	Síntese de proteína	–
01F03	XAC3704	–	DNA polymerase related protein	4380895	4379459	Replicação	ws 0, hyp –, nec 0

<sup>1</sup> ORF mutada ou afetada; <sup>2</sup> Posição 5' da ORF no genoma de Xac; <sup>3</sup> Posição 3' da ORF no genoma de Xac; <sup>4</sup> Categorias propostas pelo TIGR para classificação de genes de microrganismos ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)); <sup>5</sup> A inexistência da descrição do fenótipo de um dado mutante indica que este reverteu ao fenótipo selvagem; <sup>6</sup> NS = Não foi possível identificar a ORF mutada por meio de seqüenciamento genômico; <sup>7</sup> O “-” indica não avaliado ou não disponível; <sup>8</sup> O “\*” indica que a inserção do transposon ocorreu fora da ORF, na região 5'.

## 6 *Discussão*

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* é um dos mais importantes fitopatógenos da citricultura mundial, levando os países produtores a acumularem grandes perdas econômicas quando da sua incidência nos pomares produtores (11, 12, 5). Portanto, o estabelecimento de medidas de controle mais eficazes do que a erradicação das plantas é algo estritamente necessário e urgente, uma vez que elas ainda não existem. A produção de drogas eficazes curativas ou o desenvolvimento de medidas de controle alternativas ao uso de drogas são objetivos a serem almejados.

O conhecimento do genoma completo de um organismo representa uma oportunidade única de se obter informações acerca da evolução e da patobiologia do mesmo. Entretanto, entender quais são os genes requeridos para o desenvolvimento e em quais condições eles são requeridos é crucial para o entendimento do organismo como um todo. O estudo localizado de alguns genes pode propiciar o entendimento das vias utilizadas durante o processo adaptativo em certo substrato de crescimento ou o estabelecimento de vias alternativas às já previamente determinadas, ou, ainda, a identificação de novas vias metabólicas implicadas no processo adaptativo.

Com o objetivo de identificar genes essenciais ao estabelecimento de Xac em seu hospedeiro, citros, utilizou-se, neste estudo, um sistema de mutagênese baseado no transposon *Tn5* (87, 86) para gerar uma biblioteca de mutantes de Xac por meio da inserção aleatória de transposon no genoma desta bactéria. Os mutantes obtidos foram inoculados em planta hospedeira e analisados quanto à manutenção da virulência e/ou da patogenicidade.

Mutagênese aleatória por meio da inserção de transposon no genoma *in vivo* tem sido largamente utilizada com sucesso em vários microrganismos, patogênicos ou não patogênicos (93, 94, 95, 85). Utilizando esta técnica, obteve-se uma biblioteca com aproximadamente 10.000 mutantes viáveis de Xac. Esta estratégia eliminou a necessidade da construção de vetores suicidas para a execução das mutações, uma vez que o complexo transposon/transposase foi inserido diretamente no interior da célula por meio de eletroporação.

Após inoculação de 3.300 mutantes em folhas de plantas de limoeiro cravo, 122 mutantes foram

identificados com algum tipo de alteração na sua habilidade em causar a doença ou em elicitar os sintomas característicos da mesma.

A ORF mutada foi identificada por meio de seqüenciamento, exceto para 16 delas. Nestas 16, a observação dos cromatogramas indicou mistura de seqüências, fato que pode ser um indicativo de mais de uma inserção do transposon nesses clones. Comparando esse resultado com o obtido pela análise de *Southern blot*, onde se verificou que, aproximadamente 6,25% (6 mutantes em 96 analisados) dos mutantes continham inserções duplas do transposon, os 13,11% (16 em 122) encontrados por meio do seqüenciamento, caso o insucesso no mesmo seja devido a múltiplas inserções do transposon, estão em acordo, haja vista que os resultados de *Southern blot* foram obtidos ao acaso e que os encontrados durante o seqüenciamento foram previamente selecionados pelo processo de inoculação. Segundo o manual do Kit utilizado para obtenção dos mutantes, a taxa de inserções duplas gira em torno de  $\sim 1\%$  dos clones (96).

A re-inoculação *in planta*, por 4 vezes, desses mutantes, previamente identificados e caracterizados geneticamente, confirmou os resultados prévios para 56 deles. Em *Staphylococcus aureus*, Benton (84) e colaboradores produziram duas bibliotecas de mutantes, uma com 4.200 e outra com 2.400, e analisaram esses mutantes *in vivo*. Inicialmente, ao analisar 6.300 deles, encontraram-se 339 com patogenicidade alterada. Após uma série de novos testes *in vivo* confirmaram os resultados para 24 mutantes, os quais representavam 23 genes diferentes, corroborando com os resultados ora obtidos para Xac.

Se o genoma da Xac (20), que contém 5.175.554 pb, for dividido em três partes iguais, sendo a primeira a região entre a base 1 e a base 1.725.184, a segunda entre a base 1.725.185 e a base 3.450.369 e a última compreendendo a região entre as bases 3.450.370 e 5.175.554, de todas as ORFs mutadas, desde o início do experimento, 34 ORFs se localizam no primeiro terço, 27 ORFs no segundo terço e 48 ORFs no terceiro terço do genoma. Logo, considera-se que as mutações foram bem distribuídas ao longo do genoma. Além disso, foram encontradas quatro ORFs mutadas nos plasmídeos, sendo que todas elas estavam no plasmídeo maior (64.920 pb). Este dado está de acordo com o geral encontrado para Xac, pois, proporcionalmente, se no cromossomo principal foram encontrados 122 mutantes, nos plasmídeos deveriam ser encontrados  $\sim 3$ , considerando o evento de inserção do transposon como sendo totalmente aleatório.

Dentre o grupo de mutantes seqüenciados, verifica-se a presença de genes das diversas categorias funcionais, incluindo genes implicados no processo de patogênese, como as proteínas virB2, hrpB4 e uptC, bem como novos genes (XAC0340, XAC4040 e XAC2047). A sintomatologia indu-

zida por esses mutantes em limoeiro cravo também foi muito variável, sendo sete deles avirulentos (Tabela 5.1).

Dois dos mutantes avirulentos carregam genes previamente relatados como sendo necessários à patogenicidade, *hrpB4* (02H02; XAC0410) e *hrpXct* (03C01; XAC1266). Estes dois genes fazem parte do sistema *hrp*, que está presente na maioria das bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas, exceto *Agrobacterium*, e compõe o sistema de secreção do tipo três (SSTT) (97). Vários resultados sugerem, indiretamente, que as proteínas de virulência, também chamadas de efetores de virulência, são injetadas a partir do patógeno diretamente no interior de células eucarióticas do hospedeiro por meio de um pilus, o qual compõe o SSTT (98, 99, 100). Presume-se que as proteínas efetoras estimulam ou suprimem várias funções celulares do hospedeiro para beneficiar a infecção do patógeno (38). Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), o cluster de genes *hrp* possui 23 kb e contém seis operons, designados *hrpA* até *hrpF* (101). Dois genes reguladores, *hrpG* e *hrpX*, localizados fora do cluster gênico maior, são responsáveis por ativar a expressão de genes *hrp* em planta e em meio de cultura sintético XVM2 (52, 102). Mutante para o gene *hrpB4* em Xcv não foi capaz de causar doença em plantas de pimenteiro suscetível e nem HR em pimenteiro carregando o respectivo gene R compatível com o gene *avr* presente no isolado de Xcv utilizado no estudo (103). Estudos posteriores verificaram que essa proteína, *hrpB4*, não era secretada, ou seja, trata-se de uma proteína de ação na própria célula bacteriana. Além disso, nesse mesmo estudo, detectou-se que *hrpB4* permanecia no extrato de proteínas solúvel. Verificou-se, também, que AvrBs3 fora excretado pelo isolado selvagem, fato não observado no mutante defectivo para *hrpB4*.

O gene *hrpXv* (*hrpX* de *X. c.* pv. *vesicatoria*) foi caracterizado e sua função foi determinada (52). A seqüência de aminoácidos deduzida indicou similaridade com proteínas da família AraC, as quais atuam no processo de regulação de proteínas. Mutações na posição 1335 desse gene impediu o mutante resultante de elicitar os sintomas da doença em plantas de pimenteiro e de tomateiro suscetível e de elicitar HR em plantas resistentes. Complementação com fragmentos desse gene mostraram que apenas 580 pb acima do códon iniciador são suficientes para produzir um polipeptídeo funcional. Quantificação do título bacteriano de mutantes *hrpX<sup>-</sup>* *in planta* mostrou que o mutante apresenta  $10^5$  vezes menos bactéria que o genótipo selvagem (52).

Ambos os resultados descritos na literatura, tanto para o gene *hrpB4* quanto para o *hrpX*, corroboram com os resultados obtidos para os mutantes 02H02 e 03C01 de Xac, os quais carregam mutação nos genes *hrpB4* e *hrpXct*, respectivamente, pois, nenhum desses dois mutantes causa doença e o crescimento em folhas de laranjeiras é bem menor que o apresentado pelo isolado 306

de Xac (Figuras 5.3 e 5.4). Em Xcv, *hrpXv* age como um ativador transcricional para os genes do grupo *hrp*. Esse gene é necessário para a ativação da transcrição de cinco genes *hrp* dos loci *hrpB* até *hrpF* (52). Já a proteína *hrpB4* é necessária para a completa funcionalidade do SSTT, uma vez que mutantes *hrpB4*<sup>-</sup> não foram capazes de excretar as proteínas *avrBs3* e nem *hrpB2* em Xcv (103). Dessa maneira, pode-se concluir que esses dois mutantes, 02H02 e 03C01, deixaram de ser patogênicos devido à inabilidade em levar até a célula do hospedeiro os fatores de virulência necessários ao seu desenvolvimento *in planta*.

Um outro mutante, também avirulento, teve mutada a ORF XAC3980, a qual possui similaridade com o gene *htrA* (high temperature requirement) de *Xyella fastidiosa*. Identificado primeiramente em *E. coli*, o locus *htrA* nessa bactéria codifica uma serina protease HtrA (também chamada DegP) que contém uma tríade catalítica (His<sub>105</sub>–Asp<sub>135</sub>–Ser<sub>210</sub>) requerida para a atividade proteolítica (104) e dois domínios PDZ, responsáveis pela oligomerização do complexo protéico, pelo reconhecimento do substrato e pela ligação (105, 106). Adicionalmente à atividade proteolítica, HtrA de *E. coli* também possui atividade de chaperona *in vitro* em baixas temperaturas (107), onde uma mudança conformacional da proteína mascara os resíduos proteolíticos (108). Em elevadas temperaturas, os resíduos catalíticos ficam acessíveis e a atividade proteolítica de HtrA predomina (108, 107).

As proteases HtrA identificadas em *Escherichia coli* são requeridas para o crescimento a 42 °C (109) e para a degradação de proteínas mal dobradas no periplasma (110) da membrana interna. Posteriormente, foi demonstrado que HtrA degrada proteínas desnaturadas pela ação do calor *in vivo* e *in vitro* (111). Devido ter-se encontrado *in vivo* um número muito pequeno de substrato para a atividade catalítica de HtrA (112, 113, 114), sugere-se que a principal função biológica dessa proteína seja a remoção de proteínas mal dobradas de dentro do envelope celular. Em *E. coli*, HtrA está localizada no periplasma interno da membrana (115, 104).

Proteínas homólogas a HtrA são encontradas na maioria das bactérias, e mesmo sendo uma proteína muito conservada durante a evolução, o seu impacto na fisiologia bacteriana difere entre as bactérias Gram-negativas. Em contraste a *E. coli*, HtrA não é essencial para o crescimento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium em altas temperaturas (116).

Mutante *htrA* de *S. enterica* serovar Typhimurium mostrou virulência reduzida em um modelo murino (117) e reduziu a sobrevivência em macrófagos (116). A caracterização fenotípica do mutante *htrA* de *S. enterica* serovar Typhimurium revelou, ainda, uma tolerância diminuída ao stress oxidativo, o que pode explicar a sobrevivência reduzida nos macrófagos, onde os interme-

diários reativos de oxigênio são liberados durante a explosão oxidativa (116). Mutantes *htrA* de outras bactérias patogênicas Gram-negativas, tais como *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Brucella abortus*, são sensíveis tanto às altas temperaturas quanto ao estresse oxidativo (118, 119, 120, 121). Além disso, os mutantes *htrA* de *Y. enterocolitica* e de *B. abortus* mostraram reduzida virulência em modelos murino (119, 121). Em *Listeria monocytogenes*, análises transcricionais em um mutante *htrA* revelaram que o gene *htrA* não é induzido em resposta a choque térmico, mas o é em resposta a estresse devido a baixo pH e a ampicilina G. Além disso, uma significativa queda na virulência foi detectada nesse mutante, revelando que a proteína HtrA é muito importante para a completa virulência de *Listeria monocytogenes* em ratos (122). Recentemente, um mutante *htrA* de *Listeria monocytogenes* 10403S mostrou ser sensível ao estresse oxidativo e à puromicina em altas temperaturas, ter reduzida habilidade para formação de biofilme e virulência atenuada em rato (123).

No entanto, ainda não é claro o por quê de mutantes *htrA* de bactérias Gram-negativa possuírem virulência atenuada. Entretanto, desde que são mais suscetíveis ao estresse do que o isolado parental, os mutantes podem também ser menos viáveis em tecidos do hospedeiro, uma vez que este criará diversos tipos de estresse à célula invasora. Além disso, especula-se que as funções chaperoninas e de processamento da proteína HtrA são necessárias para a dobradura de proteínas secretadas ou que HtrA pode estar envolvida na oligomerização e na exportação dos fatores de virulência (124).

Uma vez que HtrA tem-se mostrado ser essencial para a completa virulência de muitos patógenos, mas, por outro lado, não ser essencial ao crescimento bacteriano em condições não estressantes, ela se qualifica como um potencial alvo para drogas “antipatogênicas”. Estes alvos incluem aquelas drogas que inibem a virulência, ao invés de matar a bactéria ou parar o seu crescimento (125). Assume-se que as drogas antipatogênicas reduzem a pressão para o desenvolvimento de resistência à drogas, qualidade extremamente importante quando se trata de controle de uma praga agrônômica, a qual deverá ser aplicada em grandes áreas exercendo grande pressão de seleção sobre o respectivo alvo. Além disso, o fato de não matar o alvo, torna esse tipo de droga ecologicamente sustentável.

Grupos heme são responsáveis por desempenhar uma grande variedade de funções biológicas em procariotos e eucariotos. A muito se sabe que esses grupos são essenciais para a respiração, para o metabolismo do oxigênio e transporte de elétrons assim como são grupos prostéticos de hemoglobulinas, hidroxilases, catalases, peroxidases e citocromos (126). Mais recentemente, funções para grupos hemes, como um biossensor de gases diatômicos (127, 128, 129) e como um modulador da atividade de proteínas (130, 131, 132), têm sido descritas. A biossíntese de protoheme envolve

sete passos enzimáticos seqüenciais a partir do precursor universal ALA (ácido  $\delta$ -aminolevulínico); outros grupos hemes de que a célula necessita são obtidos a partir de modificações do protoheme. Em um passo antes da obtenção de protoheme, um íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é inserido dentro do composto protoporphyrin IX catalizado pela enzima ferroquelatase (133).

Siroheme, produzido a partir de uroporfirinogênio III, é o grupo prostético de muitas enzimas nitrito e sultito redutases que funcionam na conversão de formas de nitrogênio e enxofre altamente oxidadas encontradas no meio ambiente para formas completamente reduzidas ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{S}_2^-$ ) que são utilizadas na biossíntese de outros compostos (134, 135).

Uma das muitas funções que o protoheme desenvolve na célula está a sua participação na constituição de citocromos. Os citocromos do tipo C, que contém um grupo heme c covalente, são amplamente distribuídos em organismos, onde tem função na fotossíntese e no transporte de elétrons da cadeia respiratória (136). A maioria dos citocromos tipo c de *E. coli* e de *S. enterica* serovar Typhimurium são os citocromos  $c_{552}$ , que contém seis grupos heme covalentemente ligados e está localizado no espaço periplásmico, onde atua como nitrito redutase dissimilatória (137).

Portanto, grupos hemes são utilizados pelo metabolismo básico da célula para a produção de energia, como na cadeia de transporte de elétrons, numa via aeróbica, e no complexo de redução de nitrato numa via anaeróbica. Desse modo, a interrupção da produção de grupos heme interrompe a cadeia de transporte de elétrons, o que impede a célula de utilizar oxigênio ou nitrato como aceptor final de elétrons. Se essa hipótese for verdadeira, ela explicaria o fato do mutante 11D09, que possui a ORF XAC4040 interrompida, uma ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (*hemB*), não causar a doença e apresentar uma ausência total de sintomas.

Consistente com essa hipótese, um trabalho prévio usando análise proteômica em *Staphylococcus aureus* mostrou que as proteínas envolvidas na via glicolítica, e vias relacionadas, e na fermentação foram superexpressadas em células em crescimento exponencial de mutante *hemB* comparado ao isolado parental (138). Logo, este estudo prévio indica que mutante *hemB* gera energia somente a partir da fosforilação ao nível de substrato (139), *in vitro*. Dessa maneira, o fato do mutante se multiplicar *in vitro* e *in vivo* (Figuras 5.3 e 5.4) se explica devido a utilização de fontes de carbono para a produção anaeróbica de ATP ou, ainda, pela utilização de hemes produzidos pela planta. O fato de não elicitar os sintomas em limoeiro cravo pode ser devido à baixa concentração de células no interior da folha, revelando um efeito no sistema “quorum sensing” desse mutante.

Outros três mutantes, 06H10 (XAC0789), 18C05 (XAC0340) e 18D06 (XAC3673), também não elicitarão nenhum tipo de sintomas em folhas de limoeiro cravo. Além desses, outros 49



mutantes também apresentaram algum tipo de alteração na sintomatologia da doença. Estudos anteriores com bactérias Gram-negativas mostraram que os genes *tex* (140), *VirB2* (141), *wzt* (142) e *cls* (143) estão envolvidos no processo de adaptação e patogênese, direta ou indiretamente. Para os demais genes mutados não foi encontrado nenhuma referência na literatura. Logo, o estabelecimento da ação destes genes no processo de patogênese carece de mais dados. Talvez, a análise da expressão global de genes desses mutantes por meio da técnica de microarranjos de DNA poderia identificar a via metabólica afetada nesses casos.

Num período de dois anos, esses mutantes foram re-inoculados por mais três vezes, totalizando quatro análises. Ao final da quarta inoculação, verificou-se que dos 122 mutantes previamente selecionados como tendo a patogenicidade e/ou virulência alterada, 72 retornaram ao fenótipo selvagem. Este fato ocorreu ao longo das inoculações e não de uma única vez.

Fato semelhante foi encontrado em mutantes de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis deficientes para motilidade (144). Após três subcultivos foi observado de 2 a 3% de bactérias móveis na população de mutantes. Uma vez que os clones móveis se multiplicaram em meio com canamicina, os autores hipotetizaram que o transposon se excisou precisamente e se transpôs para outro local do genoma, uma vez que estes mutantes reverteram para motilidade, mas continuaram resistentes a canamicina. A transposição foi confirmada por meio de PCR e Southern blot. No entanto, cabe enumerar que o sistema utilizado para gerar as mutações não possui o gene para a codificação da enzima transposase, necessária à transposição do complexo (87, 86). Logo, para que haja a transposição o organismo em estudo deverá produzir esta enzima. Em outro estudo, Gendel (145) verificou que plasmídeos transformados com transposon derivado de *Tn5* reverteram para o fenótipo selvagem.

A reversão de mutante para o fenótipo selvagem pode ocorrer por quatro razões, basicamente: i) ocorrência de uma transposição para outro loco no genoma; ii) o mutante possuía mais de uma inserção transposômica e perdeu o transposon, por alguma razão, no locus que conferia o fenótipo de interesse; iii) mesmo na presença de antibiótico, o genótipo selvagem persistiu na população de mutantes; e iv) contaminação com outros mutantes para outros locos. A primeira hipótese somente poderia ocorrer após a produção de uma transposase no organismo, e compatibilidade dessa para com o sistema mutagênico utilizado. A segunda poderia ser decorrente de uma segregação das duas inserções, gerando duas populações de mutantes. Com o passar do tempo e com uma degradação natural do antibiótico no meio, uma das duas populações segregante se sobrepõe à outra. No terceiro caso, o consumo e/ou a degradação do antibiótico no meio de cultura de armazenamento pode levar a favorecer o genótipo selvagem. Na última suposição, pode-se aventar que a manipulação dos

mutantes, geralmente armazenados em placas de 96 cavidades, por muitas pessoas, uma vez que o banco de mutantes é utilizado em vários projetos diferentes, pode ter facilitado a contaminação de um pocinho com material de outra cavidade da mesma placa ou de outra placa. Considerando as duas últimas hipóteses, como solução, caso estes sejam a real causa da reversão de fenótipo, seria o isolamento dos mutantes em várias replicatas em tubos do tipo Eppendorf e a realização de transferências para novo meio de cultura com antibiótico recém preparado. No entanto, caso o gene mutado seja conhecido, em qualquer dos casos pode-se obter o mutante por meio de mutagênese sítio dirigida utilizando um plasmídeo suicida.

As curvas de crescimento *in vitro* e *in planta* demonstram que as ORFs mutadas exercem funções necessárias ao crescimento, tanto em meio de cultura, quanto na planta. No entanto, alguns mutantes foram mais afetados que outros, como por exemplo o mutante 18C05 (ORF0340). Esse mutante teve uma curva de crescimento *in vitro* bem diferente dos demais, com uma taxa de crescimento baixa, o que fez com que ele atingisse a mesma DO que os demais somente após 28 h de incubação. *In planta*, o mutante 18C05 também apresentou menor crescimento. *In vitro*, a densidade óptica dos mutantes não passou de 1,5, sendo que, após atingir esse valor todos apresentaram uma queda na DO, chegando próximo de 1,0 na 40ª hora. Essa diminuição da densidade óptica não é normal, uma vez que células mortas também absorvem luz, fato que poderia manter a DO em um patamar e não diminuí-la. No entanto, com o passar do tempo as condições no meio de cultivo tornam-se estressantes e há uma diminuição na disponibilidade de nutrientes. Em *E. coli*, a diminuição de nutrientes e o estresse favorecem a diminuição do tamanho das células tornando-as esféricas, ao invés do formato de bastonete, como resultado de diversas divisões celulares sem um aumento na massa celular (Kolter et al., 1993).

A inabilidade de um organismo em causar doença pode ser decorrente da falta de enzimas do metabolismo básico, cuja expressão independe da interação com o hospedeiro, ou da falta de enzimas diretamente relacionadas à interação planta-patógeno, as quais somente são necessárias quando o patógeno está se multiplicando no seu hospedeiro.

Portanto, a fim de mostrar que os genes mutados que apresentaram sintomatologia da doença alterada estavam realmente envolvidos no processo de patogênese (expressão dependente da interação planta-patógeno), a expressão de 15 ORFs foi analisada por meio da técnica de *Northern blot* reverso em duas situações: bactéria multiplicada em meio de cultura (*in vitro*) e bactéria multiplicada em folhas de laranjeira Pêra (*in planta*).

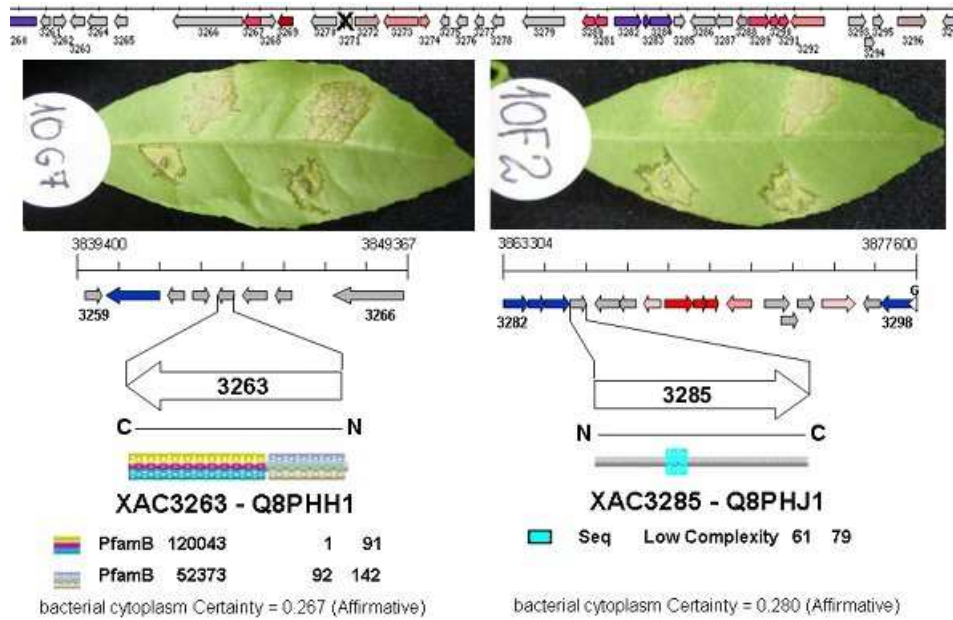
As análises dos autoradiogramas permitiram verificar que, dentre os mutantes analisados, existe

um cujo gene mutado (ORF XAC3704) é expresso nas células bacterianas tanto em meio de cultura quanto quando elas são multiplicadas em folhas de laranjeira Pêra. A seqüência de aminoácidos deduzida dessa ORF tem similaridade com DNA polimerase do fago SPO1 de *Bacillus subtilis* (146), onde sua função é desconhecida, e com “Uracil-DNA glycosylase” (EC:3.2.2.-), uma enzima reparadora de DNA (147). Logo, uma vez que ela está ligada ao processo de tradução, função esta necessária à célula em qualquer situação de cultivo, esperaria a sua expressão em ambas as situações. No entanto, a nítida diferença de expressão encontrada para essa proteína entre as duas situações de cultivo é um indicativo de que a sua expressão em níveis mais elevados é necessária para que a bactéria cause a doença, pois o seu nível de expressão quando a bactéria foi cultivada em meio de cultura foi, visualmente, bem menor que na situação *in planta*.

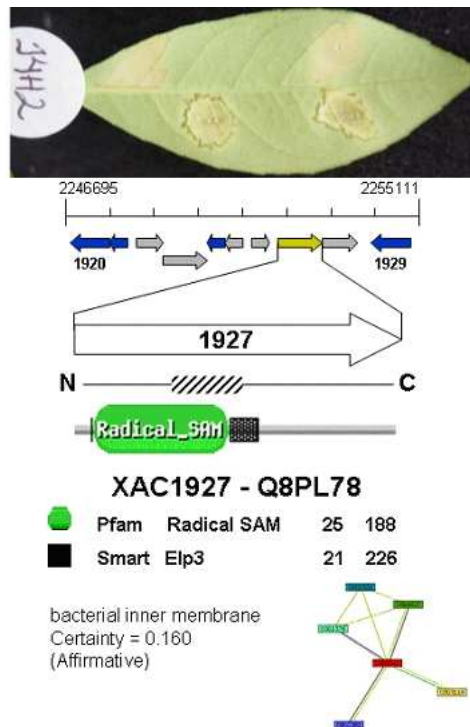
As ORFs XAC3263 e XAC3285, que codificam ambas para proteínas de funções desconhecidas, e que apresentaram distintos padrões de expressão nas condições supra referidas, estão contidas numa teórica ilha de transferência lateral. Além disso, é importante destacar que esta ilha de transferência lateral é exclusiva de Xac quando comparada a outras *Xanthomonas*, inclusive as recentemente seqüenciadas *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* B e C. A composição das suas ORFs, na grande maioria hipotéticas, a presença de integrases e tRNA nas pontas, a nítida variação nos conteúdos de GC, “códon usage” e variação de dinucleotídeos, e por apresentar transposases na sua composição, garante que esta região compreenda uma ilha de transferência lateral em Xac. Nenhum domínio classicamente descrito foi encontrado na composição das prováveis proteínas codificadas por essas ORFs e uma análise por Psort sugere serem proteínas de citoplasma (Figura 6.1). Do mesmo modo, nenhum COG foi encontrado, o que descarta qualquer similaridade com outra seqüência já conhecida.

Assim como as ORFs descritas acima, a ORF XAC1927 também, aparentemente, está contida dentro de uma ilha de transferência lateral, que por sua vez está flanqueada pelos grupos gênicos de síntese e regulação da atividade flagelar. Da mesma maneira que a anterior, a ilha apresenta transposases na sua composição e variação no conteúdo de GC, “códon usage” e dinucleotídeos. Interessantemente, essa ORF, cuja seqüência de aminoácidos deduzida sugere codificar para uma “Fe-S oxidoreductase”, apresenta um COG para o domínio SAM (Figura 6.2) e provavelmente caracteriza-se como uma proteína de membrana interna, dada a sua composição de aminoácidos.

Em suma, todas as três ORFs, embora se apresentem inseridas em prováveis ilhas de transferência lateral, quando analisadas em termos de níveis e condições de expressão, o que se observa é que as mesmas parecem ter fundamental importância para a inter-relação planta-patógeno, uma vez



**Figura 6.1:** Localização das ORFs XAC3263 e XAC3285 no genoma de Xac. A sintomatologia apresentada por mutantes dessas duas ORFs quando inoculados em folhas de limoeiro cravo e os resultados da análise por Psort também são mostrados.



**Figura 6.2:** Localização da ORF XAC1927 no genoma de Xac. A sintomatologia apresentada por mutantes dessas duas ORFs quando inoculados em folhas de limoeiro cravo e os resultados da análise por Psort também são mostrados.

que só se expressaram em folhas de laranjeira. É fato que o meio de cultura não contém compostos que a planta possui e por isso não induziu sua expressão. Mas, o fato dos mutantes para estes genes apresentarem reduzida virulência e alteração na sintomatologia natural, reforçam sua importância nesta interação.

O presente resultado corrobora com o fato dos mutantes analisados apresentarem patogenicidade alterada quando inoculados em planta hospedeira, indicando que o produto desses genes é importante para o estabelecimento e/ou desenvolvimento do patógeno no interior do hospedeiro.

As complementações realizadas para quatro mutantes não lograram êxito. Em duas situações obteve-se o mesmo fenótipo que o apresentado para o isolado selvagem, indicando uma nítida contaminação dos mutantes. Caso isso se confirme, a repetição de todo o processo utilizando células mutantes puras poderá lograr êxito.

Para os outros dois mutantes analisados, interessantemente, não verificou-se nenhum sintoma da doença (Figura 5.8). Isso pode ser decorrente da não expressão do gene no plasmídeo utilizado para estudo, ou ainda, que isso pode ser decorrente de uma baixa expressão do gene. Em *Ralstonia solanacearum*, um plasmídeo utilizado para complementação não era estável quando a bactéria era inoculada *in planta*, fazendo com que não se obtivesse êxito nas complementações (148).

## *Conclusões*

O presente estudo permite concluir que:

- O sistema de mutagênese por transposon é um método de análise genômica adequado à prospecção de genes envolvidos no processo de patogênese e virulência de Xac;
- Existem genes com diferentes implicações no processo de virulência, desde genes cujo mutante apresenta um pequeno desvio do fenótipo selvagem até genes que abolem totalmente a patogenicidade;
- Os genes XAC0789, XAC0410, XAC3839, XAC4040, XAC0340, XAC3673 e XAC3980 são essenciais à patogenicidade de Xac, uma vez que mutantes para os mesmos não elicitou sintomas quando multiplicados *in planta*;

*Análise temporal global do transcrito de  
Xanthomonas axonopodis pv. citri in planta e  
em meio indutor XAM1*

## 7 *Introdução*

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (14) forma asiática (A), é uma das doenças cítricas mais importante no Brasil (5), sendo a Xac encontrada em praticamente todas as regiões onde já foi detectado o cancro cítrico (16). Essa importância se deve aos danos causados, que geram grandes perdas econômicas, e devido essa bactéria ser de difícil controle, sendo que a única maneira de eliminar a doença de um pomar é por meio da erradicação do material doente, procedimento que eleva, consideravelmente, as perdas econômicas, pois há a necessidade de eliminação de todas as plantas ao redor do foco em um raio de 30 m, com a área devendo permanecer por dois anos sem replantio de plantas cítricas (5).

A fim de gerar conhecimentos sobre essa fitobactéria que pudesse levar ao seu controle, da Silva (20) e colaboradores publicaram o seqüenciamento e a anotação do genoma completo de Xac e identificaram, *in silico*, diversas ORFs relacionadas à possíveis genes de patogenicidade e virulência. No entanto, para aproximadamente 40% do total de ORFs mapeadas em Xac não foi possível atribuir uma provável função, uma vez que se tratavam de ORFs desconhecidas até então. Possivelmente, dentre essas ORFs desconhecidas pode estar um conjunto de genes necessários à hospedeiro-especificidade em Xac.

Embora para parte do genoma de Xac tenha sido atribuído uma provável função (20), as inferências realizadas através da análise *in silico* carecem de investigação experimental para que se possa detectar com precisão quais genes estão relacionados aos processos de adaptação do patógeno ao hospedeiro e ao processo de patogênese propriamente dito. Do mesmo modo, as ORFs hipotéticas também necessitam de maiores estudos para poder atribuir-lhes uma função. Em sendo assim, estudos de genômica funcional são necessários para a elucidação da maquinaria necessária ao processo de instalação e proliferação do patógeno *in planta* bem como indução de sintomas do cancro cítrico no hospedeiro.

Assume-se que, em geral, a expressão dos genes necessários em uma situação particular será regulada positivamente, visto que as funções desnecessárias, ou não desejáveis na mesma situação,



serão reguladas negativamente. Este princípio pode ser aplicado aos genes de virulência, os quais são igualmente sujeitos aos mecanismos regulatórios que asseguram a expressão gênica no ambiente apropriado do hospedeiro (149).

Apesar de ser possível identificar novos genes relacionados à patogenicidade por meio do uso de técnicas de mutagênese mediada por transposon (46, 47, 54, 55, 56, 60), determinar a interferência desses genes no processo global de expressão gênica ou a sua co-regulação não é tarefa fácil e, em alguns casos, poder-se-ia afirmar que tal inferência seria impossível de determinar. Logo, caso seja de interesse realizar um estudo global da expressão gênica, técnicas que permitam tal averiguação deverão ser utilizadas.

A análise de arranjos de DNA (macro ou microarranjos de DNA), além da identificação de genes envolvidos em uma dada condição biológica, pode permitir a identificação de genes intercorrelacionados, podendo predizer novas vias de regulação gênica e/ou adicionar genes à vias previamente caracterizadas. Nesta técnica, seqüências complementares de ácidos nucleicos são hibridizadas entre si, sendo que uma delas encontra-se imobilizada em uma matriz sólida (81). A denominação macro ou microarranjos é determinada em função da matriz utilizada para a fixação das seqüências a serem imobilizadas. Geralmente, em macroarranjos utilizam-se membranas de náilon e em microarranjos utilizam-se lâminas de vidro como suporte. Este método tem sido utilizado com sucesso em estudos genômicos nos mais diversos modelos, permitindo inferências quanto à funções de milhares de genes em bactérias enteropatogênicas de animais, em levedura, em ratos, em seres humanos e em plantas (150, 151, 152).

A identificação de candidatos a fatores de virulência por meio da análise da expressão gênica global baseia-se em duas suposições. Primeiro: devido à regulação coordenada dos genes associados à virulência é provável que novos genes sejam, também, co-regulados (153). Desta maneira, agrupando-se os perfis de expressão gênica em condições experimentais específicas e controladas, é possível monitorar precisamente a co-regulação, revelando, desta maneira, sutilezas que podem conduzir à identificação de novos reguladores. Segundo: devido aos genes associados à virulência serem altamente regulados (153), genes que são especificamente expressos durante a infecção ou em condições que imitam a infecção são candidatos a fatores de virulência.

Estudos de expressão gênica podem, ainda, revelar diferenças no sistema regulatório do patógeno capazes de explicar virulências discrepantes entre isolados relacionados. Por exemplo, variações na virulência de *Listeria monocytogenes* têm sido correlacionadas com a transcrição diferencial dos genes reguladores de virulência associados a *prfA* (154, 155).

Abordagens utilizando macroarranjos de DNA foram empregadas com sucesso para identificação de cinco patógenos de maçã e para estudar o perfil de expressão de potenciais genes de patogenicidade e virulência em Xac. No primeiro estudo, oligonucleotídeos representando regiões entre genes ribossomais de bactéria e fungos fitopatogênicos à maçã foram arranjados e imobilizados em uma membrana de náilon. Após validação do macroarranjo foi possível identificar corretamente *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Podosphaera leucotricha*, *Venturia inaequalis*, e *Erwinia amylovora* e eliminar espécies relacionadas. A previsão de doença foi possível para *V. inaequalis* com base na identificação de ascosporos capturados em viveiros de mudas. Testes preliminares indicaram ser possível quantificar a população de *P. leucotricha*, com base nos valores obtidos após a hibridização, a qual identificou até 20 conídios por disco de folha (156). No segundo estudo, um arranjo em membrana de náilon foi construído contendo alvos para 279 genes de Xac candidatos a patogenicidade ou virulência. Uma única linhagem de células de Xac isolado 306 foi multiplicada em meio de cultura NB e em meio de cultura indutor de genes *hrp* XVM2, previamente utilizado em estudos envolvendo Xcv (157). As análises dos dados deste estudo indicaram que 31 genes foram induzidos no meio sintético XVM2 e somente sete foram reprimidos (158).

Oliveira (159) e colaboradores compararam dois isolados de *X. fastidiosa*, Xf-9a5c, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), e Xf-PD, que infecta vinha, pessegueiro, ameixeira e carvalho, dentre outros, por meio da técnica de microarranjo de DNA. Estes autores observaram que 90% do genoma de *X. fastidiosa* é comum a ambos os genomas. No entanto, eles identificaram 242 ORFs exclusivas do isolado 9a5c, sendo que 65% dessas ORFs referiam-se a proteínas hipotéticas conservadas e 3,5% a fatores de virulência e patogenicidade.

Noutro estudo, o isolado 9a5c de *X. fastidiosa* teve seu transcissoma analisado em duas condições *in planta*. Para tal, providenciaram-se duas linhagens desse isolado, sendo uma cultivada por diversas vezes em meio de cultura (SP), fato que leva a uma considerável diminuição da virulência, e uma outra, isolada de planta hospedeira pela primeira vez (FP). Essas duas linhagens foram inoculadas em plantas de laranjeiras Pêra e de *periwinkle* e mantidas em casa de vegetação. Por meio de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi possível verificar que as células FP foram muito mais eficientes em relação a colonização de ambos os hospedeiros que as células SP. Por meio de um microarranjo de DNA contendo seqüências alvos para 2.200 ORFs do genoma de *X. fastidiosa*, os autores verificaram que 18 genes foram induzidos e 21 foram reprimidos na condição FP. Muitos dos genes diferencialmente expressos codificavam para proteínas desconhecidas. Além disso, os genes potencialmente envolvidos na patogenicidade, virulência e na adaptação do patógeno foram induzidos somente na condição FP (160).

Recentemente, células de *X. fastidiosa* 9a5c foram multiplicadas em meio de cultura contendo três concentrações de glicose diferentes: 1, 50 e 250 mM. Os autores verificaram que a produção de goma não foi afetada, mas, por outro lado, a expressão gênica global apresentou-se diferente entre as condições testadas. Enquanto em meio de cultura contendo 50 mM de glicose houve a expressão de 2.143 ORFs, em meio de cultura contendo 1 mM de glicose e em meio de cultura contendo 250 mM houve 554 e 1.711 ORFs expressas, respectivamente. Adicionalmente, os autores verificaram que 211 ORFs, de um total de 511, que tinham sido consideradas inválidas em uma re-anotação do genoma de *X. fastidiosa* (161), foram transcritas na condição padrão analisada (50 mM de glicose em meio de cultura XDM2 (162)). Esse resultado mostra que a técnica de microarranjos de DNA também pode ser utilizada para a confirmação de anotação de genomas. Das 211 ORFs, 187 são hipotéticas (163).

Mais recentemente, *X. fastidiosa* foi submetida a um estresse por meio de calor e teve sua expressão diferencial analisada por meio de microarranjos de DNA. Encontraram-se 261 (9,7%) genes induzidos e 222 (8,3%) reprimidos. Dentre os genes induzidos destacaram-se os genes associados à virulência, tal como *vapD*, e genes codificadores de enzimas de degradação hemolisina, hema-glutinina e a xilana. Além desses, os autores também relatam a indução de genes relacionados à resposta ao estresse extracitoplasmático e alguns genes relacionados à fagos. Já os genes reprimidos codificavam para fimbria, respiração anaeróbica e biossíntese de proteínas (164).

Além da fitobactéria *X. fastidiosa*, existem estudos, utilizando microarranjos, somente para as fitobactérias *Xanthomans campestris* pv. *campestris*, *Erwinia* sp., e *Pseudomonas aeruginosa* (informação obtida em janeiro de 2007 na internet, nos sítios “PUBMED”<sup>1</sup> e “ISIKNOWLEDGE”<sup>2</sup>).

He (165) e colaboradores analisaram a comunicação célula-célula, em *Xanthomans campestris* pv. *campestris*, mediada por um fator de sinalização difusível, que é um ácido graxo insaturado (ácido cis-11-methyl-2-dodecenoic). Xcc utiliza esse composto para sincronizar a expressão de genes de virulência e a dispersão no biofilme. Mutante deficiente para DSF produz menor quantidade de enzimas extracelulares e polissacarídeos em comparação com o genótipo selvagem, o qual pode ser recuperado no mutante pela adição externa de DSF (166). Para investigar o perfil genômico regulado por DSF, foram realizadas comparações entre o padrão de expressão gênica do selvagem *versus* o padrão apresentado pelo mutante defectivo para a produção de DSF e entre o mutante na presença e na ausência de DSF. As análises indicaram que 165 genes tinham sua expressão gênica regulada por DSF. Esses genes codificavam para proteínas pertencentes a pelo menos 12 grupos fun-

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed&itool=toolbar>

<sup>2</sup><http://isiknowledge.com>

cionais diferentes. Além de compostos previamente conhecidos como sendo dependentes de DSF, tais como enzimas extracelulares e polissacarídeos extracelulares, foram revelados novas funções mediadas por DSF, como síntese de flagelo, resistência a toxinas e ao estresse oxidativo e respiração aeróbica. Estudos fenotípicos confirmaram que a sinalização mediada por DSF contribui para a resistência à toxina acriflavina, resistência ao peróxido de hidrogênio e para sobrevivência das células bacterianas em diferentes temperaturas. Os autores concluem que a sinalização célula-célula mediada por DSF é o responsável por manter a competência do patógeno no ecossistema (165).

Em *Erwinia amylovora* foi utilizado um sistema *in vitro* para verificar a expressão diferencial de genes durante a infecção de tecidos de pêra imatura. Os autores identificaram 394 genes induzidos unicamente em frutos, dentre os quais encontram-se genes relacionados à interação planta-patógeno (3.8%), resposta ao estresse (5.3%), regulação (11.9%), superfície celular (8.9%), transporte (13.5%), elementos móveis (1.0%), metabolismo (20.3%), síntese e aquisição de nutrientes (15.5%), e proteínas hipotéticas ou desconhecidas (19.8%). Genes de virulência conhecidos, incluindo *hrp/hrc* constituintes dos sistemas de secreção SSTT, SSTD, dentre outros. Os autores concluem que o estudo indica que *E. amylovora* utiliza várias estratégias durante a infecção para superar o estresse e a baixa disponibilidade nutricional existente no seu hospedeiro (167).

Noutro estudo onde se utilizou a técnica de microarranjos de DNA para averiguar a expressão gênica global em uma fitobactéria, Okinaka (168) e colaboradores analisaram a expressão gênica global de *Erwinia chrysanthemi* 3.937 multiplicada *in planta* comparada com a bactéria multiplicada em meio de cultura. Vários foram os genes reprimidos quando a bactéria estava sendo cultivada no hospedeiro, sendo que a maioria deles eram homólogos a genes que codificam para funções metabólicas, componentes da fosforilação oxidativa e genes envolvidos no processo de transcrição ou de tradução. Já os genes induzidos *in planta* estavam envolvidos em funções especializadas, incluindo fatores de virulência, anaerobiose, captação de ferro, transportadores ou permeases, resistência a xenobióticos, quimiotaxia e respostas a estresse causado por espécies reativas de oxigênio e calor. A maior parte dos genes induzidos *in planta* pareceram não estar diretamente relacionados à degradação do hospedeiro, mas provavelmente são importantes na adaptação da fitobactéria no ambiente interno do hospedeiro.

Já em *Pseudomonas aeruginosa* PA01, verificou-se a influência de exsudatos encontrados na rizosfera do hospedeiro na expressão gênica global. A resposta a dois exsudatos mostrou uma sobreposição parcial: a maioria dos genes com expressão alterada foi regulado apenas em um dos dois exsudatos. Dentre os genes com expressão alterada pôde-se encontrar genes relacionados à

interação planta-patógeno, tal como genes do metabolismo, quimiotaxia e do SSTT, e um grupo com funções desconhecidas ou com provável função (169).

Já para bactérias patogênicas de animais, o número de trabalhos que utilizam a técnica de microarranjos de DNA para estudar a expressão gênica global é bem mais abundante na literatura. Dentre eles, pode-se destacar a identificação de genes que contribuem para a colonização do estômago por *Helicobacter pylori* (170), a identificação de genes co-regulados pelo gene *cbrA* em *Sinorhizobium meliloti* (171), a detecção e identificação de bactéria patogênica em uma comunidade complexa de microrganismos (172), o mapeamento de inserção transposômica no genoma de *Helicobacter pylori* (173), um levantamento da diversidade genética de *Enterococcus faecalis* (174), a ocorrência de genes de virulência e de resistência a antimicrobicos em isolados de *Escherichia coli* de diferentes ecossistemas aquáticos (175) e a análise da expressão gênica global de *Pyrococcus furiosus* exposta à radiação  $\gamma$  (176).

Genomas seqüenciados por completo, combinados com métodos de análise do transcissoma, pode levar à identificação de genes essenciais à diferentes organismos. Se, aliado a isto, o perfil de expressão for analisado ao longo do tempo, os resultados poderão ser ainda mais completos, uma vez que a indução ou repressão de genes em um dado momento do desenvolvimento poderão ser detectados. Logo, o desenvolvimento de “projetos genoma funcional” vem de encontro à necessidade de aprofundar os conhecimentos obtidos a partir do seqüenciamento e anotação de genomas e da valorização do esforço e investimento empregados para se chegar àquela etapa. A crucial importância da genômica funcional é explicada pelo alto potencial na verificação de hipóteses, confirmações experimentais, estabelecimento de novos paradigmas e geração de patentes.

Portanto, a análise da expressão gênica global pode permitir identificar genes relacionados a um dado processo celular, tal como um processo infeccioso, a confirmação se uma dada ORF é realmente um gene, além de permitir supor novas vias de sinalização de sinais ou a complementação de vias previamente identificadas.

Desse modo, o presente estudo visou identificar genes de Xac relacionados ao processo de infecção, quando este fitopatógeno estava colonizando seu hospedeiro natural *citrus*, por meio do uso da técnica de microarranjos de DNA.

## 8 *Objetivos*

O objetivo geral desse estudo foi o de verificar a expressão gênica global de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri durante a colonização de folhas do hospedeiro laranjeira Pêra.

Os objetivos específicos incluem:

1. Identificar genes diferencialmente expressos e sua evolução ao longo de diferentes períodos de colonização;
2. Determinar genes com perfil de expressão similar;
3. Verificar a evolução da expressão de genes altamente significativos estatisticamente ao longo de todo o período de colonização analisados;

## **9** *Material e Métodos*

A expressão gênica global de Xac foi analisada em quatro diferentes situações: Xac cultivada em meio de cultura XAM1 por 12 h; Xac cultivada em meio de cultura XAM1 por 24 h; Xac multiplicada em folhas de laranjeira Pêra por 24 h; Xac multiplica em folhas de laranjeira Pêra por 72 h e Xac multiplicada em folhas de laranjeira Pêra por 120 h. Em todas as situações, a comparação se deu com Xac cultivada em meio de cultura NA por 12 h.

### **9.1** **Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo**

Xac foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura NA (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de ágar e água destilada suficiente para 1 L), a 28 °C. Todos os componentes do meio de cultura foram obtidos da Difco Chemical Co. Detroit, EUA. Após 24 h de cultivo, colônias isoladas foram transferidas para outras três placas contendo meio de cultura NA e incubadas por 12 h nas mesmas condições anteriores, sendo que as placas foram numeradas de 1 a 3. De cada uma dessas placas ajustou-se, assepticamente, uma suspensão celular para  $10^8$  UFC/mL (DO a  $600_{nm}$  igual a 0,3). De cada uma delas foram retirados 3 mL, sendo 1 mL transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura NA e os outros 2 mL foram divididos equitativamente em dois outros Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de cultura XAM1. Ao final, obteve-se um frasco contendo NA e dois frascos contendo XAM1, sendo que os três continham células de uma mesma placa (placa 1, placa 2 ou placa 3), perfazendo um total de 9 frascos.

Após os reagentes serem misturados nas respectivas proporções, o meio de cultura NA foi esterilizado em autoclave, a 121 °C, por 20 min. Já a preparação do meio de cultura XAM1 se deu em etapas. Primeiro foi produzido 1 L da solução 1 contendo 5 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 22,5 g de  $KH_2PO_4$ , 52,5 g de  $K_2HPO_4$ , 2,5 g de  $Na_3C_6H_5O_7 \times 2H_2O$  e água destilada suficiente para completar o volume. Essa solução foi autoclavada, a 121 °C, por 20 min e armazenada. Além dessa primeira, outras cinco soluções foram preparadas: 1 M Sulfato de magnésio ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ ), 36% (m/v) de frutose (Merck) em água deionizada; 68% (m/v) de sacarose (Merck) em água deionizada;

30% (m/v) de casamino ácidos (Difco) em água deionizada; e 10% de BSA em água deionizada. Todas as cinco soluções foram esterilizadas, as quatro primeiras em autoclave por 20 min e a última por filtração em filtro estéril 0,22  $\mu\text{m}$  sob fluxo laminar.

Após o preparo das soluções iniciais, os 50 mL do meio de cultura XAM1 foi obtido pela mistura de 5 mL da solução estoque 1, 50  $\mu\text{L}$  da solução de sulfato de magnésio, 50  $\mu\text{L}$  da solução de casamino ácidos, 30 mL de água deionizada. Neste ponto o pH foi ajustado para 5,4 com HCl. Após o ajuste do pH, o volume foi completado para 50 mL com água deionizada e autoclavado. No momento do uso, e em condições assépticas, foram adicionado 250  $\mu\text{L}$  da solução de frutose, 250  $\mu\text{L}$  da solução de sacarose e 500  $\mu\text{L}$  da solução de BSA, previamente preparadas e esterilizadas.

O crescimento em meio de cultura NA se deu por 12 h e o crescimento em meio XAM1 se deu por 12 e por 24 h. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 xg, por 5 min, e procedido, imediatamente, a extração de RNA total conforme seção 9.4. Desse modo, obtiveram-se três repetições biológicas independentes.

## 9.2 Inoculação e extração das células bacterianas de folhas de laranjeira

Para a obtenção de RNA, folhas de laranjeira Pêra cultivadas em vasos de 20 litros de capacidade foram infiltradas com uma solução de células de Xac, isolado 306, a 0,3 de DO a 600<sub>nm</sub>, obtidas de colônias de bactérias com 12 h de incubação em meio de cultura NA. As plantas inoculadas foram mantidas por 24, 72 e 120 h em laboratório a 28 °C. Empregaram-se três plantas para cada período de incubação.

Decorrido o período de multiplicação, as folhas inoculadas foram coletas e, imediatamente, fracionadas em tiras bem finas e colocadas em um Becker esterilizado contendo água destilada e mantido em banho de gelo. Para cada planta foi utilizado um Becker diferente. No meio aquoso, há a exsudação de células bacterianas a partir dos cortes gerados nas tiras de folhas. Para facilitar esse processo, o banho de gelo foi mantido sob agitação suave por 5 min. Em seguida, os restos foliares foram separados por filtração em gaze e as células foram recuperadas por centrifugação a 5.000xg por 5 min a 4 °C. A extração do RNA total ocorreu logo em seguida, conforme a seção 9.4.



## 9.3 Confeção do microarranjo de DNA

Esta parte do projeto foi realizada em colaboração, inicialmente, com o então aluno de doutorado Leandro Márcio Moreira e sua então orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Rasera da Silva. Com a saída da Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, São Paulo, a colaboração continuou com o Leandro e com a sua nova orientadora, a Dr<sup>a</sup>. Aline Maria da Silva, ambos, também, pertencentes ao Departamento de Bioquímica, do IQ-USP, São Paulo, Capital.

### 9.3.1 Seleção dos clones

Os clones que compunham a biblioteca genômica usada para o seqüenciamento de Xac foram gerados usando-se a metodologia de “shotgun” (177) em *pUC18* com insertos apresentando entre 1 e 4 Kb de tamanho. A partir de um algoritmo computacional, desenvolvido pelo grupo de bioinformática do projeto genoma das *Xanthomonas*, foi possível selecionar os clones “shotgun” contendo o maior número possível de genes que compreendem o genoma de Xac, segundo os dados de anotação (20). A partir desta análise, aproximadamente 96% dos genes estavam contidos em 4.421 clones, os quais estavam dispostos em duas grandes bibliotecas, uma pertencente ao IQ-USP em São Paulo e outra pertencente à UNESP Campus de Jaboticabal, SP.

O programa gerou uma lista contendo o endereçamento de cada um dos clones nas placas e em qual biblioteca a placa se encontrava. Com base nestes dados, uma réplica de cada placa foi providenciada para posterior rearranjo dos clones de interesse. Para tal, preparou-se meio de cultura TB (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura em 900 mL de água destilada) e adicionaram-se, sob fluxo laminar, 44 mL de tampão fosfato (125,4 g de  $K_2HPO_4$ , 23,13 g de  $KH_2PO_4$ , em um volume final de 1 L de água destilada), 400  $\mu$ L de carbenicilina (100 mg/mL) e 3,2 mL de glicerol 40%. Após homogeneização, distribuiu-se 1 mL desse meio de cultura em cada um dos 96 poços de uma placa tipo Elisa. Em seguida, procedeu-se à replicação das placas contendo os clones de bactérias, para uma nova placa, usando para isso um replicador manual de 96 pinos (Boekel). As placas foram seladas com adesivo apropriado, o qual foi furado, para permitir uma boa aeração, e mantidas a 37 °C sob agitação constante a 300 rpm por 24 horas. Após o processo de replicação das placas, procedeu-se ao rearranjo robotizado dos clones num equipamento “Q-Bot” (BCCC, UNESP Campus de Jaboticabal – SP). Após o rearranjo, as placas foram mantidas a –80 °C até o momento do uso.

A fim de verificar a qualidade e o correto endereçamento dos clones, todos eles foram reseqüenciados. Para tal, procedeu-se à multiplicação dos clones em placas tipo Elisa, conforme descrito previamente, e à extração do DNA plasmidial, por meio da técnica de “Boiling prep”, descrita na seção 9.3.2.

Os clones contaminados e/ou com erro de endereçamento e/ou onde a bactéria estava morta foram eliminados do processo. O restante foi novamente rearranjado e, para certificar-se de que tudo estava correto, uma coluna de cada placa foi multiplicada, procedida à extração do DNA plasmidial e seu inserto foi novamente seqüenciado.

### **9.3.2 Micro-Preparação de DNA plasmidial para uso no seqüenciamento e em reações de PCR (Boiling-prep)**

As colônias isoladas contidas nas placas tipo ELISA de 96 poços (Evergreen/Costar), estocadas em a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram descongeladas e os insertos semeados em placas do tipo “deep well” de 96 poços, contendo em cada poço  $1.000\ \mu\text{L}$  de meio CG (40 g de Circlegrow da “Q-BIO gene”; água destilada q.s.p. 1 L) acrescido de  $1\ \mu\text{L}$  de ampicilina (50 mg/mL). As amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante a 300 rpm, por 24 horas.

Após este período, o inóculo foi submetido à centrifugação a  $2.700\times g$  por 8 minutos, a  $20^{\circ}\text{C}$ , sendo desprezado o sobrenadante, permanecendo apenas o precipitado de bactéria na parte inferior da placa. Posteriormente, com o auxílio de um pipetador multicanal, foram adicionados aos precipitados  $25\ \mu\text{L}$  de água bidestilada estéril. Após agitação vigorosa em vortex e completa homogeneização, iniciou-se o processo de preparação da solução STET ( $200\ \mu\text{L}$  de NaCl 5 M; 0,65 g de Tween 20;  $22\ \mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M pH 8,0;  $160\ \mu\text{L}$  Tris-HCl 1 M pH 8,0; água bidestilada estéril q.s.p. 10 mL). Foram adicionados ao STET 0,005 g de lisosima e  $240\ \mu\text{L}$  de RNase A (10 mg/mL). Todas estas quantidades citadas acima são relativas a uma placa de 96 poços. A cada poço da placa foram adicionados, com o auxílio de um pipetador multicanal,  $70\ \mu\text{L}$  desta nova solução, chamada de MW-STET. Após agitação em vortex por 30 s, a placa foi mantida por 7 minutos em temperatura ambiente. A placa foi então submetida ao forno microondas por 30 s na potência 8 para ocasionar o rompimento da parede bacteriana. Imediatamente após esta etapa,  $300\ \mu\text{L}$  de água bidestilada estéril foram adicionados em cada poço da placa com o auxílio de um pipetador multicanal e, após homogeneização por 30 s, a placa foi mantida por 10 minutos em banho de gelo. Novamente as amostras contidas na placa foram submetidas à centrifugação a  $4.000\times g$  por 30 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$ . Por meio do uso de um pipetador multicanal, de cada poço da placa foi retirado,

aproximadamente, 60  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, o qual foi transferido para uma nova placa tipo ELISA de 96 poços (Evergreen/Costar), estocando-se o a suspensão de DNA a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a montagem da reação de seqüenciamento ou PCR.

Para determinar a quantidade de DNA a ser utilizada na reação de seqüenciamento, 3  $\mu\text{L}$  de cada amostra de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e fotodocumentado.

### 9.3.3 Amplificação por PCR das preparações de DNA plasmidial

Em uma placa de PCR com fundo em “V” e com capacidade máxima de 200  $\mu\text{L}$  (Sorenson Biosciences) foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções de DNA plasmidial, preparadas como descrito na seção 9.3.2. Logo em seguida, preparou-se, em um tubo Falcon de 15 mL, uma solução de amplificação contendo os seguintes reagentes: 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM, 1.000  $\mu\text{L}$  de tampão 10 $\times$  que acompanha a enzima, 40  $\mu\text{L}$  de dNTP 25 mM (Invitrogen), 400  $\mu\text{L}$  da mistura de oligonucleotídeos iniciadores universais 10 pmol/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen) que flanqueiam as extremidades do vetor de clonagem pUC19, 10  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase 5 U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen) e água bi-destilada estéril suficiente para 9.800  $\mu\text{L}$ . Em seguida, adicionaram-se 98  $\mu\text{L}$  da solução de amplificação em cada um dos poços da placa de amplificação, já contendo os 2  $\mu\text{L}$  de DNA plasmidial a ser amplificado. A placa foi vedada com selo de alumínio e submetida à amplificação em um termociclador “GeneAmp® PCR System 9700” (Applied Biosystems), com a seguinte ciclagem: 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos (desnaturação inicial); seguido de mais 30 segundos (desnaturação), que compreendem o início de um dos 30 ciclos de duplicação das fitas de DNA, 57  $^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos (pareamento) e 72  $^{\circ}\text{C}$  por 4 minutos (extensão da fita). Após o término do trigésimo ciclo procedeu-se a um acréscimo de mais 10 minutos de extensão, seguidos de um decréscimo da temperatura para 4  $^{\circ}\text{C}$ , mantendo-se nesta até a retirada da placa do termociclador. Três  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras foram aplicados em géis de agarose (1,2%) que, após serem corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), foram fotodocumentados. O restante do material foi utilizado para purificação do DNA amplificado.

### 9.3.4 Purificação dos produtos de PCR

Antes da purificação, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução C (4,35 g de sal sódico de MES – Sigma, 50 mL de água bi-destilada esterilizada) em cada um dos poços da placa contendo os produtos amplificados (ver seção 9.3.3) a serem purificados, e 10  $\mu\text{L}$  da solução A (7 M Guanidina

HCl, 200 mM MES pH 5,6) em cada um dos poços da placa de purificação Multiscreen 96 poços (Millipore). Em seguida, a placa de purificação foi submetida a uma centrifugação a 2.500 rpm por 1 minuto em uma centrífuga Eppendorf 5810 R. Essa placa de purificação possui, acoplada a ela, uma placa de coleta do material filtrado. Esta placa de coleta pode ser removida e substituída por outra, nova, para a coleta do material purificado.

Após homogeneização do amplificado com a solução C, transferiram-se os  $\sim 200 \mu\text{L}$  para a placa de purificação, previamente umedecida e acoplada à placa de coleta. O conjunto, placas de purificação e coleta, foi centrifugado a 2.500 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. A solução coletada na placa de coleta foi descartada e cada poço da placa de purificação foi lavado 4 vezes com  $200 \mu\text{L}$ , por poço, de etanol 80% em cada lavagem. A centrifugação, após cada um das quatro lavagens, foi feita a 2.500 rpm por 1 min em temperatura ambiente, descartando o coletado na placa de coleta ao final de cada ciclo. Após a quarta lavagem, e subsequente descarte do etanol coletado, as placas foram re-centrifugadas na mesma rotação, porém elevando-se o tempo para 5 minutos, para garantir a total eliminação do etanol. Ao término, trocou-se a placa de coleta por uma placa de coleta nova e aplicaram-se  $50 \mu\text{L}$  da solução de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 em cada um dos poços da placa de purificação, submetendo-as a uma centrifugação a 2.500 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. A partir da solução final coletada,  $2 \mu\text{L}$  foram aplicados em gel de agarose (1,2%) que foi, então, submetido a eletroforese, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e fotodocumentado.

### 9.3.5 Imobilização das seqüências nas lâminas de vidro

Posteriormente à purificação, as amostras de DNA foram re-arranjadas em placas de 384 poços, formato padrão utilizado pelo equipamento que deposita o DNA na lâmina de vidro. O conjunto de genes foi transferido das placas de 384 poços para as lâminas por intermédio de um robô “Generation III Microarrays Spotter” (Amersham Biosciences), sob temperatura e umidade controladas, (20 °C e 37% URA), respectivamente. Este robô permite a deposição de até 4.608 amostras de DNA organizadas em 12 subarranjos de 384 pontos. Cada subconjunto de 384 pontos é arranjado em 32 colunas por 9 linhas. O conjunto de 4.608 pontos foi depositado em duplicada, configurando um arranjo de  $32 \times 12 \times 2 \times 12$  (colunas de pontos por linhas de pontos, dentro de cada subarranjo, por colunas de subarranjos por linhas de subarranjos). No presente estudo foi utilizado um arranjo configurado para  $32 \times 9 \times 12 \times 2$ , totalizando 6.912 pontos na lâmina, incluindo as duplicatas.

O protocolo adotado previu a utilização de lâminas de vidro, tratadas com poli-L-lisina espelhadas tipo 7 “Star” (Amersham Biosciences), para a fixação dos clones de DNA de maneira

organizada. A superfície da lâmina é carregada positivamente, característica que auxilia a fixação do DNA por meio de ligação eletrostática com os radicais fosfatos da fita de DNA. Após a deposição da solução de DNA sobre as lâminas, estas foram submetidas a uma irradiação com luz UV e, em seguida, armazenadas em dessecador. A energia produzida pela irradiação permite a formação de ligações covalentes entre os resíduos de timina, principalmente, do DNA com os grupos aminos presentes na superfície da lâmina. Além disso, a luz UV ajuda a separar as duplas fitas de DNA, favorecendo a hibridização futura do DNA ao substrato (178).

Antes da deposição, as amostras purificadas foram misturadas a igual volume de DMSO, de modo que a concentração final fosse entre 200 e 400 fmol/ $\mu$ L de DNA. O DMSO mantém as fitas de DNA desnaturadas, o que expõe as bases nitrogenadas, facilitando a ligação dessas aos alvos marcados com os fluoróforos.

Ao final, o arranjo desse material atendeu a um mapa de consolidação que permite correlacionar a posição de cada clone ao nome da respectiva ORF fixada na lâmina, permitindo, assim, sua identificação e análises futuras.

### 9.3.6 Pós-processamento dos microarranjos de DNA

Após a deposição das amostras, os microarranjos passaram por uma etapa de pós-processamento para a fixação definitiva do DNA à superfície da lâmina.

Primeiramente, o DNA foi reidratado em câmara úmida, contendo 100 mL de SSC 1x, por 2 h. Em seguida o arranjo foi seco numa temperatura entre 85 – 90 °C, por 2 h, e fixado à lâmina por meio da exposição a raios UV a 65 mJ (cross-linking) e a um banho de formalina, por 1 minuto. As lâminas foram, então, lavadas por meio da imersão rápida, 5–10 vezes, em água destilada, secas, por meio de centrifugação a 700xg por 7 min, e imergidas em solução de ácido succínico e ácido bórico durante 30 segundos, seguida por agitação em “shaker” orbital por 25 minutos, a fim de bloquear a superfície da lâmina não utilizada. Finalmente, o DNA foi desnaturado, em água destilada a 95 °C, por 5 min, a lâmina lavada em etanol 95%, seca e armazenados em caixas de lâminas, à temperatura ambiente, em dessecador (URA *sim5%*).

### 9.3.7 Validação dos microarranjos de DNA

Após a imobilização das sondas nas lâminas, seguiu-se a uma hibridização com DNA total de Xac a fim de testar a qualidade do arranjo. Para tal, 4  $\mu$ g de DNA de Xac foram adicionados a um

tubo de 500  $\mu\text{L}$  e adicionou-se água bidestilada até o volume final de 44  $\mu\text{L}$ . Com o auxílio de uma seringa de insulina equipada com agulha (20 gauge), o DNA foi fragmentado, passando-o por 14 vezes através do orifício da agulha. O volume da solução foi dividido ao meio, em dois tubos de 500  $\mu\text{L}$ , e todos os procedimentos a seguir foram realizados para os dois tubos concomitantemente, apesar de ser descrito como se fosse para um único tubo. Ao final, um dos tubos recebeu o corante Cy3™ e o outro o Cy5™.

O DNA fragmentado recebeu 20  $\mu\text{L}$  de tampão  $2,5\times$  *random primer reaction buffer mix* (Invitrogen) e 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleotídeos degenerados de nove bases. Em seguida, essa solução foi aquecida, por 5 min, em banho de água em ebulição. Ao término desse passo, as amostras foram transferidas, imediatamente, para banho de gelo, onde receberam 3  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo todos os dNTPs (dCTP, dATP, dGTP e dTTP) a 10 mM cada um. Finalizando, 3  $\mu\text{L}$  de Cy5-dCTP™ ou Cy3-dCTP™ 1 mM (Amersham Biosciences) e 1  $\mu\text{L}$  da enzima Klenow Fragment 40 U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen) foram adicionados à solução, nesta ordem, e a amostra foi mantida a 37 °C por 2 horas, quando procedeu-se ao bloqueio da reação por meio da adição de 5  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M pH 8,0. Após a amostra ser purificada com o conjunto de reagentes “PureLink™ PCR Purification Kit” (Invitrogen), estas foram quantificadas em um aparelho *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* a fim de poder estimar a quantidade incorporada do respectivo fluoróforo. Essa quantificação foi realizada conforme descrito na seção 9.5.1.

As amostras foram hibridizadas às sondas imobilizadas nas lâminas conforme descrito na seção 9.5.2.

## 9.4 Extração de RNA total de *Xac*

As células bacterianas coletadas conforme as seções 9.1 e 9.2 foram submetidas à extração de RNA conforme descrito a seguir.

A extração do RNA total foi realizada com conjunto de reagentes para purificação de RNA total *Illustra RNAspin* (Amersham Biosciences), segundo as instruções sugeridas pelo fabricante. Este conjunto de reagentes remove possíveis traços de DNA da amostra, uma vez que, durante a marcha de extração, é realizado um tratamento com a enzima DNase I. Além disso, este conjunto de reagentes remove RNAs de baixo peso molecular, que tanto interferem na produção de cDNA a ser utilizado nas hibridizações dos microarranjos, além de interferirem no processo de hibridização contribuindo para um aumento da emissão de fundo (179).

As amostras obtidas foram submetidas à eletroforese, em gel de agarose 1% em tampão TAE, para verificar a qualidade do RNA extraído. O RNA das amostras foi quantificado em um aparelho *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* e as amostras armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso. Amostras com qualidade e/ou quantidade de RNA inadequadas foram re-extraídas.

## 9.5 Preparo dos alvos e hibridização

### 9.5.1 Produção e marcação do cDNA e hibridização das amostras

O conjunto de reagentes *SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen) foi utilizado para produzir os respectivos cDNA, a partir das amostras de RNA obtidas conforme seção 9.4, bem como para marcar estes cDNA com os fluoróforos Cy3™ e Cy5™ (Amersham Biosciences). O cDNA obtido a partir de RNA de células multiplicadas em meio de cultura NA foi marcado com o fluoróforo Cy5™, em todos os experimentos, e o obtido a partir de RNA de células multiplicadas em meio de cultura XAM1 ou a partir de folhas de laranjeira foi marcado com o Cy3. Seguiram-se, rigorosamente, as recomendações contidas no protocolo que acompanha o produto fornecido pela Invitrogen, partindo, inicialmente, de 20  $\mu\text{g}$  de RNA total.

A quantidade de cDNA marcado foi calculado pela formula  $cDNA(\text{ng}) = (A_{260} - A_{320}) \times 37\text{ng} \times \mu\text{L}^{-1}$  e a quantidade de fluoróforo incorporada foi calculada usando a fórmula  $Cy3(\text{pmole}) = \frac{(A_{550} - A_{650})}{0} \cdot 15 \times (\text{volume de eluição})$ , para o Cy3™, e  $Cy5(\text{pmole}) = \frac{(A_{650} - A_{750})}{0} \cdot 25 \times (\text{volume de eluição})$ , para o Cy5™. Espera-se valores em acima de 250 ng para a quantidade de cDNA marcado e acima de 40 pmoles para a quantidade de fluoróforos incorporados.

### 9.5.2 Hibridização das amostras

As amostras, marcadas com Cy3™ e Cy5™ e purificadas, foram secas à vácuo sob proteção da luz. Em seguida, o cDNA marcado com Cy3™ foi ressuspenso em 13,5  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases. Essa solução foi transferida para o tubo contendo o cDNA marcado com Cy5™, ressuspendendo-o, de modo que as amostras, a partir desse ponto, estão misturadas em uma única solução. Adicionaram-se 13,5  $\mu\text{L}$  de tampão de hibridização 4 $\times$  (Amersham Biosciences) e 27  $\mu\text{L}$  de formamida (Anmresco). Após homogeneização, a solução foi mantida a 90  $^{\circ}\text{C}$ , no escuro, por 2 min e transferida para banho de gelo, por igual período. A fim de eliminar possíveis bolhas, procedeu-se a uma centrifugação por 15 s à velocidade máxima em microcentrífuga. A mistura foi

mantida em banho de gelo até a sua deposição na lâmina.

A lâmina contendo o arranjo de DNA a ser hibridizado foi submetida a um jato de gás nitrogênio comprimido para a remoção de possíveis partículas indesejáveis presentes na sua superfície da lâmina. Do mesmo modo, a lamínula a ser utilizada foi limpa com papel *Kin Wipes*<sup>TM</sup>.

Finalmente, a solução contendo o cDNA marcado com Cy3<sup>TM</sup> e Cy5<sup>TM</sup> foi depositada sobre a lâmina de microarranjos de DNA e coberta com a lamínula, tomando o cuidado para a não formação de bolhas de ar, garantindo o completo contato entre as sondas e os alvos. A lâmina foi colocada em um berço de vidro e este colocado em uma cuba, também de vidro, com tampa. A cuba foi transferida para um forno e a hibridização prosseguiu a 42 °C, por um período de 16 horas, protegida da luz, após o que foi submetida ao processo de lavagem.

Previamente ao processamento digital dos sinais dos microarranjos de DNA, a lâmina foi submetida a cinco etapas de lavagem, manualmente e em cubas de vidro, a fim de eliminar sinais inespecíficos (*background*). Duas horas antes do início do procedimento de lavagem, as soluções que deveriam estar a 55 °C foram preparadas e colocadas em um banho-maria ajustado para essa temperatura.

Na primeira lavagem, a lâmina foi submetida a uma solução contendo SSC 1× e SDS 0,2%, previamente aquecida a 55 °C, por 10 min a temperatura ambiente, sob leve agitação constante. Na primeira imersão da lâmina nesta solução, a lamínula se desprende da mesma, automaticamente. Seguiram-se duas lavagens em solução contendo SSC 0,1× e SDS 0,2%, previamente aquecida a 55 °C, por 10 min cada uma, a temperatura ambiente, sob leve agitação constante. Logo em seguida, a lâmina foi lavada mais uma vez em solução contendo SSC 0,1× por 5 min a temperatura ambiente. Finalizando, a lâmina foi imersa em água destilada por 60 s e imediatamente submetida a um jato de gás nitrogênio comprimido, a fim de secá-la o mais rápido possível.

Neste ponto, as imagens (Cy3<sup>TM</sup> e Cy5<sup>TM</sup>) do microarranjo de DNA foram imediatamente digitalizadas em um equipamento “GMS 418 Array Scanner” (Affymetrix®), pertencente ao LBMP, da UNESP Campus de Jaboticabal, o qual é coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana G. de Macedo Lemos. Para cada lâmina foi gerada uma imagem referente à hibridização com Cy5<sup>TM</sup> (controle) e uma referente à hibridização feita com Cy3<sup>TM</sup> (teste). Após a digitalização das imagens as lâminas foram armazenadas em caixas plásticas, as quais foram mantidas sob vácuo, a temperatura ambiente e protegida da luz.



## 9.6 Análise estatística dos dados

As imagens geradas foram analisadas, aos pares, Cy3™ e Cy5™, pelo programa ArrayVision 8.0 (Image Research / Amersham Biosciences), o qual transforma a intensidade luminosa emitida por um ponto da lâmina em valor numérico. Previamente, foi informado ao programa um mapa indicando qual o local da lâmina onde existia sonda e onde não existia. Do mesmo modo, também fora informado o nome da sonda correspondente a um dado ponto da lâmina. Logo, para cada par de imagens, obtidas de uma mesma lâmina, o programa gerou uma tabela contendo um número de linhas igual ao número de pontos/genes presentes na lâmina, incluindo os pontos que só apresentam DMSO em sua composição (controle negativo) e os que correspondem aos controles positivos, “spike” (Amersham Biosciences). Essa tabela contém pelo menos 5 colunas: a primeira contém a identificação do ponto, XAC0001, por exemplo, duas possuem os valores referentes à emissão de fundo (“background”) e as outras duas possuem os valores referentes ao sinal emitido pelo interior do ponto/gene (“foreground”). Nos casos, uma coluna refere-se à valores gerados pelo fluoróforo Cy3™ e a outra refere-se a valores gerados pelo Cy5™.

A tabela gerada pelo programa ArrayVision 8.0, em formato texto delimitado por tabulações, foi lida no programa estatístico R (180) em ambiente GNU Linux Debian 3.2. No ambiente estatístico R, a qualidade dos arranjos foi avaliada por meio da visualização gráfica, as intensidades foram normalizadas e as subseqüentes análises estatísticas realizadas. O pacote para o programa R limma (181, 182) foi utilizada para averiguar a qualidade, para realizar as normalizações e para identificar os genes diferencialmente expressos. Antes do processo de normalização, os valores referentes à emissão de fundo foram subtraídos do respectivo valor colhido para o ponto onde se localizava a sonda, gerando o valor líquido para o respectivo ponto. Em seguida, geraram-se gráficos do tipo MA plot, box plot e do tipo printtiploess (183). Se verificada a necessidade de realizar uma normalização, esta foi feita dentro de cada arranjo, aplicando o método printtiploess, e, sua eficácia foi averigüada produzindo e observando os mesmo tipos de gráficos observados antes da normalização. Se, por acaso a normalização dos dados dentro dos arranjos não fosse satisfatória, uma segunda normalização entre arranjos era realizada utilizando o método “scale” (183, 184, 185). Após a normalização, realizaram-se os procedimentos estatísticos e os genes diferencialmente expressos em cada situação de interesse foram identificados, com uma significância de 5% ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). A fim de controlar a seleção de falsos positivos, utilizou-se um valor de FDR (186) igual a 0,05 para selecionar os genes significativos, ou seja, dentre todos os genes selecionados, a taxa de falsos positivos estará, estatisticamente, sempre abaixo de 5%.

A fim de verificar possíveis padrões de expressão comuns entre os genes, o pacote para o programa R *maSigPro* (187) foi utilizado. Esse programa analisa experimentos em séries temporais, tanto simples quanto múltiplos. *maSigPro* realiza uma estratégia de regressão em dois passos para procurar genes com expressão temporal significativa entre os grupos experimentais. O método define um modelo de regressão geral para os dados onde os grupos experimentais são identificados por meio de variáveis modelos. O procedimento inicial ajusta este modelo global, por meio da técnica dos quadrados mínimos, para identificar os genes diferencialmente expressos e aplica o FDR para controlar a taxa de falsas descobertas. No segundo passo, uma regressão linear passo-a-passo é aplicada como uma estratégia de seleção variável para estudar as diferenças entre os grupos experimentais para procurar perfis estatisticamente diferentes. Os coeficientes obtidos neste segundo modelo foram usados para agrupar os genes significativos que apresentam padrão de expressão similar e para visualizar os resultados.

Finalmente, a fim de verificar quais genes, individualmente, são significativos quando se analisam os dados da série temporal em conjunto, lançou-se mão do pacote para o programa R *timecourse* (188). Esse pacote gera, como resultado da análise, vários gráficos ordenados, iniciando do gene mais significativo para o menos significativo. Desse modo, pode-se verificar a evolução ao longo do tempo para qualquer um dos genes do banco analisado, desde que esse gene tenha apresentado a condição mínima para ser analisado, qual seja, a intensidade da expressão gênica maior que a intensidade da emissão de fundo.

Essas três análises estatísticas foram realizadas independentemente, não tendo nenhuma relação entre elas. Logo, não necessariamente uma ORF significativa em uma delas necessita ser, também, significativa nas outras análises, uma vez que cada uma possui metodologia própria e que se baseiam em hipóteses diferentes e/ou em grupo de dados distintos. Por exemplo, o pacote *limma* analisa os experimentos de forma individual e os outros dois, *maSigPro* e *timecourse*, analisam os experimentos em conjunto.

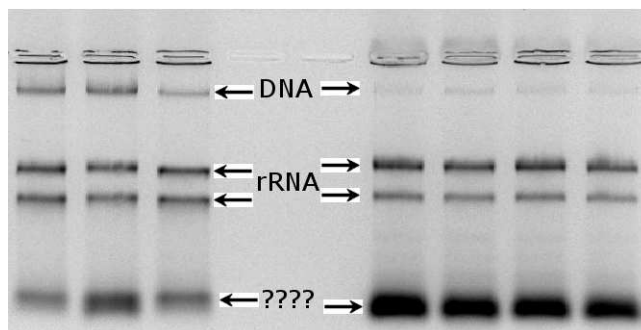
## ***10 Resultados***

### **10.1 Extração de RNA total de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

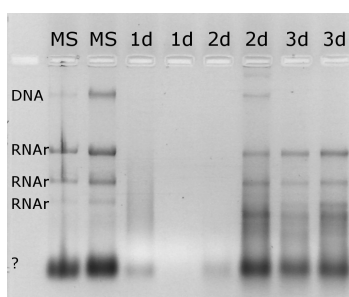
Um dos pontos cruciais em um estudo envolvendo a técnica de microarranjos de DNA é a qualidade e quantidade do RNA disponível para a análise. Um dos principais responsáveis pela má qualidade de preparações de RNA é a contaminação com a enzima RNase, seja externa ou do próprio organismo. Desse modo, tanto os utensílios utilizados para a extração quanto os reagentes utilizados devem ser isentos dessa enzima. Assim, os protocolos de extração trazem, na sua grande maioria, compostos que inibem a ação enzimática. Um desses produtos, o reagente Trizol (Invitrogen), é um dos mais largamente utilizados para a extração de RNA total, tanto de plantas, como de animais e de microrganismos.

No início do presente trabalho, as extrações de RNA foram realizadas utilizando o reagente Trizol, seguindo as instruções do fabricante. Na Figura 10.1 são apresentadas três amostras de RNA extraídas a partir de Xac multiplicada em meio de cultura NA líquido e quatro amostras obtidas a partir de Xac multiplicada no mesmo meio de cultura sólido. Observa-se que o RNA obtido a partir de células cultivadas em meio de cultura sólido possui uma maior contaminação com DNA (banda de maior tamanho no gel), enquanto que em meio de cultura líquido há uma banda de maior intensidade, indicada pelos símbolos “????”. Além disso, em ambas as amostras verifica-se que as duas bandas referentes aos RNAs ribossômicos 23S e 16S apresentam a mesma mobilidade.

No entanto, a reprodutibilidade das extrações, bem como extração de RNA de Xac cultivadas em folhas de laranjeira deixava a desejar. A Figura 10.2 mostra amostras de RNA total extraídas a partir de células bacterianas multiplicadas em folhas de laranjeiras Pêra, com um, dois e três dias da inoculação, e em meio de cultura. Verificou-se, experimentalmente, que com um e dois dias da inoculação foi muito difícil obter RNA, nestas condições, utilizando Trizol. Com dois, três e cinco dias (não mostrado) foi possível obter RNA da bactéria multiplicada *in planta*, mas, com dois



**Figura 10.1:** Perfil eletroforético de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, extraído com Trizol, de células de Xac multiplicadas em meio de cultura NA líquido (painel da direita) e NA sólido (painel da esquerda). A amostra presente em cada poço representa extrações independentes.

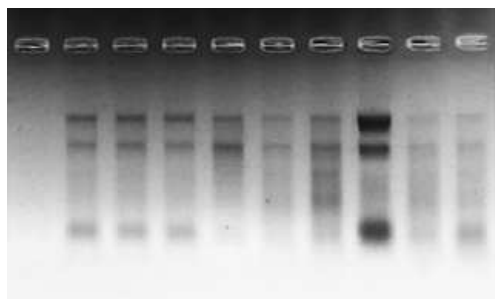


**Figura 10.2:** Perfil eletroforético de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, extraído com Trizol, de células de Xac multiplicadas em meio de cultura NA (MS) e de células de Xac extraídas de folhas de laranjeira 1 (1d), 2 (2d) e 3 (3d) dias após a inoculação. A posição dos RNAs ribossomais 23S e 16S é indicada.

dias a qualidade foi uma das piores. Observa-se a presença de DNA, bem como de uma banda desconhecida (?), além de três bandas de RNAr, que devem corresponder aos RNAs ribossomais 23S, 16S e 5S. Nas amostras de folhas nota-se um arraste de RNA mais intenso que nas provenientes de meio de cultura, caracterizando uma possível degradação.

A presença de DNA genômico deve ser totalmente eliminada da solução de RNA, uma vez que o mesmo pode ser marcado com fluoróforo e resultar em falsos positivos. Este procedimento implica em manipular a solução de RNA novamente, o que implica em mais perdas, tanto de qualidade quanto de quantidade (Figura 10.3). Logo, para se obter uma quantidade razoável de RNA suficiente para uma análise, há que se partir de grandes quantidades iniciais de RNA, uma vez que as perdas são significativas (dados não mostrados).

Apesar de ter sido possível utilizar RNA total de Xac extraído com Trizol para análise de “Northern Reverso” (Ver Primeira Parte desta Tese), desde que realizada logo após a extração, esse mesmo RNA não foi adequado para análise de microarranjos de DNA, principalmente aqueles

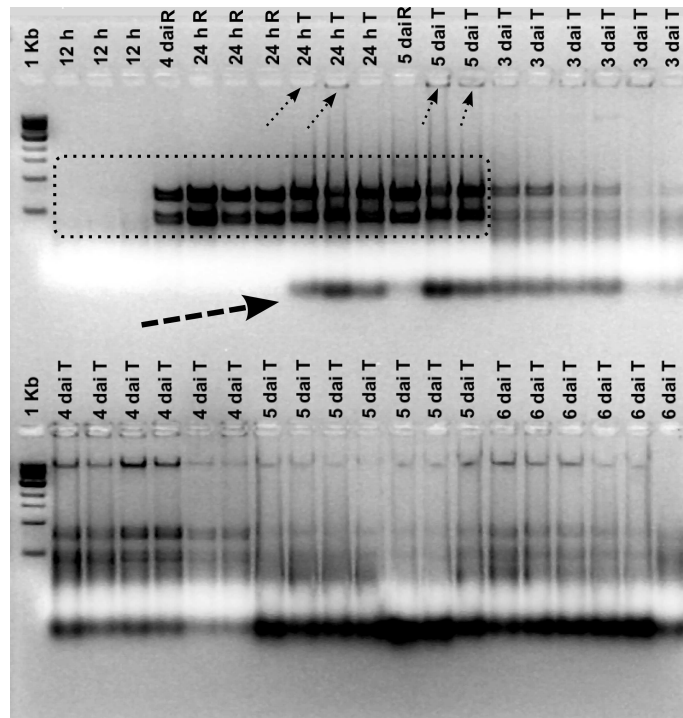


**Figura 10.3:** Perfil eletroforético de 5 µL de RNA total de Xac, extraído com Trizol, imediatamente após ter sido purificado para eliminar o DNA contaminante, conforme seção 4.9.2.

extraídos de plantas. Após um longo período tentando padronizar o protocolo de extração de RNA total com Trizol de modo a obter material adequado à técnica de microarranjos de DNA, optou-se por testar outros dois conjuntos de reagentes existentes no mercado e específicos para extração de RNA total: *ChargeSwitch Total RNA Cell Kits*, produzido pela Invitrogen e *Illustra RNAspin* produzido pela Amersham Biosciences.

O conjunto de reagentes *ChargeSwitch Total RNA Cell Kits* não foi satisfatório (resultados não apresentados). Por outro lado, o conjunto de reagentes produzido pela Amersham Biosciences, *Illustra RNAspin*, possibilitou a extração de RNA de excelente qualidade (Figura 10.4). Nota-se que o uso desses reagentes diminuíram a presença de bandas de RNA de baixo peso molecular, ou produto de degradação, da preparação. Além das bandas de baixo peso molecular, as amostras extraídas com Trizol apresentam impurezas que ficam retidas no local de aplicação da amostra no gel. Além disso, pode ser verificado na Figura 10.4 que as amostras previamente extraídas com Trizol e armazenadas, degradaram consideravelmente. Uma outra vantagem do conjunto de reagentes *RNAspin* é o tratamento com DNase I já durante o processo de extração, fato que facilita o trabalho, minimiza os custos e diminui o número de vezes em que se necessita manipular as amostras, diminuindo, com isso, as chances de degradação ou perda do RNA. Dessa maneira, RNA de Xac multiplicada em meio de cultura XAM1, em meio de cultura NA e em plantas foi, então, obtido por este método e utilizado para hibridização das lâminas de microarranjos.

Outra desvantagem do Trizol era a necessidade de uma grande quantidade de folhas de laranjeiras inoculadas para poder obter uma quantidade mínima de RNA de Xac. Esse fato demandava um período longo infiltrando folhas, de 4 a 6 horas, o que inviabilizava o estudo de Xac multiplicada em folhas de laranjeira por períodos menores que 72 h. Considerando que a quantidade de células de Xac nas folhas com 1 ou 2 dias de crescimento é muito pouca, a quantidade de folhas a ser infil-



**Figura 10.4:** RNA total de *Xac* extraído com o conjunto de reagentes *RNAspin* (Amersham Biosciences) e com o regente Trizol (Invitrogen). As amostras extraídas com Trizol estão indicados por um “T” e as com *RNAspin* estão indicadas por um “R”. O retângulo pontilhado destaca extrações recentes. As demais amostras retratam o estágio das mesmas após um período de armazenamento. A seta tracejada indica a presença de RNA de baixo peso molecular ou degradação. As setas pontilhadas indicam a presença de sujeiras retidas no gel no ponto de aplicação das amostras. dai = dias após a inoculação.

trada tornou esse experimento inviável com o protocolo de extração à base de Trizol. Esse problema também foi resolvido com o conjunto de reagentes *RNAspin*, uma vez que, com esses reagentes, é possível a extração de RNA a partir de uma pequena quantidade de células. Desse modo, além de 3 e 120 h, RNA de *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h também foi possível de ser obtido.

## 10.2 Construção do microarranjo de DNA

Procurou-se construir um microarranjo de DNA que pudesse representar o maior número possível das ORFs anotadas para o genoma de *Xac* (20) e que apresentasse um baixo custo. Logo, resolveu-se utilizar os clones oriundos do projeto genoma da própria *Xac* para tal, pois assim poder-se-ia utilizar os oligonucleotídeos universais (SP-6 e T7 ou M13R e M13F) para amplificação por PCR das ORFs presentes nos clones, visto ser este um dos custos mais elevados no processo de

construção de um microarranjo de DNA a partir de PCR, para a produção das sondas a serem fixadas nas lâminas. No entanto, antes da produção de tais sondas, necessário foi encontrar, confirmar e preparar os clones para as ampliações.

O projeto genoma de Xac gerou duas coleções de bibliotecas “shotgun” independentes, com insertos entre 500 e 4.000 pb, obtidas a partir de uma mesma preparação inicial de DNA, contendo, no total, 46.462 clones. Desse modo, por meio de análise *in silico* foram selecionados 4.421 clones representativos de 3.084 ORFs. Um clone foi considerado representativo de uma dada ORF quando a maior parte do seu inserto era composta por um gene de interesse, mesmo que no restante da sequência existissem outras seqüências. Esse procedimento não permitiu identificar clones que representassem 1.229 ORFs.

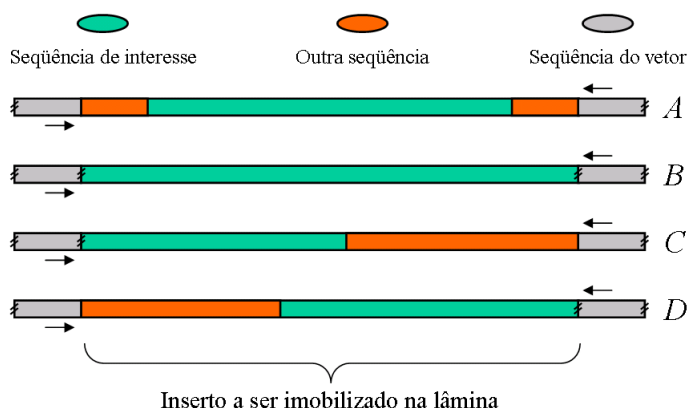
Os insertos presentes nos clones foram classificados em quatro tipos (Figura 10.5), quais sejam:

- A – o inserto contém a ORF completa, podendo ou não ser flanqueada por outras seqüências gênicas;
- B – o inserto é a própria ORF de interesse ou parte desta. Não há contaminação com outras seqüências;
- C – parte da ORF de interesse está ligada diretamente ao vetor pelo seu lado esquerdo. O restante da seqüência do inserto pode ser regiões intergênicas ou parte de outra ORF;
- D – parte da ORF de interesse está ligada diretamente ao vetor pelo seu lado direito. O restante da seqüência do inserto pode ser regiões intergênicas ou parte de outra ORF.

Inicialmente, os 4.421 clones estavam divididos entre 2.055 (~46,5%) do tipo A, 463 (~10,5%) do tipo B, 827 do tipo C (~19,0%) e 1.124 do tipo D (~25,5%). Cabe salientar que o tamanho médio das regiões intergênicas de Xac é de 200 pb, o que diminui a probabilidade de ocorrência de hibridização cruzada.

Após definição dos clones a serem utilizados no projeto, todas as placas que continham pelo menos um clone de interesse foram replicadas e os mesmos foram rearranjados em 47 placas, representando 72% de todos os possíveis genes que compreendiam o genoma de Xac.

Durante as análises iniciais foi verificado que 5% dos clones não se multiplicavam em meio de cultura, impossibilitando o seu aproveitamento. Dentre aqueles cujo plasmídeo foi possível extrair,



**Figura 10.5:** Esquema ilustrando os quatro tipos de insertos encontrados nas bibliotecas do projeto genoma de Xac. As setas representam o local onde os oligonucleotídeos iniciadores irão parear durante o processo de amplificação desses insertos. A – o inserto contém a ORF completa; B – o inserto é a própria ORF; C e D – parte da ORF de interesse está ligada diretamente ao vetor por um de seus lados. Nos insertos dos tipos A, C e D existe a presença de outras seqüências de DNA que podem ou não ser parte de outras ORFs. Dois pequenos segmentos de reta paralelos dispostos na diagonal indicam ruptura da seqüência de nucleotídeos da ORF de interesse ou do vetor.

10% apresentaram um tamanho de inserto diferente do tamanho esperado e em 15% dos casos não houve amplificação.

Uma vez que muitos insertos apresentaram tamanhos de fragmentos amplificados diferente do esperado, resolveu-se ressequenciar todos os clones e comparar os resultados com o genoma de Xac, a fim de confirmar a seqüência de nucleotídeos de cada um dos clones em uso.

O ressequenciamento dos clones mostrou que 28% apresentavam endereçamento errado, enquanto que cerca de 12% estavam contaminados ou a bactéria contendo o plasmídeo havia morrido durante o processo de estocagem. A contaminação foi evidenciada pelo péssimo resultado obtido pelo seqüenciamento, o qual apresentava picos duplos.

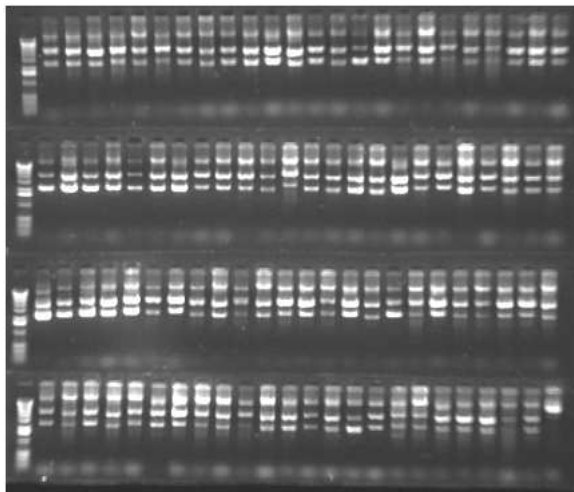
Os clones que apresentaram endereçamento correto foram novamente rearranjados em 28 placas, as quais contêm 2.653 clones capaz de cobrir o mesmo número de ORFs de Xac. A validação desse último rearranjo, por meio do ressequenciamento de uma coluna de cada placa, confirmou todos os endereçamentos.

Outras perdas ocorreram durante a extração de DNA plasmidial das amostras (Figura 10.6) contidas nas 28 placas, durante as reações de PCR (Figura 10.7), e durante o processo de purificação desses produtos da PCR (Figura 10.8), fazendo com que o número de clones úteis baixasse para 2.639 seqüências de DNA. Uma análise destes clones revelou que, de todas as 104 subcate-



gorias anotadas em Xac, apenas 17 delas possuem menos do que 50% das ORFs que as compõem representada no microarranjo de DNA de Xac.

A este conjunto de seqüências foi somado mais 34 ORFs de interesse, obtidas por meio da amplificação de DNA genômico de Xac utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para tais ORFs. Esse conjunto de 2.673 seqüências de DNA, após serem purificadas, foi rearranjado em placas de 384 poços, perfazendo um conjunto de sete placas.

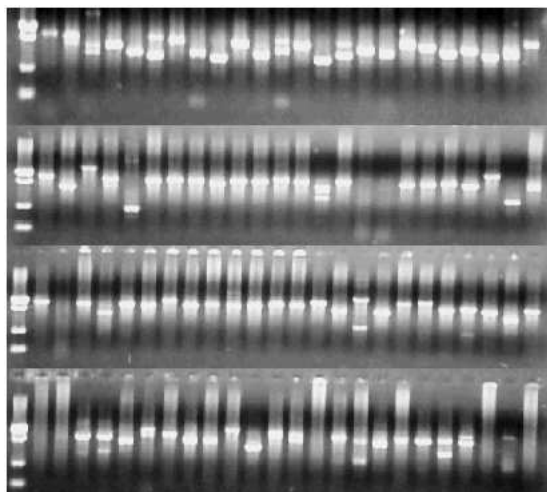


**Figura 10.6:** Perfil eletroforético de 3  $\mu$ L de DNA plasmidial isolado de clones contendo DNA de Xac. O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e a primeira coluna de cada um dos pentes do gel refere-se ao padrão de tamanho molecular 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Desse modo, o microarranjo de DNA de Xac amostra 2.673 ORFs, possui 384 controles positivos e 312 controles negativos. Uma vez que existem algumas ORFs de Xac duplicadas, resultando em mais 87 pontos, o microarranjo de DNA de Xac ficou assim constituído: 2.673 ORFs, 87 ORFs repetidas, 312 controles negativos (DMSO) e 384 controles positivos (Lucidea Universal ScoreCard, Amersham Biosciences), totalizando 3.456 pontos em cada um dos arranjos. Logo, o microarranjo é formado por 6.912 pontos.

### 10.2.1 Validação do microarranjo de DNA

A fim de verificar se as lâminas produzidas com os microarranjos de DNA estavam com boa qualidade foi realizada uma marcação utilizando DNA genômico de Xac como alvo para as sondas do microarranjo (hibridização DNA–DNA). Convém ressaltar que as seqüências conhecidas são as seqüências de DNA que estão fixadas nas lâminas. Neste caso, essas seqüências são as sondas.



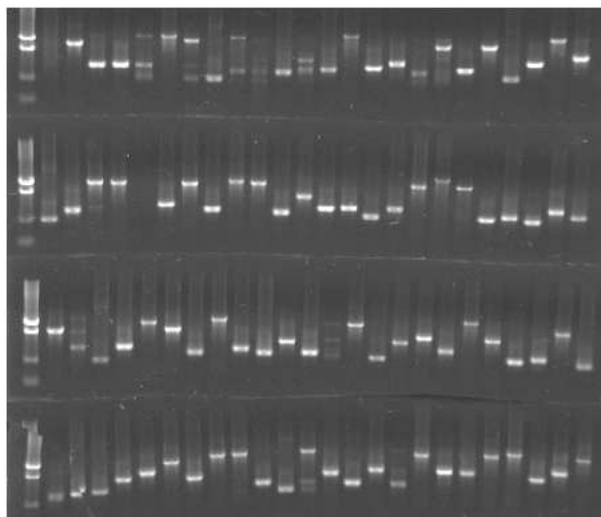
**Figura 10.7:** Perfil eletroforético de 3  $\mu$ L de DNA amplificado por PCR a partir de DNA plasmidial. O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e a primeira coluna de cada um dos pentes do gel refere-se ao padrão de tamanho molecular 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Estas sondas irão então identificar alvos desconhecidos que serão hibridizados, sejam eles DNA ou RNA (179, 189).

A análise das imagens obtidas (Figura 10.9) permitiu verificar que, dos 2.673 pontos que representam ORFs de Xac, 2.365 pontos, (85,7% do total) apresentaram sinal de hibridização maior que a emissão de fundo. Esse resultado permite concluir que as lâminas apresentam boa qualidade e que o processo de hibridização, assim como os reagentes e equipamentos empregados no mesmo, estavam funcionando perfeitamente. No entanto, verifica-se que a marcação com o fluoróforo Cy5™ ficou com qualidade inferior à marcação realizada com o fluoróforo Cy3™.

### 10.3 Análise da expressão gênica de Xac em diferentes condições de cultivo

Inicialmente, estava previsto que as hibridizações seriam executas automaticamente em um equipamento que executa todos os processos, desde a hibridização, propriamente dita, até a secagem da lâmina, passando pelas lavagens necessárias. No entanto, testes iniciais mostraram que as lâminas utilizadas, as quais são espelhadas (Amersham Biosciences), soltam parte do espelho durante o processo automatizado, fato, este, que mancha a lâmina, cobrindo importantes regiões da mesma ou gerando emissão de fundo indesejável. Portanto, adotou-se realizar o processo de hibridização manualmente em cubas de vidro utilizadas para coração de lâminas em geral.



**Figura 10.8:** Perfil eletroforético de 2  $\mu\text{L}$  do produto da PCR após ser purificado. O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e a primeira coluna de cada um dos pentes do gel refere-se ao padrão de tamanho molecular.

A Figura 10.10 mostra o resultado de uma das hibridizações realizadas. Observa-se que existe emissão de fundo indesejável (*background*), mas sinais de hibridização específica da sonda com os cDNAs marcados podem ser claramente observados.

A Tabela 10.9 apresenta todos os genes diferencialmente expressos em *Xac* obtidos nos cinco experimentos realizados em triplicata: *Xac* multiplicada em meio XAM1 por 12 h, *Xac* multiplicada em meio XAM1 por 24 h, *Xac* multiplicada em folhas de laranjeiras por 24 h, *Xac* multiplicada em folhas de laranjeiras por 72 h e *Xac* multiplicada em folhas de laranjeiras por 120 h. Verifica-se que foram induzidos genes com similaridade a celulases (XAV0028), genes do sistema sensor de dois componentes (XAC0225), genes de avirulência conhecidos (*avrXacE1*, *E2* e *E3*), inibidor de proteinase (XAC0347), vários genes *hpa*, *hrc* e *hrp* (XAC0394, XAC0406, XAC0408), genes *kdp* (XAC0758), receptores de colicina (XAC0999), receptores de ferro (XAC2185), transposase (XAC2371), proteínas produtoras de goma (XAC2575), genes *rpf* (XAC1877), genes relacionados a detoxificação celular (XAC2843) e muitas proteínas hipotéticas. Dentre o grupo dos reprimidos observa-se genes envolvidos na gliconeogênese (XAC0124), genes da biossíntese de ácidos graxos (XAC1129), de transporte (XAC2600), da degradação de lipídios (XAC1315), genes envolvidos na respiração anaeróbica (XAC2700), proteínas regulatórias (XAC3443), degradação de proteínas (XAC3627), genes previamente conhecidos como relacionados ao processo de patogenicidade e virulência (XACb0015, XAC2620), bem como proteínas hipotéticas.

### 10.3.1 Análise da expressão gênica de *Xac* em meio de cultura XAM1

A expressão gênica de *Xac* em meio de cultura XAM1 após 12 h de crescimento, comparada à expressão gênica de *Xac* multiplicada em meio de cultura NA por igual período, apresentou 229 genes induzidos em XAM1 e 162 reprimidos (Tabela 10.1). Dentre os genes induzidos, aqueles pertencentes à categoria VIII.A (Proteínas hipotéticas conservadas) são os mais abundantes, correspondendo a 18,34% do total, seguido pelos genes da categoria V.C (10,04%– Quimiotaxia e mobilidade) (Figura 10.11). Do mesmo modo, a categoria VIII.A também é a mais abundante dentre os genes reprimidos, seguida pelas categorias VIII.B (Proteínas hipotéticas) e VIII.C (Proteína hipotética conservada em *Xanthomonas*), representando 13,58%, 11,73% e 7,41%, respectivamente (Figura 10.11). Das 104 categorias definidas para o genoma de *Xac* (Anexo A), 69 (66,3%) delas estão representadas por pelo menos um gene dentre o conjunto de genes diferencialmente expressos nesta condição (Tabela 10.1).

**Tabela 10.1:** ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em *Xac* quando esta foi multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e se ela foi induzida ou reprimida. X12h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h; P3 = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 72 h; P5 = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0575	arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase	r					I.A.1
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	i		i	i	i	I.A.2
XAC3862	(tcbD) chloromuconate cyclisomerase	i					I.A.2
XAC4009	(argI) arginase	i					I.A.2
XAC1138	(prpC) citrate synthase 2	r		r			I.A.2
XAC1214	(gcvP) glycine decarboxylase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1316	(mmsB) 3-hydroxyisobutirate dehydrogenase	r		r	r	r	I.A.2
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC4327	(uahA) urea amidolyase	r					I.A.2
XAC1313	(fadE9) acyl-CoA dehydrogenase	r		r	r		I.A.3
XAC1314	(paaF) enoyl-CoA hydratase	r	r		r	r	I.A.3
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0211	(gloA) lactoylglutathione lyase	i				i	I.B.10
XAC0923	(pntA) pyridine nucleotide transhydrogenase subunit alpha	i					I.B.10
XAC2469	(gabD) succinate-semialdehyde dehydrogenase	i	i			i	I.B.10
XAC3632	(gloA) lactoylglutathione lyase	r					I.B.10
XAC0124	(cbbFC) fructose-1,6-bisphosphatase	r		r	r	r	I.B.3
XAC0256	(mls) malate synthase	i	i				I.B.4
XAC0491	(nudH) probable (di)nucleoside polyphosphate hydrolase	i		i	i	i	I.B.7
XAC2759	(phoA) alkaline phosphatase	r		r		r	I.B.9
XAC1260	(cyoC) cytochrome O ubiquinol oxidase subunit III	i					I.C.1
XAC2455	(petC) ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome C1 subunit	i					I.C.1
XAC2697	(nuoH) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO8 subunit	i		r			I.C.1
XAC2983	quinol oxidase subunit I	i				i	I.C.1
XAC2336	(cydA) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	r	r		r		I.C.1
XAC2337	(cydB) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	r	r	r	r		I.C.1
XAC2486	formate dehydrogenase a chain	i		i		i	I.C.2
XAC2826	alcohol dehydrogenase	i	i				I.C.2
XAC0492	bacterioferritin-associated ferredoxin	i					I.C.3
XAC1160	oxidoreductase	i					I.C.3
XAC2062	(cycM) cytochrome C552	i					I.C.3
XAC2136	oxidoreductase	i	r		i		I.C.3
XAC2233	short chain dehydrogenase	i					I.C.3
XAC3477	(mocA) rhizopine catabolism protein mocA	i					I.C.3
XAC3676	oxidoreductase	i			i		I.C.3
XAC4186	(ucpA) oxidoreductase	i				i	I.C.3
XAC3431	short chain dehydrogenase	r					I.C.3
XAC3575	(etfQO) flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	r		r	r	r	I.C.3
XAC3344	fructose-bisphosphate aldolase	r					I.C.4
XAC1633	(gcd) glucose dehydrogenase	i	i	i		i	I.C.5
XAC1542	(fumC) fumarate hydratase	i					I.C.7

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1006	(mdh) malate dehydrogenase	r		r			I.C.7
XAC2078	(sdhB) succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	r	r	r			I.C.7
XAC3649	(atpD) ATP synthase beta chain	r		r			I.C.8
XAC3650	(atpG) ATP synthase gamma chain	r		r	r	r	I.C.8
XAC3651	(atpA) ATP synthase alpha chain	r		r		r	I.C.8
XAC0730	two-component system regulatory protein	i	i				I.D.1
XAC2804	(baeS) two-component system sensor protein	i					I.D.1
XAC0495	two-component system regulatory protein	r					I.D.1
XAC3993	two-component system regulatory protein	r	i				I.D.1
XAC4023	(phoP) two-component system regulatory protein	r					I.D.1
XAC0333	(metR) regulador transcricional metE/metH family	i					I.D.2
XAC1173	(uidR) regulador transcricional uid family	i			i		I.D.2
XAC1655	regulador transcricional	i		i	i	i	I.D.2
XAC1743	(csrA) carbon storage regulator	i					I.D.2
XAC1767	(gbpR) galactose-binding protein regulator	i				i	I.D.2
XAC2482	(rrpX) regulador transcricional	i		i			I.D.2
XAC3137	(exsB) regulador transcricional	i					I.D.2
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC3476	(ybhD) regulador transcricional	i			i	i	I.D.2
XAC3487	(cebR) regulador transcricional	i			i		I.D.2
XAC4359	sugar diacide regulator	i					I.D.2
XAC0266	regulador transcricional acrR family	r				r	I.D.2
XAC0581	regulador transcricional araC family	r					I.D.2
XAC3689	(lrp) leucine responsive regulatory protein	r					I.D.2
XAC0610	proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta	i		i			I.D.3
XAC1669	proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta	i				i	I.D.3
XAC4127	(pknB) quinase serina/treonina	i		i			I.D.3

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1345	sensor histidine kinase	r					I.D.3
XAC1319	(algU) RNA polymerase sigma-H factor	i					I.D.4
XAC1380	(rpoE) RNA polymerase sigma factor	i		i			I.D.4
XAC1939	GGDEF family protein	i		i			I.D.4
XAC3824	(rpoH) RNA polymerase sigma-32 factor	i		i	i	i	I.D.4
XAC3429	(argD) acetylornithine amino-transferase	r					II.A.1
XAC0382	(aspH) aspartyl-asparaginyl beta-hydroxylase	r					II.A.2
XAC0630	(aspC) aminotransferase	r		r	r	r	II.A.2
XAC1432	(dapE) succinyl-diaminopimelate desuccinylase	r				r	II.A.2
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC1000	(dhs1) family II 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	i					II.A.4
XAC2716	(trpA) tryptophan synthase alpha chain	i					II.A.4
XAC0480	(trpD) anthranilate synthase component II	r	i		r		II.A.4
XAC1832	(hisH) amidotransferase	i					II.A.5
XAC3437	(adk) adenylate kinase	i					II.B.1
XAC1032	(purF) amidophosphoribosyl-transferase	r	r		r	r	II.B.1
XAC0861	(apaH) diadenosine triphosphatase	r			r	r	II.B.4
XAC2824	phosphodiesterase-nucleotide pyrophosphatase	r		r			II.B.4
XAC0388	(bioB) biotin synthase	i					II.D.1
XAC3830	(trxA) thioredoxin	i					II.D.10
XAC4072	(trxA) thioredoxin	r					II.D.10
XAC3114	(pqqG) pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein G	i		i		i	II.D.11
XAC3116	(pqqC/D) PqqC/D protein	i	i		i		II.D.11
XAC3340	(cysG) siroheme synthase	r					II.D.12
XAC2098	(syrE2) ATP-dependent serine activating enzyme	r					II.D.15
XAC2744	phytoene dehydrogenase	i		i		i	II.D.17

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1099	(moaD) molybdopterin-converting factor chain I	i	r	i		i	II.D.4
XAC2023	(moeB) molybdopterin biosynthesis protein	bi-i					II.D.4
XAC3792	(ribA) riboflavin biosynthesis protein	i					II.D.9
XAC1964	(fabH) 3-oxoacyl-[ACP] synthase	i					II.E
XAC2048	(phbC) poly (3-hydroxybutyric acid) synthase	i					II.E
XAC2756	acyl-CoA thioester hydrolase	i				i	II.E
XAC3625	(fabB) beta-ketoacyl-[ACP] synthase I	i					II.E
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC1128	(acpP) acyl carrier protein	r		r		r	II.E
XAC1199	(dnaE2) DNA polymerase III alpha chain	r					III.A.1
XAC1740	(recA) RecA protein	i					III.A.3
XAC2297	(ihfB) integration host factor beta subunit	i					III.A.3
XAC3016	(rebA) RebA protein	i					III.A.3
XAC3017	(rebB) RebB protein	i				i	III.A.3
XAC3551	(xerD) integrase-recombinase XerD	i		i			III.A.3
XAC4336	(recB) exodeoxyribonuclease V beta chain	r					III.A.3
XAC1586	MutT-nudix family protein	i		i			III.A.4
XAC2030	(xthA2) exodeoxyribonuclease III	i					III.A.4
XAC3825	(ung) uracil-DNA glycosylase	i					III.A.4
XAC2281	RadC family protein	r				r	III.A.4
XAC4171	(xthA1) exodeoxyribonuclease III	r					III.A.4
XAC2084	(comA) competence protein	r	r	r			III.A.5
XAC2900	(hsdM) type I restriction-modification system DNA methylase	r				r	III.A.5
XAC0975	(rplB) 50S ribosomal protein L2	i					III.B.2
XAC0997	(rplQ) 50S ribosomal protein L17	i				i	III.B.2
XAC0968	(rpsG) 30S ribosomal protein S7	r					III.B.2

Continua na próxima página



**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC4158	(rpmG) 50S ribosomal protein L33	r					III.B.2
XAC2514	(queA) adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	S- i					III.B.4
XAC2589	(pheT) phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	i					III.B.4
XAC3800	(fmt) Formyltetrahydrofolate:L-methionyl-tRNA formyltransferase	10- i	i				III.B.4
XAC1386	(metS) methionyl-tRNA synthetase	r					III.B.4
XAC0078	ATP-dependent RNA helicase	r			r	r	III.B.5
XAC0244	pseudouridylate synthase	r					III.B.5
XAC2687	(infB) protein chain initiation factor IF-2	i					III.C.1
XAC1005	(ppiB) peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	r		r		r	III.C.1
XAC0669	(prc) tail-specific protease	i					III.C.3
XAC1736	(hflX) GTP-binding protein	i					III.C.3
XAC2001	(clpA) ATP-dependent Clp protease subunit	i					III.C.3
XAC3195	(clpB) ATP-dependent Clp protease subunit	i				r	III.C.3
XAC0249	(dcp) peptidyl-dipeptidase	r		r	r	r	III.C.3
XAC2537	peptidase	r					III.C.3
XAC3403	(pepQ) proline dipeptidase	r					III.C.3
XAC3987	leucine aminopeptidase	r			r	r	III.C.3
XAC0425	(glgA) glycogen synthase	i			i	i	III.D.1
XAC1887	(pdeA) c-di-GMP phosphodiesterase A	i		i			III.D.1
XAC3909	(dpm1) dolichol-phosphate mannosyltransferase	r					III.D.1
XAC4099	(plsC) acyltransferase	i		i		i	III.D.2
XAC3823	proteína hipotética conservada	i				i	IV.A.1
XAC3867	(yiaA) membrane protein	i	r		i	i	IV.A.1
XAC4028	(ankB) ankyrin-like protein	i		i		i	IV.A.1
XAC0664	(dacC) penicillin-binding protein 6	r					IV.A.1
XAC3912	(algC) phosphomannomutase	r				r	IV.A.1
XAC0999	(cirA) colicin I receptor	i	i		i	i	IV.A.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1425	(fasD) outer membrane usher protein FasD	i	i				IV.A.2
XAC2802	(ttgF) outer membrane channel protein	i	r	i			IV.A.2
XAC1305	(wapA) wall-associated protein	r					IV.A.2
XAC0658	(mreD) rod shape-determining protein	i					IV.B
XAC0779	(murG) UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol	i		i	i	i	IV.B
XAC3141	(ompP6) outer membrane protein P6 precursor	r					IV.B
XAC1176	(srfJ) glycosyl hydrolase	i	i				IV.C
XAC1957	(rbfC) O-antigen biosynthesis protein	i					IV.C
XAC1038	(gtrB) glycosyl transferase	r					IV.C
XAC2965	(murA) UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	r			r	r	IV.C
XAC2666	(pilX) PilX protein	i		i			IV.D
XAC3239	(pilB) pilus biogenesis protein	i					IV.D
XAC3240	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC3241	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC1968	response regulator	i			i		IX
XAC2670	alginate biosynthesis protein	i			r		IX
XAC3826	response regulator protein	i					IX
XAC0170	sugar-phosphate isomerase	r					IX
XAC2570	(gumP) GumP protein	r					IX
XAC4221	hydrolase	r					IX
XAC0449	(yhiP) di-tripeptide transporter	i					V.A.1
XAC3157	(ycaD) transmembrane transport protein	i	i				V.A.1
XAC2468	(corA) magnesium and cobalt transport protein	i	i			i	V.A.4
XAC2980	(mgtE) Mg <sup>++</sup> transporter	i		i			V.A.4
XAC3176	(fecA) citrate-dependent iron transporter	i					V.A.4
XAC0254	(yjl094C) Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -exchanging protein	r					V.A.4
XAC1438	(brf) bacterioferritin	r	r	r			V.A.4

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC4216	(tatC) sec-independent protein translocase	r					V.A.6
XAC2066	(acrD) transport protein	i			i		V.A.7
XAC2185	(fhuA) ferrichrome-iron receptor	i		i	i		V.A.7
XAC3198	(ssuA) nitrate transport protein	i			i	i	V.A.7
XAC3530	(bfrC) iron receptor	i					V.A.7
XAC3759	(drrA) ABC transporter ATP-binding protein	i	i				V.A.7
XAC0074	(cirA) TonB-dependent receptor	r			i	i	V.A.7
XAC0741	(yjjK) ABC transporter ATP-binding protein	r		r			V.A.7
XAC0757	(kdpB) potassium-transporting ATPase B chain	r		i			V.A.7
XAC2600	(btuB) TonB-dependent receptor	r		r	r	r	V.A.7
XAC2742	(btuB) TonB-dependent receptor	r	r		r	r	V.A.7
XAC3308	(mscL) large-conductance mechanosensitive channel	r			r	r	V.A.7
XAC4065	(yadG) ABC transporter ATP-binding protein	r					V.A.7
XAC4365	(ygtT) export protein	r					V.A.7
XAC1385	proteína hipotética conservada	i			i	i	V.B
XAC1934	(fleN) flagellar biosynthesis switch protein	i		i	i	i	V.B
XAC3906	(parB) chromosome partitioning protein	i					V.B
XAC1004	(typA) GTP-binding elongation factor protein	r					V.B
XAC1666	(tsr) chemotaxis protein	i		i			V.C
XAC1897	(tsr) chemotaxis protein	i		i	r		V.C
XAC1900	(tsr) chemotaxis protein	i		i	r		V.C
XAC1932	(cheY) chemotaxis protein	i		i	i	i	V.C
XAC1942	(fliQ) flagellar biosynthesis	i		i	i	i	V.C
XAC1946	(fliN) flagellar protein	i		i	i		V.C
XAC1948	(fliL) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1950	(fliJ) flagellar FliJ protein	i		i	i	i	V.C
XAC1951	(fliI) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1953	(fliG) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1954	(fliF) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1955	(fliE) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XAC1977	(flgK) flagellar protein	i		i		i	V.C
XAC1979	(flgI) flagellar protein	i		i		i	V.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1980	(flgH) flagellar L-ring protein	i		i		i	V.C
XAC1983	(flgE) flagellar biosynthesis hook protein	i		i	i	i	V.C
XAC1985	(flgC) flagellar biosynthesis cell-proximal portion of basal-body rod	i		i		i	V.C
XAC1988	(flgA) flagellar protein	i		i			V.C
XAC1989	(flgM) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1996	(mcp) chemotaxis protein	i		i			V.C
XAC2865	(cheA) chemotaxis histidine protein kinase	i					V.C
XAC3693	(motA) chemotaxis protein	i		i			V.C
XAC0888	(gfo) glucose-fructose oxidoreductase	i					V.D
XAC2652	(R) phage-related tail protein	i		i	i	i	VI.A
XAC1068	(stf) phage-related tail protein	r					VI.A
XAC2285	(orf84) phage-related protein	r					VI.A
XAC2655	(J) phage-related baseplate assembly protein	r			r		VI.A
XAC2660	(gpV) phage-related baseplate assembly protein	r					VI.A
XAC2238	(ccgAII) plasmid-related protein	i			i		VI.B
XACb0030	(trwB) TrwB protein	r		r		r	VI.B
XACb0031	(trwC) TrwC protein	r	r				VI.B
XAC2663	transposase	i	i				VIC
XACa0034	( <i>Tn5045 tnpA</i> ) <i>Tn5045</i> transposase	r					VIC
XACb0062	(ISxac3) ISxac3 transposase	r					VIC
XAC0093	ISxac1 transposase	r					VIC
XAC0342	ISxac3 transposase	r		r			VIC
XAC1102	ISxac3 transposase	r		r			VIC
XAC1660	ISxac3 transposase	r	r				VIC
XAC1916	ISxac1 transposase	r		r			VIC
XAC2371	IS1479 transposase	r		i		i	VIC
XAC4323	ISxac3 transposase	r					VIC
XAC4328	ISxac1 transposase	r					VIC
XAC0393	(hpaF) HpaF protein	i				i	VII.B
XAC0396	(hpaB) HpaB protein	i		i	i	i	VII.B
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1265	(hrpG) HrpG protein	i			i		VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2494	(yieO) drug resistance translocase	i	i			i	VII.C
XAC1461	(gst) glutathione S-transferase	r					VII.C
XAC4161	(czcB) cation efflux system protein	r		i			VII.C
XAC4162	(czcC) cation efflux system protein	r	r	i			VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC0612	(engXCA) cellulase	i					VII.D
XAC1427	(pru) protein U	i			i		VII.F
XAC3541	(xpsH) general secretion pathway protein H	i					VII.H
XACb0036	(virB1) VirB1 protein	r		r			VII.H
XACb0059	(vapC) virulence associated protein	r					VII.H
XACb0060	(vppA) virulence plasmid protein	r					VII.H
XAC2614	(virB4) VirB4 protein	r		r	r	r	VII.H
XAC2616	(virB2) VirB2 protein	r	r	r		r	VII.H
XAC2617	(virB1) VirB1 protein	r		r		r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XAC0132	proteína hipotética conservada	i	r		i		VIII.A
XAC0145	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC0267	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC0268	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A
XAC0682	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC0915	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC0926	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1161	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1181	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1240	proteína hipotética conservada	i	i		r	r	VIII.A
XAC1264	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1355	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1552	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1629	proteína hipotética conservada	i	r	i		i	VIII.A
XAC1706	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC1824	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2007	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2113	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2130	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2152	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC2301	proteína hipotética conservada	i					VIII.A

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2319	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2407	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A
XAC2443	proteína hipotética conservada	i	r			r	VIII.A
XAC2654	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2657	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2755	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2768	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC2828	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.A
XAC2879	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2901	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC3049	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC3333	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC3401	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC3408	proteína hipotética conservada	i	r	i	i		VIII.A
XAC3865	proteína hipotética conservada	i	r		i	i	VIII.A
XAC3948	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC3982	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC4021	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC4039	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC4059	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC4122	proteína hipotética conservada	i					VIII.A
XAC0035	proteína hipotética conservada	r		r			VIII.A
XAC0196	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC0691	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC1036	proteína hipotética conservada	r		r	r		VIII.A
XAC1761	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC2011	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.A
XAC2434	proteína hipotética conservada	r	r		r	r	VIII.A
XAC3073	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3140	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC3301	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3714	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC3743	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A
XAC3840	proteína hipotética conservada	r	r		r		VIII.A
XAC3841	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3843	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC4119	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC4131	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A
XAC4181	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC4253	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC4278	proteína hipotética conservada	r					VIII.A

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC4324	proteína hipotética conservada	r					VIII.A
XAC0392	proteína hipotética	i	r	i			VIII.B
XAC0527	proteína hipotética	i				i	VIII.B
XAC0556	proteína hipotética	i			i		VIII.B
XAC1153	proteína hipotética	i					VIII.B
XAC1452	proteína hipotética	i		i			VIII.B
XAC1657	proteína hipotética	i	i				VIII.B
XAC1898	proteína hipotética	i		i	r		VIII.B
XAC2245	proteína hipotética	i					VIII.B
XAC3131	proteína hipotética	i	i	i			VIII.B
XAC3285	proteína hipotética	i					VIII.B
XAC3337	proteína hipotética	i		i			VIII.B
XACb0029	proteína hipotética	r					VIII.B
XACb0035	proteína hipotética	r	r	r			VIII.B
XACb0043	proteína hipotética	r				r	VIII.B
XACb0048	proteína hipotética	r				r	VIII.B
XAC0099	proteína hipotética	r					VIII.B
XAC0149	proteína hipotética	r					VIII.B
XAC0754	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B
XAC0796	proteína hipotética	r					VIII.B
XAC1055	proteína hipotética	r		r			VIII.B
XAC1502	proteína hipotética	r				r	VIII.B
XAC1613	proteína hipotética	r	i				VIII.B
XAC1923	proteína hipotética	r					VIII.B
XAC2506	proteína hipotética	r		r	r	r	VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC2860	proteína hipotética	r					VIII.B
XAC3319	proteína hipotética	r		r		r	VIII.B
XAC3404	proteína hipotética	r			r		VIII.B
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C
XAC0131	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC0822	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.C
XAC1166	proteína hipotética conservada	i			r		VIII.C
XAC1364	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.C
XAC1370	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC1382	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC1971	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC1990	proteína hipotética conservada	i		i		i	VIII.C
XAC2445	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2485	proteína hipotética conservada	i	r	i			VIII.C
XAC2710	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC2786	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.1 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2873	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C
XAC3086	proteína hipotética conservada	i		i			VIII.C
XAC3336	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC3441	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC3682	proteína hipotética conservada	i			i	i	VIII.C
XAC3752	proteína hipotética conservada	i					VIII.C
XAC0111	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.C
XAC0547	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.C
XAC0810	proteína hipotética conservada	r					VIII.C
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC1412	proteína hipotética conservada	r					VIII.C
XAC1503	proteína hipotética conservada	r				r	VIII.C
XAC1694	proteína hipotética conservada	r				i	VIII.C
XAC1718	proteína hipotética conservada	r		r			VIII.C
XAC1914	proteína hipotética conservada	r		i		i	VIII.C
XAC2622	proteína hipotética conservada	r		r	r	r	VIII.C
XAC2815	proteína hipotética conservada	r					VIII.C
XAC3501	proteína hipotética conservada	r					VIII.C

A expressão gênica de Xac em meio de cultura XAM1 após 24 h de crescimento, comparada a expressão gênica de Xac multiplicada em meio de cultura NA por 12 h, apresentou 169 ORFs induzidas e 229 reprimidas (Tabela 10.2). A maioria das ORFs induzidas pertence à categoria VIII.A (Proteínas hipotéticas conservadas), representando 22,0% do total. Do mesmo modo, a maioria das ORFs reprimidas também pertence a esta classe. Das 104 categorias definidas para o genoma de Xac, 68 (65,4%) possuem pelo menos um gene diferencialmente expresso nesta condição (Figura 10.12). Um fato relevante desse experimento foi o único em que a quantidade de genes induzidos foi menor que a quantidade de genes reprimidos.



**Tabela 10.2:** ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em *Xac* quando esta foi multiplicada meio de cultura XAM1 por 24 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e se ela foi induzida ou reprimida. X12h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h; P3 = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 72 h; P5 = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2599	(aglA) alpha-glucosidase		r				I.A.1
XAC3312	glycosyl hydrolase		r				I.A.1
XAC4250	beta-galactosidase		i				I.A.1
XAC0370	(catD) b-ketoadipate enol-lactone hydrolase		r				I.A.2
XAC1636	(hutG) formylglutamate amidohydrolase		r			i	I.A.2
XAC1792	(phoX) alkaline phosphatase		r				I.A.2
XAC2516	L-lysine 6-aminotransferase		r	r			I.A.2
XAC3080	(rbsK) ribokinase		r				I.A.2
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC4157	(fldW) 4-oxalomesaconate hydratase		i				I.A.2
XAC1314	(paaF) enoyl-CoA hydratase	r	r		r	r	I.A.3
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3
XAC1850	(hadH2) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II		r				I.A.3
XAC1853	enoyl-CoA hydratase		i				I.A.3
XAC0948	(ipk) 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase		r				I.B.10
XAC2469	(gabD) succinate-semialdehyde dehydrogenase	i	i			i	I.B.10
XAC3060	(gcvH) glycine cleavage H protein		r				I.B.10
XAC0256	(mls) malate synthase	i	i				I.B.4
XAC3372	(tktA) transketolase 1		i				I.B.6
XAC4369	(phoC) phosphatase precursor		i				I.B.9
XAC2336	(cydA) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	r	r		r		I.C.1
XAC2337	(cydB) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	r	r	r	r		I.C.1
XAC2456	(petB) ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome B subunit		r				I.C.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2700	(nuoE) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO2 subunit		r	r	r	r	I.C.1
XAC3884	(cox3) cytochrome C oxidase subunit III		r	r	i	r	I.C.1
XAC0133	(lctD) L-lactate dehydrogenase		i			i	I.C.2
XAC0201	(adh) alcohol dehydrogenase		i		r		I.C.2
XAC2826	alcohol dehydrogenase	i	i				I.C.2
XAC0288	(mocA) oxidoreductase		i				I.C.3
XAC0440	oxidoreductase		r				I.C.3
XAC0539	oxidoreductase		i				I.C.3
XAC2136	oxidoreductase	i	r		i		I.C.3
XAC2708	dehydrogenase		i				I.C.3
XAC2893	(yagR) oxidoreductase		r				I.C.3
XAC4156	(fldA) FldA protein		i				I.C.3
XAC4199	polyvinylalcohol dehydrogenase		i	i		i	I.C.3
XAC1633	(gcd) glucose dehydrogenase	i	i	i		i	I.C.5
XAC2078	(sdhB) succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	r	r	r			I.C.7
XAC3653	(atpF) ATP synthase B chain		i				I.C.8
XAC3654	(atpE) ATP synthase C chain		i				I.C.8
XAC0225	two-component system sensor protein		i	i			I.D.1
XAC0326	(smeS) two-component system sensor protein		r				I.D.1
XAC0730	two-component system regulatory protein	i	i				I.D.1
XAC1282	two-component system sensor protein		r				I.D.1
XAC2055	two-component system regulatory protein		r				I.D.1
XAC2493	two-component system regulatory protein		r				I.D.1
XAC3249	(colS) two-component system sensor protein		i				I.D.1
XAC3993	two-component system regulatory protein	r	i				I.D.1
XAC0330	(cmfA) conditioned medium factor		r	i	i	i	I.D.2
XAC1196	(lexA) LexA repressor		i				I.D.2
XAC1269	(rsbR) positive regulator of sigma-B		r	r	i		I.D.2
XAC1499	regulador transcricional		r				I.D.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1529 (oxyR)	hydrogen peroxide-inducible genes activator		i				I.D.2
XAC1819 (tspO)	tryptophan-rich sensory protein		r				I.D.2
XAC2454 (sspA)	stringent starvation protein A		r				I.D.2
XAC3274 (cheY)	single-domain response regulator		r				I.D.2
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC3929 (glnB)	nitrogen regulatory protein P-II		i				I.D.2
XAC1074	sensor histidine kinase		r				I.D.3
XAC1075	sensor histidine kinase		r				I.D.3
XAC1912	quinase serina/treonina		r		r	r	I.D.3
XAC2555 (fixL)	sensor histidine kinase		i				I.D.3
XAC1938	GGDEF family protein		r	i			I.D.4
XAC0033 (gltB)	glutamate synthase alpha subunit		i				II.A.1
XAC2352 (argF)	ornithine carbamoyltransferase		i				II.A.1
XAC1820 (metL)	aspartokinase		r				II.A.2
XAC2547 (dapA)	dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC2723 (asd)	aspartate semialdehyde dehydrogenase		i				II.A.2
XAC3181 (lysA)	diaminopimelate decarboxylase		i				II.A.2
XAC0477	threonine aldolase		i				II.A.3
XAC0743 (glyA)	serine hydroxymethyltransferase		i				II.A.3
XAC1648 (serC)	phosphoserine aminotransferase		i				II.A.3
XAC3628 (cysM)	cysteine synthase		r				II.A.3
XAC0480 (trpD)	anthranilate synthase component II	r	i		r		II.A.4
XAC0481 (trpC)	indole-3-glycerol phosphate synthase		i				II.A.4
XAC3010 (aroK)	shikimate kinase		r		r		II.A.4
XAC0470 (purC)	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase		i				II.B.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1032	(purF) amidophosphoribosyl-transferase	r	r		r	r	II.B.1
XAC0548	(GNL) gluconolactonase precursor		r	i	i		II.C
XAC3116	(pqqC/D) PqqC/D protein	i	i		i		II.D.11
XAC4102	hydroxylase		r		r	r	II.D.17
XAC1099	(moaD) molybdopterin-converting factor chain 1	i	r	i		i	II.D.4
XAC3521	(pncB) nicotinate phosphoribosyltransferase		i				II.D.7
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC2212	(topB) DNA topoisomerase III		r				III.A.1
XAC3107	(yoaA) ATP-dependent helicase		i				III.A.1
XAC3058	histone H1		r				III.A.2
XAC2103	DNA recombinase		r				III.A.3
XAC2405	(mutL) DNA mismatch repair protein MutL		r				III.A.4
XAC2410	(xseA) exodeoxyribonuclease VII large subunit		r				III.A.4
XAC2084	(comA) competence protein	r	r	r			III.A.5
XAC2639	DNA-metiltransferase sítio específico		r				III.A.5
XAC0986	(rpsH) 30S ribosomal protein S8		i				III.B.2
XAC2413	(rnD) ribonuclease D		r	r	i		III.B.4
XAC2685	(truB) tRNA pseudouridine synthase B		i				III.B.4
XAC3800	(fmt) Formyltetrahydrofolate:L-methionyl-tRNA N-formyltransferase	10-	i	i			III.B.4
XAC4373	(rnpA) ribonuclease P, protein component		i				III.B.4
XAC1783	(pcnB) polynucleotide adenyltransferase		r				III.B.5
XAC2734	(greB) transcription elongation factor and transcript cleavage		r				III.B.5
XAC0900	(pms) peptide methionine sulfide reductase		r				III.C.1
XAC1091	protein phosphatase		r	i			III.C.1
XAC1255	(lspA) lipoprotein signal peptidase		r				III.C.1
XAC1426	(ecpD) pili assembly chaperone		r		i		III.C.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0023	(ctp) carboxyl-terminal protease		i		r		III.C.3
XAC0609	zinc protease		i				III.C.3
XAC2541	peptidase		r			r	III.C.3
XAC2984	peptidase		r				III.C.3
XAC3309	aminopeptidase		i				III.C.3
XAC3371	proline imino-peptidase		r				III.C.3
XAC3514	serine protease		r			r	III.C.3
XAC3545	protease		r			r	III.C.3
XAC3547	serine protease		r	i	i		III.C.3
XAC1780	(amiC) N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase		i				III.D.1
XAC2596	(cgt) cyclomaltodextrin glucanotransferase		r		r	r	III.D.1
XAC3092	(aspG) asparaginase		r		r		III.D.1
XAC0375	lipase		i				III.D.2
XAC1463	phospholipase		i				III.D.2
XAC2393	carboxylesterase		i				III.D.2
XAC0070	ankyrin-like protein		i				IV.A.1
XAC2748	integral membrane protein		r				IV.A.1
XAC3584	(rmlA) glucose-1-phosphate thymidyltransferase		i				IV.A.1
XAC3867	(yiaA) membrane protein	i	r		i	i	IV.A.1
XAC0999	(cirA) colicin I receptor	i	i		i	i	IV.A.2
XAC1113	(slp) outer membrane protein Slp		r				IV.A.2
XAC1425	(fasD) outer membrane usher protein FasD	i	i				IV.A.2
XAC2802	(ttgF) outer membrane channel protein	i	r	i			IV.A.2
XAC3354	(ompW) outer membrane protein W		r				IV.A.2
XAC0187	(hipA) HipA protein		r	r			IV.B
XAC0421	(mdoB) phosphoglycerol transferase I		i				IV.B
XAC1691	aminotransferase		i				IV.B
XAC0047	galactosyltransferase		i				IV.C
XAC1176	(srfJ) glycosyl hydrolase	i	i				IV.C
XAC3585	(rmlB) dTDP-glucose 4,6-dehydratase		i				IV.C
XAC1133	(pilZ) type IV fimbriae assembly protein		r				IV.D
XAC2924	(pilT) twitching motility protein		r				IV.D
XAC3240	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3241	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC0064	acetyltransferase		r				IX
XAC0065	microcystin dependent protein		r	r			IX
XAC0067	(mdpB) microcystin dependent protein		r				IX
XAC0554	nitroreductase		i				IX
XAC0572	(icfG) IcfG protein		r	i			IX
XAC2572	(gumN) GumN protein		i				IX
XAC3110	glycosyltransferase		i				IX
XAC3428	hydrolase		r				IX
XAC3921	(ugt) glucosyltransferase		i	i		i	IX
XAC4371	polysaccharide deacetylase		i				IX
XAC3157	(ycaD) transmembrane transport protein	i	i				V.A.1
XAC4255	(exuT) hexuronate transporter		i				V.A.3
XAC1438	(brf) bacterioferritin	r	r	r			V.A.4
XAC2468	(corA) magnesium and cobalt transport protein	i	i			i	V.A.4
XAC3148	(kup) potassium uptake protein		i				V.A.4
XAC3207	(bfeA) ferric enterobactin receptor		r	r			V.A.4
XAC3370	(fhuE) outer membrane receptor for ferric iron uptake		i		r	r	V.A.4
XAC4053	(natB) ABC transporter sodium permease		i				V.A.4
XAC2324	(cycW) ABC transporter heme permease		r				V.A.6
XAC0558	(mxcB) iron utilization protein		i				V.A.7
XAC0829	ABC transporter substrate binding protein		i				V.A.7
XAC1310	(btuB) TonB-dependent receptor		i		i		V.A.7
XAC1459	(msbA) ABC transporter ATP-binding protein		i				V.A.7
XAC2193	(cirA) TonB-dependent receptor		i				V.A.7
XAC2234	(cynX) MFS transporter		r				V.A.7
XAC2520	(cirA) TonB-dependent receptor		r				V.A.7
XAC2531	(btuB) TonB-dependent receptor		r			r	V.A.7
XAC2742	(btuB) TonB-dependent receptor	r	r		r	r	V.A.7
XAC2836	MFS transporter		r				V.A.7
XAC3006	potassium channel related protein		i				V.A.7
XAC3071	(iroN) TonB-dependent receptor		r		r		V.A.7

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3179	(yceE) transport protein		i		i		V.A.7
XAC3201	(fyuA) TonB-dependent receptor		i				V.A.7
XAC3529	(bfrC) iron receptor		i				V.A.7
XAC3560	(btuB) TonB-dependent receptor		r	r		r	V.A.7
XAC3759	(drrA) ABC transporter ATP-binding protein	i	i				V.A.7
XAC4048	(iroN) TonB-dependent receptor		r				V.A.7
XAC0783	(ftsA) cell division protein		i				V.B
XAC2552	(ftsY) cell division protein		i				V.B
XAC1893	(tsr) chemotaxis protein		i	i			V.C
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XAC1063	(p13) phage-related lysozyme		r		r		VI.A
XAC2214	(ea31) phage-related protein		r				VI.A
XAC2628	(int) phage-related integrase		r				VI.A
XAC2647	(X) phage-related tail protein		r				VI.A
XAC2904	(int) integrase/recombinase		r				VI.A
XACb0031	(trwC) TrwC protein	r	r				VI.B
XAC2422	(kfrA) plasmid-related protein		r		i		VI.B
XAC2433	(parA) resolvase		r			r	VI.B
XAC2435	(yacA) plasmid-related protein		i				VI.B
XAC2440	(mobB) plasmid mobilization protein		r				VI.B
XACa0005	(ISxac2) ISxac2 transposase		r			r	VI.C
XACa0010	ISxac3 transposase		r				VI.C
XAC0091	ISxac3 transposase		r				VI.C
XAC1660	ISxac3 transposase	r	r				VI.C
XAC2131	ISxac3 transposase		r				VI.C
XAC2431	(tnp) transposase		i			i	VI.C
XAC2508	transposase		r				VI.C
XAC2604	ISxac4 transposase		r				VI.C
XAC2634	ISxac3 transposase		r				VI.C
XAC2663	transposase	i	i				VI.C
XAC3233	transposase		r				VI.C
XAC3247	ISxac3 transposase		r				VI.C
XAC3248	ISxac3 transposase		r				VI.C
XAC3932	integrase/recombinase		r		r	r	VI.C
XAC3224	(avrXacE2) avirulence protein		i	i	i	i	VII.A
XAC0408	(hrpB2) HrpB2 protein		i	i	i	i	VII.B
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1994	HrpX related protein		r				VII.B
XAC0210	(sodC2) superoxide dismutase		i				VII.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0641	multidrug resistance efflux pump		r				VII.C
XAC0866	(ostA) organic solvent tolerance precursor		i				VII.C
XAC1437	(acyII) penicillin acylase II		r				VII.C
XAC1439	(tpmT) thiopurine methyltransferase		i		r		VII.C
XAC2121	(mdmC) O-methyltransferase		r				VII.C
XAC2494	(yieO) drug resistance translocase	i	i			i	VII.C
XAC2498	(acrA) multidrug resistance protein		r				VII.C
XAC2499	(acrB) multidrug efflux transporter		r		i		VII.C
XAC2806	beta-lactamase		i				VII.C
XAC3362	TonB-like protein		i				VII.C
XAC3848	(mtrC) membrane fusion protein precursor		i		r	r	VII.C
XAC4005	beta-lactamase related protein		i				VII.C
XAC4008	(ecnA) entericidin A		r		i		VII.C
XAC4162	(czcC) cation efflux system protein	r	r	i			VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC0029	(egl) cellulase		i			i	VII.D
XAC2522	(egl2) cellulase		r				VII.D
XAC3579	(xanA) phosphoglucomutase		i				VII.E
XAC0389	(comF) competence protein F		i				VII.F
XAC2151	(yapH) YapH protein		r				VII.F
XAC1337	(scoF) cold shock protein		r	i	i		VII.G
XAC1495	(xrvA) virulence regulator		r				VII.H
XAC1874	(rpfD) regulatory protein		r				VII.H
XAC1877	(rpfG) response regulator		r	i	i	i	VII.H
XAC1878	(rpfC) RpfC protein		r	i	i	i	VII.H
XAC1880	(rpfB) RpfB protein		r			r	VII.H
XAC1882	(rpfA) aconitase		r	r			VII.H
XAC2513	(tgt) queuine tRNA-ribosyltransferase		r		r		VII.H
XAC2616	(virB2) VirB2 protein	r	r	r		r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XACb0023	proteína hipotética conservada		r		r	r	VIII.A
XAC0017	proteína hipotética conservada		i		r	r	VIII.A
XAC0085	proteína hipotética conservada		r				VIII.A

Continua na próxima página



**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0132	proteína hipotética conservada	i	r			i	VIII.A
XAC0268	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A
XAC0289	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC0341	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC0420	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC0424	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC0464	proteína hipotética conservada		r			r	VIII.A
XAC0623	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC0625	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC0739	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC0766	RNA subunit of RNase P		r				VIII.A
XAC0792	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC0814	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC0904	proteína hipotética conservada		r		r		VIII.A
XAC1003	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC1008	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A
XAC1047	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1088	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1093	proteína hipotética conservada		r		i		VIII.A
XAC1120	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1201	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC1240	proteína hipotética conservada	i	i		r	r	VIII.A
XAC1328	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1376	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1401	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC1464	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1605	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1607	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1629	proteína hipotética conservada	i	r	i		i	VIII.A
XAC1644	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1752	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC1884	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC2000	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC2011	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.A
XAC2026	proteína hipotética conservada		r		i	i	VIII.A
XAC2052	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC2152	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC2155	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC2227	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC2239	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC2316	proteína hipotética conservada		i				VIII.A

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2392	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC2407	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A
XAC2415	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC2434	proteína hipotética conservada	r	r		r	r	VIII.A
XAC2443	proteína hipotética conservada	i	r			r	VIII.A
XAC2557	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC2755	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2796	proteína hipotética conservada		i	r			VIII.A
XAC2879	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2903	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC2969	proteína hipotética conservada		i	r	r		VIII.A
XAC3032	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC3034	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC3049	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC3089	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC3119	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC3155	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC3178	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A
XAC3206	proteína hipotética conservada		i	i		i	VIII.A
XAC3244	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC3314	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC3408	proteína hipotética conservada	i	r	i	i		VIII.A
XAC3618	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC3707	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC3720	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC3726	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC3802	proteína hipotética conservada		i	i			VIII.A
XAC3816	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XAC3840	proteína hipotética conservada	r	r		r		VIII.A
XAC3846	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC3865	proteína hipotética conservada	i	r		i	i	VIII.A
XAC3948	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC4021	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC4077	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC4219	proteína hipotética conservada		i				VIII.A
XAC4329	proteína hipotética conservada		r				VIII.A
XACa0011	proteína hipotética		r				VIII.B
XACa0012	proteína hipotética		r				VIII.B
XACb0003	proteína hipotética		r				VIII.B
XACb0025	proteína hipotética		r	r	r		VIII.B
XACb0035	proteína hipotética	r	r	r			VIII.B
XAC0040	proteína hipotética		i				VIII.B

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0045	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC0048	proteína hipotética		i		r		VIII.B
XAC0167	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC0392	proteína hipotética	i	r	i			VIII.B
XAC0500	proteína hipotética		i	i	i		VIII.B
XAC0616	proteína hipotética		i	i			VIII.B
XAC0617	proteína hipotética		i	i			VIII.B
XAC0754	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B
XAC1062	proteína hipotética		r	r			VIII.B
XAC1613	proteína hipotética	r	i				VIII.B
XAC1657	proteína hipotética	i	i				VIII.B
XAC2143	proteína hipotética		r	i			VIII.B
XAC2264	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC2268	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC2272	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC2421	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC2610	proteína hipotética		r	r		r	VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC2787	proteína hipotética		i	i	i	i	VIII.B
XAC2863	proteína hipotética		r		r		VIII.B
XAC3020	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC3131	proteína hipotética	i	i	i			VIII.B
XAC3231	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC3262	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC3264	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC3276	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC3369	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC3557	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC3723	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC3962	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC4045	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC4071	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC4261	proteína hipotética		r				VIII.B
XAC4334	proteína hipotética		i		i		VIII.B
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C
XAC0190	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC0275	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.C
XAC0285	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.C
XAC0547	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.C
XAC0646	proteína hipotética conservada		i				VIII.C
XAC1119	proteína hipotética conservada		i				VIII.C
XAC1381	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.2 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC1487	proteína hipotética conservada		r	i			VIII.C
XAC1701	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC1915	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC1972	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC2057	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC2170	proteína hipotética conservada		r	i		i	VIII.C
XAC2485	proteína hipotética conservada	i	r	i			VIII.C
XAC2490	proteína hipotética conservada		i				VIII.C
XAC2559	proteína hipotética conservada		r			i	VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C
XAC3446	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC3665	proteína hipotética conservada		i				VIII.C
XAC3724	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC3732	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC3734	proteína hipotética conservada		r			i	VIII.C
XAC3866	proteína hipotética conservada		r			i	VIII.C
XAC3957	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC4035	proteína hipotética conservada		i				VIII.C
XAC4200	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C
XAC4260	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC4279	proteína hipotética conservada		i				VIII.C
XAC4294	proteína hipotética conservada		r				VIII.C
XAC4304	proteína hipotética conservada		i	i			VIII.C

### 10.3.2 Análise da expressão gênica de *Xac* cultivada em folhas de laranja por 24 horas

Neste experimento foram detectados 251 genes induzidos e 136 genes reprimidos (Tabela 10.3). Das 104 categorias definidas para *Xac*, 68 delas estão representadas por estes genes. Grande parte dos genes induzidos pertencem as categorias VIII.A. (15,5% – Proteínas hipotéticas conservadas), V.C (12,8% – Quimiotaxia e mobilidade) e VIII.C (10,8% – Proteína hipotética conservada em *Xantomonas*), enquanto que as categorias com mais representantes dentre os reprimidos são VIII.A (11,8%), VII.H (8,1% – Patogenicidade, virulência e adaptação: Outras) e VIII.B (6,6% – Proteínas hipotéticas) (Tabela 10.3).

As categorias I.B.10, I.B.12, I.B.7, I.C.2, I.C.5, I.D.3, II.C, II.D.17, II.D.4, II.D.6, II.D.8, III.A.3, III.B.2, III.B.3, III.B.5, III.C.2, III.D.1, III.D.2, IV.A.1, IV.A.2, IV.D, V.A.1, V.B, V.C, VI.A, VII.D e VII.E estão representadas somente dentre os genes induzidos. Essas categorias possuem genes responsáveis pelas seguintes funções celulares: as categorias I.B, I.C e I.D compõem os genes que fazem parte do metabolismo intermediário; II.C e II.D participam da biosíntese de pequenas moléculas; III.A, III.B, III.C e III.D participam do metabolismo de macromoléculas; os genes da categoria IV.A são componentes de membranas; a categoria IV.D agrupa os genes responsáveis pela estrutura da superfície celular; as categorias V.A, V.B e V.C participam de processos celulares, como transporte, quimiotaxia e motilidade; a categoria VI.A compõe os genes relacionados a funções de fago, elementos genéticos móveis; e as categorias VII.D e VII.E agrupa os genes relacionados à virulência, patogenicidade e adaptação, sendo que a VII.D possui os genes responsáveis pela degradação de parede celular do hospedeiro e a categoria VII.E os responsáveis pelos exopolissacarídeos relacionados à patogenicidade, virulência e adaptação.

Já as categorias I.B.3 (Gliconeogênese), I.B.9 (Metabolismo intermediário de compostos a base de fósforo), I.C.1 (Respiração aeróbica), I.C.4 (Glicólise), I.C.7 (ciclo do TCA), I.C.8 (Força motiva da interconversão Próton-ATP), II.D.12 (Biossíntese de grupos heme e de porfirinas), II.E (Biossíntese de ácidos graxos e de ácido fosfatídico) e VII.F (Virulência, patogenicidade e adaptação, proteínas de superfície) estão representadas somente no grupo de genes reprimidos (Figura 10.13).

**Tabela 10.3:** ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em *Xac* quando esta foi multiplicada folhas de laranjeira por 24 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e, ainda, se ela foi induzida ou reprimida. X12h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h; P3 = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 72 h; P5 = *Xac* multiplicada em folhas de laranjeira por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0165	xylosidase			i	i		I.A.1
XAC1796	mannan endo-1,4-beta-mannosidase			i			I.A.1
XAC3084	(bga) beta-galactosidase			r			I.A.1
XAC4058	(xynB) beta-xylosidase			i			I.A.1
XAC0818	(rbsK) ribokinase			i		i	I.A.2
XAC0846	(msuC) FMNH2-dependent monooxygenase			r			I.A.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1138	(prpC) citrate synthase 2	r		r			I.A.2
XAC1214	(gcvP) glycine decarboxylase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1316	(mmsB) 3-hydroxyisobutirate dehydrogenase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1776	(xylA) xylose isomerase			r			I.A.2
XAC2365	(eutA) ethanolamine ammonia-lyase large subunit			i			I.A.2
XAC2516	L-lysine 6-aminotransferase		r	r			I.A.2
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	i		i	i	i	I.A.2
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC1313	(fadE9) acyl-CoA dehydrogenase	r		r	r		I.A.3
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3
XAC2563	acyl-CoA dehydrogenase			i	i	i	I.A.3
XAC2565	(dxs) deoxyxylulose-5-phosphate synthase			i			I.B.10
XAC3632	(gloA) lactoylglutathione lyase			i			I.B.10.
XAC3329	(cysD) ATP sulfurylase small subunit			i			I.B.12
XAC0124	(cbbFC) fructose-1,6-bisphosphatase	r		r	r	r	I.B.3
XAC0491	(nudH) probable (di)nucleoside polyphosphate hydrolase	i		i	i	i	I.B.7
XAC2759	(phoA) alkaline phosphatase	r		r		r	I.B.9
XAC2337	(cydB) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	r	r	r	r		I.C.1
XAC2693	(nuoL) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit			r	r		I.C.1
XAC2694	(nuoK) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO11 subunit			r			I.C.1
XAC2697	(nuoH) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO8 subunit	i		r			I.C.1
XAC2700	(nuoE) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO2 subunit		r	r	r	r	I.C.1
XAC2701	(nuoD) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO4 subunit			r			I.C.1
XAC3884	(cox3) cytochrome C oxidase subunit III		r	r	i	r	I.C.1
XAC0652	(adhC) alcohol dehydrogenase class III			i	i		I.C.2
XAC2486	formate dehydrogenase a chain	i		i		i	I.C.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0334	(sflA) NADH-dependent FMN reductase			r	r		I.C.3
XAC1684	(cycA) cytochrome C2			i		i	I.C.3
XAC3575	(etfQO) flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	r		r	r	r	I.C.3
XAC3587	(etfA) electron transfer flavoprotein alpha subunit			r		r	I.C.3
XAC4199	polyvinylalcohol dehydrogenase		i	i		i	I.C.3
XAC3352	(gapA) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase			r			I.C.4
XAC1633	(gcd) glucose dehydrogenase	i	i	i		i	I.C.5
XAC3212	(gcd) glucose dehydrogenase			i	i	i	I.C.5
XAC0443	(pdhB) dihydrolipoamide acyl-transferase			r			I.C.6
XAC3659	(lpdA) dihydrolipoamide dehydrogenase			i			I.C.6
XAC1006	(mdh) malate dehydrogenase	r		r			I.C.7
XAC1534	(sucB) dihydrolipoamide S-succinyltransferase			r			I.C.7
XAC1885	(acnB) aconitate hydratase 2			r			I.C.7
XAC2076	(sdhD) succinate dehydrogenase membrane anchor subunit			r			I.C.7
XAC2078	(sdhB) succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	r	r	r			I.C.7
XAC3388	(gltA) citrate synthase			r			I.C.7
XAC3649	(atpD) ATP synthase beta chain	r		r			I.C.8
XAC3650	(atpG) ATP synthase gamma chain	r		r	r	r	I.C.8
XAC3651	(atpA) ATP synthase alpha chain	r		r		r	I.C.8
XAC0225	two-component system sensor protein		i	i			I.D.1
XAC0834	(colR) two-component system regulatory protein			r			I.D.1
XAC3135	(exsF) two-component system regulatory protein			i			I.D.1
XAC0312	regulador transcricional lysR family			r			I.D.2
XAC0330	(cmfA) conditioned medium factor		r	i	i	i	I.D.2
XAC0671	regulador transcricional			i		i	I.D.2
XAC0880	(pcaQ) regulador transcricional			r			I.D.2
XAC0917	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0931	regulador transcricional			i			I.D.2
XAC1269	(rsbR) positive regulator of sigma-B		r	r	i		I.D.2
XAC1271	(rsbT) sigma-B negative effector			i	i	i	I.D.2
XAC1480	regulador transcricional			i		i	I.D.2
XAC1655	regulador transcricional	i		i	i	i	I.D.2
XAC2166	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC2482	(rrpX) regulador transcricional	i		i			I.D.2
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC0610	proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta	i		i			I.D.3
XAC4127	(pknB) quinase serina/treonina	i		i			I.D.3
XAC0550	(glnE) glutamine synthetase adenyltransferase			i			I.D.4
XAC1380	(rpoE) RNA polymerase sigma factor	i		i			I.D.4
XAC1938	GGDEF family protein		r	i			I.D.4
XAC1939	GGDEF family protein	i		i			I.D.4
XAC2972	(rpoN) RNA polymerase sigma-54 factor			r			I.D.4
XAC2973	sigma-54 modulation protein			r			I.D.4
XAC3824	(rpoH) RNA polymerase sigma-32 factor	i		i	i	i	I.D.4
XAC0630	(aspC) aminotransferase	r		r	r	r	II.A.2
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC3039	(metB) cystathionine gamma-synthase			i		i	II.A.2
XAC3647	(pheA) chorismate mutase			i	i	i	II.A.4
XAC2824	phosphodiesterase-nucleotide pyrophosphatase	r		r			II.B.4
XAC0548	(GNL) gluconolactonase precursor		r	i	i		II.C
XAC2762	(ispA) geranyltranstransferase			r			II.D.11
XAC3114	(pqqG) pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein G	i		i		i	II.D.11
XAC3420	(hemL) glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase			r			II.D.12
XAC2744	phytoene dehydrogenase	i		i		i	II.D.17
XAC2995	(prnA) tryptophan halogenase			i			II.D.17
XAC1099	(moaD) molybdopterin-converting factor chain 1	i	r	i		i	II.D.4

Continua na próxima página



**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1524	(pdxY) pyridoxine kinase					i	II.D.6
XAC3415	(thiE) thiamin-phosphate pyrophosphorylase					i	II.D.8
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC0561	(mdcD) delta subunit of malonate decarboxylase			r			II.E
XAC1128	(acpP) acyl carrier protein	r		r		r	II.E
XAC1129	(fabF) 3-oxoacyl-[ACP] synthase II			r	r	r	II.E
XAC4096	fatty acyl CoA synthetase			r		r	II.E
XAC4179	(acs) acetyl coenzyme A synthetase			r			II.E
XAC3015	(rebB) RebB protein			i			III.A.3
XAC3149	(ruvA) holliday junction binding protein DNA helicase			i	i	i	III.A.3
XAC3551	(xerD) integrase-recombinase XerD	i		i			III.A.3
XAC1586	MutT-nudix family protein	i		i			III.A.4
XAC3303	(micA) DNA mismatch repair protein			r		r	III.A.4
XAC2084	(comA) competence protein	r	r	r			III.A.5
XAC2807	(menG) S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase			i			III.A.5
XAC2300	(rpmJ) 50S ribosomal protein L36			i	i		III.B.2
XAC3253	(rimK) ribosomal protein S6 modification protein			i			III.B.3
XAC1618	(asnS) asparaginyl-tRNA synthetase			r			III.B.4
XAC2413	(rnD) ribonuclease D		r	r	i		III.B.4
XAC2781	(leuS) leucyl-tRNA synthetase			i		i	III.B.4
XAC3316	tRNA/rRNA methyltransferase			i		i	III.B.4
XAC3394	(rpoZ) RNA polymerase omega subunit			i	i		III.B.5
XAC3610	(rhIE) ATP-dependent RNA helicase			i			III.B.5
XAC0540	ribonuclease			i	i	i	III.B.6
XAC1089	(rnhA) ribonuclease H			r	r	r	III.B.6
XAC0957	(tufB) elongation factor Tu			i			III.C.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1005	(ppiB) peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	r		r		r	III.C.1
XAC1091	protein phosphatase		r	i			III.C.1
XAC3462	(pcm) L-isoaspartate protein carboxylmethyltransferase			r			III.C.1
XAC3550	(dsbC) disulfide isomerase			i			III.C.1
XAC1423	pili assembly chaperone			i			III.C.2
XAC0249	(dcp) peptidyl-dipeptidase	r		r	r	r	III.C.3
XAC0928	extracellular protease			i			III.C.3
XAC1204	alanyl dipeptidyl peptidase			r		r	III.C.3
XAC1456	(dcp) peptidyl-dipeptidase			r	r	r	III.C.3
XAC2831	extracellular serine protease			i	i	i	III.C.3
XAC2853	cysteine protease			i	i	i	III.C.3
XAC2987	proline imino-peptidase			i			III.C.3
XAC3547	serine protease		r	i	i		III.C.3
XAC3627	(prlC) oligopeptidase A			r	r	r	III.C.3
XAC3871	(gcp) O-sialoglycoprotein endopeptidase			r			III.C.3
XAC1887	(pdeA) c-di-GMP phosphodiesterase A	i		i			III.D.1
XAC1024	non-hemolytic phospholipase C			i			III.D.2
XAC4099	(plsC) acyltransferase	i		i		i	III.D.2
XAC1148	(pbpC) bifunctional penicillin-binding protein 1C			i			IV.A.1
XAC4028	(ankB) ankyrin-like protein	i		i		i	IV.A.1
XAC1579	(oprO) polyphosphate-selective porin O			i	i		IV.A.2
XAC2669	(fimT) pre-pilin like leader sequence			i			IV.A.2
XAC2802	(ttgF) outer membrane channel protein	i	r	i			IV.A.2
XAC3074	(nahA) beta-hexosaminidase			i			IV.A.2
XAC0187	(hipA) HipA protein		r	r			IV.B
XAC0779	(murG) UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol	i		i	i	i	IV.B
XAC2406	(amiC) N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase			r			IV.B
XAC2609	carboxypeptidase			r		r	IV.B
XAC3860	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase			r			IV.B

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0042	(wbpZ) glycosyltransferase			i			IV.C
XAC0197	acetyltransferase			i			IV.C
XAC1409	(lpxA) UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase			r		r	IV.C
XAC1966	(vioA) nucleotide sugar transferase			i			IV.C
XAC3583	(rmlC) dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase			r			IV.C
XAC2666	(pilX) PilX protein	i		i			IV.D
XAC2668	(pilV) pre-pilin leader sequence			i			IV.D
XAC2923	(pilU) twitching motility protein			i	i	i	IV.D
XAC3102	(pilG) pilus protein			i			IV.D
XAC3240	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC3241	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC0065	microcystin dependent protein		r	r			IX
XAC0572	(icfG) IcfG protein		r	i			IX
XAC1250	(yhbZ) GTP-binding protein			r			IX
XAC1970	response regulator			i			IX
XAC2358	(dksA) DnaK supressor			r			IX
XAC2883	hydrolase			i			IX
XAC2939	acetyltransferase			i	i		IX
XAC3921	(ugt) glucosyltransferase		i	i		i	IX
XAC1841	(yhdG) cationic amino acid transporter			i	i	i	V.A.1
XAC1842	(yhdG) cationic amino acid transporter			i	i		V.A.1
XAC2985	(gabP) amino acid transporter			i		i	V.A.1
XAC1438	(brf) bacterioferritin	r	r	r			V.A.4
XAC2805	(yjl094C) cation:proton antiporter			i			V.A.4
XAC2980	(mgtE) Mg <sup>++</sup> transporter	i		i			V.A.4
XAC3168	(bfeA) ferric enterobactin receptor			i	i	i	V.A.4
XAC3207	(bfeA) ferric enterobactin receptor		r	r			V.A.4
XAC4368	(fecA) TonB-dependent receptor			i			V.A.4
XAC0179	(ylmA) ABC transporter ATP-binding protein			r		r	V.A.7
XAC0741	(yjjK) ABC transporter ATP-binding protein	r		r			V.A.7

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0757 (kdpB)	potassium-transporting ATPase B chain	r		i			V.A.7
XAC0758 (kdpC)	potassium-transporting ATPase C chain			i			V.A.7
XAC1363 (araJ)	MFS transporter			i		i	V.A.7
XAC2185 (fhuA)	ferrichrome-iron receptor	i		i	i		V.A.7
XAC2488 (yhjX)	integral membrane transporter			i			V.A.7
XAC2600 (btuB)	TonB-dependent receptor	r		r	r	r	V.A.7
XAC3560 (btuB)	TonB-dependent receptor		r	r		r	V.A.7
XAC1934 (fleN)	flagellar biosynthesis switch protein	i		i	i	i	V.B
XAC1666 (tsr)	chemotaxis protein	i		i			V.C
XAC1889 (cheD)	chemotaxis protein			i			V.C
XAC1891 (tsr)	chemotaxis protein			i			V.C
XAC1893 (tsr)	chemotaxis protein		i	i			V.C
XAC1894 (tsr)	chemotaxis protein			i			V.C
XAC1897 (tsr)	chemotaxis protein	i		i	r		V.C
XAC1899 (tsr)	chemotaxis protein			i			V.C
XAC1900 (tsr)	chemotaxis protein	i		i	r		V.C
XAC1906 (cheW)	chemotaxis protein			i			V.C
XAC1932 (cheY)	chemotaxis protein	i		i	i	i	V.C
XAC1942 (fliQ)	flagellar biosynthesis	i		i	i	i	V.C
XAC1944 (fliP)	flagellar biosynthetic protein			i	i	i	V.C
XAC1945 (fliO)	flagellar protein			i	i	i	V.C
XAC1946 (fliN)	flagellar protein	i		i	i		V.C
XAC1948 (fliL)	flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1949 (fliK)	flagellar protein			i		i	V.C
XAC1950 (fliJ)	flagellar FliJ protein	i		i	i	i	V.C
XAC1951 (fliI)	flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1953 (fliG)	flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1954 (fliF)	flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1955 (fliE)	flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1974 (fliD)	flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XAC1977 (flgK)	flagellar protein	i		i		i	V.C
XAC1979 (flgI)	flagellar protein	i		i		i	V.C
XAC1980 (flgH)	flagellar L-ring protein	i		i		i	V.C
XAC1983 (flgE)	flagellar biosynthesis hook protein	i		i	i	i	V.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1985	(flgC) flagellar biosynthesis cell-proximal portion of basal-body rod	i		i		i	V.C
XAC1988	(flgA) flagellar protein	i		i			V.C
XAC1989	(flgM) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1996	(mcp) chemotaxis protein	i		i			V.C
XAC3693	(motA) chemotaxis protein	i		i			V.C
XAC3694	(motB) chemotaxis MotB protein			i			V.C
XAC2652	(R) phage-related tail protein	i		i	i	i	VI.A
XACb0030	(trwB) TrwB protein	r		r		r	VI.B
XAC0342	ISxac3 transposase	r		r			VI.C
XAC1052	ISxac3 transposase			r			VI.C
XAC1070	ISxac3 transposase			r			VI.C
XAC1102	ISxac3 transposase	r		r			VI.C
XAC1916	ISxac1 transposase	r		r			VI.C
XAC2371	IS1479 transposase	r		i		i	VI.C
XAC2372	IS1479 transposase			i		i	VI.C
XAC2432	transposase			r	r		VI.C
XAC3221	ISxac3 transposase			r			VI.C
XACb0015	(pthA3) avirulence protein			r			VII.A
XAC0286	(avrXacE1) avirulence protein			i	i	i	VII.A
XAC3224	(avrXacE2) avirulence protein		i	i	i	i	VII.A
XAC0394	(hrpF) HrpF protein			i	i	i	VII.B
XAC0396	(hpaB) HpaB protein	i		i	i	i	VII.B
XAC0398	(hrpD6) HrpD6 protein			i	i	i	VII.B
XAC0401	(hrcS) HrcS protein			i	i	i	VII.B
XAC0405	(hrcV) HrcV protein			r			VII.B
XAC0406	(hrcU) HrcU protein			i	i	i	VII.B
XAC0407	(hrpB1) HrpB1 protein			i	i	i	VII.B
XAC0408	(hrpB2) HrpB2 protein		i	i	i	i	VII.B
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1445	(pmrA) multidrug resistance efflux pump			i		i	VII.C
XAC2386	(sodM) superoxidase dismutase			r		r	VII.C
XAC2475	(rmrA) transport protein			i			VII.C
XAC2843	(mexB) multidrug efflux transporter			i	i	i	VII.C
XAC4161	(czcB) cation efflux system protein	r		i			VII.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC4162	(czcC) cation efflux system protein	r	r	i			VII.C
XAC4305	(fusE) fusaric acid resistance protein			i			VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC1770	(celA) cellulase			i	i	i	VII.D
XAC2581	(gumF) GumF protein			i		i	VII.E
XAC4273	OmpA-related protein			r		r	VII.F
XAC1337	(scoF) cold shock protein		r	i	i		VII.G
XAC1465	(cspA) major cold shock protein			r			VII.G
XACb0036	(virB1) VirB1 protein	r		r			VII.H
XACb0037	(virB11) VirB11 protein			r			VII.H
XACb0039	(virB9) VirB9 protein			r			VII.H
XACb0040	(virB8) VirB8 protein			r			VII.H
XACb0045	(virB4) VirB4 protein			r			VII.H
XACb0046	(virB3) VirB3 protein			r	r		VII.H
XAC1877	(rpfG) response regulator		r	i	i	i	VII.H
XAC1878	(rpfC) RpfC protein		r	i	i	i	VII.H
XAC1882	(rpfA) aconitase		r	r			VII.H
XAC2504	(rpfN) regulator of pathogenicity factors			i			VII.H
XAC2614	(virB4) VirB4 protein	r		r	r	r	VII.H
XAC2616	(virB2) VirB2 protein	r	r	r		r	VII.H
XAC2617	(virB1) VirB1 protein	r		r		r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XAC3538	(xpsK) general secretion pathway protein K			i			VII.H
XACb0033	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC0026	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC0035	proteína hipotética conservada	r		r			VIII.A
XAC0116	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC0141	proteína hipotética conservada			r		r	VIII.A
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC0468	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC0501	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0553	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0586	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC0692	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC0840	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC0901	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC1036	proteína hipotética conservada	r		r	r		VIII.A
XAC1339	proteína hipotética conservada			i			VIII.A

Continua na próxima página

Tabela 10.3 – continuação da página anterior

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1351	proteína hipotética conservada			r		r	VIII.A
XAC1532	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC1629	proteína hipotética conservada	i	r	i		i	VIII.A
XAC1756	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC1806	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC1997	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC2004	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC2206	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC2209	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC2210	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC2302	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC2344	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC2654	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2755	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2775	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC2788	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC2796	proteína hipotética conservada		i	r			VIII.A
XAC2879	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2901	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2907	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC2933	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC2934	proteína hipotética conservada			i	i		VIII.A
XAC2969	proteína hipotética conservada		i	r	r		VIII.A
XAC3206	proteína hipotética conservada		i	i		i	VIII.A
XAC3214	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC3408	proteína hipotética conservada	i	r	i	i		VIII.A
XAC3525	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC3617	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3703	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC3802	proteína hipotética conservada		i	i			VIII.A
XAC3959	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3998	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC4013	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC4021	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC4087	proteína hipotética conservada			i	i		VIII.A
XAC4108	proteína hipotética conservada			r			VIII.A
XAC4146	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC4192	proteína hipotética conservada			i			VIII.A
XAC1088	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A.
XAC3726	proteína hipotética conservada			i			VIII.A.
XACb0025	proteína hipotética		r	r	r		VIII.B
XACb0035	proteína hipotética	r	r	r			VIII.B

Continua na próxima página

Tabela 10.3 – continuação da página anterior

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0392	proteína hipotética	i	r	i			VIII.B
XAC0500	proteína hipotética		i	i	i		VIII.B
XAC0616	proteína hipotética		i	i			VIII.B
XAC0617	proteína hipotética		i	i			VIII.B
XAC0754	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B
XAC0843	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC1055	proteína hipotética	r		r			VIII.B
XAC1062	proteína hipotética		r	r			VIII.B
XAC1105	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC1452	proteína hipotética	i		i			VIII.B
XAC1898	proteína hipotética	i		i	r		VIII.B
XAC2143	proteína hipotética		r	i			VIII.B
XAC2146	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC2506	proteína hipotética	r		r	r	r	VIII.B
XAC2610	proteína hipotética		r	r		r	VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC2787	proteína hipotética		i	i	i	i	VIII.B
XAC3088	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC3131	proteína hipotética	i	i	i			VIII.B
XAC3230	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC3251	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC3255	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC3319	proteína hipotética	r		r		r	VIII.B
XAC3337	proteína hipotética	i		i			VIII.B
XAC3417	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC3519	proteína hipotética			i			VIII.B
XAC3702	proteína hipotética			i	i		VIII.B
XAC3775	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC4027	proteína hipotética			i	i		VIII.B
XAC0018	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C
XAC0131	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC0419	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0469	proteína hipotética conservada			i			VIII.C
XAC0677	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC0808	proteína hipotética conservada			i			VIII.C
XAC0895	proteína hipotética conservada			i			VIII.C
XAC1235	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC1487	proteína hipotética conservada		r	i			VIII.C
XAC1489	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1703	proteína hipotética conservada			i			VIII.C

Continua na próxima página



**Tabela 10.3 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1718	proteína hipotética conservada	r		r			VIII.C
XAC1901	proteína hipotética conservada			i			VIII.C
XAC1914	proteína hipotética conservada	r		i		i	VIII.C
XAC1971	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC1990	proteína hipotética conservada	i		i		i	VIII.C
XAC2170	proteína hipotética conservada		r	i		i	VIII.C
XAC2445	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2485	proteína hipotética conservada	i	r	i			VIII.C
XAC2611	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC2622	proteína hipotética conservada	r		r	r	r	VIII.C
XAC2739	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC2786	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2950	proteína hipotética conservada			i			VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C
XAC3086	proteína hipotética conservada	i		i			VIII.C
XAC3636	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C
XAC3966	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C
XAC4012	proteína hipotética conservada			i			VIII.C
XAC4200	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C
XAC4304	proteína hipotética conservada		i	i			VIII.C

### 10.3.3 Análise da expressão gênica de *Xac* cultivada em folhas de laranja por 72 h

Os genes diferencialmente expressos neste experimento fazem parte de 69 categorias, sendo que 219 genes foram induzidos e 162 foram reprimidos quando a bactéria estava sendo cultivada *in planta* pelo terceiro dia consecutivo. As categorias VIII.A (Proteínas hipotéticas conservadas), VIII.B (Proteínas hipotéticas) e VIII.C (Proteína hipotética conservada em *Xantomonas*) foram as mais representadas, tanto dentre os induzidos quanto dentre os reprimidos. Das 69 categorias representadas, 23 possuem genes que somente foram induzidos e 16 delas possuem somente genes reprimidos (Tabela 10.4).

Dentre as categorias que somente aparecem no grupo dos genes induzidos, destaca-se a categoria VII, que congrega os genes de patogenicidade, virulência e adaptação. Alguns desses genes são categorizados nas subcategorias: VII.A (Genes de avirulência), VII.B (Resposta hipersensível

e patogenicidade), VII.D (Degradação de parede celular do hospedeiro), VII.E (Produção de exopolissacarídeos) e VII.F (Proteínas de superfície). Uma outra categoria a ser destacada é a V.C (Quimiotaxia e motilidade), que também possui genes que somente aparecem dentre os induzidos (Figura 10.14).

A Figura 10.14 mostra que, apesar dos genes da categoria VIII (hipotéticos) estarem presentes tanto no grupo dos induzidos quanto dos reprimidos, fica evidente que a maioria deles foi induzido. Para a categoria VIII.C, onde estão os genes hipotéticos conservados entre as *Xanthomonas*, a relação induzido para reprimido é da ordem de quase 5 induzidos para 1 reprimido.

**Tabela 10.4:** ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em *Xac* quando esta foi multiplicada folhas de laranja por 72 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e, ainda, se ela foi induzida ou reprimida. X12h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 24 h; P3 = *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 72 h; P5 = *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0165	xylosidase			i	i		I.A.1
XAC1773	(xylS) alpha-xylosidase				i		I.A.1
XAC0878	(pcaH) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain				i	i	I.A.2
XAC1214	(gcvP) glycine decarboxylase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1316	(mmsB) 3-hydroxyisobutirate dehydrogenase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1775	D-xylulokinase				i		I.A.2
XAC3036	(sdaA) L-serine dehydratase				i		I.A.2
XAC3681	(sndH) L-sorbose dehydrogenase				i	i	I.A.2
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	i		i	i	i	I.A.2
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC0265	(acdA) acyl-CoA dehydrogenase				r	r	I.A.3
XAC1313	(fadE9) acyl-CoA dehydrogenase	r		r	r		I.A.3
XAC1314	(paaF) enoyl-CoA hydratase	r	r		r	r	I.A.3
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3
XAC2563	acyl-CoA dehydrogenase			i	i	i	I.A.3
XAC3054	acyl-CoA dehydrogenase				r		I.A.3
XAC0211	(gloA) lactoylglutathione lyase	i			i		I.B.10

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3332	(cysH) 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate reductase				r		I.B.12
XAC0124	(cbbFC) fructose-1,6-bisphosphatase	r		r	r	r	I.B.3
XAC0491	(nudH) probable (di)nucleoside polyphosphate hydrolase	i		i	i	i	I.B.7
XAC2336	(cydA) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	r	r		r		I.C.1
XAC2337	(cydB) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	r	r	r	r		I.C.1
XAC2693	(nuoL) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit			r	r		I.C.1
XAC2700	(nuoE) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO2 subunit		r	r	r	r	I.C.1
XAC3884	(cox3) cytochrome C oxidase subunit III		r	r	i	r	I.C.1
XAC0201	(adh) alcohol dehydrogenase		i		r		I.C.2
XAC0652	(adhC) alcohol dehydrogenase class III			i	i		I.C.2
XAC0287	quinone oxidoreductase				i		I.C.3
XAC0334	(sflA) NADH-dependent FMN reductase			r	r		I.C.3
XAC1685	cytochrome C				i		I.C.3
XAC2136	oxidoreductase	i	r		i		I.C.3
XAC2750	reductase				i	i	I.C.3
XAC2835	(mocA) oxidoreductase				i		I.C.3
XAC2896	alcohol dehydrogenase				i		I.C.3
XAC3575	(etfQO) flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	r		r	r	r	I.C.3
XAC3676	oxidoreductase	i			i		I.C.3
XAC3747	(ybdR) Zn-dependent alcohol dehydrogenase				i		I.C.3
XAC3868	(yliI) dehydrogenase				i		I.C.3
XAC3960	oxidoreductase				i	i	I.C.3
XAC4364	oxidoreductase				r		I.C.3
XAC2070	(glk) glucose kinase				i		I.C.4
XAC3212	(gcd) glucose dehydrogenase			i	i	i	I.C.5
XAC3650	(atpG) ATP synthase gamma chain	r		r	r	r	I.C.8
XAC3975	(ygiY) two-component system sensor protein				r		I.D.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0316	regulador transcricional lysR family				r		I.D.2
XAC0330	(cmfA) conditioned medium factor		r	i	i	i	I.D.2
XAC0917	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC1173	(uidR) regulador transcricional uid family	i			i		I.D.2
XAC1269	(rsbR) positive regulator of sigma-B		r	r	i		I.D.2
XAC1271	(rsbT) sigma-B negative effector			i	i	i	I.D.2
XAC1311	regulador transcricional				r		I.D.2
XAC1561	regulador transcricional				r		I.D.2
XAC1655	regulador transcricional	i		i	i	i	I.D.2
XAC1739	(lexA) LexA repressor				r		I.D.2
XAC2053	(tex) proteína relacionada à transcrição				r		I.D.2
XAC2166	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC2839	regulador transcricional				r		I.D.2
XAC3363	(blaI) regulador transcricional blaI family				i		I.D.2
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC3476	(ybhD) regulador transcricional	i			i	i	I.D.2
XAC3487	(cebR) regulador transcricional	i			i		I.D.2
XAC3961	regulador transcricional tetR family				i	i	I.D.2
XAC1912	quinase serina/treonina		r		r	r	I.D.3
XAC1682	(rpoE) RNA polymerase sigma-E factor				i	i	I.D.4
XAC3824	(rpoH) RNA polymerase sigma-32 factor	i		i	i	i	I.D.4
XAC0248	(ansA) asparaginase				r	r	II.A.2
XAC0630	(aspC) aminotransferase	r		r	r	r	II.A.2
XAC0791	(metF) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase				r		II.A.2
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC3455	(leuA) 2-isopropylmalate synthase				i	i	II.A.2
XAC1844	(serA) D-3-phosphoglycerate dehydrogenase				i		II.A.3

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0480	(trpD) anthranilate synthase component II	r	i		r		II.A.4
XAC1525	(tyrA) chorismate mutase				i	i	II.A.4
XAC3010	(aroK) shikimate kinase		r		r		II.A.4
XAC3647	(pheA) chorismate mutase			i	i	i	II.A.4
XAC1032	(purF) amidophosphoribosyl-transferase	r	r		r	r	II.B.1
XAC2961	(purN) 5-phosphoribosylglycinamide transformylase				i	i	II.B.1
XAC4214	(guaA) GMP synthase				r		II.B.1
XAC2916	(pyrB) aspartate carbamoyl-transferase				r		II.B.2
XAC0861	(apaH) diadenosine triphosphatase	r			r	r	II.B.4
XAC1336	(deoD) purine nucleoside phosphorylase				i		II.B.4
XAC0548	(GNL) gluconolactonase precursor		r	i	i		II.C
XAC3203	glutathione transferase				r		II.D.10
XAC3115	(pqqC) PqqC protein				i	i	II.D.11
XAC3116	(pqqC/D) PqqC/D protein	i	i		i		II.D.11
XAC4220	(hemH) ferrochelataze				r		II.D.12
XAC4102	hydroxylase		r		r	r	II.D.17
XAC0195	(cls) cardiolipin synthase				i		II.E
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC1129	(fabF) 3-oxoacyl-[ACP] synthase II			r	r	r	II.E
XAC1963	(fabG) 3-oxoacyl-[ACP] reductase				r		II.E
XAC2756	acyl-CoA thioester hydrolase	i			i		II.E
XAC3486	(phbB) reductase acetoacetyl-CoA				i		II.E
XAC1477	(dnaB) replicative DNA helicase				i		III.A.1
XAC4165	(gidB) glucose inhibited division protein B				r		III.A.1
XAC3017	(rebB) RebB protein	i			i		III.A.3
XAC3149	(ruvA) holliday junction binding protein DNA helicase			i	i	i	III.A.3
XAC3150	(ruvC) holliday junction resolvase				r		III.A.3

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2092	(uvrC) excinuclease ABC subunit C				r		III.A.4
XAC2281	RadC family protein	r			r		III.A.4
XAC4031	(dinG) ATP-dependent helicase				r		III.A.4
XAC2900	(hsdM) type I restriction-modification system DNA methylase	r			r	r	III.A.5
XAC0997	(rplQ) 50S ribosomal protein L17	i			i		III.B.2
XAC1292	(rpsP) 30S ribosomal protein S16				i	i	III.B.2
XAC2300	(rpmJ) 50S ribosomal protein L36			i	i		III.B.2
XAC2413	(rnD) ribonuclease D		r	r	i		III.B.4
XAC3875	(rbn) ribonuclease BN				i		III.B.4
XAC4006	(trpS) tryptophanyl-tRNA synthetase				i		III.B.4
XAC0078	ATP-dependent RNA helicase	r			r	r	III.B.5
XAC0442	(rhIE) ATP-dependent RNA helicase				r		III.B.5
XAC3394	(rpoZ) RNA polymerase omega subunit			i	i		III.B.5
XAC0540	ribonuclease			i	i	i	III.B.6
XAC1089	(rnhA) ribonuclease H			r	r	r	III.B.6
XAC1571	(rnt) ribonuclease T				i	i	III.B.6
XAC0944	(prfA) peptide chain release factor 1				r		III.C.1
XAC1323	(lepB) signal peptidase I				r	r	III.C.1
XAC1426	(ecpD) pili assembly chaperone		r		i		III.C.2
XAC0023	(ctp) carboxyl-terminal protease		i		r		III.C.3
XAC0249	(dcp) peptidyl-dipeptidase	r		r	r	r	III.C.3
XAC0347	proteinase inhibitor				i		III.C.3
XAC1456	(dcp) peptidyl-dipeptidase			r	r	r	III.C.3
XAC2831	extracellular serine protease			i	i	i	III.C.3
XAC2833	extracellular serine protease				i	i	III.C.3
XAC2853	cysteine protease			i	i	i	III.C.3
XAC3547	serine protease		r	i	i		III.C.3
XAC3627	(prlC) oligopeptidase A			r	r	r	III.C.3
XAC3713	peptidase				i		III.C.3
XAC3987	leucine aminopeptidase	r			r	r	III.C.3
XAC4106	dipeptidyl peptidase				r		III.C.3
XAC0425	(glgA) glycogen synthase	i			i	i	III.D.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2596	(cgt) cyclomaltodextrin glucano-transferase		r		r	r	III.D.1
XAC3092	(aspG) asparaginase		r		r		III.D.1
XAC3518	(bcsA) cellulose synthase				r		III.D.1
XAC0222	(gpdA) glycerol-3-phosphate dehydrogenase				r		III.D.2
XAC3565	(pssA) phosphatidylserine synthase				r		III.D.2
XAC2818	inner membrane protein				i		IV.A.1
XAC3867	(yiaA) membrane protein	i	r		i	i	IV.A.1
XAC4076	integral membrane protein				r		IV.A.1
XAC0999	(cirA) colicin I receptor	i	i		i	i	IV.A.2
XAC1579	(oprO) polyphosphate-selective porin O			i	i		IV.A.2
XAC3418	(oar) Oar protein				i		IV.A.2
XAC0779	(murG) UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol	i		i	i	i	IV.B
XAC1094	(opsX) saccharide biosynthesis regulatory protein				r		IV.C
XAC2965	(murA) UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	r			r	r	IV.C
XAC4150	(nodL) nodulation protein				r		IV.C
XAC2017	(pilF) fimbrial biogenesis protein				i		IV.D
XAC2722	FimV protein				r		IV.D
XAC2923	(pilU) twitching motility protein			i	i	i	IV.D
XAC3240	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC3241	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC3381	(pilQ) fimbrial assembly protein				r	r	IV.D
XAC0280	ATPase				i	i	IX
XAC1968	response regulator	i			i		IX
XAC2670	alginate biosynthesis protein	i			r		IX
XAC2939	acetyltransferase			i	i		IX
XAC3677	proteína hipotética conservada				r		IX
XAC3878	disulphide-isomerase				i	i	IX
XAC3986	hydrolase				r		IX
XAC1841	(yhdG) cationic amino acid transporter			i	i	i	V.A.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1842 (yhdG)	cationic amino acid transporter			i	i		V.A.1
XAC1577 (pstS)	ABC transporter phosphate binding protein				i	i	V.A.2
XAC2466 (ybeX)	polar amino acid transporter				r		V.A.4
XAC3168 (bfeA)	ferric enterobactin receptor			i	i	i	V.A.4
XAC3370 (fhuE)	outer membrane receptor for ferric iron uptake		i		r	r	V.A.4
XAC3701 (yjcE)	Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup> antiporter				i		V.A.4
XAC0788 (secA)	preprotein translocase SecA subunit				r		V.A.6
XAC0074 (cirA)	TonB-dependent receptor	r			i	i	V.A.7
XAC1310 (btuB)	TonB-dependent receptor		i		i		V.A.7
XAC2066 (acrD)	transport protein	i			i		V.A.7
XAC2185 (fhuA)	ferrichrome-iron receptor	i		i	i		V.A.7
XAC2600 (btuB)	TonB-dependent receptor	r		r	r	r	V.A.7
XAC2742 (btuB)	TonB-dependent receptor	r	r		r	r	V.A.7
XAC3071 (iroN)	TonB-dependent receptor		r		r		V.A.7
XAC3179 (yceE)	transport protein		i		i		V.A.7
XAC3197 (ssuC)	ABC transporter permease				r		V.A.7
XAC3198 (ssuA)	nitrate transport protein	i			i	i	V.A.7
XAC3308 (mscL)	large-conductance mechanosensitive channel	r			r	r	V.A.7
XAC3620 (pfeA)	siderophore receptor protein				i		V.A.7
XAC4256 (cirA)	TonB-dependent receptor				r	r	V.A.7
XAC1385	proteína hipotética conservada	i			i	i	V.B
XAC1934 (fleN)	flagellar biosynthesis switch protein	i		i	i	i	V.B
XAC1897 (tsr)	chemotaxis protein	i		i	r		V.C
XAC1900 (tsr)	chemotaxis protein	i		i	r		V.C
XAC1932 (cheY)	chemotaxis protein	i		i	i	i	V.C
XAC1942 (fliQ)	flagellar biosynthesis	i		i	i	i	V.C
XAC1944 (fliP)	flagellar biosynthetic protein			i	i	i	V.C
XAC1945 (fliO)	flagellar protein			i	i	i	V.C
XAC1946 (fliN)	flagellar protein	i		i	i		V.C
XAC1948 (fliL)	flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1950 (fliJ)	flagellar FliJ protein	i		i	i	i	V.C

Continua na próxima página



**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1951	(fliI) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1953	(fliG) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1954	(fliF) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1955	(fliE) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XAC1983	(flgE) flagellar biosynthesis hook protein	i		i	i	i	V.C
XAC1989	(flgM) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC3271	(tcp) chemotaxis transducer				r		V.C
XAC0344	(int) phage-related integrase				i		VI.A
XAC1063	(p13) phage-related lysozyme		r		r		VI.A
XAC1498	(int) integrase				r		VI.A
XAC2650	(lys) phage-related lytic enzyme				i	i	VI.A
XAC2652	(R) phage-related tail protein	i		i	i	i	VI.A
XAC2655	(J) phage-related baseplate assembly protein	r			r		VI.A
XAC2238	(ccgAII) plasmid-related protein	i			i		VI.B
XAC2422	(kfrA) plasmid-related protein		r		i		VI.B
XAC2432	transposase			r	r		VI.C
XAC3932	integrase/recombinase		r		r	r	VI.C
XACb0011	(avrXacE3) avirulence protein				i	i	VII.A
XAC0286	(avrXacE1) avirulence protein			i	i	i	VII.A
XAC3224	(avrXacE2) avirulence protein		i	i	i	i	VII.A
XAC0394	(hrpF) HrpF protein			i	i	i	VII.B
XAC0396	(hpaB) HpaB protein	i		i	i	i	VII.B
XAC0398	(hrpD6) HrpD6 protein			i	i	i	VII.B
XAC0401	(hrcS) HrcS protein			i	i	i	VII.B
XAC0403	(hrcQ) HrcQ protein				i	i	VII.B
XAC0406	(hrcU) HrcU protein			i	i	i	VII.B
XAC0407	(hrpB1) HrpB1 protein			i	i	i	VII.B
XAC0408	(hrpB2) HrpB2 protein		i	i	i	i	VII.B
XAC0411	(hrpB5) HrpB5 protein				i		VII.B
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1265	(hrpG) HrpG protein	i			i		VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1439	(tpmT) thiopurine methyltransferase		i		r		VII.C
XAC2499	(acrB) multidrug efflux transporter		r		i		VII.C
XAC2843	(mexB) multidrug efflux transporter			i	i	i	VII.C
XAC3144	(tolR) TolR protein				r		VII.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3450	(ggt) gamma-glutamyltranspeptidase				i		VII.C
XAC3848	(mtrC) membrane fusion protein precursor		i		r	r	VII.C
XAC3849	(acrD) acriflavin resistance protein				r		VII.C
XAC4008	(ecnA) entericidin A		r		i		VII.C
XAC4030	(catB) catalase				i	i	VII.C
XAC4105	AMP-ligase				r		VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC1770	(celA) cellulase			i	i	i	VII.D
XAC3506	truncated cellulase S				i		VII.D
XAC2575	(gumL) GumL protein				i	i	VII.E
XAC2582	(gumE) GumE protein				i		VII.E
XAC1427	(pru) protein U	i			i		VII.F
XAC0460	(phaD) PhaD protein				r		VII.G
XAC1337	(scoF) cold shock protein		r	i	i		VII.G
XAC4339	(yrbF) toluene tolerance protein				i		VII.G
XACb0046	(virB3) VirB3 protein			r	r		VII.H
XAC1877	(rpfG) response regulator		r	i	i	i	VII.H
XAC1878	(rpfC) RpfC protein		r	i	i	i	VII.H
XAC2513	(tgt) queuine tRNA-ribosyltransferase		r		r		VII.H
XAC2614	(virB4) VirB4 protein	r		r	r	r	VII.H
XAC2618	(virB11) VirB11 protein				r	r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XACb0022	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XACb0023	proteína hipotética conservada		r		r	r	VIII.A
XAC0017	proteína hipotética conservada		i		r	r	VIII.A
XAC0132	proteína hipotética conservada	i	r		i		VIII.A
XAC0193	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC0196	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A
XAC0243	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC0444	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC0479	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC0501	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0553	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0605	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC0753	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC0899	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC0904	proteína hipotética conservada		r		r		VIII.A

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0910	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC1008	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A
XAC1026	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC1036	proteína hipotética conservada	r		r	r		VIII.A
XAC1061	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1093	proteína hipotética conservada		r		i		VIII.A
XAC1121	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC1179	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1190	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC1240	proteína hipotética conservada	i	i		r	r	VIII.A
XAC1344	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC1387	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1393	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1568	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC1806	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC2026	proteína hipotética conservada		r		i	i	VIII.A
XAC2237	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC2434	proteína hipotética conservada	r	r		r	r	VIII.A
XAC2530	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC2654	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2741	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC2816	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC2828	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.A
XAC2901	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2921	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC2934	proteína hipotética conservada			i	i		VIII.A
XAC2969	proteína hipotética conservada		i	r	r		VIII.A
XAC3069	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC3073	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3178	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A
XAC3272	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC3301	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3365	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC3398	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC3408	proteína hipotética conservada	i	r	i	i		VIII.A
XAC3468	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC3617	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3743	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A
XAC3840	proteína hipotética conservada	r	r		r		VIII.A
XAC3841	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3865	proteína hipotética conservada	i	r		i	i	VIII.A
XAC3883	proteína hipotética conservada				i		VIII.A

Continua na próxima página

Tabela 10.4 – continuação da página anterior

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3925	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC3959	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3983	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC3998	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC4061	proteína hipotética conservada				i		VIII.A
XAC4087	proteína hipotética conservada			i	i		VIII.A
XAC4095	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC4131	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A
XAC4297	proteína hipotética conservada				r		VIII.A
XAC1088	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A.
XACb0025	proteína hipotética		r	r	r		VIII.B
XAC0048	proteína hipotética		i		r		VIII.B
XAC0315	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC0500	proteína hipotética		i	i	i		VIII.B
XAC0556	proteína hipotética	i			i		VIII.B
XAC0588	proteína hipotética				r		VIII.B
XAC0754	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B
XAC1170	proteína hipotética				i		VIII.B
XAC1572	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC1898	proteína hipotética	i		i	r		VIII.B
XAC2135	proteína hipotética				i		VIII.B
XAC2495	proteína hipotética				i		VIII.B
XAC2506	proteína hipotética	r		r	r	r	VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC2785	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC2787	proteína hipotética		i	i	i	i	VIII.B
XAC2863	proteína hipotética		r		r		VIII.B
XAC3019	proteína hipotética				r		VIII.B
XAC3230	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC3380	proteína hipotética				r	r	VIII.B
XAC3404	proteína hipotética	r			r		VIII.B
XAC3702	proteína hipotética			i	i		VIII.B
XAC3775	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC3984	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC4027	proteína hipotética			i	i		VIII.B
XAC4198	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC4334	proteína hipotética		i		i		VIII.B
XAC0018	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C
XAC0111	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.C
XAC0131	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC0275	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.4 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0419	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0518	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC0529	proteína hipotética conservada				i		VIII.C
XAC0573	proteína hipotética conservada				i		VIII.C
XAC0677	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC0822	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.C
XAC0935	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.C
XAC1015	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC1166	proteína hipotética conservada	i			r		VIII.C
XAC1235	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1364	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.C
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC1489	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1971	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2284	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC2445	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2611	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC2622	proteína hipotética conservada	r		r	r	r	VIII.C
XAC2732	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC2739	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC2786	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C
XAC3280	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC3281	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC3324	proteína hipotética conservada				r		VIII.C
XAC3682	proteína hipotética conservada	i			i	i	VIII.C
XAC3684	proteína hipotética conservada				i		VIII.C
XAC3751	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.C
XAC3844	proteína hipotética conservada				i		VIII.C
XAC3977	proteína hipotética conservada				i		VIII.C
XAC4200	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C
XAC4300	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.C

### 10.3.4 Análise da expressão gênica de Xac cultivada em folhas de laranjeira por 120 h

Dentre o grupo de genes diferencialmente expressos neste experimento é possível encontrar representadas 64 das 104 categorias gênicas definidas para o genoma de Xac (Tabela 10.5). Dessas 64 categorias, 25 estão representadas somente por genes induzidos e 10 delas possuem somente genes reprimidos nesta condição experimental. Dentre as categorias que contêm somente genes induzidos, cabe ressaltar as categorias V.C (Quimiotaxia e mobilidade), VII.A (Genes de avirulência), VII.B (Resposta hipersensível e patogenicidade), VII.D (Degradação de parede celular do hospedeiro) e VII.E (Exopolissacarídeos relacionados à patogenicidade, virulência e adaptação) (Figura 10.15). Apesar da categoria V.II representar somente genes de patogenicidade, virulência e adaptação, a subcategoria V.II.F está representada somente no grupo dos reprimidos, com duas ORFs: XAC4273 e XAC4274. Essas ORFs foram anotadas como uma proteína relacionada à proteína OmpA. A XAC4273 também foi reprimida quando Xac foi multiplicada *in planta* por 24 h.

Os genes induzidos, neste experimento, somam 240 e os reprimidos 140, uma diferença de exatos 100 genes, a segunda maior, perdendo somente para o experimento onde Xac foi cultivada por 24 h em folhas de laranjeira.

**Tabela 10.5:** ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac quando esta foi multiplicada em folhas de laranjeira por 120 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e, ainda, se ela foi induzida ou reprimida. X12h = Xac multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = Xac multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = Xac multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h; P3 = Xac multiplicada em folhas de laranjeira por 72 h; P5 = Xac multiplicada em folhas de laranjeira por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0160	(xynB) xylanase					r	I.A.1
XAC0707	(lacZ) truncated beta-galactosidase					r	I.A.1
XAC0311	(vanA) vanillate O-demethylase oxygenase subunit					i	I.A.2
XAC0818	(rbsK) ribokinase			i		i	I.A.2
XAC0878	(pcaH) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain				i	i	I.A.2
XAC1214	(gcvP) glycine decarboxylase	r		r	r	r	I.A.2

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1316 (mmsB)	3-hydroxyisobutirate dehydrogenase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1636 (hutG)	formylglutamate amidohydrolyase		r			i	I.A.2
XAC1766 (dgoA)	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase/2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase					i	I.A.2
XAC2736	carboxymethylenebutenolidase					i	I.A.2
XAC3454 (tdcB)	threonine dehydratase catabolic					i	I.A.2
XAC3681 (sndH)	L-sorbose dehydrogenase				i	i	I.A.2
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	i		i	i	i	I.A.2
XAC3890 (putA)	bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC4326 (uahA)	urea amidolyase					i	I.A.2
XAC0265 (acdA)	acyl-CoA dehydrogenase				r	r	I.A.3
XAC1314 (paaF)	enoyl-CoA hydratase	r	r		r	r	I.A.3
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3
XAC2563	acyl-CoA dehydrogenase			i	i	i	I.A.3
XAC2469 (gabD)	succinate-semialdehyde dehydrogenase	i	i			i	I.B.10
XAC4079 (ecaA)	a-type carbonic anhydrase					i	I.B.10
XAC3332 (cysH)	3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate reductase					i	I.B.12.
XAC0124 (cbbFC)	fructose-1,6-bisphosphatase	r		r	r	r	I.B.3
XAC0491 (nudH)	probable (di)nucleoside polyphosphate hydrolase	i		i	i	i	I.B.7
XAC1039 (ppx)	exopolyphosphatase					i	I.B.9
XAC2759 (phoA)	alkaline phosphatase	r		r		r	I.B.9
XAC2700 (nuoE)	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO2 subunit		r	r	r	r	I.C.1
XAC2983	quinol oxidase subunit I	i				i	I.C.1
XAC3884 (cox3)	cytochrome C oxidase subunit III		r	r	i	r	I.C.1
XAC0133 (lctD)	L-lactate dehydrogenase		i			i	I.C.2
XAC2486	formate dehydrogenase a chain	i		i		i	I.C.2
XAC1684 (cycA)	cytochrome C2 reductase			i		i	I.C.3
XAC2750	reductase				i	i	I.C.3

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3575	(etfQO) flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	r		r	r	r	I.C.3
XAC3587	(etfA) electron transfer flavoprotein alpha subunit			r		r	I.C.3
XAC3960	oxidoreductase				i	i	I.C.3
XAC4186	(ucpA) oxidoreductase	i				i	I.C.3
XAC4199	polyvinylalcohol dehydrogenase		i	i		i	I.C.3
XAC1633	(gcd) glucose dehydrogenase	i	i	i		i	I.C.5
XAC3212	(gcd) glucose dehydrogenase			i	i	i	I.C.5
XAC3661	(phdB) dihydrolipoamide acetyltransferase					i	I.C.6
XAC3650	(atpG) ATP synthase gamma chain	r		r	r	r	I.C.8
XAC3651	(atpA) ATP synthase alpha chain	r		r		r	I.C.8
XAC1283	two-component system sensor protein					r	I.D.1
XAC0251	regulador transcricional tetR family					i	I.D.2
XAC0266	regulador transcricional acrR family	r				r	I.D.2
XAC0302	regulador transcricional lysR family					r	I.D.2
XAC0330	(cmfA) conditioned medium factor		r	i	i	i	I.D.2
XAC0355	(pobR) PobR regulator					r	I.D.2
XAC0671	regulador transcricional			i		i	I.D.2
XAC0917	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC1271	(rsbT) sigma-B negative effector			i	i	i	I.D.2
XAC1480	regulador transcricional			i		i	I.D.2
XAC1573	(phoU) phosphate regulon regulador transcricional					i	I.D.2
XAC1655	regulador transcricional	i		i	i	i	I.D.2
XAC1767	(gbpR) galactose-binding protein regulator	i				i	I.D.2
XAC2166	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC3476	(ybhD) regulador transcricional	i			i	i	I.D.2
XAC3719	(algR) regulador transcricional protein					i	I.D.2
XAC3961	regulador transcricional tetR family				i	i	I.D.2

Continua na próxima página



**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1669	proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta	i				i	I.D.3
XAC1912	quinase serina/treonina		r		r	r	I.D.3
XAC3292	(cvgSY) proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta					r	I.D.3
XAC1682	(rpoE) RNA polymerase sigma-E factor				i	i	I.D.4
XAC3824	(rpoH) RNA polymerase sigma-32 factor	i		i	i	i	I.D.4
XAC4129	(rpoE) ECF sigma factor					i	I.D.4
XAC0248	(ansA) asparaginase				r	r	II.A.2
XAC0300	serine-pyruvate aminotransferase					i	II.A.2
XAC0630	(aspC) aminotransferase	r		r	r	r	II.A.2
XAC1432	(dapE) succinyl-diaminopimelate desuccinylase	r				r	II.A.2
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC3039	(metB) cystathionine gamma-synthase			i		i	II.A.2
XAC3455	(leuA) 2-isopropylmalate synthase				i	i	II.A.2
XAC1525	(tyrA) chorismate mutase				i	i	II.A.4
XAC3647	(pheA) chorismate mutase			i	i	i	II.A.4
XAC1032	(purF) amidophosphoribosyltransferase	r	r		r	r	II.B.1
XAC2961	(purN) 5-phosphoribosylglycinamide transformylase				i	i	II.B.1
XAC2681	(nadC) nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase					i	II.B.2
XAC0861	(apaH) diadenosine triphosphatase	te- r			r	r	II.B.4
XAC3114	(pqqG) pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein G	i		i		i	II.D.11
XAC3115	(pqqC) PqqC protein				i	i	II.D.11
XAC2744	phytoene dehydrogenase	i		i		i	II.D.17
XAC4102	hydroxylase		r		r	r	II.D.17
XAC4275	(prnA) tryptophan halogenase					r	II.D.17
XAC1099	(moaD) molybdopterin-converting factor chain 1	i	r	i		i	II.D.4

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3415	(thiE) thiamin-phosphate pyrophosphorylase				i	i	II.D.8
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC1123	(fabH) beta-ketoacyl-[ACP] synthase III					i	II.E
XAC1128	(acpP) acyl carrier protein	r		r		r	II.E
XAC1129	(fabF) 3-oxoacyl-[ACP] synthase II			r	r	r	II.E
XAC4096	fatty acyl CoA synthetase			r		r	II.E
XAC3149	(ruvA) holliday junction binding protein DNA helicase			i	i	i	III.A.3
XAC3303	(micA) DNA mismatch repair protein			r		r	III.A.4
XAC3902	(exoA) exodeoxyribonuclease III					i	III.A.4
XAC2900	(hsdM) type I restriction-modification system DNA methylase	r			r	r	III.A.5
XAC3803	(smf) DNA processing chain A					r	III.A.5
XAC0991	(rplO) 50S ribosomal protein L15					i	III.B.2
XAC1122	(rpmF) 50S ribosomal protein L32					i	III.B.2
XAC1292	(rpsP) 30S ribosomal protein S16				i	i	III.B.2
XAC2781	(leuS) leucyl-tRNA synthetase			i		i	III.B.4
XAC3316	tRNA/rRNA methyltransferase			i		i	III.B.4
XAC0078	ATP-dependent RNA helicase	r			r	r	III.B.5
XAC3129	pseudouridylate synthase					i	III.B.5
XAC0540	ribonuclease			i	i	i	III.B.6
XAC1089	(rnhA) ribonuclease H			r	r	r	III.B.6
XAC1571	(rnt) ribonuclease T				i	i	III.B.6
XAC1005	(ppiB) peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	r		r		r	III.C.1
XAC1323	(lepB) signal peptidase I				r	r	III.C.1
XAC0249	(dcp) peptidyl-dipeptidase	r		r	r	r	III.C.3
XAC1204	alanyl dipeptidyl peptidase			r		r	III.C.3
XAC1321	(mucD) periplasmic protease					r	III.C.3
XAC1456	(dcp) peptidyl-dipeptidase			r	r	r	III.C.3
XAC2140	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase					i	III.C.3
XAC2541	peptidase		r			r	III.C.3
XAC2831	extracellular serine protease			i	i	i	III.C.3

Continua na próxima página

Tabela 10.5 – continuação da página anterior

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2833	extracellular serine protease				i	i	III.C.3
XAC2853	cysteine protease			i	i	i	III.C.3
XAC3195	(clpB) ATP-dependent Clp protease subunit	i				r	III.C.3
XAC3514	serine protease		r			r	III.C.3
XAC3545	protease		r			r	III.C.3
XAC3627	(prlC) oligopeptidase A			r	r	r	III.C.3
XAC3987	leucine aminopeptidase	r			r	r	III.C.3
XAC0155	trehalose synthase					i	III.D.1
XAC0425	(glgA) glycogen synthase	i			i	i	III.D.1
XAC2596	(cgt) cyclomaltodextrin glucanotransferase		r		r	r	III.D.1
XAC4244	(xylB) xylulose kinase					i	III.D.1
XAC4099	(plsC) acyltransferase	i		i		i	III.D.2
XAC4367	(glpQ) glycerophosphoryl diester phosphodiesterase					i	III.D.2
XAC3823	proteína hipotética conservada	i				i	IV.A.1
XAC3867	(yiaA) membrane protein	i	r		i	i	IV.A.1
XAC3912	(algC) phosphomannomutase	r				r	IV.A.1
XAC4028	(ankB) ankyrin-like protein	i		i		i	IV.A.1
XAC0999	(cirA) colicin I receptor	i	i		i	i	IV.A.2
XAC3667	outer membrane protein					i	IV.A.2
XAC0779	(murG) UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol	i		i	i	i	IV.B
XAC0780	(murC) UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase					r	IV.B
XAC2609	carboxypeptidase			r		r	IV.B
XAC1409	(lpxA) UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase			r		r	IV.C
XAC2965	(murA) UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	r			r	r	IV.C
XAC3598	(rfbC) truncated O-antigen biosynthesis protein					r	IV.C
XAC2923	(pilU) twitching motility protein			i	i	i	IV.D
XAC3099	(pilJ) pilus biogenesis protein					r	IV.D
XAC3381	(pilQ) fimbrial assembly protein				r	r	IV.D
XAC0280	ATPase				i	i	IX
XAC0283	(catD) hydrolase					i	IX

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0319	chloroperoxidase					i	IX
XAC3878	disulphide-isomerase				i	i	IX
XAC3921	(ugt) glucosyltransferase		i	i		i	IX
XAC1841	(yhdG) cationic amino acid transporter			i	i	i	V.A.1
XAC2985	(gabP) amino acid transporter			i		i	V.A.1
XAC1577	(pstS) ABC transporter phosphate binding protein				i	i	V.A.2
XAC0206	(amtB) ammonium transporter					i	V.A.4
XAC2468	(corA) magnesium and cobalt transport protein	i	i			i	V.A.4
XAC3168	(bfeA) ferric enterobactin receptor			i	i	i	V.A.4
XAC3370	(fhuE) outer membrane receptor for ferric iron uptake		i		r	r	V.A.4
XAC0074	(cirA) TonB-dependent receptor	r			i	i	V.A.7
XAC0179	(ylmA) ABC transporter ATP-binding protein			r		r	V.A.7
XAC1363	(araJ) MFS transporter			i		i	V.A.7
XAC2531	(btuB) TonB-dependent receptor		r			r	V.A.7
XAC2600	(btuB) TonB-dependent receptor	r		r	r	r	V.A.7
XAC2742	(btuB) TonB-dependent receptor	r	r		r	r	V.A.7
XAC3198	(ssuA) nitrate transport protein	i			i	i	V.A.7
XAC3308	(mscL) large-conductance mechanosensitive channel	r			r	r	V.A.7
XAC3560	(btuB) TonB-dependent receptor		r	r		r	V.A.7
XAC3669	(abc) ABC transporter ATP-binding protein					r	V.A.7
XAC4256	(cirA) TonB-dependent receptor				r	r	V.A.7
XAC0773	(ftsL) cell division protein					r	V.B
XAC0784	(ftsZ) cell division protein					r	V.B
XAC1385	proteína hipotética conservada	i			i	i	V.B
XAC1934	(fleN) flagellar biosynthesis switch protein	i		i	i	i	V.B
XAC3973	(sulA) cell division inhibitor					i	V.B
XAC1932	(cheY) chemotaxis protein	i		i	i	i	V.C
XAC1942	(fliQ) flagellar biosynthesis	i		i	i	i	V.C
XAC1944	(fliP) flagellar biosynthetic protein			i	i	i	V.C
XAC1945	(fliO) flagellar protein			i	i	i	V.C
XAC1948	(fliL) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1949	(fliK) flagellar protein			i		i	V.C

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1950	(fliJ) flagellar FliJ protein	i		i	i	i	V.C
XAC1951	(fliI) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1953	(fliG) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1954	(fliF) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1955	(fliE) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XAC1977	(flgK) flagellar protein	i		i		i	V.C
XAC1979	(flgI) flagellar protein	i		i		i	V.C
XAC1980	(flgH) flagellar L-ring protein	i		i		i	V.C
XAC1983	(flgE) flagellar biosynthesis hook protein	i		i	i	i	V.C
XAC1985	(flgC) flagellar biosynthesis cell-proximal portion of basal-body rod	i		i		i	V.C
XAC1989	(flgM) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1054	integrase					r	VI.A
XAC1494	(orf2) phage-related protein					r	VI.A
XAC2650	(lys) phage-related lytic enzyme				i	i	VI.A
XAC2652	(R) phage-related tail protein	i		i	i	i	VI.A
XACb0030	(trwB) TrwB protein	r		r		r	VI.B
XAC2433	(parA) resolvase		r			r	VI.B
XAC4315	(Y4JK) plasmid stability protein					r	VI.B
XACa0005	(ISxac2) ISxac2 transposase		r			r	VI.C
XAC2371	IS1479 transposase	r		i		i	VI.C
XAC2372	IS1479 transposase			i		i	VI.C
XAC2431	(tnp) transposase		i			i	VI.C
XAC3932	integrase/recombinase		r		r	r	VI.C
XACb0011	(avrXacE3) avirulence protein				i	i	VII.A
XAC0286	(avrXacE1) avirulence protein			i	i	i	VII.A
XAC3224	(avrXacE2) avirulence protein		i	i	i	i	VII.A
XAC0393	(hpaF) HpaF protein	i				i	VII.B
XAC0394	(hrpF) HrpF protein			i	i	i	VII.B
XAC0396	(hpaB) HpaB protein	i		i	i	i	VII.B
XAC0398	(hrpD6) HrpD6 protein			i	i	i	VII.B
XAC0401	(hrcS) HrcS protein			i	i	i	VII.B
XAC0403	(hrcQ) HrcQ protein				i	i	VII.B
XAC0406	(hrcU) HrcU protein			i	i	i	VII.B
XAC0407	(hrpB1) HrpB1 protein			i	i	i	VII.B
XAC0408	(hrpB2) HrpB2 protein		i	i	i	i	VII.B
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1445	(pmrA) multidrug resistance efflux pump			i		i	VII.C
XAC2230	(gst) glutathione S-transferase					r	VII.C
XAC2386	(sodM) superoxidase dismutase			r		r	VII.C
XAC2494	(yieO) drug resistance translocase	i	i			i	VII.C
XAC2843	(mexB) multidrug efflux transporter			i	i	i	VII.C
XAC3848	(mtrC) membrane fusion protein precursor		i		r	r	VII.C
XAC4030	(catB) catalase				i	i	VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC0029	(egl) cellulase		i			i	VII.D
XAC1770	(celA) cellulase			i	i	i	VII.D
XAC2373	(pel) degenerated pectate lyase					i	VII.D
XAC2574	(gumM) GumM protein					i	VII.E
XAC2575	(gumL) GumL protein				i	i	VII.E
XAC2579	(gumH) GumH protein					i	VII.E
XAC2581	(gumF) GumF protein			i		i	VII.E
XAC4273	OmpA-related protein			r		r	VII.F
XAC4274	OmpA-related protein					r	VII.F
XAC1877	(rpfG) response regulator		r	i	i	i	VII.H
XAC1878	(rpfC) RpfC protein		r	i	i	i	VII.H
XAC1880	(rpfB) RpfB protein		r			r	VII.H
XAC2607	(virB6) VirB6 protein					r	VII.H
XAC2614	(virB4) VirB4 protein	r		r	r	r	VII.H
XAC2616	(virB2) VirB2 protein	r	r	r		r	VII.H
XAC2617	(virB1) VirB1 protein	r		r		r	VII.H
XAC2618	(virB11) VirB11 protein				r	r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XACb0023	proteína hipotética conservada		r		r	r	VIII.A
XACb0032	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC0017	proteína hipotética conservada		i		r	r	VIII.A
XAC0077	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC0141	proteína hipotética conservada			r		r	VIII.A
XAC0298	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC0464	proteína hipotética conservada		r			r	VIII.A
XAC0501	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0553	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0586	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC0625	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A

Continua na próxima página

Tabela 10.5 – continuação da página anterior

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0899	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC1037	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC1061	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1121	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC1179	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1240	proteína hipotética conservada	i	i		r	r	VIII.A
XAC1245	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC1296	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC1351	proteína hipotética conservada			r		r	VIII.A
XAC1379	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC1387	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1393	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A
XAC1553	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC1568	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC1629	proteína hipotética conservada	i	r	i		i	VIII.A
XAC1689	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC1790	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC1806	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC1958	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC2004	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC2026	proteína hipotética conservada		r		i	i	VIII.A
XAC2074	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC2210	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC2408	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC2434	proteína hipotética conservada	r	r		r	r	VIII.A
XAC2443	proteína hipotética conservada	i	r			r	VIII.A
XAC2605	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC2654	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2671	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC2816	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC2840	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC2901	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2907	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC2921	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC2945	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC3073	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3089	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC3097	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC3206	proteína hipotética conservada		i	i		i	VIII.A
XAC3301	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3314	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC3398	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A

Continua na próxima página

**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3525	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC3617	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3634	proteína hipotética conservada					r	VIII.A
XAC3720	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A
XAC3739	proteína hipotética conservada					i	VIII.A
XAC3841	proteína hipotética conservada	r			r	r	VIII.A
XAC3865	proteína hipotética conservada	i	r		i	i	VIII.A
XAC3959	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3983	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A
XAC3998	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC4013	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A
XAC1088	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A.
XACb0043	proteína hipotética	r				r	VIII.B
XACb0048	proteína hipotética	r				r	VIII.B
XAC0315	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC0527	proteína hipotética	i				i	VIII.B
XAC0601	proteína hipotética					i	VIII.B
XAC0891	proteína hipotética					i	VIII.B
XAC1502	proteína hipotética	r				r	VIII.B
XAC1572	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC1632	proteína hipotética					i	VIII.B
XAC1919	proteína hipotética					i	VIII.B
XAC2262	proteína hipotética					r	VIII.B
XAC2263	proteína hipotética					r	VIII.B
XAC2506	proteína hipotética	r		r	r	r	VIII.B
XAC2610	proteína hipotética		r	r		r	VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC2785	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC2787	proteína hipotética		i	i	i	i	VIII.B
XAC2876	proteína hipotética					i	VIII.B
XAC3230	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC3277	proteína hipotética					r	VIII.B
XAC3295	proteína hipotética					r	VIII.B
XAC3319	proteína hipotética	r		r		r	VIII.B
XAC3380	proteína hipotética				r	r	VIII.B
XAC3599	proteína hipotética					r	VIII.B
XAC3775	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC3779	proteína hipotética					i	VIII.B
XAC3984	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC4198	proteína hipotética				i	i	VIII.B
XAC0018	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C

Continua na próxima página



**Tabela 10.5 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0096	proteína hipotética conservada					r	VIII.C
XAC0131	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC0285	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.C
XAC0419	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0677	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC0935	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.C
XAC1235	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1381	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.C
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC1489	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1503	proteína hipotética conservada	r				r	VIII.C
XAC1694	proteína hipotética conservada	r				i	VIII.C
XAC1914	proteína hipotética conservada	r		i		i	VIII.C
XAC1971	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC1990	proteína hipotética conservada	i		i		i	VIII.C
XAC2170	proteína hipotética conservada		r	i		i	VIII.C
XAC2367	proteína hipotética conservada					i	VIII.C
XAC2445	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2559	proteína hipotética conservada		r			i	VIII.C
XAC2606	proteína hipotética conservada					r	VIII.C
XAC2611	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC2622	proteína hipotética conservada	r		r	r	r	VIII.C
XAC2739	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC2786	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C
XAC3267	proteína hipotética conservada					r	VIII.C
XAC3289	proteína hipotética conservada					i	VIII.C
XAC3636	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C
XAC3682	proteína hipotética conservada	i			i	i	VIII.C
XAC3734	proteína hipotética conservada		r			i	VIII.C
XAC3751	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.C
XAC3866	proteína hipotética conservada		r			i	VIII.C
XAC3966	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C
XAC3970	proteína hipotética conservada					i	VIII.C
XAC4200	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C
XAC4300	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.C

### 10.3.5 Análise comparativa da expressão gênica de Xac cultivada em meio de cultura XAM1 por 12 e por 24 h

Esta comparação se deu observando quais ORFs estavam presentes em ambas as situações experimentais, considerando os induzidos e os reprimidos. Desse modo, verificou-se que 77 delas estavam presentes em ambas as situações, sendo que 26 estavam compartilhadas no grupo das induzidas e 26 no grupo das reprimidas (Tabela 10.6). Esses 26 genes representam 28 categorias das 104 previamente determinadas para o genoma de Xac.

Para 25 ORFs a expressão gênica foi discrepante, ou seja, se foi induzida em um experimento foi reprimida no outro experimento, ou vice-versa. Neste caso, dentre as 25 discrepantes, 21 se encontram reprimidas no experimento em que Xac foi cultivada em meio de cultura XAM1 por 24 h.

**Tabela 10.6:** ORFs cuja expressão diferencial foi induzida (i) ou reprimida (r) em Xac quando esta foi multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h e nesse mesmo meio de cultura por 24 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e, ainda, se ela foi induzida ou reprimida. X12h = Xac multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = Xac multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = Xac multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h; P3 = Xac multiplicada em folhas de laranjeira por 72 h; P5 = Xac multiplicada em folhas de laranjeira por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC1314	(paaF) enoyl-CoA hydratase	r	r		r	r	I.A.3
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3
XAC2469	(gabD) succinate-semialdehyde dehydrogenase	i	i			i	I.B.10
XAC0256	(mls) malate synthase	i	i				I.B.4
XAC2336	(cydA) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	r	r		r		I.C.1
XAC2337	(cydB) cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	r	r	r	r		I.C.1
XAC2826	alcohol dehydrogenase	i	i				I.C.2
XAC2136	oxidoreductase	i	r		i		I.C.3
XAC1633	(gcd) glucose dehydrogenase	i	i	i		i	I.C.5
XAC2078	(sdhB) succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	r	r	r			I.C.7
XAC0730	two-component system regulatory protein	i	i				I.D.1

Continua na próxima página

**Tabela 10.6 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC3993	two-component system regulatory protein	r	i				I.D.1
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC0480	(trpD) anthranilate synthase component II	r	i		r		II.A.4
XAC1032	(purF) amidophosphoribosyltransferase	r	r		r	r	II.B.1
XAC3116	(pqqC/D) PqqC/D protein	i	i		i		II.D.11
XAC1099	(moaD) molybdopterin-converting factor chain I	i	r	i		i	II.D.4
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC2084	(comA) competence protein	r	r	r			III.A.5
XAC3800	(fmt) 10-Formyltetrahydrofolate:L-methionyl-tRNA N-formyltransferase	i	i				III.B.4
XAC3867	(yiaA) membrane protein	i	r		i	i	IV.A.1
XAC0999	(cirA) colicin I receptor	i	i		i	i	IV.A.2
XAC1425	(fasD) outer membrane usher protein FasD	i	i				IV.A.2
XAC2802	(ttgF) outer membrane channel protein	i	r	i			IV.A.2
XAC1176	(srfJ) glycosyl hydrolase	i	i				IV.C
XAC3240	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC3241	(fimA) fimbrillin	i	r	i	i		IV.D
XAC3157	(ycaD) transmembrane transport protein	i	i				V.A.1
XAC1438	(brf) bacterioferritin	r	r	r			V.A.4
XAC2468	(corA) magnesium and cobalt transport protein	i	i			i	V.A.4
XAC2742	(btuB) TonB-dependent receptor	r	r		r	r	V.A.7
XAC3759	(drrA) ABC transporter ATP-binding protein	i	i				V.A.7
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XACb0031	(trwC) TrwC protein	r	r				VI.B
XAC1660	ISxac3 transposase	r	r				VIC
XAC2663	transposase	i	i				VIC
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B

Continua na próxima página

Tabela 10.6 – continuação da página anterior

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC2494	(yieO) drug resistance translocase	i	i			i	VII.C
XAC4162	(czcC) cation efflux system protein	r	r	i			VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC2616	(virB2) VirB2 protein	r	r	r		r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XAC0132	proteína hipotética conservada	i	r		i		VIII.A
XAC0268	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC1240	proteína hipotética conservada	i	i		r	r	VIII.A
XAC1629	proteína hipotética conservada	i	r	i		i	VIII.A
XAC2011	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.A
XAC2152	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC2407	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A
XAC2434	proteína hipotética conservada	r	r		r	r	VIII.A
XAC2443	proteína hipotética conservada	i	r			r	VIII.A
XAC2755	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC2879	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XAC3049	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC3408	proteína hipotética conservada	i	r	i	i		VIII.A
XAC3840	proteína hipotética conservada	r	r		r		VIII.A
XAC3865	proteína hipotética conservada	i	r		i	i	VIII.A
XAC3948	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A
XAC4021	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A
XACb0035	proteína hipotética	r	r	r			VIII.B
XAC0040	proteína hipotética		i				VIII.B
XAC0392	proteína hipotética	i	r	i			VIII.B
XAC0754	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B
XAC1613	proteína hipotética	r	i				VIII.B
XAC1657	proteína hipotética	i	i				VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC3131	proteína hipotética	i	i	i			VIII.B
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C
XAC0547	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.C
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC2485	proteína hipotética conservada	i	r	i			VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C

### 10.3.6 Análise comparativa da expressão gênica de *Xac* cultivada em folhas de laranjeira por 24, 72 e 120 h

De todas as 102 ORFs expressas diferencialmente em *Xac* nestes três tempos, 73 foram induzidas e 28 reprimidas. Uma delas, XAC3834, foi reprimida em 24 h e 120 h e induzida no experimento 72 h. Juntas, essas 73 ORFs representam 31 das 104 categorias determinadas para *Xac*, sendo encontradas 16 categorias representadas dentre os reprimidos e 25 nos induzidos, uma vez que 9 delas possuem tanto ORFs induzidas quanto reprimidas.

No grupo dos induzidos a categoria V.C (Quimiotaxia e motilidade) é a mais abundante (17,8%). Inclusive, essa categoria não compartilha nenhum gene em todos os tempos, ou seja, nessa comparação ela somente está presente no grupo dos induzidos (Tabela 10.7).

**Tabela 10.7:** Quantidade de ORFs de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* que se mantém induzidas ou reprimidas durante todo o processo de infecção (de 1 a 120 h de infecção). Categoria: ver Anexo A

Categoria	Induzidos	Porcentagem	Reprimidos	Porcentagem
I.A.2	1	1.37	3	10.71
I.A.3	1	1.37	2	7.14
I.B.7	1	1.37		0.00
I.C.1		0.00	1	3.57
I.C.3		0.00	1	3.57
I.C.5	1	1.37		0.00
I.C.8		0.00	1	3.57
I.D.2	5	6.85	1	3.57
I.D.4	1	1.37		0.00
II.A.2		0.00	2	7.14
II.A.4	1	1.37		0.00
II.E		0.00	2	7.14
III.A.3	1	1.37		0.00
III.B.6	1	1.37	1	3.57
III.C.3	2	2.74	3	10.71
IV.B	1	1.37		0.00
IV.D	1	1.37		0.00
V.A.1	1	1.37		0.00
V.A.4	1	1.37		0.00
V.A.7		0.00	1	3.57
V.B	1	1.37		0.00
V.C	13	17.81		0.00
VI.A	1	1.37		0.00
VII.A	2	2.74		0.00
VII.B	9	12.33		0.00

Continua na próxima página

**Tabela 10.7 – continuação da página anterior**

<b>Categoria</b>	<b>Induzidos</b>	<b>Porcentagem</b>	<b>Reprimidos</b>	<b>Porcentagem</b>
VII.C	1	1.37		0.00
VII.D	2	2.74		0.00
VII.H	2	2.74	2	7.14
VIII.A	9	12.33	1	3.57
VIII.B	3	4.11	2	7.14
VIII.C	11	15.07	5	17.86
Total	73	100.00	28	100.00

Uma análise gráfica, onde se plotou a quantidade de genes por categoria, considerando todos os genes diferencialmente expressos, nota-se que nas categorias I.A.2 e I.D.2 o grupo de genes induzidos tende a aumentar com o passar do tempo, enquanto o contrário ocorre com os genes reprimidos. Outro grupo interessante são os genes pertencentes às categorias III.A.3 (Recombinação), IV.A.2 (Constituintes da membrana externa) e IV.D (Estruturas de superficial da célula), onde o grupo de genes induzidos tende a diminuir ao longo do tempo, enquanto que os genes reprimidos são quase inexistentes. Nas categorias V.B (Divisão celular), VII.D (Degradação de parede celular do hospedeiro) e VII.E (Produção de exopolissacarídeos) ocorre exatamente o contrário dessa última. Nessas três categorias o grupo de genes induzidos tende a crescer com o passar do tempo. Na categoria VIII.B ocorre o oposto do que ocorre nas categorias I.A.2 (Degradação de pequenas moléculas) e I.D.2 (Ativadores-repressores). Na VIII.B (Hipotéticas) são os genes induzidos que diminuem em quantidade enquanto os reprimidos tende a aumentar. Enquanto na categoria I.C.3 (Transporte de elétrons) os genes reprimidos tendem a diminuir em quantidade, nas categorias III.C.3 (Degradação de proteína) e V.A.7 (Transporte: Outros) eles tendem a aumentar em número ao longo do tempo. Um outro dado interessante ocorre na categoria V.C (Transporte de carboidratos, ácidos orgânicos e álcoois), uma vez que os genes dessa categoria tem aparecido, quase que exclusivamente, como induzidos (raramente aparece algum reprimido) e em grandes quantidades. O fato interessante está na quantidade de genes dessa categoria diferencialmente expressos após 24 h de cultivo *in planta*, um valor próximo ao dobro do observado para os outros dois tempos (Figura 10.16).

A Tabela 10.8 apresenta os genes diferencialmente expressos em *Xac* cultivada em folhas de laranjeiras comuns aos três tempos analisados. Nela é possível verificar que genes relacionados a virulência (*avrXacE1* e *avrXacE2*), receptor de enterobactina férrica (*bfeA*), proteínas relacionadas a quimiotaxia (*cheY*), genes envolvidos na degradação de parede celular do hospedeiro (*egl*), proteínas de flagelos (*fliQ*), genes *hrp*, *hpa* e *hrc*, genes de detoxificação (*mexB*), genes *rpf*, enzimas

extracelular (XAC2831) e muitas proteínas hipotéticas foram induzidos. Já genes relacionados a degradação de pequenas moléculas (XAC3890), de degradação de lipídios (XAC1315), genes *vir* e *pthA3* e muitas proteínas hipotéticas, encontram-se reprimidos *in planta*.

**Tabela 10.8:** ORFs cuja expressão foi induzida (i) ou reprimida (r) em *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 24 h, 72 h e 120 h, em comparação com o perfil de expressão apresentado por esse mesmo isolado quando multiplicado em meio de cultura NA por 12 h. As demais colunas referem-se aos demais experimentos e indicam se a referida ORF também foi diferencialmente expressa naquele experimento e se ela foi induzida ou reprimida. X12h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 12 h; X24h = *Xac* multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h; P24h = *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 24 h; P3 = *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 72 h; P5 = *Xac* multiplicada em folhas de laranja por 120 h; Cat = categoria (Anexo A); Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1214	(gcvP) glycine decarboxylase	r		r	r	r	I.A.2
XAC1316	(mmsB) 3-hydroxyisobutirate dehydrogenase	r		r	r	r	I.A.2
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	i		i	i	i	I.A.2
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3
XAC2563	acyl-CoA dehydrogenase			i	i	i	I.A.3
XAC0124	(cbbFC) fructose-1,6-bisphosphatase	r		r	r	r	I.B.3
XAC0491	(nudH) probable (di)nucleoside polyphosphate hydrolase	i		i	i	i	I.B.7
XAC2700	(nuoE) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO2 subunit		r	r	r	r	I.C.1
XAC3884	(cox3) cytochrome C oxidase subunit III		r	r	i	r	I.C.1
XAC3575	(etfQO) flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	r		r	r	r	I.C.3
XAC3212	(gcd) glucose dehydrogenase			i	i	i	I.C.5
XAC3650	(atpG) ATP synthase gamma chain	r		r	r	r	I.C.8
XAC0330	(cmfA) conditioned medium factor		r	i	i	i	I.D.2
XAC0917	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC1271	(rsbT) sigma-B negative effector			i	i	i	I.D.2
XAC1655	regulador transcricional	i		i	i	i	I.D.2
XAC2166	regulador transcricional			i	i	i	I.D.2
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2
XAC3824	(rpoH) RNA polymerase sigma-32 factor	i		i	i	i	I.D.4

Continua na próxima página

**Tabela 10.8 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC0630	(aspC) aminotransferase	r		r	r	r	II.A.2
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2
XAC3647	(pheA) chorismate mutase			i	i	i	II.A.4
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E
XAC1129	(fabF) 3-oxoacyl-[ACP] synthase II			r	r	r	II.E
XAC3149	(ruvA) holliday junction binding protein DNA helicase			i	i	i	III.A.3
XAC0540	ribonuclease			i	i	i	III.B.6
XAC1089	(rnhA) ribonuclease H			r	r	r	III.B.6
XAC0249	(dcp) peptidyl-dipeptidase	r		r	r	r	III.C.3
XAC1456	(dcp) peptidyl-dipeptidase			r	r	r	III.C.3
XAC2831	extracellular serine protease			i	i	i	III.C.3
XAC2853	cysteine protease			i	i	i	III.C.3
XAC3627	(prlC) oligopeptidase A			r	r	r	III.C.3
XAC0779	(murG) UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol	i		i	i	i	IV.B
XAC2923	(pilU) twitching motility protein			i	i	i	IV.D
XAC1841	(yhdG) cationic amino acid transporter			i	i	i	V.A.1
XAC3168	(bfeA) ferric enterobactin receptor			i	i	i	V.A.4
XAC2600	(btuB) TonB-dependent receptor	r		r	r	r	V.A.7
XAC1934	(fleN) flagellar biosynthesis switch protein	i		i	i	i	V.B
XAC1932	(cheY) chemotaxis protein	i		i	i	i	V.C
XAC1942	(fliQ) flagellar biosynthesis	i		i	i	i	V.C
XAC1944	(fliP) flagellar biosynthetic protein			i	i	i	V.C
XAC1945	(fliO) flagellar protein			i	i	i	V.C
XAC1948	(fliL) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1950	(fliJ) flagellar FliJ protein	i		i	i	i	V.C
XAC1951	(fliI) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1953	(fliG) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1954	(fliF) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1955	(fliE) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C
XAC1983	(flgE) flagellar biosynthesis hook protein	i		i	i	i	V.C

Continua na próxima página



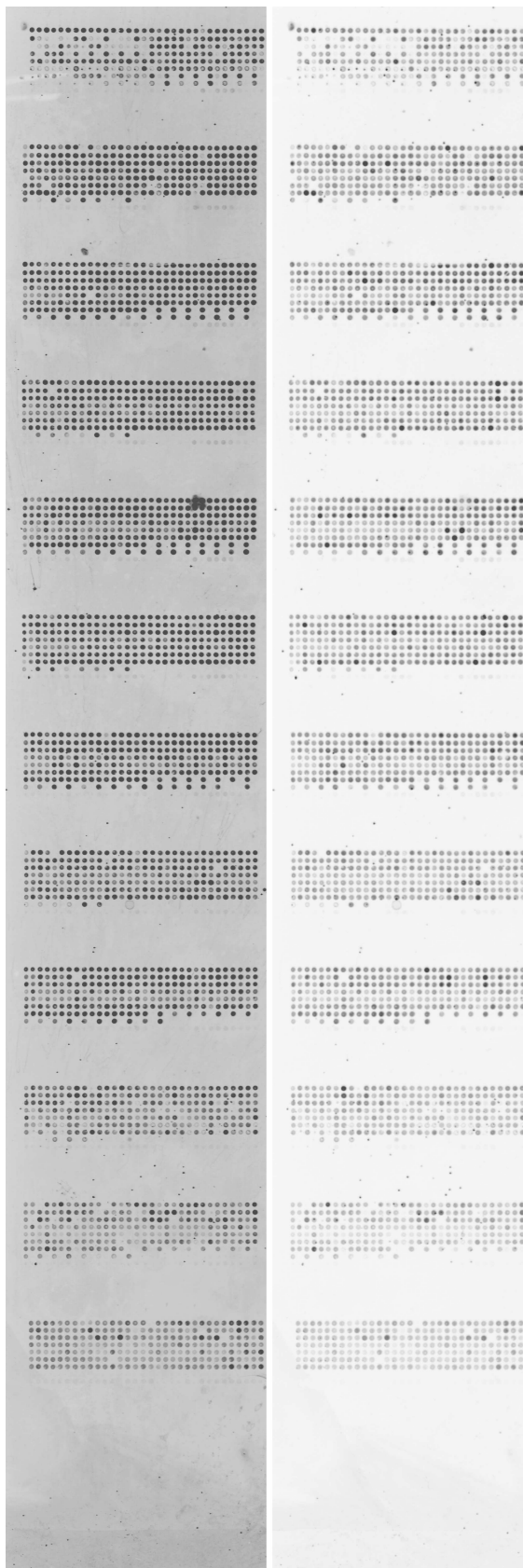
**Tabela 10.8 – continuação da página anterior**

ORF	Nome	X12h	X24h	P24h	P3	P5	Cat
XAC1989	(flgM) flagellar protein	i		i	i	i	V.C
XAC2652	(R) phage-related tail protein	i		i	i	i	VI.A
XAC0286	(avrXacE1) avirulence protein			i	i	i	VII.A
XAC3224	(avrXacE2) avirulence protein		i	i	i	i	VII.A
XAC0394	(hrpF) HrpF protein			i	i	i	VII.B
XAC0396	(hpaB) HpaB protein	i		i	i	i	VII.B
XAC0398	(hrpD6) HrpD6 protein			i	i	i	VII.B
XAC0401	(hrcS) HrcS protein			i	i	i	VII.B
XAC0406	(hrcU) HrcU protein			i	i	i	VII.B
XAC0407	(hrpB1) HrpB1 protein			i	i	i	VII.B
XAC0408	(hrpB2) HrpB2 protein		i	i	i	i	VII.B
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein	i	i	i	i	i	VII.B
XAC2843	(mexB) multidrug efflux trans- porter			i	i	i	VII.C
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i	i	VII.D
XAC1770	(celA) cellulase			i	i	i	VII.D
XAC1877	(rpfG) response regulator		r	i	i	i	VII.H
XAC1878	(rpfC) RpfC protein		r	i	i	i	VII.H
XAC2614	(virB4) VirB4 protein	r		r	r	r	VII.H
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r	r	VII.H
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A
XAC0501	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC0553	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC1806	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC2654	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC2901	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.A
XAC3617	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3959	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC3998	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A
XAC1088	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.A.
XAC2506	proteína hipotética	r		r	r	r	VIII.B
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r	r	VIII.B
XAC2787	proteína hipotética		i	i	i	i	VIII.B
XAC3230	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC3775	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B
XAC0018	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C
XAC0131	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC0419	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC0677	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1235	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C

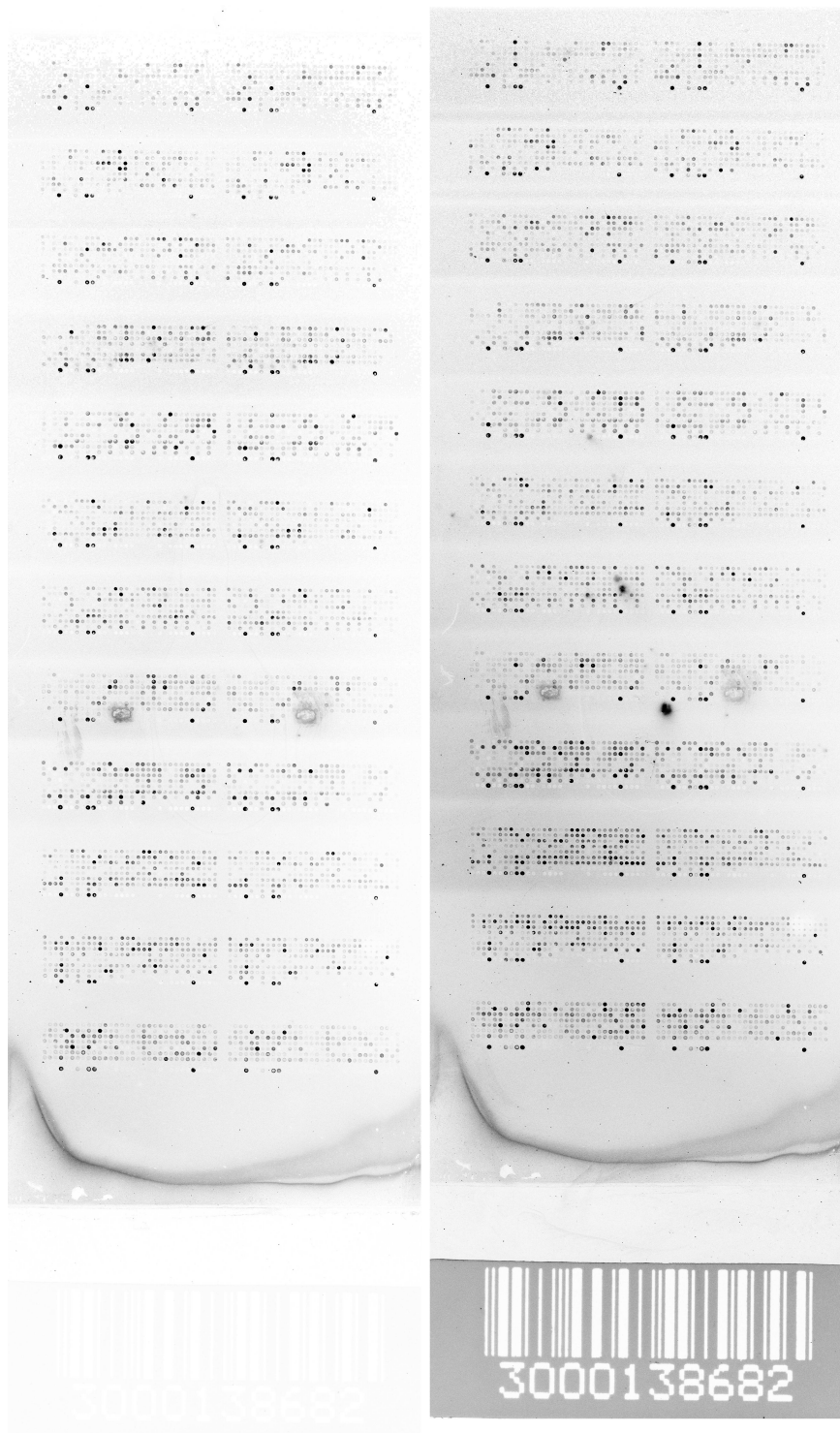
Continua na próxima página

**Tabela 10.8 – continuação da página anterior**

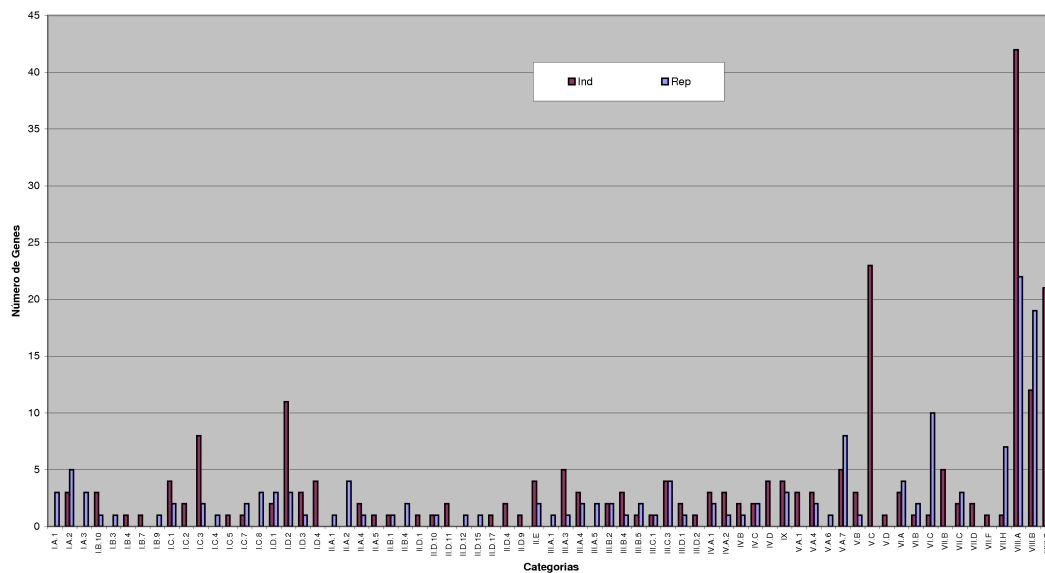
<b>ORF</b>	<b>Nome</b>	<b>X12h</b>	<b>X24h</b>	<b>P24h</b>	<b>P3</b>	<b>P5</b>	<b>Cat</b>
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C
XAC1489	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC1971	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2445	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC2611	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C
XAC2622	proteína hipotética conservada	r		r	r	r	VIII.C
XAC2739	proteína hipotética conservada			i	i	i	VIII.C
XAC2786	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C
XAC4200	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C



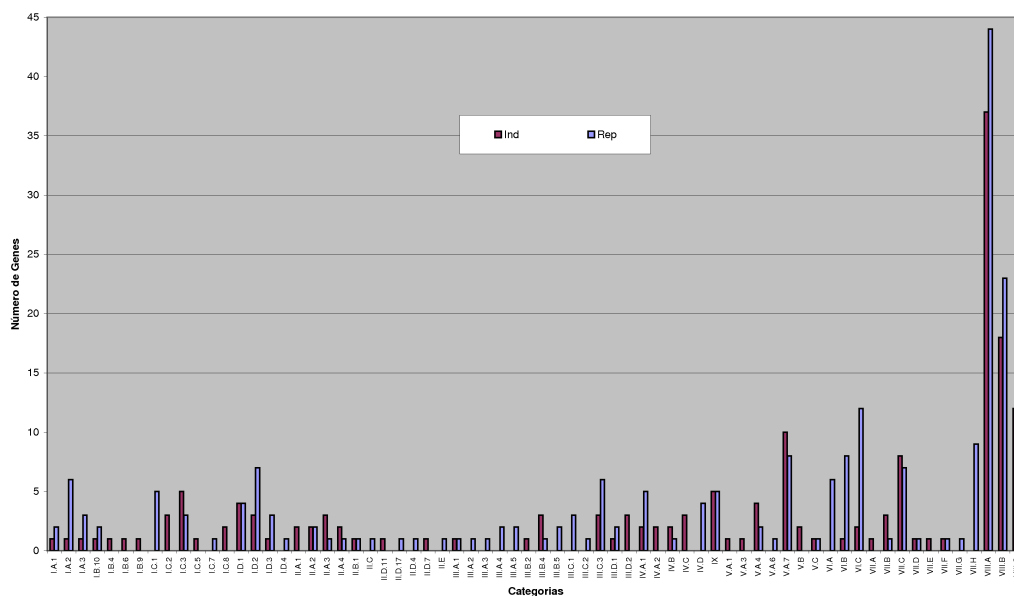
**Figura 10.9:** Imagem de uma lâmina de microarranjos de DNA de Xac hibridizada com DNA desse mesmo isolado marcado com fluoróforo Cy3 (lado esquerdo) e com fluoróforo Cy5 (lado direito).



**Figura 10.10:** Imagem de uma lâmina de microarranjos de DNA de *Xac* hibridizados com cDNA desse mesmo isolado multiplicado em meio de cultura, marcado com fluoróforo Cy5 (lado esquerdo), e multiplicado em folhas de Laranja Pêra por 72 h, marcado com fluoróforo Cy3 (lado direito).

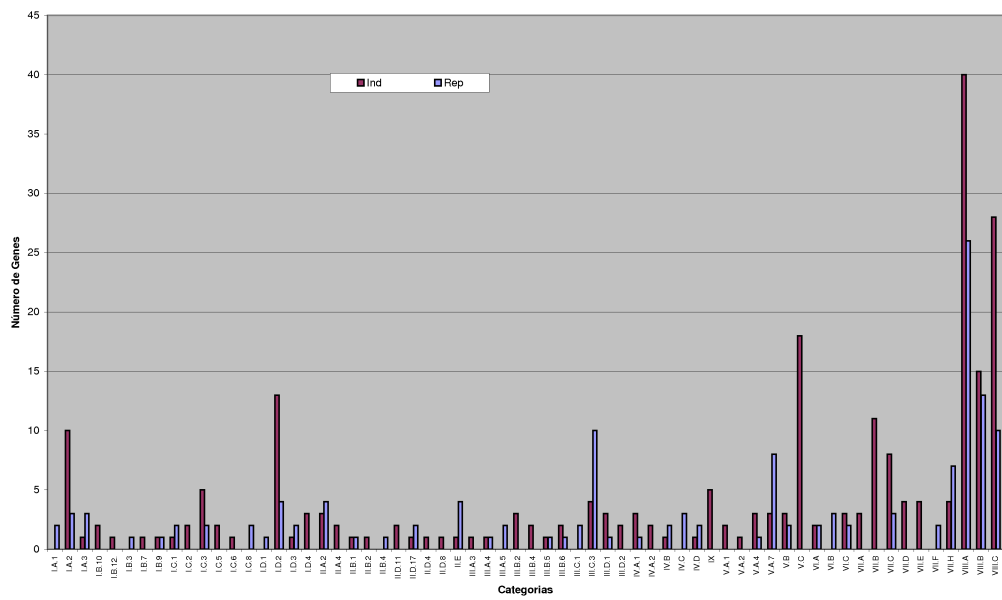


**Figura 10.11:** Quantidade de genes diferencialmente expressos por categoria gênica quando células de Xac foram multiplicadas em meio de cultura XAM1 por 12 h, comparada a sua expressão em meio de cultura NA por igual período.

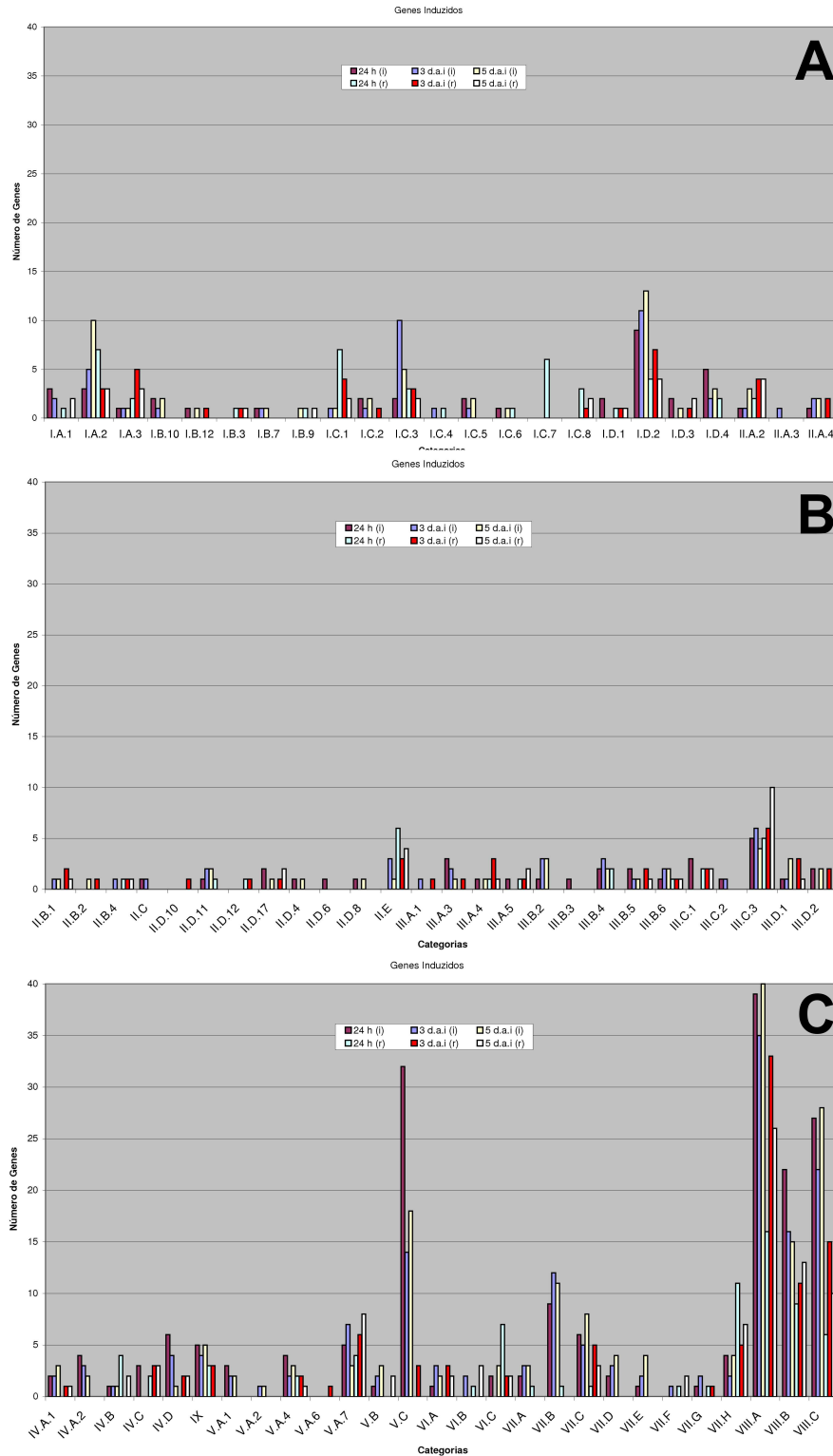


**Figura 10.12:** Quantidade de genes diferencialmente expressos por categoria gênica quando células de Xac foram multiplicadas em meio de cultura XAM1 por 24 h, comparada a sua expressão em meio de cultura NA por 12 h.





**Figura 10.15:** Quantidade de genes diferencialmente expressos por categoria gênica quando células de Xac foram multiplicadas em folhas de laranjeiras por 120 h, comparada a sua expressão em meio de cultura NA por 12 h.



**Figura 10.16:** Densidade de genes diferencialmente expressos por categoria gênica, considerando os três experimentos realizados *in planta*: Xac cultivada em folhas de laranjeira por 24 h, por 72 h e por 120 h após a inoculação em folhas de laranjeira.



**Tabela 10.9:** ORFs induzidas (i) e reprimidas (r) em Xac cultivada em meio de cultura XAM1 por 12 h (X12), em XAM1 por 24 h (X24), em folhas de laranjeira Pêra por 24 h (P24), em folhas de laranjeira por 72 h (P3) e em folhas de laranjeira por 120 h (P5) quando comparada à expressão gênica global de Xac multiplicada em meio de cultura NA por 12 h. Cat = código da respectiva categoria; Nome = nome do gene, entre parênteses, quando houver, seguido do provável produto protéico

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0480 (trpD)	anthranilate synthase component II	r	i	r	r		II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC0481 (trpC)	indole-3-glycerol phosphate synthase		i				II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC1000 (dhs1)	family II 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase					i	II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC1525 (tyrA)	chorismate mutase				i	i	II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC2716 (trpA)	tryptophan synthase alpha chain					i	II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC3010 (aroK)	shikimate kinase			r		r	II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC3647 (pheA)	chorismate mutase				i	i	II.A.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família dos aminoácidos aromáticos
XAC0248 (ansA)	asparaginase				r	r	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Famílias do aspartato e do piruvato

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0300	serine-pyruvate aminotransferase					i	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC0382	(aspH) aspartyl-asparaginyl beta-hydroxylase	r					II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC0630	(aspC) aminotransferase	r	r	r	r	r	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC0791	(metF) methylenetetrahydrofolate reductase			5,10-	r		II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC1432	(dapE) succinyl-diaminopimelate desuccinylase	r				r	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC1820	(metL) aspartokinase		r				II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC2547	(dapA) dihydrodipicolinate synthetase	r	r	r	r	r	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC2723	(asd) aspartate semialdehyde dehydrogenase		i				II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC3039	(metB) cystathionine gamma-synthase					i	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato
XAC3181	(lysA) diaminopimelate decarboxylase					i	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Fasmílias do aspartato e do piruvato

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3455	(leuA) 2-isopropylmalate synthase			i	i	i	II.A.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Famílias do aspartato e do piruvato
XAC0033	(gltB) glutamate synthase alpha subunit	i					II.A.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família do glutamato   assimilação de nitrogênio
XAC2352	(argF) ornithine carbamoyltransferase	i					II.A.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família do glutamato   assimilação de nitrogênio
XAC3429	(argD) acetylornithine aminotransferase	r					II.A.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Família do glutamato   assimilação de nitrogênio
XAC0477	threonine aldolase	i					II.A.3	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Glycine-Serine Family/Metabolismo de enxofre
XAC0743	(glyA) serine hydroxymethyltransferase	i					II.A.3	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Glycine-Serine Family/Metabolismo de enxofre
XAC1648	(serC) phosphoserine aminotransferase	i					II.A.3	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Glycine-Serine Family/Metabolismo de enxofre

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1844 (serA)	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase		i				II.A.3	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Glycine-Serine Family/Metabolismo de enxofre
XAC3628 (cysM)	cysteine synthase	r					II.A.3	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Glycine-Serine Family/Metabolismo de enxofre
XAC1832 (hisH)	amidotransferase	i					II.A.5	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de aminoácidos / Histidina
XAC0388 (bioB)	biotin synthase	i					II.D.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Biotina
XAC2098 (syrE2)	ATP-dependent serine activating enzyme	r					II.D.15	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Enterocelina
XAC3340 (cysG)	siroheme synthase	r					II.D.12	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Heme, porfirina
XAC3420 (hemL)	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase		r				II.D.12	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Heme, porfirina
XAC4220 (hemH)	ferrochelatase		r				II.D.12	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Heme, porfirina

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2762	(ispA) geranyltransferase		r				II.D.11	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Menaquinona, ubiquinona
XAC3114	(pqqG) pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein G	i	i			i	II.D.11	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Menaquinona, ubiquinona
XAC3115	(pqqC) PqqC protein				i	i	II.D.11	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Menaquinona, ubiquinona
XAC3116	(pqqC/D) PqqC/D protein	i	i			i	II.D.11	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Menaquinona, ubiquinona
XAC1099	(moaD) molybdopterin-converting factor chain 1	i	r			i	II.D.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Molibdopterina
XAC2023	(moeB) molybdopterin biosynthesis protein	i				i	II.D.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Molibdopterina
XAC2744	phytoene dehydrogenase	i				i	II.D.17	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Outras
XAC2995	(prmA) tryptophan halogenase					i	II.D.17	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Outras

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4102	hydroxylase	r	r	r	r	r	II.D.17	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Outras
XAC4275	(pmA) tryptophan halogenase					r	II.D.17	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Outras
XAC3521	(pncB) nicotinate phosphoribosyl-transferase	i					II.D.7	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Nucleotídeos de piridina
XAC1524	(pdxY) pyridoxine kinase		i				II.D.6	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Piridoxina
XAC3792	(ribA) riboflavin biosynthesis protein					i	II.D.9	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Riboflavin
XAC3415	(thiE) thiamin-phosphate phosphorylase			i		i	II.D.8	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Tiamina
XAC3203	glutathione transferase				r		II.D.10	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Tioredoxina, glutaredoxina, glutatona
XAC3830	(trxA) thioredoxin					i	II.D.10	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Tioredoxina, glutaredoxina, glutatona

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4072	(trxA) thioredoxin	r					II.D.10	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores / Tioredoxina, glutaredoxina, glutatona
XAC0195	(cls) cardiolipin synthase			i			II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC0263	(accC) biotin carboxylase	r	r	r	r	r	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC0561	(mdcD) delta subunit of malonate decarboxylase		r				II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC1123	(fabH) beta-ketoacyl-[ACP] synthase III					i	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC1128	(acpP) acyl carrier protein	r	r			r	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC1129	(fabF) 3-oxoacyl-[ACP] synthase II		r		r	r	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC1963	(fabG) 3-oxoacyl-[ACP] reductase				r		II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC1964	(fabH) 3-oxoacyl-[ACP] synthase					i	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2048	(phbC) poly (3-hydroxybutyric acid) synthase	i					II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC2756	acyl-CoA thioester hydrolase	i			i		II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC3486	(phbB) acetoacetyl-CoA reductase				i		II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC3625	(fabB) beta-ketoacyl-[ACP] synthase I	i					II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC4096	fatty acyl CoA synthetase		r			r	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC4179	(acs) acetyl coenzyme A synthetase		r				II.E	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC0470	(purC) phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase			i			II.B.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ribonucleotídeos purínicos
XAC1032	(purF) amidophosphoribosyltransferase	r	r			r	II.B.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ribonucleotídeos purínicos
XAC2961	(purN) 5-phosphoribosylglycinamide transformylase			5-			II.B.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ribonucleotídeos purínicos
XAC3437	(adk) adenylylate kinase	i					II.B.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ribonucleotídeos purínicos

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4214	(guaA) GMP synthase				r		II.B.1	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ri-bonucleotídeos purínicos
XAC2681	(nadC) nicotinate–nucleotide pyrophosphorylase				i		II.B.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ri-bonucleotídeos pirimidínicos
XAC2916	(pyrB) aspartate carbamoyltransferase				r		II.B.2	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Ri-bonucleotídeos pirimidínicos
XAC0861	(apaH) diadenosine tetraphosphatase				r	r	II.B.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Salvamento de nucleosídeos e nucleotídeos
XAC1336	(deoD) purine nucleoside phosphorylase				i		II.B.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Salvamento de nucleosídeos e nucleotídeos
XAC2824	phosphodiesterase–nucleotide pyrophosphatase			r	r		II.B.4	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de nucleotídeos / Salvamento de nucleosídeos e nucleotídeos
XAC0548	(GNL) gluconolactonase precursor				r	i	II.C	Biossíntese de pequenas moléculas / Biossíntese de açúcares e de açúcar nucleotídeo
XAC0070	ankyrin–like protein					i	IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC0664	(dacC) penicillin–binding protein 6			r			IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC1148	(pbpC) bifunctional penicillin–binding protein 1C				i		IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2748	integral membrane protein	r					IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC2818	inner membrane protein				i		IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC3584	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	i					IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC3823	proteína hipotética conservada	i				i	IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC3867	(yiaA) membrane protein	i				i	IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC3912	(algC) phosphomannomutase	r				r	IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC4028	(ankB) ankyrin-like protein	i				i	IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC4076	integral membrane protein				r		IV.A.1	Estrutura celular / Componentes de membrana / Membrana interna
XAC0999	(cirA) colicin I receptor	i				i	IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC1113	(slp) outer membrane protein Slp	r					IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC1305	(wapA) wall-associated protein	r					IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC1425	(fasD) outer membrane usher protein FasD	i				i	IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1579	(oprO) polyphosphate-selective porin O		i	i	i		IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC2669	(fimT) pre-pilin like leader sequence		i				IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC2802	(ttgF) outer membrane channel protein	i	r	i			IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC3074	(nahA) beta-hexosaminidase		i				IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC3354	(ompW) outer membrane protein W		r				IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC3418	(oar) Oar protein				i		IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC3667	outer membrane protein					i	IV.A.2	Estrutura celular / Componentes de membrana / Constituintes de membrana externa
XAC0187	(hipA) HipA protein		r	r			IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC0421	(mdoB) phosphoglycerol transferase I		i				IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC0658	(mreD) rod shape-determining protein		i				IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0779	(murG) acetylglucosamine-N- acetylmuramyl- pyrophosphoryl-undecaprenol (pentapeptide)	UDP-N-	i	i	i	i	IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC0780	(murC) UDP-N-acetylmuramate- alanine ligase					r	IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC1691	aminotransferase		i				IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC2406	(amiC) N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase		r				IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC2609	carboxypeptidase		r			r	IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC3141	(ompP6) outer membrane protein P6 precursor		r				IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC3860	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase		r				IV.B	Estrutura celular / Saco de mureína, peptidoglicano
XAC0042	(wbpZ) glycosyltransferase		i				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC0047	galactosyltransferase		i				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC0197	acetyltransferase			i			IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC1038	(gtrB) glycosyl transferase		r				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1094	saccharide biosynthesis regulatory protein			r			IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC1176	(srfJ) glycosyl hydrolase	i	i				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC1409	(lpxA) UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase		r		r		IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC1957	(rbfC) O-antigen biosynthesis protein	i					IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC1966	(vioA) nucleotide sugar transaminase		i				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC2965	(murA) acetylglucosamine carboxyvinyltransferase	r			r		IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC3583	(rmlC) dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase		r				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC3585	(rmlB) dTDP-glucose dehydratase	4,6-	i				IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC3598	(rbfC) truncated O-antigen biosynthesis protein	bi-			r		IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
XAC4150	(nodL) nodulation protein				r		IV.C	Estrutura celular / Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1133	(pilZ) type IV fimbriae assembly protein	r					IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC2017	(pilF) fimbrial biogenesis protein			i			IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC2666	(pilX) PilX protein	i		i			IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC2668	(pilV) pre-pilin leader sequence			i			IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC2722	FimV protein				r		IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC2923	(pilU) twitching motility protein			i	i		IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC2924	(pilT) twitching motility protein	r					IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC3099	(pilJ) pilus biogenesis protein					r	IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC3102	(pilG) pilus protein			i			IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC3239	(pilB) pilus biogenesis protein	i					IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC3240	(fimA) fimbriillin	i	r	i			IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC3241	(fimA) fimbriillin	i	r	i			IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC3381	(pilQ) fimbrial assembly protein				r		IV.D	Estrutura celular / Estruturas de superfícies
XAC0773	(ftsL) cell division protein					r	V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC0783	(ftsA) cell division protein					i	V.B	Processos celulares / Divisão celular

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0784	(ftsZ) cell division protein					r	V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC1004	(typA) GTP-binding elongation factor protein	r					V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC1385	proteína hipotética conservada	i			i	i	V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC1934	(fleN) flagellar biosynthesis switch protein	i			i	i	V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC2552	(ftsY) cell division protein					i	V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC3906	(parB) chromosome partitioning protein	i					V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC3973	(sulA) cell division inhibitor					i	V.B	Processos celulares / Divisão celular
XAC1666	(tsr) chemotaxis protein	i			i		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1889	(cheD) chemotaxis protein				i		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1891	(tsr) chemotaxis protein				i		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1893	(tsr) chemotaxis protein				i		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1894	(tsr) chemotaxis protein				i		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1897	(tsr) chemotaxis protein	i			i	r	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1899	(tsr) chemotaxis protein				i		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1900	(tsr) chemotaxis protein	i			i	r	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1906	(cheW) chemotaxis protein		i				V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1932	(cheY) chemotaxis protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1942	(fliQ) flagellar biosynthesis	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1944	(fliP) flagellar biosynthetic protein			i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1945	(fliO) flagellar protein			i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1946	(fliN) flagellar protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1948	(fliL) flagellar protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1949	(fliK) flagellar protein			i		i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1950	(fliJ) flagellar FliJ protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1951	(fliI) flagellar protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1953	(fliG) flagellar protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1954	(fliF) flagellar protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1955	(fliE) flagellar protein	i		i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1974	(fliD) flagellar protein	i	r	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1977	(flgK) flagellar protein	i		i		i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1979	(flgI) flagellar protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1980	(flgH) flagellar L-ring protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1983	(flgE) flagellar biosynthesis hook protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1985	(flgC) flagellar biosynthesis cell-proximal portion of basal-body rod	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1988	(flgA) flagellar protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1989	(flgM) flagellar protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC1996	(mcp) chemotaxis protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC2865	(cheA) chemotaxis histidine protein kinase	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC3271	(tcp) chemotaxis transducer				r		V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC3693	(motA) chemotaxis protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC3694	(motB) chemotaxis MotB protein	i	i	i	i	i	V.C	Processos celulares / Mobilidade e quimiotaxia
XAC0888	(gfo) glucose-fructose oxidoreductase	i					V.D	Processos celulares / Adaptação osmótica
XAC0449	(yhiP) di-tripeptide transporter	i					V.A.1	Processos celulares / Transporte / Aminoácidos, aminos
XAC1841	(yhdG) cationic amino acid transporter		i	i	i	i	V.A.1	Processos celulares / Transporte / Aminoácidos, aminos
XAC1842	(yhdG) cationic amino acid transporter		i	i	i	i	V.A.1	Processos celulares / Transporte / Aminoácidos, aminos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2985 (gabP)	amino acid transporter		i			i	V.A.1	Processos celulares / Transporte / Aminoácidos, aminas
XAC3157 (ycaD)	transmembrane transport protein	i					V.A.1	Processos celulares / Transporte / Aminoácidos, aminas
XAC1577 (pstS)	ABC transporter phosphate binding protein			i		i	V.A.2	Processos celulares / Transporte / Ânions
XAC4255 (exuT)	hexuranate transporter					i	V.A.3	Processos celulares / Transporte / Carboidratos, ácidos orgânicos, álcoois
XAC0206 (amtB)	ammonium transporter					i	V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC0254 (yjl094C)	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -exchanging protein	r					V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC1438 (brf)	bacterioferritin	r		r			V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC2466 (ybeX)	polar amino acid transporter				r		V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC2468 (corA)	magnesium and cobalt transport protein	i				i	V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC2805 (yjl094C)	cation:proton antiporter					i	V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC2980 (mgtE)	Mg <sup>++</sup> transporter	i					V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC3148 (kup)	potassium uptake protein					i	V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC3168 (bfeA)	ferric enterobactin receptor					i	V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC3176 (fecA)	citrate-dependent iron transporter	i					V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3207	(bfeA) ferric enterobactin receptor	r	r				V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC3370	(fhuE) outer membrane receptor for ferric iron uptake	i		r	r		V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC3701	(yjeE) Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup> antiporter				i		V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC4053	(natB) ABC transporter sodium permease	i					V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC4368	(fecA) TonB–dependent receptor		i				V.A.4	Processos celulares / Transporte / Cátions
XAC0074	(cirA) TonB–dependent receptor	r			i	i	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0179	(ylmA) ABC transporter ATP–binding protein		r			r	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0558	(mxcB) iron utilization protein		i				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0741	(yjjK) ABC transporter ATP–binding protein	r					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0757	(kdpB) potassium–transporting ATP–Pase B chain	r			i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0758	(kdpC) potassium–transporting ATP–Pase C chain		i				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0829	ABC transporter substrate binding protein	i					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC1310	(btuB) TonB–dependent receptor				i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC1363	(araJ) MFS transporter					i	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC1459	(msbA) ABC transporter ATP–binding protein		i				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2066	(acrD) transport protein	i			i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2185	(fhuA) ferrichrome–iron receptor	i		i	i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2193	(cirA) TonB–dependent receptor		i				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2234	(cynX) MFS transporter	r					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2488	(yhjX) integral membrane transporter			i			V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2520	(cirA) TonB–dependent receptor	r					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2531	(btuB) TonB–dependent receptor	r			r		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2600	(btuB) TonB–dependent receptor	r	r		r		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2742	(btuB) TonB–dependent receptor	r	r		r		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC2836	MFS transporter	r					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3006	potassium channel related protein	i					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3071	(ironN) TonB–dependent receptor	r			r		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3179	(yceE) transport protein	i			i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3197	(ssuC) ABC transporter permease				r		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3198	(ssuA) nitrate transport protein	i			i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3201	(fyuA) TonB–dependent receptor		i				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3308	(mscL) large–conductance mechanosensitive channel	r		r	r	r	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3529	(bfrC) iron receptor		i				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3530	(bfrC) iron receptor	i					V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3560	(btuB) TonB–dependent receptor		r	r	r	r	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3620	(pfeA) siderophore receptor protein				i		V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3669	(abc) ABC transporter binding protein	ATP–				r	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC3759	(dirA) ABC transporter binding protein	ATP–	i	i			V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC4048	(iroN) TonB–dependent receptor		r				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC4065	(yadG) ABC transporter binding protein	ATP–	r				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC4256	(cirA) TonB–dependent receptor				r	r	V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC4365	(ygtJ) export protein		r				V.A.7	Processos celulares / Transporte / Outro
XAC0788	(secA) preprotein translocase subunit	SecA			r		V.A.6	Processos celulares / Transporte / Proteína, secreção de peptídeo
XAC2324	(cycW) ABC transporter heme permease		r				V.A.6	Processos celulares / Transporte / Proteína, secreção de peptídeo
XAC4216	(tatC) sec–independent translocase	protein	r				V.A.6	Processos celulares / Transporte / Proteína, secreção de peptídeo

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1088	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3726	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0022	proteína hipotética conservada			r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0023	proteína hipotética conservada	r		r	r	r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0032	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0033	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0017	proteína hipotética conservada	i		r	r	r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0026	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0035	proteína hipotética conservada	r		r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0077	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0085	proteína hipotética conservada	r		r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0116	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0132	proteína hipotética conservada	i	r		i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0141	proteína hipotética conservada		r			r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0145	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0193	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0196	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0243	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0267	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0268	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0289	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0298	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0341	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0420	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0424	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0444	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0453	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0464	proteína hipotética conservada		r			r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0468	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0479	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0501	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0553	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0586	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0605	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0623	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0625	proteína hipotética conservada	i				i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0682	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0691	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0692	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0739	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0753	proteína hipotética conservada			r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0766	RNA subunit of RNase P	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0792	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0814	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0840	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0899	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0901	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0904	proteína hipotética conservada			r	r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0910	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0915	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0926	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1003	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1008	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1026	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1036	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1037	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1047	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1061	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1088	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1093	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1120	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1121	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1161	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1179	proteína hipotética conservada		r		r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1181	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1190	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1201	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1240	proteína hipotética conservada	i	i		r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1245	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1264	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1296	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1328	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1339	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1344	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1351	proteína hipotética conservada		r			r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1355	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1376	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1379	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1387	proteína hipotética conservada		r		r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1393	proteína hipotética conservada		r		r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1401	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1464	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1532	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1552	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1553	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1568	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1605	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1607	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1629	proteína hipotética conservada	i	r	i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1644	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1689	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1706	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1752	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1756	proteína hipotética conservada			r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1761	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1790	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1806	proteína hipotética conservada			i	i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1824	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1884	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1958	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1997	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2000	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2004	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2007	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2011	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2026	proteína hipotética conservada	r			i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2052	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2074	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2113	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2130	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2152	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2155	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2206	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2209	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2210	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2227	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2237	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2239	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2301	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2302	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2316	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2319	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2344	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2392	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2407	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2408	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2415	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2434	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2443	proteína hipotética conservada	i			r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2530	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2557	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2605	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2654	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2657	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2671	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2741	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2755	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2768	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2775	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2788	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2796	proteína hipotética conservada		i	r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2816	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2828	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2840	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2879	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2901	proteína hipotética conservada	i			i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2903	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2907	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2921	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2933	proteína hipotética conservada			i			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2934	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2945	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2969	proteína hipotética conservada		i		r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3032	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3034	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3049	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3069	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3073	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3089	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3097	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3119	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3140	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3155	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3178	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3206	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3214	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3244	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3272	proteína hipotética conservada			r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3301	proteína hipotética conservada	r		r		r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3314	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3333	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3365	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3398	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3401	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3408	proteína hipotética conservada	i	r		i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3468	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3525	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3617	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3618	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3634	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3703	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3707	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3714	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3720	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3726	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3739	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3743	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3802	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3816	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3840	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3841	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3843	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3846	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3865	proteína hipotética conservada		r		i	i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3883	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3925	proteína hipotética conservada			r			VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3948	proteína hipotética conservada	i	r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3959	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3982	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3983	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3998	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4013	proteína hipotética conservada				i		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4021	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4039	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4059	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4061	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4077	proteína hipotética conservada						VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4087	proteína hipotética conservada					i	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4095	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4108	proteína hipotética conservada					r	VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4119	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4122	proteína hipotética conservada	i					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4131	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4146	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4181	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4192	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4219	proteína hipotética conservada		i				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4253	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4278	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4297	proteína hipotética conservada				r		VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4324	proteína hipotética conservada	r					VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XAC4329	proteína hipotética conservada		r				VIII.A	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACa0011	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACa0012	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0003	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0025	proteína hipotética	r	r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas
XACb0029	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XACb0035	proteína hipotética	r	r	r			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XACb0043	proteína hipotética	r				r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XACb0048	proteína hipotética	r				r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0040	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0045	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0048	proteína hipotética		i		r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0099	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0149	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0167	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0315	proteína hipotética				i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0392	proteína hipotética	i	r	i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0500	proteína hipotética		i		i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0527	proteína hipotética	i				i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0556	proteína hipotética	i				i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0588	proteína hipotética				r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0601	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0616	proteína hipotética		i		i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0617	proteína hipotética		i		i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0754	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0796	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0843	proteína hipotética				i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0891	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1055	proteína hipotética	r		r			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1062	proteína hipotética		r		r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1105	proteína hipotética				i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1153	proteína hipotética	i					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1170	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1452	proteína hipotética	i			i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1502	proteína hipotética	r				r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1572	proteína hipotética				i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1613	proteína hipotética	r	i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1632	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1657	proteína hipotética	i	i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1898	proteína hipotética	i		i	r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1919	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC1923	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2135	proteína hipotética				i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2143	proteína hipotética		r	i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2146	proteína hipotética			i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2245	proteína hipotética	i					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2262	proteína hipotética					r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2263	proteína hipotética					r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2264	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2268	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2272	proteína hipotética						VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2421	proteína hipotética						VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2495	proteína hipotética						VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2506	proteína hipotética	r		r	r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2610	proteína hipotética					r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2613	proteína hipotética	r	r	r	r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2785	proteína hipotética				i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2787	proteína hipotética						VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2860	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2863	proteína hipotética		r		r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC2876	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3019	proteína hipotética				r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3020	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3088	proteína hipotética			i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3131	proteína hipotética	i	i	i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3230	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3231	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3251	proteína hipotética			i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3255	proteína hipotética			i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3262	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3264	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3276	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3277	proteína hipotética					r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3285	proteína hipotética	i					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3295	proteína hipotética					r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3319	proteína hipotética	r		r			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3337	proteína hipotética	i		i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3369	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3380	proteína hipotética				r	r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3404	proteína hipotética	r			r		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3417	proteína hipotética			i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3519	proteína hipotética			i			VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3557	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3599	proteína hipotética					r	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3702	proteína hipotética			i	i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3723	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3775	proteína hipotética			i	i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3779	proteína hipotética					i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3962	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC3984	proteína hipotética				i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC4027	proteína hipotética				i		VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC4045	proteína hipotética		r				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC4071	proteína hipotética	i					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4198	proteína hipotética				i	i	VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC4261	proteína hipotética	r					VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC4334	proteína hipotética		i				VIII.B	Hipotética / Proteínas hipotéticas
XAC0018	proteína hipotética conservada		r	r	r	r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0095	proteína hipotética conservada	i	r	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0096	proteína hipotética conservada					r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0111	proteína hipotética conservada	r			r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0131	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0190	proteína hipotética conservada		r				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0275	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0285	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0419	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0469	proteína hipotética conservada					i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0518	proteína hipotética conservada				r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0529	proteína hipotética conservada				i		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0547	proteína hipotética conservada	r	r				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0573	proteína hipotética conservada				i		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0646	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0677	proteína hipotética conservada		i		i		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0808	proteína hipotética conservada		i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0810	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0822	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0895	proteína hipotética conservada		i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0935	proteína hipotética conservada				i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1015	proteína hipotética conservada				r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1119	proteína hipotética conservada		i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1166	proteína hipotética conservada	i			r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1235	proteína hipotética conservada		i		i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1364	proteína hipotética conservada	i			i		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1370	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1381	proteína hipotética conservada		i		i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1382	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1396	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1412	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1487	proteína hipotética conservada	r	r	i			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1489	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1503	proteína hipotética conservada	r				r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1694	proteína hipotética conservada	r				i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1701	proteína hipotética conservada		r				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1703	proteína hipotética conservada	r		i			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1718	proteína hipotética conservada	r	r	r			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1901	proteína hipotética conservada		i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1914	proteína hipotética conservada	r	r	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1915	proteína hipotética conservada		r				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1971	proteína hipotética conservada	i		i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC1972	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1990	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2057	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2170	proteína hipotética conservada	r	i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2284	proteína hipotética conservada			r			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2367	proteína hipotética conservada					i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2445	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2485	proteína hipotética conservada	i	r	i			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2490	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2559	proteína hipotética conservada	r				i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2606	proteína hipotética conservada					r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2611	proteína hipotética conservada			r	r	r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2622	proteína hipotética conservada	r	r	r	r	r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2710	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2732	proteína hipotética conservada			r			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2739	proteína hipotética conservada		i	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2786	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2815	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2873	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC2950	proteína hipotética conservada		i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3085	proteína hipotética conservada	i	i	i	i	i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3086	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3267	proteína hipotética conservada					r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3280	proteína hipotética conservada				r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3281	proteína hipotética conservada				r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3289	proteína hipotética conservada					i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3324	proteína hipotética conservada				r		VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3336	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3441	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3446	proteína hipotética conservada		r				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3501	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3636	proteína hipotética conservada		i			i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3665	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3682	proteína hipotética conservada	i		i		i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3684	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3724	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3732	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3734	proteína hipotética conservada	r				i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3751	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3752	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3844	proteína hipotética conservada			i			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3866	proteína hipotética conservada	r				i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3957	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3966	proteína hipotética conservada			i		i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3970	proteína hipotética conservada					i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC3977	proteína hipotética conservada					i	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4012	proteína hipotética conservada		i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4035	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4200	proteína hipotética conservada	i	i	i			VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4260	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4279	proteína hipotética conservada	i					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4294	proteína hipotética conservada	r					VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4300	proteína hipotética conservada				r	r	VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC4304	proteína hipotética conservada	i	i				VIII.C	Hipotética / Proteínas hipotéticas conservadas em Xanthomonas
XAC0124	(cbbFC) fructose-1,6-bisphosphatase	r		r	r	r	I.B.3	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Gliconeogênese
XAC0256	(mls) malate synthase	i	i				I.B.4	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Glyoxylate Bypass
XAC3372	(tktA) transketolase I	i					I.B.6	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Non-Via oxidativa, via das pentoses
XAC0491	(nudH) probable (di)nucleoside polyphosphate hydrolase	i	i	i	i	i	I.B.7	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Nucleotide Hydrolysis
XAC1039	(ppx) exopolyphosphatase					i	I.B.9	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Phosphorus Compounds

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2759	(phoA) alkaline phosphatase	r		r		r	I.B.9	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Phosphorus Compounds
XAC4369	(phoC) phosphatase precursor		i				I.B.9	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Phosphorus Compounds
XAC0211	(gloA) lactoylglutathione lyase	i			i		I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC0923	(pntA) pyridine nucleotide transhydrogenase subunit alpha	i					I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC0948	(ipk) 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase		r				I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC2469	(gabD) succinate-semialdehyde dehydrogenase	i	i			i	I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC2565	(dxs) deoxyxylulose-5-phosphate synthase			i			I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC3060	(gcvH) glycine cleavage H protein		r				I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC3632	(gloA) lactoylglutathione lyase				i		I.B.10.	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC3632	(gloA) lactoylglutathione lyase	r					I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4079	(ecaA) a-type carbonic anhydrase					i	I.B.10	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Pool, Multipurpose Conversions
XAC3329	(cysD) ATP sulfurylase small subunit		i				I.B.12	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Metabolismo de enxofre
XAC3332	(cysH) 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate reductase			r			I.B.12	Intermediary Metabolism / Central Intermediary / Metabolismo de enxofre
XAC0265	(acdA) acyl-CoA dehydrogenase			r	r	r	I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC1313	(fadE9) acyl-CoA dehydrogenase	r		r	r	r	I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC1314	(paaF) enoyl-CoA hydratase	r		r	r	r	I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC1315	enoyl-CoA hydratase	r	r	r	r	r	I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC1850	(hadH2) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II		r				I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC1853	enoyl-CoA hydratase		i				I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC2563	acyl-CoA dehydrogenase			i	i	i	I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC3054	acyl-CoA dehydrogenase				r		I.A.3	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Lipids
XAC0160	(xynB) xylanase					r	I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0165	xylosidase		i	i			I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC0575	arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase	r					I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC0707	(lacZ) truncated beta-galactosidase				r		I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC1773	(xylS) alpha-xylosidase				i		I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC1796	mannan endo-1,4-beta-mannosidase		i				I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC2599	(aglA) alpha-glucosidase	r					I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC3084	(bga) beta-galactosidase		r				I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC3312	glycosyl hydrolase	r					I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC4058	(xynB) beta-xylosidase				i		I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC4250	beta-galactosidase					i	I.A.1	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0311	vanillate O-demethylase oxygenase subunit					i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC0370	b-ketoadipate enol-lactone hydrolase	r					I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC0818	(rbsK) ribokinase		i			i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC0846	(msuC) FMNH <sub>2</sub> -dependent monooxygenase		r				I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC0878	(pcaH) protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain			i		i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1138	(prpC) citrate synthase 2	r		r			I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1214	(gcvP) glycine decarboxylase	r		r		r	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1316	(mmsB) 3-hydroxyisobutirate dehydrogenase	r		r		r	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1636	(hutG) formylglutamate amidohydrolyase	r		r			I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1766	(dgoA) 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase/2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase					i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1775	D-xylulokinase				i		I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1776	(xyIA) xylose isomerase		r				I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1792	(phoX) alkaline phosphatase	r					I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC2365	(eutA) ethanalamine ammonia-lyase large subunit			i			I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC2516	L-lysine 6-aminotransferase	r	r				I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC2736	carboxymethylenebutenolidase					i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC3036	(sdaA) L-serine dehydratase				i		I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC3080	(rbsK) ribokinase	r					I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC3454	(tdcB) threonine dehydratase catalytic					i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC3681	(sndH) L-sorbose dehydrogenase				i	i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3740	UDP-glucose 4-epimerase	i	i	i	i	i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC3862	(tcbD) chloromuconate cyclisomerase	i					I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC3890	(putA) bifunctional PutA protein	r	r	r	r	r	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC4009	(argI) arginase	i					I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC4157	(fldW) 4-oxalomesaconate hydratase		i				I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC4326	(uahA) urea amidolyase					i	I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC4327	(uahA) urea amidolyase	r					I.A.2	Intermediary Metabolism / Degradation / Degradation of Small Molecules
XAC1260	(cyoC) cytochrome O oxidase subunit III	i					I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolism energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2336	(cydA) cytochrome D oxidase subunit I	r	r	r	r	r	I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolism energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2337	(cydB) cytochrome D oxidase subunit II	r	r	r	r	r	I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolism energético, carbono / Respiração aeróbica

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2455	(petC) ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome C1 subunit	i					I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2456	(petB) ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome B subunit	r					I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2693	(nuoL) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit		r				I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2694	(nuoK) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO11 subunit		r				I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2697	(nuoH) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO8 subunit	i		r			I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2700	(nuoE) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO2 subunit	r		r		r	I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2701	(nuoD) NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO4 subunit		r				I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC2983	quinol oxidase subunit I	i				i	I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC3884	(cox3) cytochrome C oxidase subunit III	r		r		i	I.C.1	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Respiração aeróbica
XAC0133	(lctD) L-lactate dehydrogenase	i				i	I.C.2	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Fermentação e respiração anaeróbica

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0201	(adh) alcohol dehydrogenase	i			r		I.C.2	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Fermentação e respiração anaeróbica
XAC0652	(adhC) alcohol dehydrogenase class III		i		i		I.C.2	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Fermentação e respiração anaeróbica
XAC2486	formate dehydrogenase a chain	i		i		i	I.C.2	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Fermentação e respiração anaeróbica
XAC2826	alcohol dehydrogenase	i				i	I.C.2	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Fermentação e respiração anaeróbica
XAC3649	(atpD) ATP synthase beta chain	r		r			I.C.8	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / ATP-Proton Motive Force Interconversion
XAC3650	(atpG) ATP synthase gamma chain	r		r		r	I.C.8	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / ATP-Proton Motive Force Interconversion
XAC3651	(atpA) ATP synthase alpha chain	r		r		r	I.C.8	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / ATP-Proton Motive Force Interconversion
XAC3653	(atpF) ATP synthase B chain		i				I.C.8	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / ATP-Proton Motive Force Interconversion

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3654	(atpE) ATP synthase C chain		i				I.C.8	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / ATP-Proton Motive Force Interconversion
XAC0287	quinone oxidoreductase			i			I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC0288	(mocA) oxidoreductase					i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC0334	(sflA) NADH-dependent FMN reductase			r	r		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC0440	oxidoreductase					r	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC0492	bacterioferritin-associated ferredoxin					i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC0539	oxidoreductase					i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC1160	oxidoreductase					i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC1684	(cycA) cytochrome C2					i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1685	cytochrome C				i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2062	(cycM) cytochrome C552	i					I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2136	oxidoreductase	i	r		i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2233	short chain dehydrogenase	i					I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2708	dehydrogenase		i				I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2750	reductase				i	i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2835	(mocA) oxidoreductase				i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2893	(yagR) oxidoreductase		r				I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2896	alcohol dehydrogenase				i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3431	short chain dehydrogenase	r					I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3477	(mocA) rhizopine catabolism protein mocA	i					I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3575	(etfQO) flavoprotein–ubiquinone oxidoreductase	r	r	r	r	r	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3587	(etfA) electron transfer flavoprotein alpha subunit		r			r	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3676	oxidoreductase	i			i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3747	(ybdR) Zn-dependent dehydrogenase				i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3868	(yliI) dehydrogenase				i		I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC3960	oxidoreductase				i	i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC4156	(fldA) FldA protein						I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC4186	(ucpA) oxidoreductase	i				i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC4199	polyvinylalcohol dehydrogenase				i	i	I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4364	oxidoreductase		r				I.C.3	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Transporte de elétrons
XAC2070	(glk) glucose kinase		i				I.C.4	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Glicólise
XAC3344	fructose-bisphosphate aldolase	r					I.C.4	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Glicólise
XAC3352	(gapA) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		r				I.C.4	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Glicólise
XAC1633	(gcd) glucose dehydrogenase	i	i	i	i	i	I.C.5	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Via oxidativa, via das pentoses
XAC3212	(gcd) glucose dehydrogenase		i				I.C.5	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Via oxidativa, via das pentoses
XAC0443	(pdhB) dihydrolipoamide acyltransferase		r				I.C.6	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Piruvato desidrogenase
XAC3659	(lpdA) dihydrolipoamide dehydrogenase		i				I.C.6	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Piruvato desidrogenase
XAC3661	(phdB) dihydrolipoamide acetyltransferase				i		I.C.6	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Piruvato desidrogenase
XAC1006	(mdh) malate dehydrogenase	r	r				I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1534	(sucB) dihidrolipoamide succinyltransferase	S-	r				I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico
XAC1542	(fumC) fumarate hydratase	i					I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico
XAC1885	(acnB) aconitate hydratase 2		r				I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico
XAC2076	(sdhD) succinate dehydrogenase membrane anchor subunit		r				I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico
XAC2078	(sdhB) succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	r	r				I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico
XAC3388	(gltA) citrate synthase		r				I.C.7	Intermediary Metabolism / Metabolismo energético, carbono / Ciclo do ácido tri-carboxílico
XAC0251	regulador transcricional tetR family					i	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0266	regulador transcricional acrR family	fa-	r				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0302	regulador transcricional lysR family	lysR	fa-			r	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0312	regulador transcricional lysR family	lysR	fa-			r	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0316	regulador transcricional lysR family			r			I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0330	(cmfA) conditioned medium factor	r	i	i	i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0333	(metR) regulador transcricional metE/methH family	i					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0355	(pobR) PobR regulator				r		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0581	regulador transcricional araC family	r					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0671	regulador transcricional		i		i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0880	(pcaQ) regulador transcricional		r				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0917	regulador transcricional			i	i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC0931	regulador transcricional			i			I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1173	(uidR) regulador transcricional uid family	i			i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1196	(lexA) LexA repressor		i				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1269	(rsbR) positive regulator of sigma-B	r	r	i	i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1271	(rsbT) sigma-B negative effector		i	i	i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1311	regulador transcricional				r		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1480	regulador transcricional		i		i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1499	regulador transcricional	r					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1529	(oxyR) hydrogen peroxide-inducible genes activator	i					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1561	regulador transcricional				r		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1573	(phoU) phosphate regulon regulador transcricional					i	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1655	regulador transcricional	i	i	i	i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1739	(lexA) LexA repressor			r			I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1743	(csrA) carbon storage regulator	i					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1767	(gbpR) galactose-binding protein regulator	i			i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC1819	(tspO) tryptophan-rich protein		r				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC2053	(tex) transcription-related protein				r		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC2166	regulador transcricional		i		i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC2454	(sspA) stringent starvation protein A		r				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC2482	(rrpX) regulador transcricional	i			i		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC2839	regulador transcricional				r		I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3137	(exsB) regulador transcricional	i					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3274	(cheY) single-domain response regulator		r				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3363	(blaI) regulador transcricional blaI family			i			I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3443	response regulator	i	r	r	r	r	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3476	(ybhD) regulador transcricional	i			i	i	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3487	(cebR) regulador transcricional	i			i	i	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3689	(lrp) leucine responsive regulatory protein	r					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3719	(algR) regulador transcricional proteïn					i	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3929	(glnB) nitrogen regulatory protein P-II		i				I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC3961	regulador transcricional tetR family				i	i	I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors
XAC4359	sugar diacide regulator	i					I.D.2	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Activators-Repressors

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0610	histidine kinase–response regulator hybrid protein	i		i			I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC1074	sensor histidine kinase		r				I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC1075	sensor histidine kinase		r				I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC1345	sensor histidine kinase	r					I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC1669	histidine kinase–response regulator hybrid protein	i			i		I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC1912	quinase serina/treonina		r		r	r	I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC2555	(fixL) sensor histidine kinase		i				I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC3292	(cvgSY) histidine kinase–response regulator hybrid protein					r	I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC4127	(pknB) quinase serina/treonina	i		i			I.D.3	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / cinases–fosfatases
XAC0550	(glnE) glutamine adenyltransferase			i			I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC1319	(algU) RNA polymerase sigma–H factor	i					I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC1380	(rpoE) RNA polymerase sigma factor	i		i			I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC1682	(rpoE) RNA polymerase sigma–E factor				i	i	I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1938	GGDEF family protein	r	i				I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC1939	GGDEF family protein	i	i				I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC2972	(rpoN) RNA polymerase sigma-54 factor		r				I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC2973	sigma-54 modulation protein		r				I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC3824	(rpoH) RNA polymerase sigma-32 factor	i	i	i	i	i	I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC4129	(rpoE) ECF sigma factor					i	I.D.4	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
XAC0225	two-component system sensor protein		i				I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC0326	(smeS) two-component system sensor protein		r				I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC0495	two-component system regulatory protein	r					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC0730	two-component system regulatory protein	i	i				I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0834	(colR) two-component system regulatory protein			r			I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC1282	two-component system sensor protein	r					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC1283	two-component system sensor protein				r		I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC2055	two-component system regulatory protein	r					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC2493	two-component system regulatory protein	r					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC2804	(baeS) two-component system sensor protein	i					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC3135	(exsF) two-component system regulatory protein		i				I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC3249	(colS) two-component system sensor protein	i					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC3975	(ygiY) two-component system sensor protein				r		I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC3993	two-component system regulatory protein	r	i				I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4023	(phoP) two-component system regulatory protein	r					I.D.1	Intermediary Metabolism / Funções regulatórias / Sistema de dois componentes
XAC3332	(cysH) 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate reductase				i		I.B.12.	Intermediary Metabolism/Central Intermediary / Metabolismo de enxofre
XAC1740	(recA) RecA protein	i					III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC2103	DNA recombinase		r				III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC2297	(ihfB) integration host factor beta subunit	i					III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC3015	(rebB) RebB protein		i				III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC3016	(rebA) RebA protein	i					III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC3017	(rebB) RebB protein	i			i		III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC3149	(ruvA) holliday junction binding protein DNA helicase		i		i		III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC3150	(ruvC) holliday junction resolvase				r		III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3551	(xerD) integrase-recombinase XerD	i	i				III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC4336	exodeoxyribonuclease beta chain	V	r				III.A.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Recombinação
XAC1586	MutT–nudix family protein	i	i				III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC2030	(xthA2) exodeoxyribonuclease III	i					III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC2092	(uvrC) excinuclease ABC subunit C				r		III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC2281	RadC family protein	r			r		III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC2405	(mutL) DNA mismatch repair protein MutL				r		III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC2410	(xseA) exodeoxyribonuclease large subunit	VII			r		III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC3303	(micA) DNA mismatch repair protein				r	r	III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC3825	(ung) uracil–DNA glycosylase	i					III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC3902	(exoA) exodeoxyribonuclease III					i	III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC4031	(dinG) ATP–dependent helicase					r	III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC4171	(xthA1) exodeoxyribonuclease III					r	III.A.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Reparo
XAC1199	(dnaE2) DNA polymerase III alpha chain	r					III.A.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Replicação

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1477	(dnaB) replicative DNA helicase				i		III.A.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Replicação
XAC2212	(topB) DNA topoisomerase III	r					III.A.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Replicação
XAC3107	(yoaA) ATP-dependent helicase	i					III.A.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Replicação
XAC4165	(gidB) glucose inhibited division protein B				r		III.A.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Replicação
XAC2084	(comA) competence protein	r	r	r			III.A.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Restrição, modificação
XAC2639	site-specific methyltransferase				r		III.A.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Restrição, modificação
XAC2807	(menG) S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase				i		III.A.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Restrição, modificação
XAC2900	(hsdM) type I restriction-modification system DNA methylase	r			r	r	III.A.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Restrição, modificação
XAC3803	(smf) DNA processing chain A					r	III.A.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Restrição, modificação
XAC3058	histone H1	r					III.A.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de DNA / Proteína estrutural de ligação de DNA
XAC0222	(gpdA) glycerol-3-phosphate dehydrogenase				r		III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolípidos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0375	lipase		i				III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC1024	non-hemolytic phospholipase C		i				III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC1463	phospholipase		i				III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC2393	carboxylesterase		i				III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC3565	(pssA) phosphatidylserine synthase				r		III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC4099	(plsC) acyltransferase		i		i		III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC4367	(glpQ) glycerophosphoryl diester phosphodiesterase				i		III.D.2	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Fosfolipídeos
XAC0155	trehalose synthase				i		III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC0425	(glgA) glycogen synthase		i		i		III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC1780	(amiC) N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase				i		III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1887	(pdeA) c-di-GMP phosphodiesterase A	i	i				III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC2596	(cgt) cyclomaltodextrin transferase	r	r	r	r	r	III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC3092	(aspG) asparaginase	r	r	r	r	r	III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC3518	(bcsA) cellulose synthase			r	r	r	III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC3909	(dpm1) dolichol-phosphate nosyltransferase	r					III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC4244	(xyIB) xylulose kinase					i	III.D.1	Metabolismo de macromoléculas / Other Macromolecules / Polissacarídeos
XAC1423	pili assembly chaperone		i				III.C.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Chaperonas
XAC1426	(ecpD) pili assembly chaperone	r	r	r	r	r	III.C.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Chaperonas
XAC0023	(ctp) carboxyl-terminal protease	i					III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC0249	(dcp) peptidyl-dipeptidase	r	r	r	r	r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0347	proteinase inibitor				i		III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC0609	zinc protease	i					III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC0669	(prc) tail-specific protease		i				III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC0928	extracellular protease			i			III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC1204	alanyl dipeptidyl peptidase			r		r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC1321	(mucD) periplasmic protease			r		r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC1456	(dcp) peptidyl-dipeptidase			r	r	r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC1736	(hflX) GTP-binding protein			i			III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC2001	(clpA) ATP-dependent Clp prote- ase subunit			i			III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC2140	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase					i	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2537	peptidase	r					III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC2541	peptidase	r				r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC2831	extracellular serine protease		i			i	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC2833	extracellular serine protease					i	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC2853	cysteine protease					i	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC2984	peptidase	r					III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC2987	proline imino-peptidase						III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC3195	(clpB) ATP-dependent Clp protease subunit	i				r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC3309	aminopeptidase						III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína
XAC3371	proline imino-peptidase	r					III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degradação de proteína

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3403	(pepQ) proline dipeptidase	r					III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3514	serine protease	r				r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3545	protease	r				r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3547	serine protease	r			i	i	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3627	(prlC) oligopeptidase A		r		r	r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3713	peptidase					i	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3871	(gcp) O-sialoglycoprotein endo- peptidase		r				III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC3987	leucine aminopeptidase	r				r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC4106	dipeptidyl peptidase					r	III.C.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Degra- dação de proteína
XAC0900	(pms) peptide methionine sulfoxide reductase	r					III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradu- ção e modificação

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0944	(prfA) peptide chain release factor I			r			III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC0957	(tufB) elongation factor Tu		i				III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC1005	(ppiB) peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	r			r		III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC1091	protein phosphatase	r	i				III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC1255	(lspA) lipoprotein signal peptidase	r					III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC1323	(lepB) signal peptidase I			r			III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC2687	(infB) protein chain initiation factor IF-2		i				III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC3462	(pcm) L-isoaspartate protein carboxylmethyltransferase		r				III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação
XAC3550	(dsbC) disulfide isomerase		i				III.C.1	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de proteína / Tradução e modificação

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1386 (metS)	methionyl-tRNA synthetase	r					III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt
XAC1618 (asnS)	asparaginyl-tRNA synthetase	r					III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt
XAC2413 (rmD)	ribonuclease D	r	r		i		III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt
XAC2514 (queA)	adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	S-	i				III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt
XAC2589 (pheT)	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	i					III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt
XAC2685 (truB)	tRNA pseudouridine synthase B	i					III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt
XAC2781 (leuS)	leucyl-tRNA synthetase	i				i	III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt ami-noacil sintetase, modificação de RNAt

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3316	tRNA/rRNA methyltransferase		i			i	III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt aminoacil sintetase, modificação de RNAt
XAC3800	(fmt) Formyltetrahydrofolate:L-methionyl-tRNA formyltransferase	10-	i			i	III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt aminoacil sintetase, modificação de RNAt
XAC3875	(rbn) ribonuclease BN					i	III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt aminoacil sintetase, modificação de RNAt
XAC4006	(trpS) tryptophanyl-tRNA synthetase					i	III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt aminoacil sintetase, modificação de RNAt
XAC4373	(rnpA) ribonuclease P, protein component					i	III.B.4	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / RNAt aminoacil sintetase, modificação de RNAt
XAC0968	(rpsG) 30S ribosomal protein S7	r					III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC0975	(rplB) 50S ribosomal protein L2					i	III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC0986	(rpsH) 30S ribosomal protein S8					i	III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0991	(rplO) 50S ribosomal protein L15					i	III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC0997	(rplQ) 50S ribosomal protein L17	i			i		III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC1122	(rpmF) 50S ribosomal protein L32					i	III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC1292	(rpsP) 30S ribosomal protein S16				i	i	III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC2300	(rpmJ) 50S ribosomal protein L36			i	i		III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC4158	(rpmG) 50S ribosomal protein L33	r					III.B.2	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Proteínas ribossomais
XAC3253	(rimK) ribosomal protein S6 modification protein			i			III.B.3	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Ribossomes – Maturation and Modification
XAC0540	ribonuclease				i	i	III.B.6	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Degradação de RNA
XAC1089	(rnhA) ribonuclease H			r	r	r	III.B.6	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Degradação de RNA
XAC1571	(rnt) ribonuclease T				i	i	III.B.6	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Degradação de RNA

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0078	ATP-dependent RNA helicase	r			r	r	III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC0244	pseudouridylylate synthase	r					III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC0442	(rhIE) ATP-dependent RNA helicase				r		III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC1783	(pcnB) polynucleotide adenylyltransferase		r				III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC2734	(greB) transcription elongation factor and transcript cleavage		r				III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC3129	pseudouridylylate synthase					i	III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC3394	(rpoZ) RNA polymerase omega subunit			i	i		III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3610	(rhlE) ATP-dependent RNA helicase		i				III.B.5	Metabolismo de macromoléculas / Metabolismo de RNA / Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
XAC0344	(int) phage-related integrase		i				VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC1054	integrase				r		VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC1063	(p13) phage-related lysozyme		r		r		VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC1068	(stf) phage-related tail protein	r					VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC1494	(orf2) phage-related protein					r	VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC1498	(int) integrase				r		VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2214	(ea31) phage-related protein		r				VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2285	(orf84) phage-related protein	r					VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2628	(int) phage-related integrase	r					VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2647	(X) phage-related tail protein	r					VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2650	(lys) phage-related lytic enzyme			i	i		VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2652	(R) phage-related tail protein	i		i	i		VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2655	(J) phage-related baseplate assembly protein	r			r		VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2660	(gpV) phage-related baseplate assembly protein	r					VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XAC2904	(int) integrase/recombinase	r					VI.A	Elementos genéticos móveis / Phage-Related Functions and Prophages
XACb0030	(trwB) TrwB protein	r		r		r	VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid – Related Functions
XACb0031	(trwC) TrwC protein	r				r	VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid – Related Functions
XAC2238	(csgAII) plasmid-related protein	i			i		VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid-Related Functions
XAC2422	(kfrA) plasmid-related protein	r			i		VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid-Related Functions

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2433	(parA) resolvase	r				r	VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid-Related Functions
XAC2435	(yacA) plasmid-related protein	i					VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid-Related Functions
XAC2440	(mobB) plasmid mobilization protein	r					VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid-Related Functions
XAC4315	(Y4JK) plasmid stability protein					r	VI.B	Elementos genéticos móveis / Plasmid-Related Functions
XACa0005	(ISxac2) ISxac2 transposase	r				r	VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon – and Intron – Related Functions
XACa0010	ISxac3 transposase	r					VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon – and Intron – Related Functions
XACa0034	( <i>Tn5045 tnpA</i> ) <i>Tn5045</i> transposase	r				r	VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon – and Intron – Related Functions
XACb0062	(ISxac3) ISxac3 transposase	r					VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon – and Intron – Related Functions
XAC0091	ISxac3 transposase	r					VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron-Related Functions
XAC0093	ISxac1 transposase	r					VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron-Related Functions
XAC0342	ISxac3 transposase	r				r	VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron-Related Functions

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1052	ISxac3 transposase		r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC1070	ISxac3 transposase		r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC1102	ISxac3 transposase	r	r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC1660	ISxac3 transposase	r	r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC1916	ISxac1 transposase	r	r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2131	ISxac3 transposase		r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2371	IS1479 transposase	r	i	i			V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2372	IS1479 transposase		i	i			V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2431	(tnp) transposase		i				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2432	transposase		r	r			V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2508	transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2604	ISxac4 transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2634	ISxac3 transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC2663	transposase	i	i				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC3221	ISxac3 transposase		r				V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC3233	transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC3247	ISxac3 transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC3248	ISxac3 transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC3932	integrase/recombinase	r	r	r			V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC4323	ISxac3 transposase	r					V.I.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4328	ISxac1 transposase	r					VI.C	Elementos genéticos móveis / Transposon– and Intron–Related Functions
XAC0064	acetyltransferase		r				IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0065	microcystin dependent protein		r	r			IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0067	(mdpB) microcystin dependent protein		r				IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0170	sugar–phosphate isomerase	r					IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0280	ATPase				i	i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0283	(catD) hydrolase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0319	chloroperoxidase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0554	nitroreductase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0572	(icfG) IcfG protein		r				IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC1250	(yhbZ) GTP–binding protein			r			IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC1968	response regulator	i				i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC1970	response regulator					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC2358	(dksA) DnaK supressor			r			IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC2570	(gumP) GumP protein	r					IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC2572	(gumN) GumN protein					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC2670	alginate biosynthesis protein	i				r	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC2883	hydrolase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC2939	acetyltransferase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3110	glycosyltransferase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3428	hydrolase		r				IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3677	proteína hipotética conservada					r	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3826	response regulator protein	i					IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3878	disulphide–isomerase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3921	(ugt) glucosyltransferase					i	IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC3986	hydrolase					r	IX	ORFs com categoria indefinida /

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4221	hydrolase	r					IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC4371	polysaccharide deacetylase	i					IX	ORFs com categoria indefinida /
XAC0460	(phaD) PhaD protein			r			VII.G	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Adaptação, condições atípi- cas
XAC1337	(scoF) cold shock protein	r	i	i			VII.G	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Adaptação, condições atípi- cas
XAC1465	(cspA) major cold shock protein		r				VII.G	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Adaptação, condições atípi- cas
XAC4339	(yrbF) toluene tolerance protein				i		VII.G	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Adaptação, condições atípi- cas
XACb0011	(avrXacE3) avirulence protein				i	i	VII.A	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Avirulência
XACb0015	(pthA3) avirulence protein			r			VII.A	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Avirulência
XAC0286	(avrXacE1) avirulence protein			i	i	i	VII.A	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Avirulência
XAC3224	(avrXacE2) avirulence protein			i	i	i	VII.A	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Avirulência
XAC2574	(gumM) GumM protein					i	VII.E	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Exopolissacarídeos
XAC2575	(gumL) GumL protein				i	i	VII.E	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Exopolissacarídeos
XAC2579	(gumH) GumH protein					i	VII.E	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Exopolissacarídeos
XAC2581	(gumF) GumF protein				i	i	VII.E	Patogenicidade, virulência e adap- tação / Exopolissacarídeos

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2582	(gumE) GumE protein				i		VII.E	Patogenicidade, virulência e adaptação / Exopolissacarídeos
XAC3579	(xanA) phosphoglucomutase		i				VII.E	Patogenicidade, virulência e adaptação / Exopolissacarídeos
XAC0028	(egl) cellulase	i	i	i	i		VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC0029	(egl) cellulase		i		i		VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC0612	(engXCA) cellulase	i					VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC1770	(celA) cellulase			i	i		VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC2373	(pel) degenerated pectate lyase				i		VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC2522	(egl2) cellulase		r				VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC3506	truncated cellulase S				i		VII.D	Patogenicidade, virulência e adaptação / Hoscell Wall Degradation
XAC0393	(hpaF) HpaF protein	i				i	VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0394	(hrpF) HrpF protein			i	i		VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0396	(hpaB) HpaB protein	i		i	i		VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0398	(hrpD6) HrpD6 protein			i	i		VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC0401	(hrcS) HrcS protein		i		i	i	VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0403	(hrcQ) HrcQ protein				i	i	VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0405	(hrcV) HrcV protein		r				VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0406	(hrcU) HrcU protein				i	i	VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0407	(hrpB1) HrpB1 protein				i	i	VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0408	(hrpB2) HrpB2 protein				i	i	VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0411	(hrpB5) HrpB5 protein						VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC0416	(hpa1) Hpa1 protein						VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC1265	(hrpG) HrpG protein						VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC1266	(hrpXct) HrpX protein						VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade

Continua na próxima página



Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1994	HrpX related protein	r					VII.B	Patogenicidade, virulência e adaptação / Resposta hipersensível e patogenicidade
XACb0036(virB1)	VirB1 protein	r	r				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0037(virB11)	VirB11 protein		r				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0039(virB9)	VirB9 protein		r				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0040(virB8)	VirB8 protein		r				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0045(virB4)	VirB4 protein		r				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0046(virB3)	VirB3 protein		r	r			VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0059(vapC)	virulence associated protein	r					VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0060(vppA)	virulence plasmid protein	r					VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1495	(xrvA) virulence regulator	r					VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1874	(rpfD) regulatory protein	r					VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1877	(rpfG) response regulator	r	i	i	i	i	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1878	(rpfC) RpfC protein	r	i	i	i	i	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1880	(rpfB) RpfB protein	r				r	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC1882	(rpfA) aconitase	r	r				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2504	(rpfN) regulator of pathogenicity factors		i				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2513	(tgt) queuine ribosyltransferase	r	r		r		VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2607	(virB6) VirB6 protein				r		VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2614	(virB4) VirB4 protein	r	r	r	r		VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2616	(virB2) VirB2 protein	r	r	r	r		VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2617	(virB1) VirB1 protein	r	r	r	r		VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2618	(virB11) VirB11 protein				r	r	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2620	(virB9) VirB9 protein	r	r	r	r		VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC3538	(xpsK) general secretion pathway protein K		i				VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC3541	(xpsH) general secretion pathway protein H	i					VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC0389	(comF) competence protein F		i				VII.F	Patogenicidade, virulência e adaptação / Proteínas de superfície
XAC1427	(pru) protein U	i			i		VII.F	Patogenicidade, virulência e adaptação / Proteínas de superfície
XAC2151	(yapH) YapH protein		r				VII.F	Patogenicidade, virulência e adaptação / Proteínas de superfície
XAC4273	OmpA-related protein		r		r	r	VII.F	Patogenicidade, virulência e adaptação / Proteínas de superfície

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC4274	OmpA-related protein					r	VII.F	Patogenicidade, virulência e adaptação / Proteínas de superfície
XAC0210	(sodC2) superoxide dismutase	i					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC0641	multidrug resistance efflux pump	r					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC0866	(ostA) organic solvent tolerance precursor	i					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC1437	(acyII) penicillin acylase II	r					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC1439	(tpmT) thiopurine methyltransferase	i		r			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC1445	(pmrA) multidrug resistance efflux pump		i			i	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC1461	(gst) glutathione S-transferase	r					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2121	(mdmC) O-methyltransferase	r					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2230	(gst) glutathione S-transferase					r	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC2386	(sodM) superoxidase dismutase		r			r	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2475	(rmrA) transport protein		i				VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2494	(yieO) drug resistance translocase	i	i			i	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2498	(acrA) multidrug resistance protein	r					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2499	(acrB) multidrug efflux transporter	r		i			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2806	beta-lactamase	i					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC2843	(mexB) multidrug efflux transporter		i			i	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC3144	(tolR) TolR protein			r			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC3362	TonB-like protein	i					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC3450	(ggt) glutamyltranspeptidase					i	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação

Continua na próxima página

Tabela 10.9 – continuação da página anterior

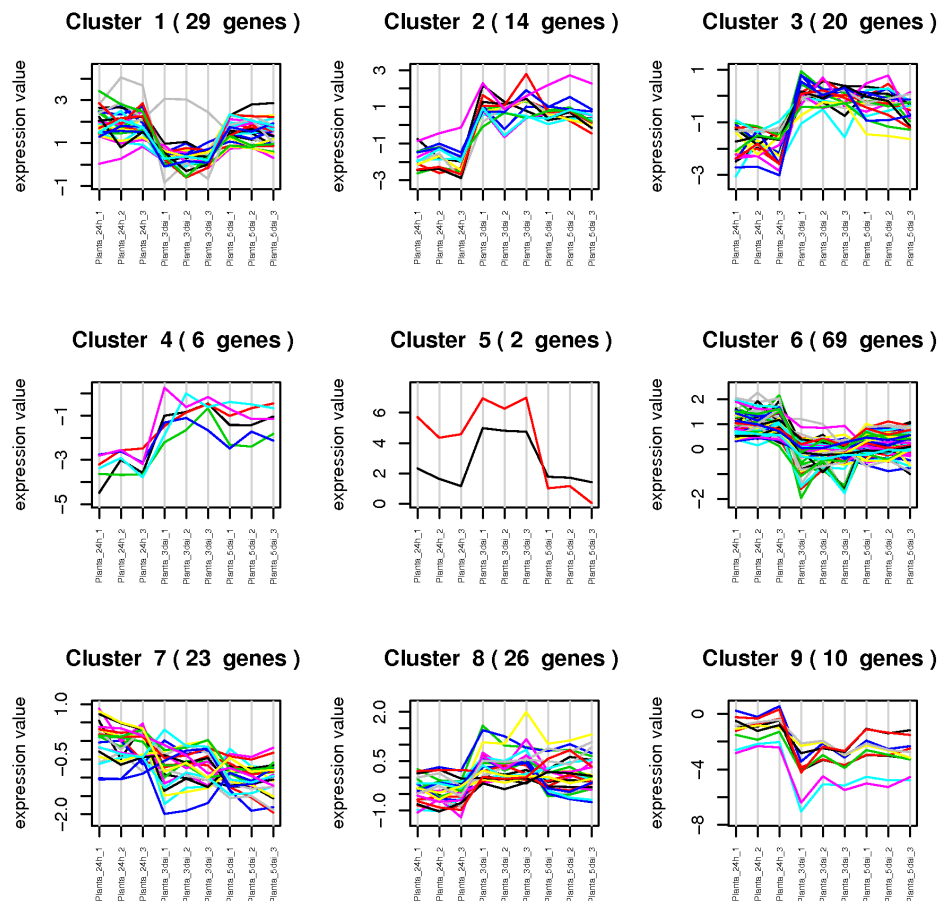
ID	Nome	X12	X24	P24	P3	P5	Cat	Categoria
XAC3848	(mtrC) membrane fusion protein precursor	i		r	r	r	VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC3849	(acrD) acriflavin resistance protein			r			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4005	beta-lactamase related protein	i					VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4008	(ecnA) entericidin A	r		i			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4030	(catB) catalase			i	i		VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4105	AMP-ligase			r			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4161	(czcB) cation efflux system protein	r	i				VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4162	(czcC) cation efflux system protein	r	r	i			VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação
XAC4305	(fusE) fusaric acid resistance protein		i				VII.C	Patogenicidade, virulência e adaptação / Produção de toxinas e detoxificação

## 10.4 Análise temporal da expressão gênica de Xac in planta

### 10.4.1 Agrupamento de ORFs com padrão de expressão similar

A fim de verificar possíveis padrões de expressão que pudesse indicar possíveis vias metabólicas comuns compartilhadas pelas ORFs constantes do microarranjo, realizou-se uma análise estatística calcada, principalmente, na correlação entre os padrões de expressão apresentados pelos genes ao longo do tempo.

Essa análise retornou 9 padrões de expressão significativos estatisticamente, ao nível de 1% de probabilidade (Figura 10.17). Os genes constantes de cada um desses nove grupos é apresentado na Tabela 10.10.



**Figura 10.17:** Grupos de ORFs de Xac que possuem um perfil de expressão gênica similar ao longo do tempo. As ORFs podem ser identificadas na Tabela 10.10, onde o número do cluster corresponde a coluna Grupo na tabela.

**Tabela 10.10:** Grupo de ORFs de *Xac* cujo perfil de expressão gênica ao longo tempo se correlacionam, quando *Xac* é multiplica em folhas de laranjeira por 24 h, 3 e 120 h. O perfil de cada grupo pode ser verificado na Figura 10.17. CD = nome do gene; Nome = Produto gênico; Cat = código da respectiva categoria;

ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC0630	aspC	aminotransferase	1	II.A.2	Biossíntese de aminoácidos
XACb0015	pthA3	avirulence protein	1	VII.A	Avirulência
XAC2609		carboxypeptidase	1	IV.B	Estrutura celular
XAC3587	etfA	electron transfer flavoprotein alpha subunit	1	I.C.3	Metabolismo energético, carbono
XAC1128	acpP	acyl carrier protein	1	II.E	Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XACb0035		proteína hipotética	1	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC2610		proteína hipotética	1	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3319		proteína hipotética	1	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XACb0036	virB1	VirB1 protein	1	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2614	virB4	VirB4 protein	1	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC2616	virB2	VirB2 protein	1	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1204		alanyl dipeptidyl peptidase	1	III.C.3	Degradação de proteína
XAC4273		OmpA-related protein	1	VII.F	Proteínas de superfície
XAC2386	sodM	superoxidase dismutase	1	VII.C	Produção de toxinas e detoxificação
XAC1005	ppiB	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1	III.C.1	Tradução e modificação
XAC3560	btuB	TonB-dependent receptor	1	V.A.7	Transporte
XAC1396		proteína hipotética conservada	1	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>
XAC2606		proteína hipotética conservada	1	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>
XAC2611		proteína hipotética conservada	1	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>
XAC1889	cheD	chemotaxis protein	2	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC1897	tsr	chemotaxis protein	2	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC1900	tsr	chemotaxis protein	2	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC3693	motA	chemotaxis protein	2	V.C	Mobilidade e quimiotaxia

Continua na próxima página

**Tabela 10.10 – continuação da página anterior**

ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC2807	menG	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase	2	III.A.5	Metabolismo de DNA
XAC1266	hrpXct	HrpX protein	2	VII.B	Resposta hipersensível e patogenicidade
XAC1898		proteína hipotética	2	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3099	pilJ	pilus biogenesis protein	2	IV.D	Estruturas de superfícies
XAC1091		protein phosphatase	2	III.C.1	Tradução e modificação
XAC1423		pili assembly chaperone	3	III.C.2	Chaperonas
XAC1666	tsr	chemotaxis protein	3	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC1894	tsr	chemotaxis protein	3	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC0940		proteína hipotética conservada	3	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3214		proteína hipotética conservada	3	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3015	rebB	RebB protein	3	III.A.3	Metabolismo de DNA
XAC1452		proteína hipotética	3	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC2637		proteína hipotética	3	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3251		proteína hipotética	3	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC2908	murD	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase	3	IV.B	Saco de mureína, peptidoglicano
XAC2883		hydrolase	3	IX	ORFs com categoria indefinida
XAC0957	tufB	elongation factor Tu	3	III.C.1	Metabolismo de proteína
XAC0610		proteína híbrida histidina quinase reguladora de resposta	3	I.D.3	Funções regulatórias
XAC1445	pmrA	multidrug resistance efflux pump	3	VII.C	Produção de toxinas e detoxificação
XAC1842	yhdG	cationic amino acid transporter	3	V.A.1	Transporte
XAC3531	pnuC	PnuC protein	3	V.A.5	Transporte
XAC1951	fliI	flagellar protein	4	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC3694	motB	chemotaxis MotB protein	4	V.C	Mobilidade e quimiotaxia
XAC3337		proteína hipotética	4	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC0928		extracellular protease	4	III.C.3	Degradação de proteína
XAC2781	leuS	leucyl-tRNA synthetase	4	III.B.4	Metabolismo de RNA
XAC1841	yhdG	cationic amino acid transporter	4	V.A.1	Transporte
XAC0754		proteína hipotética	5	VIII.B	Proteínas hipotéticas

Continua na próxima página



**Tabela 10.10 – continuação da página anterior**

ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC0018		proteína hipotética conservada	5	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>
XAC2694	nuoK	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO11 subunit	6	I.C.1	Respiração aeróbica
XAC3884	cox3	cytochrome C oxidase subunit III	6	I.C.1	Respiração aeróbica
XAC0533	aroQ	catabolic dehydroquinase	6	II.A.4	Biossíntese de aminoácidos
XAC1433	asnB	asparagine synthase B	6	II.A.2	Biossíntese de aminoácidos
XAC3603	cysB	cystathionine beta-synthase	6	II.A.3	Biossíntese de aminoácidos
XAC0192	parA	partition protein	6	V.B	Divisão celular
XAC3598	rfbC	truncated O-antigen biosynthesis protein	6	IV.C	Estrutura celular
XAC2528	htpG	heat shock protein G	6	III.C.2	Chaperonas
XAC0007		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0026		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0035		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0141		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0901		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1351		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1492		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2312		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC2775		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3374		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3378		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3898		proteína hipotética conservada	6	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas

Continua na próxima página

**Tabela 10.10 – continuação da página anterior**

ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC1112		histidine triad-like protein	6	I.A.2	Degradation of Small Molecules
XAC1776	xylA	xylose isomerase	6	I.A.2	Degradation of Small Molecules
XAC3303	micA	DNA mismatch repair protein	6	III.A.4	Metabolismo de DNA
XAC4171	xthA1	exodeoxyribonuclease III	6	III.A.4	Metabolismo de DNA
XAC0334	sflA	NADH-dependent FMN reductase	6	I.C.3	Transporte de elétrons
XAC0539		oxidoreductase	6	I.C.3	Transporte de elétrons
XAC2062	cycM	cytochrome C552	6	I.C.3	Transporte de elétrons
XAC0561	mdcD	delta subunit of malonate decarboxylase	6	II.E	Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
XAC3347	pgk	phosphoglycerate kinase	6	I.C.4	Glicólise
XAC3352	gapA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	I.C.4	Glicólise
XAC0099		proteína hipotética	6	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC1057		proteína hipotética	6	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3294		proteína hipotética	6	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC2753		Lipoproteína	6	III.D.3	Lipoproteína
XACb0039	virB9	VirB9 protein	6	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0040	virB8	VirB8 protein	6	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0060	vppA	virulence plasmid protein	6	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XAC1880	rpfB	RpfB protein	6	VII.H	Patogenicidade, virulência e adaptação / Outro
XACb0030	trwB	TrwB protein	6	VI.B	Plasmid – Related Functions
XACb0056	repA	replication protein A	6	VI.B	Plasmid – Related Functions
XAC1269	rsbR	positive regulator of sigma-B	6	I.D.2	Funções regulatórias
XAC0972	rplC	50S ribosomal protein L3	6	III.B.2	Metabolismo de RNA
XAC0974	rplW	50S ribosomal protein L23	6	III.B.2	Metabolismo de RNA
XAC2413	rnD	ribonuclease D	6	III.B.4	Metabolismo de RNA
XAC3123		DNA-binding related protein	6	III.A.2	Proteína estrutural de ligação de DNA

Continua na próxima página

Tabela 10.10 – continuação da página anterior

ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC1587	sseA	thiosulfate sulfurtransferase	6	I.B.12	Metabolismo de enxofre
XAC1885	acnB	aconitate hydratase 2	6	I.C.7	Ciclo do ácido tricarboxílico
XAC2076	sdhD	succinate dehydrogenase membrane anchor subunit	6	I.C.7	Ciclo do ácido tricarboxílico
XAC2078	sdhB	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	6	I.C.7	Ciclo do ácido tricarboxílico
XAC3388	gltA	citrate synthase	6	I.C.7	Ciclo do ácido tricarboxílico
XAC1461	gst	glutathione S-transferase	6	VII.C	Produção de toxinas e detoxificação
XAC1549	btuE	ABC transporter vitamin B12 uptake permease	6	V.A.7	Transporte
XAC2174		ISxac3 transposase	6	VI.C	Funções relacionadas a transposons e a íntrons
XAC2224		ISxac3 transposase	6	VI.C	Funções relacionadas a transposons e a íntrons
XAC0834	colR	two-component system regulatory protein	6	I.D.1	Sistema de dois componentes
XAC1374		proteína hipotética conservada	6	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>
XAC1503		proteína hipotética conservada	6	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>
XAC3455	leuA	2-isopropylmalate synthase	7	II.A.2	Biossíntese de aminoácidos
XAC0899		proteína hipotética conservada	7	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC1543		proteína hipotética conservada	7	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3720		proteína hipotética conservada	7	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0311	vanA	vanillate O-demethylase oxygenase subunit	7	I.A.2	Degradation of Small Molecules
XAC3454	tdcB	threonine dehydratase catabolic	7	I.A.2	Degradation of Small Molecules
XAC0287		quinone oxidoreductase	7	I.C.3	Transporte de elétrons
XAC1572		proteína hipotética	7	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3287		proteína hipotética	7	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3779		proteína hipotética	7	VIII.B	Proteínas hipotéticas

Continua na próxima página

Tabela 10.10 – continuação da página anterior

ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC3984		proteína hipotética	7	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC4244	xylB	xylulose kinase	7	III.D.1	Metabolismo de macromoléculas
XAC2575	gumL	GumL protein	7	VII.E	Patogenicidade, virulência e adaptação / Exopolissacarídeos
XAC1573	phoU	phosphate regulon regulador transcricional	7	I.D.2	Funções regulatórias
XAC0997	rplQ	50S ribosomal protein L17	7	III.B.2	Metabolismo de RNA
XAC3610	rhIE	ATP-dependent RNA helicase	7	III.B.5	Metabolismo de RNA
XAC4006	trpS	tryptophanyl-tRNA synthetase	7	III.B.4	Metabolismo de RNA
XAC2380	efP	elongation factor P	7	III.C.1	Tradução e modificação
XAC0373	pcaR	regulador transcricional	8	I.D.2	Ativadores–repressores
XAC1601		kynureninase	8	II.D.17	Biossíntese de pequenas moléculas
XAC3103	gshB	glutathione synthetase	8	II.D.10	Biossíntese de pequenas moléculas
XAC1964	fabH	3-oxoacyl-[ACP] synthase	8	II.E	Biossíntese de pequenas moléculas
XAC1708	exoD	ExoD protein	8	IV.C	Estrutura celular
XAC3098	pilL	PilL protein	8	IV.D	Estrutura celular
XAC1240		proteína hipotética conservada	8	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC3691		proteína hipotética conservada	8	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0427		maltooligosyltrehalose trehalohydrolase	8	I.A.1	Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC1275	xylB	xylosidase	8	I.A.1	Degradation of Polysaccharides and Oligosaccharides
XAC2956		replication related protein	8	III.A.1	Metabolismo de DNA
XAC3818	priA	primosomal protein N	8	III.A.1	Metabolismo de DNA
XAC1384	ydgM	ferredoxin II	8	I.C.3	Transporte de elétrons
XAC3020		proteína hipotética	8	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC3519		proteína hipotética	8	VIII.B	Proteínas hipotéticas
XAC0631	ptrB	protease II	8	III.C.3	Degradação de proteína
XAC2537		peptidase	8	III.C.3	Degradação de proteína
XAC0922		ECF sigma factor	8	I.D.4	Funções regulatórias

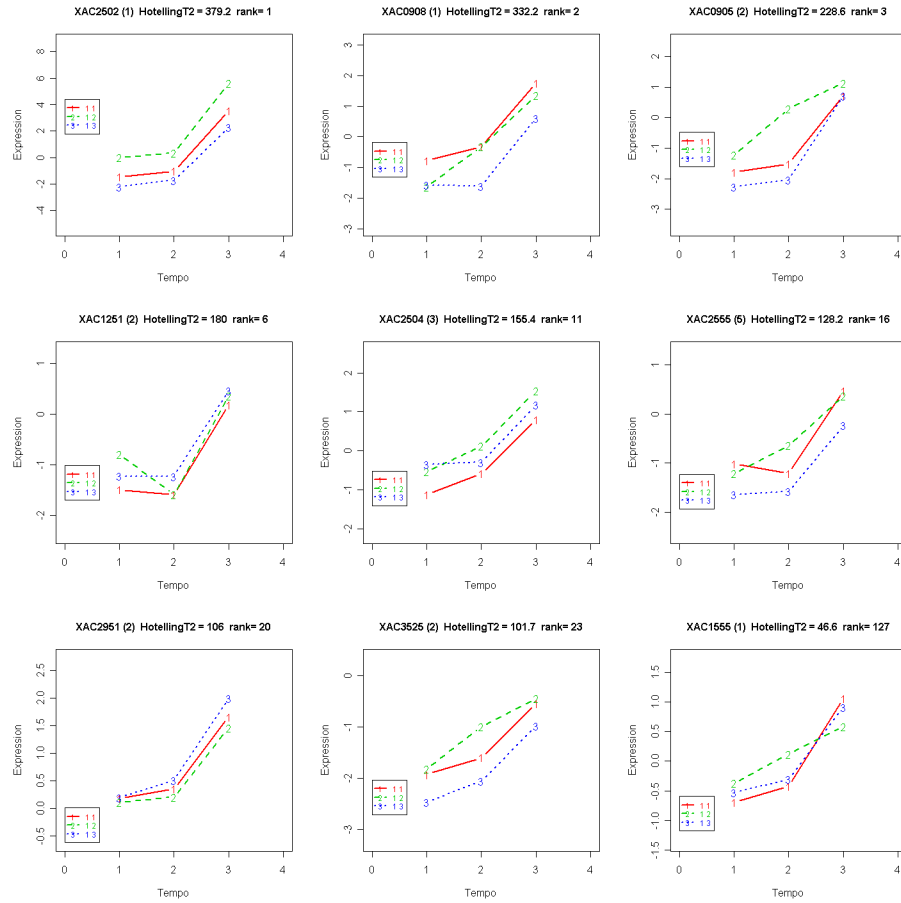
Continua na próxima página

Tabela 10.10 – continuação da página anterior

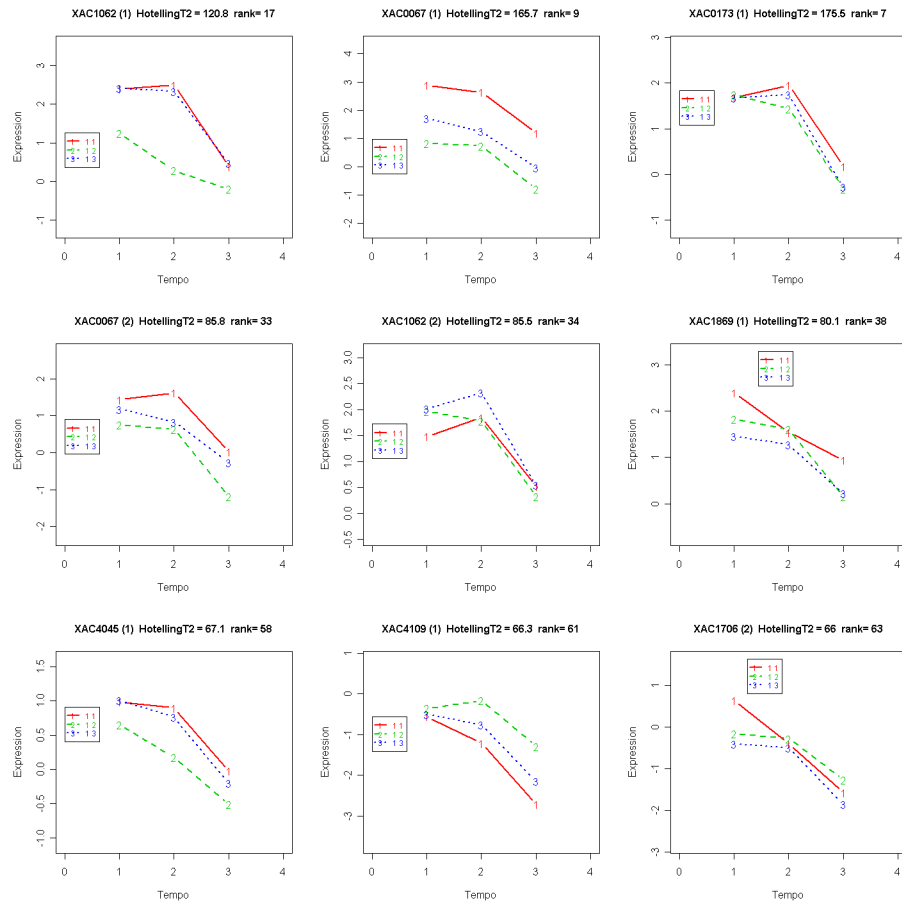
ORF	CD	Produto	Grupo	Cat	Categoria
XAC0990	rpmD	50S ribosomal protein L30	8	III.B.2	Metabolismo de RNA
XAC1620	rpsF	30S ribosomal protein S6	8	III.B.2	Metabolismo de RNA
XAC0900	pms	peptide methionine sulfoxide reductase	8	III.C.1	Tradução e modificação
XAC1323	lepB	signal peptidase I	8	III.C.1	Tradução e modificação
XACb0011	avrXacE3	avirulence protein	9	VII.A	Avirulência
XAC1806		proteína hipotética conservada	9	VIII.A	Proteínas hipotéticas conservadas
XAC0028	egl	cellulase	9	VII.D	Degradação da parede celular do hospedeiro
XAC2961	purN	5-phosphoribosylglycinamide transformylase	9	II.B.1	Biossíntese de nucleotídeos
XAC3878		disulphide-isomerase	9	IX	ORFs com categoria indefinida
XAC1577	pstS	ABC transporter phosphate binding protein	9	V.A.2	Transporte / Ânions
XAC0095		proteína hipotética conservada	9	VIII.C	Proteínas hipotéticas conservadas em <i>Xanthomonas</i>

### 10.4.2 Expressão gênica diferencial por gene, individualizado

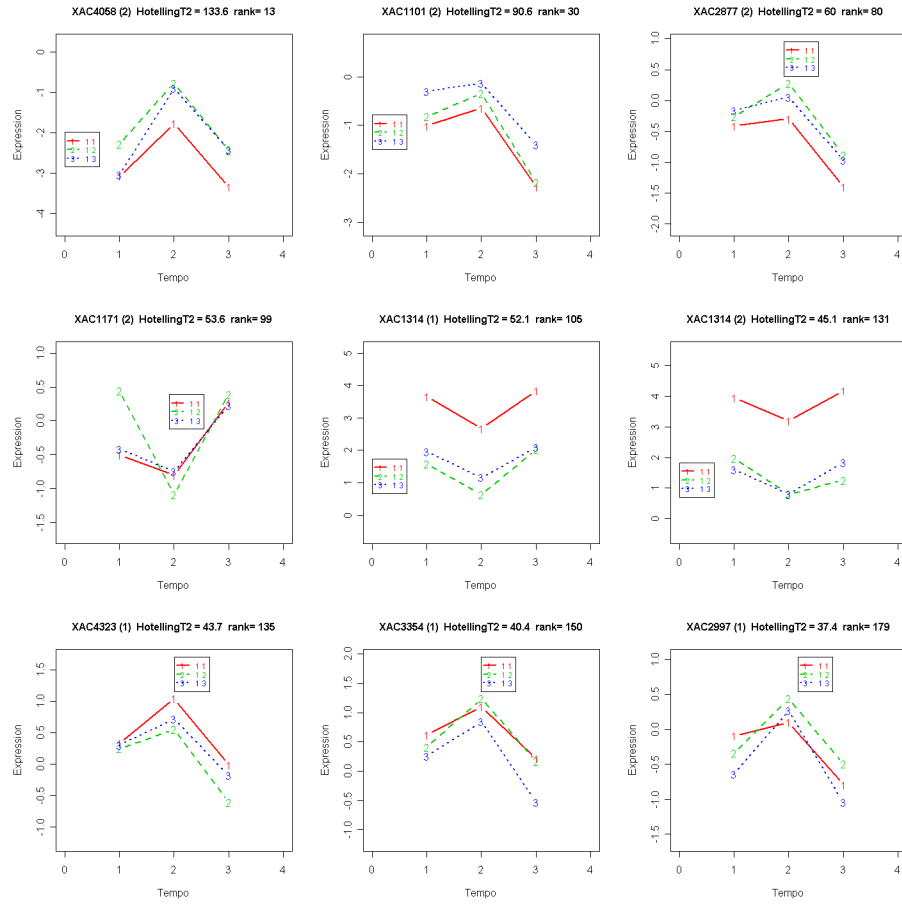
As análises implementadas no pacote “timecourse”, que roda no programa estatístico R, permite ordenar os genes analisados, do mais para o menos significativo, considerando os três pontos analisados *in planta* (24, 72 e 120 horas). Como resultado, ele gera um gráfico para cada um dos genes, plotando neste gráfico os pontos relativos às três repetições em cada um dos pontos analisados. As Figuras 10.18, 10.19 e 10.20 são exemplos de resultados obtidos com essa análise. Apesar de haver um índice estatístico para cada uma das ORFs analisadas, é possível verificar a expressão gênica ao longo do tempo para qualquer uma das ORFs presentes no microarranjo.



**Figura 10.18:** Expressão gênica de Xac, ao longo do tempo, para cada uma das ORFs indicadas na figura. Quanto menor for o “rank”, mais significativa foi a expressão gênica, em relação à expressão gênica global



**Figura 10.19:** Expressão gênica de Xac, ao longo do tempo, para cada uma das ORFs indicadas na figura. Quanto menor for o “rank”, mais significativa foi a expressão gênica, em relação à expressão gênica global



**Figura 10.20:** Expressão gênica de Xac, ao longo do tempo, para cada uma das ORFs indicadas na figura. Quanto menor for o “rank”, mais significativa foi a expressão gênica, em relação à expressão gênica global



## 11 *Discussão*

Neste estudo é descrito pela primeira vez o uso da técnica de microarranjos de DNA para avaliar a expressão diferencial e temporal de genes em Xac multiplicada em seu hospedeiro natural, *citrus*, e em meio de cultura indutor XAM1, utilizado na literatura por mimetizar a planta.

Bactérias patogênicas utilizam uma expressão coordenada de genes em resposta à mudanças ambientais e para driblar as respostas de defesa do hospedeiro, permitindo, desta maneira, a sua persistência, proliferação, invasão e disseminação no mesmo (190). Em Xac, uma bactéria fitopatogênica, não deve ser diferente. Para infectar o hospedeiro, Xac necessita de encontrar uma porta de entrada, a qual pode ser um ferimento ou aberturas naturais, como estômatos e hidatódios. Já nesse primeiro passo, encontrar uma porta de entrada, Xac deve identificar essas aberturas e, muito provavelmente, se deslocar até as mesmas, para, então, adentrar ao interior do tecido da planta. Após estar no interior do seu hospedeiro, Xac deve proteger-se contra as respostas de defesa da planta, ou fazer passar-se despercebida, e, ao mesmo tempo, obter alimento para poder se multiplicar. Esses processos pressupõem a necessidade de uma série de compostos produzidos a partir da expressão de genes específicos. Essa expressão, presume-se, deve ocorrer de maneira coordenada e ao seu devido tempo. Desse modo, grande é a curiosidade a respeito de quais genes a bactéria utiliza em cada um desses processos, pois a identificação desses genes poderá levar ao estabelecimento de medidas de controle. No caso específico de Xac, o estabelecimento de uma medida de controle poderá resultar em ganhos significativos para a citricultura brasileira e mundial.

Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de determinar o conjunto de genes utilizado por Xac durante a colonização de folhas de laranjeira. Para isso, a abordagem utilizada foi o microarranjos de DNA, visto que essa técnica permite verificar a indução ou repressão de um grande número de genes em conjunto. Mas, antes de obter os resultados, o alvos, as sondas e o microarranjo devem ser obtidos e os possíveis obstáculos à sua produção devem ser superados.

O primeiro obstáculo a ser superado foi a obtenção de RNA de células bacterianas cultivadas *in planta*. Esse obstáculo foi superado infiltrando células bacterianas diretamente em folhas de la-

ranjeira e recuperando-as posteriormente. O próximo passo, a extração de RNA total de altíssima qualidade a partir dessas células, é crucial para a condução da técnica de microarranjos de DNA. Inicialmente, essa extração começou a ser executada com o reagente Trizol. Mas, esse método não foi apropriado para a técnica, pois, parece que esse método de extração não elimina alguns dos compostos da folha, solúveis em água, que acompanham a solução de células e permanecem junto ao RNA por todo o processo de extração. Essas impurezas na amostra, bem como a presença de RNAs de baixo peso molecular oriundos de degradação ou nativos da própria célula bacteriana, podem interferir no processo de obtenção dos cDNAs, seqüestrando oligonucleotídeos ou inibindo a enzima transcriptase reversa e no processo de marcação dos cDNAs, reagindo com os nucleotídeos modificados, o que dificulta a reação dos mesmos com os fluoróforos. Além disso, provavelmente, esses contaminantes favorecem a perda de qualidade do RNA, favorecendo a sua degradação, mesmo se armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Somado a esse problema, a presença de grandes quantidades de RNA de baixo peso molecular na amostra obriga a elevar a quantidade de RNA total a ser inicialmente utilizada, pois, aproximadamente, somente 4% do total de RNA constitui RNAm. Com isso, ao elevar essa quantidade, aumenta-se, também, a quantidade de RNAr e RNAt, aumentando consideravelmente a emissão de fundo (179), uma vez que os RNAt hibridizam inespecificamente com a superfície da lâmina.

Dificuldades durante a extração de RNA, não só para uso na técnica de microarranjos, mas para outras técnicas, também foram encontradas por Zeng e Yang(191), Li et al.(192), Manickavelu et al.(193), Baelde et al.(194) e por Culley et al.(195) a partir de microrganismos, plantas e animais. Na grande maioria, a presença de polissacarídeos foi o contaminante mais problemático, mas houve casos onde a presença de polifenóis foi importante. Já em outros casos, a presença de células não completamente lisadas ou intactas foi a responsável pela péssima qualidade e/ou baixo rendimento. Houve, também casos em que a contaminação por polissacarídeos formou uma gosma e, ao se transferir a parte aquosa para um novo tubo, essa gosma levou junto parte da solução orgânica, contaminando a preparação com fenol e com clorofórmio. Sabe-se que a casca dos *citrus* é rica em polifenóis (196), talvez as folhas também o sejam.

Além das contaminações, a extração de RNA com o reagente Trizol a partir de Xac multiplicada em folhas por menos de 72 h não foi adequada. Muito provavelmente, a quantidade de células não foi suficiente para uma extração mínima e reproduzível.

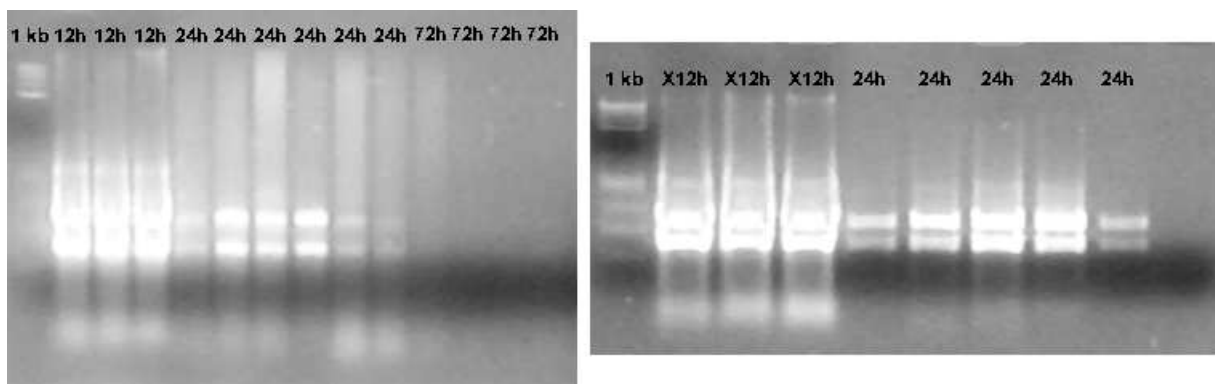
Ao contrário do Trizol, a extração com o conjunto de reagentes “Illustra RNAspin” da Amersham Biosciences propiciou RNA de excelente qualidade, avaliada em aparelho *NanoDrop® ND-1000*

*Spectrophotometer*, e a partir de pequena quantidade de células, o que possibilitou a extração de RNA de folhas de laranjeira com 24 h de cultivo de Xac. Durante o processo de extração com esses reagentes, observou-se que junto com o RNA, um composto verde, possivelmente clorofila, ficava retido na coluna. Esse composto somente era eluído da coluna quando da última lavagem, ao passar pela mesma um dos reagentes que contém etanol na sua constituição, ou seja, esse composto, possivelmente, é solúvel em álcool ou em outro constituinte desse reagente. Pode ser que esse contaminante, junto com outros ou sozinho, fosse o causador da baixa qualidade das extrações com Trizol. Além disso, a extração com esse conjunto de reagentes eliminou os RNAs de baixo peso molecular, uma vez que estes são eliminados da coluna quando do processo de lavagem, e a contaminação por DNA. Esse, talvez, seja um dos maiores benefícios do uso do conjunto de reagentes “RNAspin” frente ao uso de Trizol. Assim, os RNAs utilizados nas hibridizações foram obtidos com o conjunto de reagentes “RNAspin” e o uso do reagente Trizol foi abolido.

Outro fato importante observado durante o processo de extração de RNA foi a mesma mobilidade eletroforética apresentada pelas bandas correspondentes ao RNAs ribossomais tanto nas amostras provenientes de meio de cultura NA quanto nas amostras provenientes de células bacterianas multiplicadas na planta, indicando que as amostras provenientes de folhas são RNAs de bactéria e não de laranjeira, confirmando a eficácia da metodologia de recuperação da bactéria do tecido vegetal inoculado.

Sanado os problemas iniciais, procederam-se às hibridizações. Estas foram realizadas com alvos produzidos a partir de RNA de Xac multiplicada em meio de cultura NA, meio de cultura XAM1 e em folhas de laranjeira Pêra. O meio de cultura NA foi utilizado como controle e os demais como teste.

Durante as extrações do RNA total de Xac multiplicada em meio de cultura NA, observou-se que as extrações procedentes de células multiplicadas por mais de 12 h não apresentavam boa qualidade (Figura 11.1). Parece que acima desse tempo de cultivo há a produção de alguns metabólitos no meio de cultura, fazendo com que o RNA extraído não tenha boa qualidade. Possivelmente, esse fato deva-se à morte de células, as quais liberam esses contaminantes, ao atingir a fase estacionária de crescimento. Além disso, ao atingir-se a fase estacionária, as células sofrem um estresse, o qual pode, significativamente, modular a expressão de genes, alterando, dessa maneira, a expressão global da célula (197). Essa alteração na expressão pode se dar, também, pela inibição da atividade da RNA polimerase sob condições de estresse (198). Desse modo, tanto os experimentos em meio XAM1 quanto os em planta foram contrastados com o experimento em meio de cultura NA.

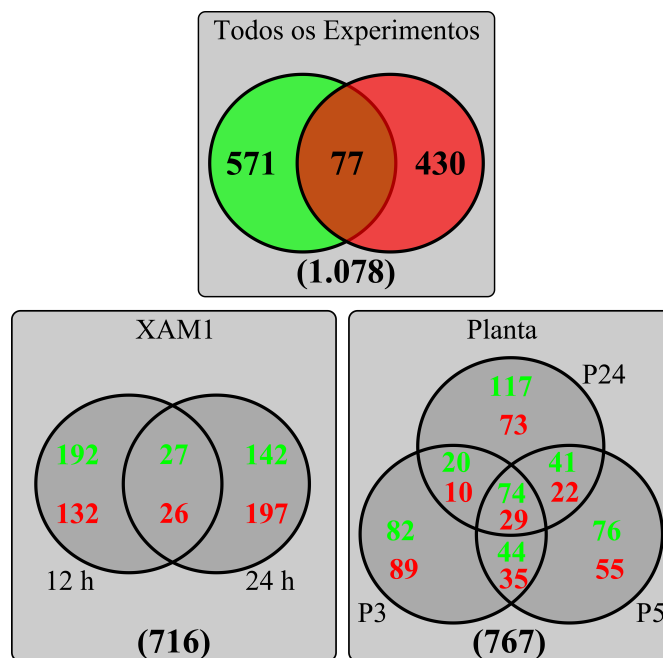


**Figura 11.1:** Padrão eletroforético de 5  $\mu$ L de uma suspensão contendo RNA total de *Xac* multiplicada em meio de cultura NA (12 h, 24 h e 72 h) e em meio de cultura XAM1 (X12h e X24h). As amostras foram extraídas com o conjunto de reagentes “Illustra RNAspin”.

No geral, considerando-se todos os experimentos, observa-se que houve 1.078 genes diferencialmente expressos (Figura 11.2), dentre os 2.673 representados no microarranjo. Essa quantidade se deve ao fato de se ter utilizado um valor de corte ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ) menos rigoroso e da multiplicação de *Xac* em substratos distintos: meio de cultura NA, meio de cultura XAM1 e folhas de laranja. Esse valor de  $p\text{-value}$  se justifica considerando que este é o primeiro estudo dessa natureza envolvendo expressão de genes de uma bactéria fitopatogênica *in planta*. Além disso, esse montante de genes diferencialmente expressos é resultado de todos os experimentos em conjunto. Em *Pseudomonas aeruginosa* PA01, em resposta a exsudatos de raízes provenientes de duas variedades de beterraba, identificaram-se 516 e 451 genes diferencialmente expressos ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ) (169). Em *Yersinia pestis*, resultados similares também foram obtidos, onde foi identificado 755 genes diferencialmente expressos em resposta ao crescimento em substrato contendo cloranfenicol (199). Um outro estudo, onde se comparou a expressão gênica de *Y. pestis* durante a infecção *in vivo* versus seu crescimento *in vitro*, foi verificado que  $\sim 23\%$  do genoma foi expresso diferencialmente de maneira significativa entre as duas condições (200).

No geral, houve um maior número de genes induzidos que reprimidos, sendo que uma pequena quantidade, 77, apresentou comportamento dúbio: em um experimento foi induzido e nos outros foi reprimido, ou *vice-versa*. Isso pode ser devido a genes essenciais ao desenvolvimento da bactéria, os quais são necessários em qualquer uma das situações a que ela venha sobreviver.

Em meio de cultura XAM1, apesar de haver somente dois tempos de avaliação, nota-se que houve uma grande quantidade de genes diferencialmente expressos. Além disso, a quantidade de genes comuns aos dois tempos é pequena, se comparado ao observado *in planta* (Figura 11.2).



**Figura 11.2:** Diagrama de Venn mostrando a quantidade de genes diferencialmente expressos em Xac em cada um dos cinco experimentos (ver seção 9 para detalhes) realizados. A cor verde indica os genes induzidos e a vermelha os reprimidos. Os números entre parênteses indicam o total de genes na referida comparação.

Especificamente para Xac multiplicada em meio de cultura XAM1 por 24 h é possível verificar que a maior parte dos genes diferencialmente expressos deve-se a genes que foram reprimidos. As características desse meio de cultura devem ter influenciado de alguma maneira esses resultados. Durante a extração de RNA total de Xac multiplicada em meio de cultura NA, notou-se que células multiplicadas por mais de 12 h em meio líquido não resultavam em boa extração de RNA total. Apesar de não ter sido possível verificar, por meio de observação ou por meio de equipamentos, o mesmo para o meio XAM1, pode ser que ele tenha exaurido e que tenha, com isso, ocasionado um estresse nas células, alterando a expressão de seus genes.

Uma comparação entre a expressão de Xac em meio XAM1 com a expressão *in planta* mostra que, dos 35 genes da categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação) presente no experimento XAM1 24 h, 15 foram induzidos e 20 reprimidos. Desses 35, apenas seis estão presente no experimento XAM1 12h, 11 no experimento planta 24 h, 13 em planta 72 h e 12 estão presentes em planta 120 h. Dos 15 genes induzidos, apenas quatro foram induzidos *in planta* no experimento 24 h. Do mesmo modo, dos 20 reprimidos, apenas três foram reprimidos quando Xac foi multiplicada em folhas de laranjeira por 24 h (Tabela 10.9). Dos genes *hrp*, apenas três foram induzidos em XAM1 24 h: *hrpB2*, *hpa1* e *hrpXct*. Já para os genes de avirulência, somente *avrXacE2* foi indu-

zido em meio de cultura XAM1 com 24 h de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos por Astua-Monge et al.(158), quando observaram que em meio indutor somente *avrXacE1*, *avrXacE2* e *avrBs2* foram induzidos. Assim como no presente estudo, os quatro membros da família *pthA* exibiram expressão constitutiva tanto em meio indutor quanto em meio de cultura NA. Outros genes *avr* de *Xanthomonas* spp., incluindo genes da família *pthA* tem apresentado expressão gênica não significativa em meio indutor (201, 202, 203). Em um outro estudo envolvendo macroarranjos de DNA, de 32 ORFs de Xac, classificadas como sendo da categoria VII (Patogenicidade, virulência e adaptação), constantes de um estudo envolvendo macroarranjos de DNA, apenas seis foram induzidas em meio indutor XAM1 (204). No entanto, desses seis, apenas *hpa1* foi comum entre aquele e o presente estudo.

Um outro fato interessante é a comparação direta entre o resultado obtido quando Xac foi multiplicada em meio de cultura XAM1 e quando ela foi cultivada em folhas de laranjeira Pêra, sem considerar os tempos, somente os meios de culturas (folhas *versus* XAM1). Observa-se que dos 169 genes induzidos em XAM1, apenas 23 aparecem induzidos *in planta*. O mesmo acontece com os reprimidos: dos 223 genes reprimidos em XAM1, 29 também o são em folhas de laranjeira. Quando se verifica quantos genes foram diferencialmente expressos em planta 24 h após a inoculação, os resultados são parecidos. Dos 252 genes induzidos em folhas 24 h após a inoculação, 22 aparecem induzidos em XAM1 24 h após o semeio. Dentre os 134 reprimidos *in planta* 24 h após a inoculação, 29 deles aparecem reprimidos em meio de cultura XAM1 24 h após a inoculação. Os resultados obtidos evidenciam as limitações do meio de cultura XAM1 como indutor de virulência e a capacidade de mimetizar o contato com a planta hospedeira, pois esses números deveriam ser bem próximos um do outro, se o meio indutor não apresentasse limitações. Desta forma, fica claro que a possibilidade de realização de experimentos *in planta*, possível no patossistema Xac-citros, mas não realizável para outros patossistemas, tornam os dados obtidos muito mais próximos da realidade do processo infeccioso do que aqueles obtidos a partir de meios sintéticos indutores.

Os dados apresentados pelos experimentos exclusivamente *in planta* mostram resultados em acordo com o relatado na literatura, bem como apresentam novidades.

A Figura 11.2 mostra que no início da infecção, 24 h, é quando a bactéria apresenta uma maior quantidade de genes diferencialmente regulados e exclusivos para aquele momento, 190, sendo que, destes, a expressão de 117 foi induzida. Já no terceiro dia após a infecção, a quantidade de genes diferencialmente regulados e exclusivos cai para 171, sendo que, destes, 82 foram induzidos. Esse valor continua caindo e, aos 120 h, chega a 131, sendo 76 induzidos. Considerando esses dados,

pode-se supor que a bactéria necessita, inicialmente, de adaptar-se ao seu hospedeiro e enfrentar as defesas do mesmo, necessitando de um maior arsenal gênico expresso. Com o passar do tempo, uma vez já estabelecida, passa a necessitar de um menor número de genes para a sua manutenção no hospedeiro. Mas nota-se, também, na mesma Figura, que existem genes comuns entre as fases de desenvolvimento e genes que se expressam durante todo o processo de infecção, independente da etapa de colonização. Interessante que a quantidade de genes diferencialmente expressos comuns a 24 h e 72 h, além de ser a menor entre as três, também é menor que o observado entre 24 h e 120 h.

Dentre os genes diferencialmente expressos exclusivamente 24 h após a inoculação, destacam-se induzidas as ORFs XAC0928 (Protease extracelular), XAC0931 (Regulador transcricional), 12 ORFs relacionadas a quimiotaxia, XAC4161 e XAC4162 (Proteínas do sistema de efluxo de cátion), XAC1988 (Proteína de flagelo flgA) e XAC2504 (regulador de patogenicidade).

Segundo o Pfam, XAC0928 possui domínios característicos de proteínas das famílias TraB, peptidase S8, proteínas citoplasmáticas e com domínios PPC. TraB consiste em proteínas que participam da montagem do pilus e é conhecida como essencial para a transferência através do pilus. Possivelmente, TraB se estende dentro da região periplásmica e é ancorada na membrana interna por meio de um segmento transmembrânico próximo à região N-terminal (205). As peptidases S8 fazem parte de uma grande família de serina proteases onde a atividade catalítica é função de um sistema de revezamento de cargas similar àquele da família tripsina de serina proteases, mas de ramos evolutivos independentes. Membros dessa família, S8, possuem uma tríade catalítica na ordem Asp, His e Ser. Em bactéria, os membros dessa família estão, provavelmente, envolvidos na nutrição celular. Muitas são excretadas, mas lactocepina (“cell envelope-associated peptidase” (*Lactobacillus* sp.)) permanece anexada à superfície externa da parede celular, enquanto que “lantibiotic leader peptidases” são intracelulares. Peptidases de seqüências líder (peptídeo sinal), conhecidas como “CylP leader peptidase” (“CylP/CylA lantibiotic leader peptidase” (*Enterococcus faecalis*)), são requeridas para a ativação de lantibióticos (antibióticos peptídicos) e citolisinas (substância tóxica que provoca lise celular) (206, 207). Desse modo, sugere-se um papel na virulência para a peptidase codificada pela ORF XAC0928 de *Xac*.

A maioria das bactérias Gram-negativas se movimenta e, com isso, resolve a maioria de seus problemas no confronto com o hospedeiro. Essa motilidade permite a elas conseguir mais e melhores nutrientes, fugir de substâncias tóxicas ou ambientes desfavoráveis, procurar um hospedeiro e se dispersar eficientemente. Esses movimentos se dão por meio de nado, deslizamento, contração ou por movimento de aglomerados de células (208, 209). O movimento de nado é mediado por fla-

gelo, uma estrutura composta por um longo filamento ancorado no envelope celular por um gancho flexível e um por um complexo corpo basal. O filamento flagelar é um tubo oco composto por aproximadamente 20.000 cópias da proteína flagelina (FliC) polimerizada dentro da hélice complexa. A rotação flagelar é controlada no corpo basal pelo motor flagelar, o qual é composto pelas proteínas FliG, FliM e FliN (209).

A estrutura flagelar em *Salmonella* e *E. coli* possui uma estrutura localizada no citoplasma, chamada MS, uma no periplasma, denominada anel P, e uma na membrana externa, denominada anel L. Além desses, existe mais um anel, denominado anel C, que fica no lado citoplasmático, próximo ao anel MS. Os anéis P e L, juntos, formam uma estrutura cilíndrica rígida que segura a rotação da haste (210).

O anel P é formado por múltiplas cópias da proteína FlgI, a qual, em *Xac*, é codificada pela ORF XAC1979. O precursor de FlgI é transportado para dentro do periplasma via sistema de secreção Sec (211, 212). Uma outra proteína, FlgA, também é sintetizada em uma forma precursora e exportada, pelo mesmo sistema Sec, para dentro do periplasma, onde auxilia FlgI na formação do anel P. Essas duas proteínas são essenciais para a formação dessa estrutura. Estudos com mutantes para essas proteínas sugerem a existência de uma interação entre FlgA–FlgI. Desse modo, esses estudos indicam que FlgA, além de agir no periplasma, atua como uma chaperona periplásmica, a qual assiste a reação de polimerização de FlgI no anel P por meio da interação FlgA–FlgI (213, 214, 215, 216, 214, 217).

Uma vez que os flagelos são responsáveis pela propulsão celular, algum outro sistema tem de determinar a que direção seguir, quando seguir e quando não seguir. Este processo, de sentir o ambiente químico ao redor, é denominado quimiotaxia e requer sensibilidade à concentração de um produto químico no ambiente e a transmissão de um sinal para os flagelos bacterianos, indicando mudança ou não de direção do nado. A maioria das proteínas envolvidas na quimiotaxia são receptores transmembrânicos do tipo MCP. O sistema quimiosensor em bactéria pode ser resumido da seguinte forma: as proteínas receptoras de membrana MCP percebem um sinal extracelular e o endereça para um sistema de transdução de sinais onde a proteína CheA recebe o sinal de MCP e fosforila CheY, que então liga-se ao complexo flagelar para controlar a direção rotacional dos flagelos. A saturação do sistema é evitada pelo controle exercido pela própria CheA e ainda CheR, sobre a sensibilidade da MCP na recepção do sinal, sendo que o término do estímulo é conduzido por modificações da MCP pela ação de CheC e CheD (218). Desse modo, o sistema sensor de quimiotaxia transfere para os flagelos os estímulos necessários para que estes possam fazer com que a



célula se mova na direção correta.

Em *Salmonella* spp., a função motilidade e quimiotaxia na virulência têm sido estudada. Existem quatro diferentes tipos de mutantes que afetam ou o aparato flagelar (app), ou o flagelo propriamente dito (fla), ou a motilidade (mot) ou a quimiotaxia (che). Mutantes para quimiotaxia (app<sup>+</sup> fla<sup>+</sup> mot<sup>+</sup> che) produz um flagelo funcional mas não responde a estímulos quimioestáticos (219). Mutantes para motilidade (app<sup>+</sup> fla<sup>+</sup> mot che) produzem flagelo mas é deficiente para a motilidade. Mutantes para o flagelo (app<sup>+</sup> fla mot che) possuem o aparato de secreção funcional, mas não produzem o filamento flagelar. Por último, mutantes para o aparato (app fla mot che) possui mutações nos genes que codificam subunidades do aparato flagelar ou reguladores do processo de produção do aparato flagelar (220).

Em *Xac*, os genes que codificam para flagelo e para quimiotaxia estão divididos em 6 regiões gênicas. Especificamente os genes de flagelos estão dispostos em duas regiões. Nota-se que existem vários genes duplicados, sendo que a ORF *tsr* aparece duplicada 10 vezes em tandem. A verificação da expressão de genes de *Xac* codificando proteínas de quimiotaxia e flagelo sugere uma importância para estes sistemas de captação de sinais exteriores e movimentação da bactéria em 24 horas após a infecção, quando fenômenos de adaptação ao ambiente, representados pela planta hospedeira, encontram-se em ação. Essa suposição é corroborada pelo padrão de expressão apresentado pelos genes *che*, *mot*, *tsr* e *mcp* (Figura 11.3). Os genes *che* estão envolvidos diretamente na transmissão dos sinais químicos até o motor do flagelo. A proteína CheA, ao ser estimulada, forma um complexo com a proteína CheW. CheA, uma histidina quinase, transfere seu grupo fosfato para CheY, um regulador de resposta citoplasmática difusível. CheY fosforilada (Phosphoryl-CheY) interage com o motor do flagelo mudando a sua direção de rotação, alterando assim a taxa de deslocamento da bactéria. A consequência dessa mudança é um movimento a favor de condições favoráveis e contra as desfavoráveis. Mutações em CheA, CheY ou CheW resulta em um fenótipo totalmente não tático em *E. coli* (221, 222, 223), confirmando a suposição acima.

Para se manter dentro do hospedeiro, a bactéria necessita degradar diversos compostos, ou para a sua alimentação, ou para sua própria defesa. Os compostos degradados que serão utilizados na alimentação, na sua maioria açúcares, devem ser transportados do exterior para o interior da célula bacteriana. Desse modo, a célula necessita de um sistema de transporte específico através de poros na sua estrutura membranar, de modo a favorecer a passagem desses subprodutos. Para este tipo de transporte, a célula utiliza o sistema PTS (224). *Xac* possui um operon incompleto que codifica para o sistema PTS específico para glicose e um outro específico para frutose. A primeira ORF, logo

abaixo do PTS específico para frutose é a ORF XAC2504, que corresponde ao gene *rpfN*. Esse gene codifica uma proteína envolvida na regulação de fatores de patogenicidade e, além disso, é descrita como formadora de um possível poro de membrana externa. Sua função é relacionada à captação de carboidratos, principalmente frutose (225, 226). Os resultados apresentados por Xac 24 h após a infecção mostram que *rpfN* foi induzida somente neste estágio de desenvolvimento da bactéria, sugerindo que o sistema PTS está ativo nesta fase de desenvolvimento celular *in planta*.

Xac coloniza a região interna do hospedeiro. Provavelmente, durante essa interação o hospedeiro produz ou retira do meio ambiente compostos que, em excesso, podem ser nocivos à bactéria. Particularmente, os cátions  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{+}$  e  $Cd^{2+}$  podem, em excesso, ser tóxicos à bactéria (227, 228). Para evitar essa toxidez, as células bacterianas possuem genes que codificam proteínas responsáveis pela eliminação desses compostos do interior celular. Um desses genes é o complexo CzcCBA. Em *Alcaligenes eutrophus* o produto dos genes *CzcA*, *CzcB* e *CzcC* são requeridos para completa resistência a  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , e  $Cd^{2+}$  (229). Nessa bactéria, essas proteínas estão na fase lipídica, provavelmente na membrana externa. Estudos com mutantes mostrou que *CzcA* sozinha consegue transportar zinco e cobalto através da membrana citoplasmática, agindo como uma bomba de cátion. As outras duas proteínas, *CzcB* e *CzcC*, parecem estar no periplasma, logo elas podem agir como um dissociador do complexo enzima (*CzcA*) com o substrato (cátion). No entanto, *CzcB* e *CzcC* sozinhos não conseguem transportar cátions do citoplasma para o exterior, o que indica que *CzcA* é a parte transmembrânica do processo. Desse modo, a célula se livra de cátions que, por ventura, estejam sendo tóxicos à célula. Em Xac, as ORFs XAC4161 (*CzcB*) e XAC4162 (*CzcC*) foram diferencialmente expressas, exclusivamente, no início da infecção, 24 h após a inoculação (227, 228). Em acordo com esses resultados encontrados na literatura, além dessas duas ORFs estarem induzidas, um mutante de Xac (vide Primeira Parte), cuja ORF mutada foi a XAC4160 (*CzcA*), apresenta um fenótipo de patogenicidade diminuído em relação ao fenótipo selvagem.

Considerando o exposto acima e o fato desses genes de Xac estarem sendo expressos exclusivamente no início da colonização, pode-se dizer que, nesta fase, Xac encontra um ambiente inóspito, deparando-se com as defesas da planta. Em sendo assim, a célula necessita deslocar-se dentro do hospedeiro, ou em busca do alimento imediatamente disponível ou para fugir de compostos tóxicos. Logo, pode-se supor que a bactéria, primeiramente induz seu sistema de quimiotaxia, o qual induz a produção e o movimento de flagelos na direção desejada. Junto a isso, ela produz proteases extracelulares para, tanto contribuir na produção de compostos benéfico quanto na clivagem de produtos tóxicos. Mesmo que esses produtos tóxicos adentrem ao patógeno, o sistema CzcCBA elimina es-

ses compostos para o meio extracelular. E, para captar seu alimento, a produção de enzimas, como RpfN, que formam poros na membrana é essencial. Finalizando, todo esse complexo regido por um rígido controle de reguladores transcricionais, tal como aquele produzido pela ORF0931.

A expressão gênica global de Xac, analisada somente *in planta*, mostra genes conhecidos, e que são expressos durante a interação planta-patógeno, e desconhecidos, como os codificadores para proteínas hipotéticas. Por outro lado, verifica-se que existem algumas surpresas interessantes.

Os genes do sistema de secreção do tipo IV, denominados genes *virB*, é uma das surpresas observadas nos experimentos conduzidos em folhas de laranjeira.

Muitas bactérias patogênicas Gram-negativas possuem um sistema de secreção do tipo IV. O SST4 foi descrito pela primeira vez em *Agrobacterium tumefaciens*, a qual utiliza esse sistema para transferir genes (T-DNA) de seu plasmídeo, chamado Ti, para dentro de seu hospedeiro, causando uma doença, a galha. Esse plasmídeo possui diversos genes, dentre eles os genes *virB*, os quais são induzidos por compostos fenólicos produzidos pela planta, propiciando a transferência do material genético (230, 231). Portanto, a função primeira desse sistema é a transferência de DNA. Mas, em vários casos foi demonstrado que esse sistema entrega proteínas no interior das células de seus hospedeiros e que são requeridos para a virulência (232). Em *Agrobacterium* sp. foi demonstrado que algumas proteínas também são entregues no hospedeiro por meio desse sistema (233, 234, 235). Xac possui duas cópias desses genes, uma no plasmídeo pXAC64 e outra no cromossomo (20). Dentre os 11 genes *virB*, presentes tanto no plasmídeo quanto no cromossomo, nota-se a falta do gene *virB7*. No cromossomo, além da ausência de *virB7* também está ausente o gene *virB5*. O gene *virD4* está presente no cromossomo. Tanto no plasmídeo como no cromossomo, os genes *virB* de Xac estão agrupados sequencialmente, intercalados por alguns genes codificadores de proteínas hipotéticas (Figura 11.4). Ao contrário do esperado, uma vez que esses genes são necessários à patogenicidade em diversas bactérias, alguns desses genes foram reprimidos em Xac quando esta foi cultivada em folhas de laranjeira. Os genes *virB1*, *virB3*, *virB4*, *virB8*, *virB9* e *virB11* cromossomais foram reprimidos no início da colonização. Já *virB1*, *virB2*, *virB4*, *virB6*, *virB9* e *virB11* plasmidiais foram reprimidos, alguns no início, outros no final e outros durante todo o período avaliado. Além disso, ao se analisar o comportamento das proteínas hipotéticas próximas ao grupamento onde se encontram os genes *virB*, tanto do plasmídeo quanto do cromossomo, observa-se que XAC2606, XAC2610, XAC2611, XAC2613, XAC2622, XACb0035, XACb0043 e XACb0048 e XAC2609, uma carboxipeptidase, também foram reprimidas em Xac nestas condições de crescimento (Tabela 10.9). Alegria et al.(236) mostraram que os produtos dos

genes *virB* cromossomais possuem uma grande identidade com proteínas codificadas pelos genes *tra* encontrados nos plasmídeos *pSB105* e *pIP102*. Esses genes são requeridos durante o processo de conjugação (237). No mesmo estudo, Alegria et al.(236) verificaram a interação entre as proteínas do SST4 de *Xac*. Constatou-se que, para as proteínas codificadas pelo plasmídeo, houve as interações VirB6–XACb0042 e XACb0043–XACb0021b, e para as proteínas codificadas pelo cromossomo foram encontradas interações XAC2622–VirB9, XAC2609–VirD4 e XAC2610–VirB11. Os autores sugerem que XAC2622 possa atuar como um VirB7 cromossomal e que, ou XACb0042 ou XACb0043, funcionariam como VirB7 plasmidial.

Em adição a estes resultados, verifica-se que um dos mutantes de *Xac* (vide Primeira Parte desta Tese), defectivo para o gene *virB2*, teve a sintomatologia característica da doença alterada aos três dias após a inoculação, apresentando uma hiperplasia diminuída sem necrose e sem enxarcamento. Interessante notar que esse mesmo gene foi reprimido a 24 h e a 120 h., mas manteve-se constitutivamente expresso três dias após a inoculação.

Considerando que os genes *virB* são transcritos em um baixo nível e que eles são induzidos por compostos fenólicos (230), baixa temperatura, pH ácido e presença de açúcares (238), condições típicas encontradas no solo, próximo à rizosfera, é possível aceitar que esses genes estejam reprimidos em *Xac* colonizando folhas de laranja. Além disso, muito provavelmente, a planta irá produzir compostos fenólicos, em maior quantidade, quando sofrer algum tipo de ferimento. Neste caso, *Xac* pode se utilizar deste sistema quando da infecção natural, uma vez que ela tem de ser guiada até a porta de entrada e, dentro desta, realizar interações com as células do hospedeiro. Uma vez dentro do hospedeiro, ela pode utilizar um outro sistema de secreção, talvez mais apropriado para a entrega de proteínas de patogenicidade e virulência, o SSTT. Estudos com *Agrobacterium tumefaciens* C58 mostrou que AIA inibe a expressão de genes *virB* (238). Outros compostos da classe das benzoxazinonas também podem inibir a expressão dos genes *virB*. Um dos membros dessa classe, sintetizado pelo milho, 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H) (DIMBOA), inibe o crescimento da bactéria e a indução dos genes *virB* (239). Um outro composto, 2-hydroxyl-4,7-dimethoxy-benzoxazin-3 inibe a expressão dos genes mas não inibe o crescimento (240). Estas observações e os resultados obtidos com *Xac* cultivada em folhas de laranja podem estabelecer novas hipóteses para o programa de expressão dos genes *virB* nesta fitobactéria. A premissa inicial era de que estariam induzidos, mas no entanto apresentaram-se reprimidos.

Em bactérias, o fenômeno conhecido como “quorum sensing”, ou melhor, estimativa da densidade bacteriana local, é comumente decorrente da concentração extracelular de pequenas moléculas

auto-indutoras capazes de serem difundidas pela membrana celular bacteriana. Classicamente, em *Vibrio fischeri* este mecanismo de quorum sensing é regulado pelo sistema Lux, composto basicamente por uma enzima codificada pelo gene *luxI*, responsável pela geração das moléculas indutoras propriamente ditas, neste caso as homoseril-lactonas (HSL), e pelo regulador transcricional, codificado pelo gene *luxR* que é ativado ou reprimido em decorrência da concentração de HSL, atuando como um modulador da produção e ativação do sistema. Sistemas de regulação parecidos já foram encontrados em outras bactérias, inclusive com a síntese de outras HSL que atuam de maneira similar na resposta de densidade celular (241, 242, 243, 244). Entretanto, em bactérias do gênero *Xanthomonas* o que se observa é algo diferente, mas com resposta análoga. Nestas bactérias o fenômeno pode ser induzido por dois grupos distintos de moléculas: i) por intermédio da síntese dos chamados fatores difusíveis (Diffusible Factors, DF), que se caracterizam bioquimicamente por serem butirólactonas ainda pouco caracterizadas, mas que são de fundamental importância para outra peculiaridade de bactérias deste gênero, a fotoproteção, já que, *Xanthomonas* pode sobreviver como organismo epifítico durante parte de sua vida que precede o processo infeccioso propriamente dito (245). Além disso, estes DF ainda estão classicamente envolvidos com a biossíntese de exopolissacarídeo (EPS), envolvidos como sendo fundamentais para a virulência destes organismos em seus respectivos hospedeiros (246, 247, 166); ii) por intermédio da biossíntese de moléculas conhecidas como fatores de sinalização difusível, que se caracterizam bioquimicamente por serem um ácido graxo insaturado (ácido cis-11-metil-2-dodecenóico) (248). Estas moléculas DSF são biossintetizadas pelo conjunto de genes denominados de fatores de regulação da patogenicidade (“Regulators of Pathogenicity Factors”, RPF), que se encontram agrupados inteiramente num único locus do genoma destas bactérias, compondo nove genes *rpfABFCHG–DEI*, especificamente para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, já que em *Xac* encontra-se ausentes os genes *rpfH* e *rpfI* (246, 247, 249, 250, 166).

Cada um destes genes apresenta uma característica funcional peculiar: *rpfA* codifica para uma aconitase, cuja função está relacionada à homeostasia por ferro (251); *rpfB* codifica uma acil-coA ligase, com uma cadeia longa de ácidos graxos; *rpfF* media, junto com *rpfB*, a síntese de DSF, de tal maneira que mutações em qualquer um destes genes proporciona redução na síntese destas moléculas e, conseqüentemente, redução no processo de virulência (166); *rpfC* e *rpfG* codificam um sistema de dois componentes (246); *rpfH* codifica uma proteína acessório que ancora em *rpfC* permitindo que moléculas de DSF se liguem em ambas, auxiliando assim no desencadeamento da resposta mediada por *rpfC*+DSF (247); *rpfDEI*, além de se localizarem a montante do agrupamento principal de genes, não apresentam funções de grande importância para a síntese ou regulação da

síntese de DSF (252, 253).

Devido à importância deste sistema na regulação dos fatores de patogenicidade em *Xanthomonas*, mais especificamente na regulação da atividade dos genes de goma, de celulases e proteases (246, 247, 166), vários grupos têm focado suas pesquisas nestes genes. Recentemente Andrade e colaboradores (254) obtiveram resultados interessantes de interação proteína-proteína por intermédio da técnica de duplo-híbrido, demonstrando haver interações físicas entre as proteínas que compõe o sistema de regulação dos genes *rpf*, previamente propostas por Slater e colaboradores (247). Mais surpreendente é que este mesmo grupo ainda mostrou que, além das interações *rpfF-rpfC* e *rpfC-rpfG* propostas por Slater e colaboradores (247), foi possível observar que: 1) que *rpfC* é capaz de se ligar a um gene nomeado como *cmfA* cuja seqüência é similar ao mesmo gene do organismo modelo *Dictyostelium discoideum*, cuja função também relaciona-se com o controle da densidade celular neste organismo (255, 256, 257); 2) que *rpfC* interage com *ntrB* e que *rpfG* interage com *ntrC*. Neste caso, embora não se tenha verificado a ligação direta de *ntrBC*, pode-se deduzir que deva haver uma direta relação de ambos na regulação da expressão de alguns genes, já que, além de compreenderem um sistema de dois componentes, *ntrB* foi capaz de se ligar a um fator sigma, neste caso sigma 54 (*rpoN*), que por sua vez desencadearia uma resposta de expressão gênica dirigida; 3) que *rpfG* foi capaz de se interagir com inúmeras proteínas que apresentam o domínio GGDEF, cuja função seria converter GTP em c-diGMP, e que por sua vez atuaria como mediador secundário da resposta celular de controle da atividade gênica, por promover modificações alostéricas em inúmeras enzimas (254).

Muitas dessas interações foram verificadas *in vitro* longe da maquinaria celular do organismo estudado e, devido a isto, não se foi possível verificar o nível de expressão dessas proteínas. Diante deste quadro de modelos e interações propostas, procurar-se-á adicionar neste modelo o nível de expressão de alguns destes genes por obtidos no presente estudo. O que se observou é que a grande maioria destes genes propostos no modelo, e que estavam presentes no microarranjo, foram induzidos quando se inoculou Xac em plantas de *Citrus sinensis*, após análise de 24, 72 e 120 horas, como foi o caso dos genes *cmfA*, *rpfC*, *rpfG* e algumas ORFs que codificam proteínas com domínio GGDEF (XAC0610, XAC1887, XAC1938, XAC1939, XAC2482, XAC3272) (“NCBI’s Computational Biology Branch” - (258)), celulases (XAC1770, XAC0028, XAC0029) e proteases (XAC2853, XAC0928, XAC2831, XAC2833, XAC3547), além de uma expressão não uniforme, no início da infecção, dos genes que participam da biossíntese de goma. Estes dados corroboram os dados de interação propostos por Andrade et al.(254), com base no modelo proposto por Slater et al.(247), de tal maneira que muitos outros genes que apresentaram padrão de expressão similar aos

apresentados pelos genes referenciados acima, possam estar envolvidos com o processo de patogenicidade de Xac após contato com os tecidos vegetais. No entanto, uma única proteína destoa dentro desse raciocínio: rpoN (XAC2972). O gene codificador para essa proteína apareceu reprimido nas primeiras 24 h de infecção e comportou-se de maneira constitutiva nos demais tempos analisados. Sabe-se que Xac possui uma outra cópia desse gene, XAC1969, que também apresentou expressão constitutiva ao longo do experimento. Por outro lado, outros fatores sigma (ECF sigma factor, RNA polymerase sigma factor, RNA polymerase sigma-E factor, RNA polymerase sigma-32 factor) apresentaram-se induzidos *in planta*. A expressão constitutiva de rpoN seria suficiente ou estaria algum desses outros fatores realizando as funções de rpoN? Um resumo dessa discussão é apresentada na Figura 11.5, a qual expressa este perfil de expressão nos três tempos propostos (24, 72 e 120 horas após inoculação).

A interação entre a célula bacteriana e a célula eucariótica durante a simbiose ou durante o parasitismo é mediada por proteínas secretadas pela bactéria. A chave para algumas interações entre patógeno e hospedeiro é o sistema de secreção do tipo III, o qual está presente em muitas bactérias patogênicas de plantas e de animais. Esse sistema é muito estudado em organismos modelos, incluindo espécies de patógenos animal, como *Yersinia*, *Shigella* e *Salmonella* e fitopatógenos, como *Ralstonia solanacearum*, espécies de *Erwinia* e de *Xanthomonas* e patovares de *Pseudomonas syringae* (259).

O SSTT possibilita a translocação de proteínas efetoras da bactéria diretamente para o interior da célula eucariótica do hospedeiro, as quais são utilizadas para manipular o hospedeiro durante a infecção (260). Em contraste com as bactérias patogênicas de animais, as fitobactérias possuem um grande arsenal de efetores (por exemplo, há seis efetores conhecidos em *Yersinia* (261) comparado a 29 efetores em *P. syringae* pv. tomato DC3000 (262)) os quais, presumivelmente, interferem de uma maneira coletiva nas vias metabólicas do hospedeiro, para benefício do patógeno. Para algumas proteínas efetoras, funções enzimáticas, como de cisteína protease ou de fosfatase, foram demonstradas (263).

Estudos com fitobactérias têm revelado que o SSTT envolve uma variedade de fatores, tais como adesinas, pili, fatores de sinalização bacteriana, receptores externos e fatores derivados da planta, proteínas envolvidas na transdução de sinais, fatores de transcrição especializados e fatores sigma substitutos, dentre outros. No entanto, somente uma pequena quantidade desses processos são conhecidos em detalhes ao nível molecular, sobretudo no que diz respeito às características particulares da interação entre patógeno e hospedeiro (264). Como exemplo, a translocação de

proteínas efetoras através da membrana plasmática da planta requer a presença de um provável canal protéico hetero-oligomérico, o qual é dispensável *in vitro*, mas é essencial para a translocação de proteínas efetoras para dentro da célula do hospedeiro (265). O primeiro candidato a ser este canal em bactéria fitopatogênica foi a proteína HrpF (codificada em Xac pela ORF0394) que é um fator de patogenicidade essencial em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (266). Homólogos de HrpF estão presentes em diferentes *Xanthomonas*, rizóbios, *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tomato*. No entanto, HrpF de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *P. syringae* pv. *tomato* não são essenciais à patogenicidade, sugerindo que outras proteínas estão envolvidas no processo de translocação nesses organismos (267, 268).

O SSTT de fitobactérias são codificados por um grupo de ~25 genes, cujas proteínas formam um complexo que atravessa as membranas interna e externa do envelope bacteriano. Em *Salmonella typhimurium*, externamente à célula bacteriana, é formada uma estrutura alongada com cerca de 120 nm de comprimento ((269)). No isolado 306 de Xac foram identificadas 25 ORFs *hrp*, localizadas em um agrupamento de aproximadamente 23.573 pares de bases (20). Este agrupamento compreende os genes *hpaF* a *hpa2*. A expressão desses genes é induzida pela planta e a regulação é efetuada por proteínas de dois componentes, fatores sigma alternativos e ativadores transcricionais do tipo AraC.

Quando a expressão gênica de Xac multiplicada *in planta* foi analisada, verificou-se que 24 h após a inoculação houve a indução de dois genes que codificam para proteínas regulatória de dois componentes (XAC3135 e XAC0225). Por outro lado, cinco fatores sigma (XAC4129, XAC1380, XAC1682, XAC3824 e XAC2972) apresentaram indução por todo o período analisado (24, 72 e 120 h), sendo que o mesmo aconteceu para o gene *hrpXct*, um ativador transcricional da família AraC, o qual foi induzido nos três tempos analisados. Em concordância com este resultado, quando um mutante para o gene *hrpXct* foi quando inoculado em *citrus*, não houve elicitação de nenhum tipo de sintoma da doença (vide primeira parte dessa Tese).

No SSTT, nove genes *hrp* são conservados entre os patógenos de plantas e de animais, os quais foram designados *hrc*. Além do alto grau de conservação, as proteínas Hrc também são similares a componentes do corpo basal do flagelo bacteriano, sugerindo uma ancestralidade comum entre flagelo e SSTT (270). Nos loci *hrp*, também encontram-se os genes denominados *hpa* que em sua maioria não tem um papel claro na patogenicidade.

Estudos tem mostrado que HrpG, uma proteína regulatória transcricional com sítio de ligação de DNA, controla a expressão do gene *hrpA* em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, assim como o gene



*hrpX* (53, 271). Por sua vez, a proteína HrpX ativa a transcrição do locus *hrpB–F*, assim como um grande número de proteínas de membrana externa (Xop) em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (52). O gene *hrpG* de *R. solanacearum* é regulado por uma cascata de sinais dependente de contato com a célula hospedeira. O gene *prhA* (um receptor de sinal) transmite esse sinal para o gene *prhR* (uma proteína transmembrana), a qual envia a sinalização para *prhI* (um fator sigma ECF) e *prhJ* (um regulador de transcrição da família LuxR/UhpA) (272, 273, 274).

Recentemente, Alegria et al.(264), por meio de estudos de duplo híbrido, identificaram em Xac uma série de interações proteína–proteína relacionadas ao grupo de genes *hrp*. Os autores mostraram interações entre as proteínas HrpG, HpaA, HpaB, HrcV, HrpB1, HrpD6, HrpB2, HrcU, HrpW, HrpB4, e HrcN. Além dessas interações, os autores também demonstram a interação de HrpG com as proteínas hipotéticas conservadas XAC0095 e XAC1568 e entre XAC0095 e XAC0524 (regulador transcricional pbsX family).

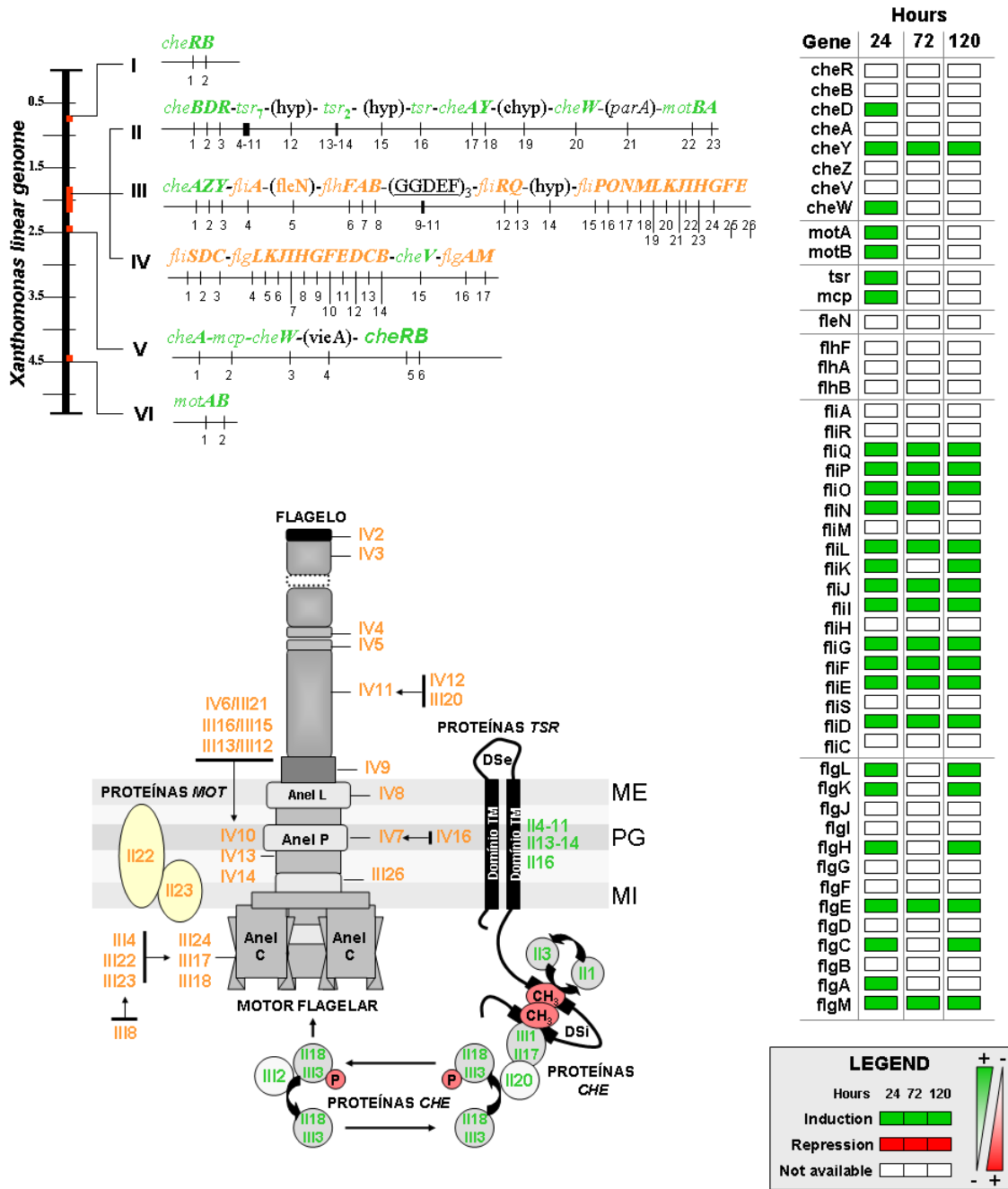
Interessantemente, no presente estudo, os genes *hpa1*, *hpaB*, *hpaF*, *hrcQ*, *hrcS*, *hrcU*, *hrcV*, *hrpB1*, *hrpB2*, *hrpB5*, *hrpD6*, *hrpF*, *hrpG* e *hrpXct* foram induzidos *in planta*. Mais interessante ainda, as ORFs hipotéticas XAC0095 e XAC1568 também aparecem induzidas quando Xac foi multiplicada em seu hospedeiro natural. Adicionalmente a isso, mutantes para as ORFs XAC0410 (*hrpB4*), XAC1266 (*hrpXct*) e XAC0095 (proteína hipotética conservada) não são patogênicos quando inoculados em folhas de laranjeira.

No entanto, os dados de expressão ora apresentados não identificaram expressão diferencial para alguns genes *hrp*, dentre eles os genes *hrcJ*, *hrcN* e *hrcR*. Os produtos destes genes faz parte do aparato principal do SSTT e possuem análogos no sistema flagelar (275, 276, 277, 260). Observando esses análogos, verifica-se que seus correspondentes *fliF*, *fliI* e *fliP* foram induzidos nos três tempos analisados. Outros dois genes do SSTT que possuem análogos no sistema flagelar também tiveram seus análogos diferencialmente expressos. O gene *hrcS* foi expresso diferencialmente expresso nos três pontos de análise cm o seu análogo, *fliQ*, ocorreu o mesmo. Já com o gene *hrcQ* ocorreu uma alternância. Enquanto ele foi diferencialmente expresso *in planta* no final da infecção, em 72 e 120 h, seu análogo, *fliN*, foi diferencialmente expresso no início, 24 e 72 h. Desse modo, os genes que estão faltando no SSTT podem estar sendo substituído por seus análogos presentes no sistema flagelar.

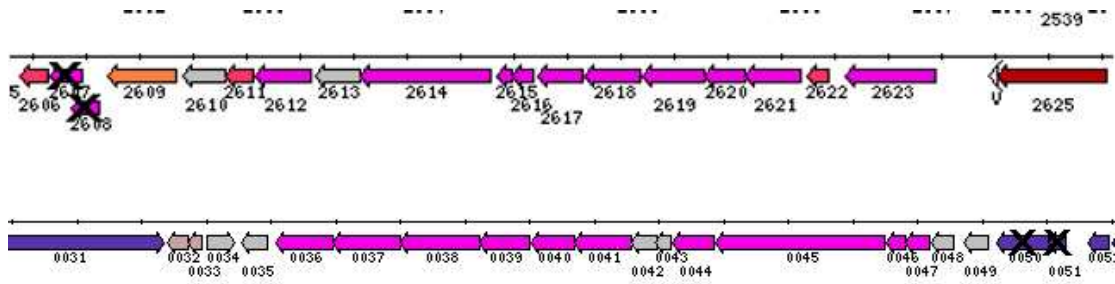
Considerando esses dados e aqueles discutidos para o sistema flagelar e de quimiotaxia, onde se supõe que aqueles dois sistemas são necessários à bactéria no início da infecção, mais precisamente nas primeiras 24 h, pode-se aqui supor que uma vez que o sistema flagelar continua a ser diferencial-

mente expresso após ter cessado o de quimiotaxia, que as proteínas de flagelo estão sendo utilizadas na montagem do SSTT.

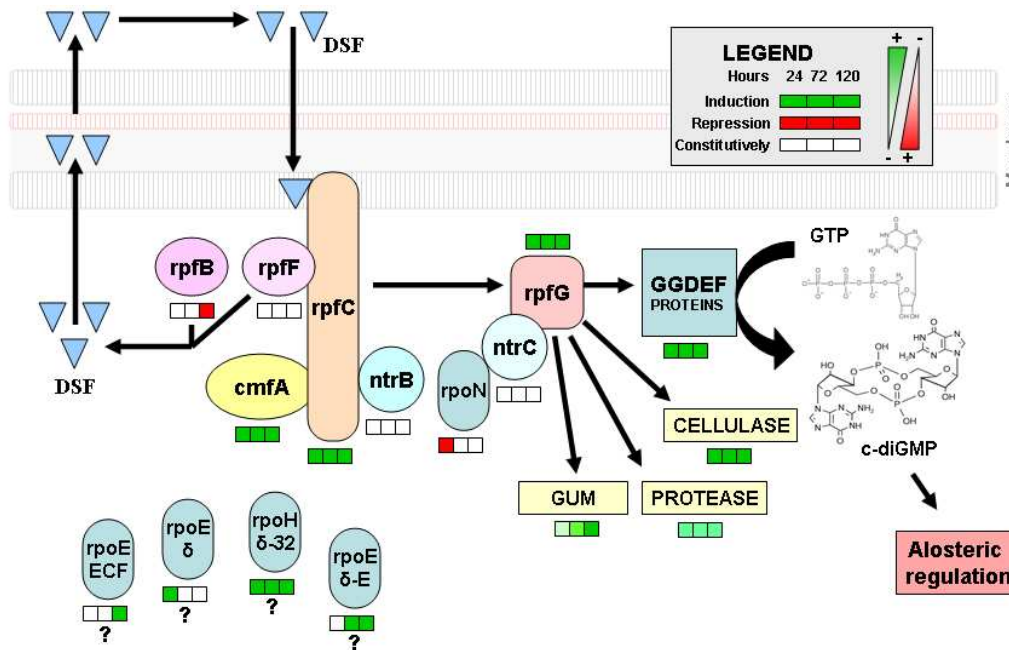
Considerando estes resultados e aqueles obtidos por Alegria et al.(264), e outros encontrados na literatura, é possível agrupá-los de modo a produzir um modelo das interações entre as proteínas do SSTT (Figura 11.6).



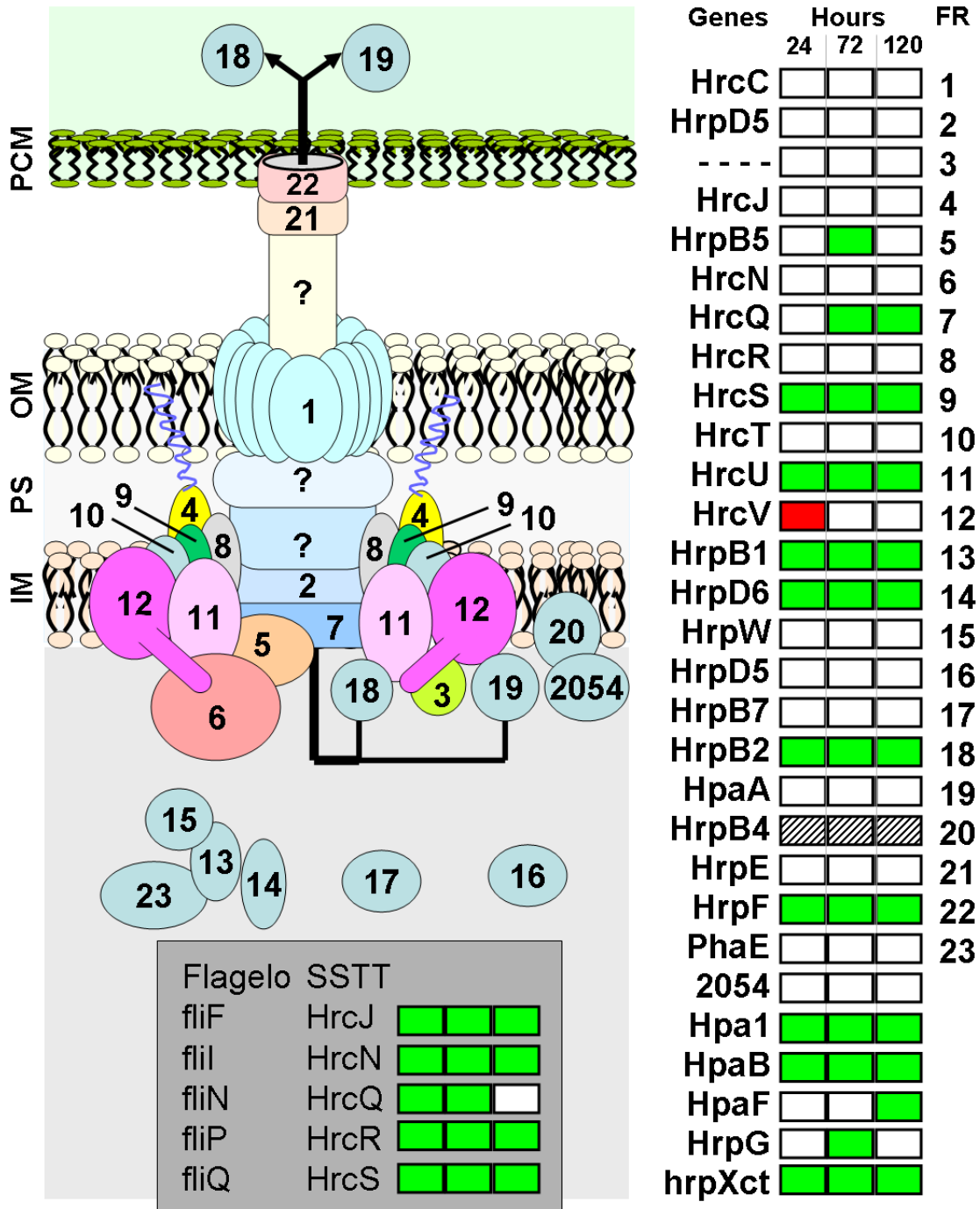
**Figura 11.3:** Esquema ilustrando os cluster gênicos que Xac possui relacionados à percepção de sinais e a motilidade em cada um dos cinco experimentos (ver seção 9 para detalhes) realizados. A cor verde indica os genes induzidos e a vermelha os reprimidos. Os números entre parênteses indicam o total de genes na referida comparação.



**Figura 11.4:** Diagrama indicando a disposição dos genes *virB* no genoma de Xac. No mapa inferior estão os genes presentes nos plasmídeos e no superior os presentes no cromossomo.



**Figura 11.5:** Esquema ilustrando a via de regulação dos fatores de patogenicidade (genes *rpf*) de Xac, bem como a respectiva expressão gênica em três períodos de desenvolvimento: 24, 72 e 120 h após a inoculação em folhas de laranja-êira Pêra.



LEGEND: IM – Inner Membrane; PS – Periplasmic Space; OM – Outer Membrane; PCM – Plant Cell-Membrane; FR – Figure Reference Numbers

**Figura 11.6:** Proteínas constituintes do sistema de secreção do tipo três em *Xac* com respectivos níveis de expressão em três diferentes estádios de desenvolvimento *in planta*, 24, 72 e 120 h. As proteínas que fazem parte dos sistema de flagelo análogas ao SSTT estão indicadas na figura.

## *Conclusões*

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- A técnica de microarranjos de DNA permite identificar genes diferencialmente expressos em Xac durante o período de infecção;
- No início da colonização (24 h) a fitobactéria depara com os maiores desafios frente ao hospedeiro, uma vez que a expressão de genes exclusivos (não expressos em outra ocasião) é a maior, dentre os três tempos analisados (24, 72 e 120 h);
- A quantidade de produtos catiônicos tóxicos à célula é maior nas primeiras 24 h de infecção, uma vez que proteínas “cation:proton antiporter” e “cation efflux system protein” só estão induzidas nesta fase;
- Genes do sistema de flagelo e quimiotaxia são muito importantes nas primeiras 24 h de colonização;
- O sistema de secreção do tipo III é essencial durante todo o processo de infecção;
- Os genes codificadores de proteínas relacionadas à goma são expressos após o terceiro dia (72) de infecção, na sua maioria;
- Aos cinco dias (120 h) de infecção a célula parece diminuir sua atividade metabólica, pois os genes XAC0773 (*ftsL* - cell division protein) e XAC0784 (*ftsZ* - cell division protein) são reprimidos enquanto que XAC3973 (*sula* - cell division inhibitor) é induzido 120 h após a inoculação;
- As celulasas são necessárias durante todo o processo de colonização do hospedeiro;
- O gene *pthA3* parece não ser essencial ao processo de patogenicidade;
- Os genes *virB* não são essenciais à sobrevivência de Xac no interior de citros;

- A utilização de meios de cultura como mimetizador de hospedeiro e/ou como indutores de genes deve ser avaliada com um certo cuidado.

## *Referências Bibliográficas*

- 1 AGROPECUÁRIA: Produção vegetal: Levantamento sistemático da produção agrícola. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Pagina internet. Disponível em: <[http://www-  
.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 13/02/2006.
- 2 PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Maiores Produtores Mundiais de Laranja*: Estado de são paulo e países selecionados. 2004. Página internet. Disponível em: <<http://www.investimentos.sp.gov.br/sis/graficos-.php?xml=G\ECO\Produtores\Mundiais\Laranja\2004.xml&xsl=gBarraLateral.xsl>>. Acesso em: 2/4/2006.
- 3 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Citrus Commodity Notes*: Developments in international citrus trade in 2004-2005. 2006. Página internet. Disponível em: <[http://www.fao.org/es/esc/en/20953/20990/highlight\\_28187en.html](http://www.fao.org/es/esc/en/20953/20990/highlight_28187en.html)>. Acesso em: 2/4/2006.
- 4 HASSE, G. *A Laranja no Brasil 1500 – 1987*. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>.
- 5 FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. 2006. Disponível em: <<http://www.fundecitrus-com.br>>. Acesso em: 25/02/2006.
- 6 DONADIO, L. C. Produtividade dos citros. In: \_\_\_\_\_. *Produtividade dos citros em Israel*. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1988. p. 47–62.
- 7 LARANJEIRA, F. F.; PALAZZO, D. A. Danos qualitativos a produção de laranja ‘natal’ causados pela clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 20, n. 1, p. 77–91, 1999.
- 8 NAMEKATA, T.; ROSSI, A. C.; CERAVOLO, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. *Laranja*, v. 17, n. 1, p. 67–78, 1996.
- 9 GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de são paulo e sul do triângulo mineiro. *Summa Phytopathologica*, v. 27, p. 93, 2001. Resumo.
- 10 MACCHERONI, W. et al. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae family) associated with citrus sudden death disease. *J. Virol.*, v. 79, n. 5, p. 3028–3037, Mar 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.5.3028-3037.2005>>.
- 11 KOLLER, O. C. *Citricultura: laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre: Editora Rígel, 1994. 446 p.



- 12 ROSSETTI, V.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. *Doenças dos citros causada por algas, fungos, bactérias e vírus*. [S.l.]: Fundação Cargill, 1993. 84 p.
- 13 BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO - SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. *Instrução Normativa SDA nº38/1999 de 14 de outubro de 1999*. Brasília - DF, 1999.
- 14 VAUTERIN, L. et al. Reclassification of xanthomonas. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, n. 3, p. 472–489, Jul 1995. English Article INT J SYST BACT.
- 15 WHITESIDE, J.; GARNSEY, S.; TIMMER, L. *Compendium of citrus diseases*. Saint Paul: APS Press, 1988.
- 16 FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no brasil. In: DONADIO, L. (Ed.). *Anais do V Seminário Internacional de Citros - Tratos Culturais*. Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p. 517.
- 17 PALAZZO, D.; JÚNIOR, V. M.; NOGUEIRA, E. Effect of some climatic factors on the index of infection of citrus canker caused of xanthomonas campestris pv. citri on valencia orange (citrus sinensis) in bataguassu, ms. *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, n. 2, p. 283–290, 1984.
- 18 AMORIM, L.; FILHO, A. B. A epidemiologia do cancro cítrico. In: \_\_\_\_\_. *3 Encontro de fitopatologia: Doenças de fruteiras tropicais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 1–17.
- 19 SWARUP, S. et al. An xanthomonas citri pathogenicity gene, ptha, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 5, n. 3, p. 204–213, 1992.
- 20 SILVA, A. C. R. da et al. Comparison of the genomes of two xanthomonas pathogens with differing host specificities. *Nature*, v. 417, n. 6887, p. 459–463, May 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/417459a>>.
- 21 HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: \_\_\_\_\_. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 21, p. 1102–1156.
- 22 DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 32, p. 479–501, 1994. English Review ANNU REV PHYTOPATHOL.
- 23 BOLWELL, G. P. et al. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research*, v. 23, n. 6, p. 517–532, 1995. English Article FREE RADICAL RES.
- 24 HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, v. 8, n. 10, p. 1773–1791, Oct 1996. English Review PLANT CELL.
- 25 CORBIN, D. R.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Molecular and Cellular Biology*, v. 7, n. 12, p. 4337–4344, Dec 1987. English Article MOL CELL BIOL.

- 26 GRAND, C.; SARNI, F.; LAMB, C. J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. *European Journal of Biochemistry*, v. 169, n. 1, p. 73–77, Nov 16 1987. English Article EUR J BIOCHEM.
- 27 GUSTINE, D. L. et al. Metabolites from pseudomonas-corrugata elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. *Phytopathology*, v. 80, n. 12, p. 1427–1432, Dec 1990. English Article PHYTOPATHOLOGY.
- 28 BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 1, p. 44–50, Feb 2002. English Review CURR OPIN MICROBIOL.
- 29 CHE, F. S. et al. Identification of novel genes differentially expressed in compatible and incompatible interactions between rice and pseudomonas avenae. *Plant Science*, v. 162, n. 3, p. 449–458, Mar 2002. English Article PLANT SCI.
- 30 KELLER, H. et al. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, v. 11, n. 2, p. 223–235, Feb 1999. English Article PLANT CELL.
- 31 YANG, Y. O.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in defense responses. *Genes & Development*, v. 11, n. 13, p. 1621–1639, Jul 1 1997. English Review GENE DEVELOP.
- 32 FLOR, H. H. Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, v. 9, p. 275–&, 1971. English Review ANNU REV PHYTOPATHOL.
- 33 KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*, v. 24, p. 447–463, 1990. English Review ANNU REV GENET.
- 34 GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*, v. 28, p. 365–391, 1990. English Review ANNU REV PHYTOPATHOL.
- 35 LAUGE, R.; WIT, P. D. Fungal avirulence genes: Structure and possible functions. *Fungal Genetics and Biology*, v. 24, n. 3, p. 285–297, Aug 1998. English Review FUNGAL GENET BIOL.
- 36 KJEMTRUP, S.; NIMCHUK, Z.; DANGL, J. L. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 73–78, Feb 2000. English Review CURR OPIN MICROBIOL.
- 37 WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, n. 4, p. 291–298, Aug 2000. English Review CURR OPIN PLANT BIOL.
- 38 STASKAWICZ, B. J. et al. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, v. 292, n. 5525, p. 2285–2289, Jun 22 2001. English Review SCIENCE.

- 39 COLLMER, A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 1, n. 4, p. 329–335, Aug 1998. English Review CURR OPIN PLANT BIOL.
- 40 KATO-MAEDA, M.; GAO, Q.; SMALL, P. M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cellular Microbiology*, v. 3, n. 11, p. 713–719, Nov 2001. English Review CELL MICROBIOL.
- 41 HAMER, L. et al. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, n. 1, p. 67–73, Feb 2001. English Review CURR OPIN CHEM BIOL.
- 42 JUDSON, N.; MEKALANOS, J. J. Tnaraout, a transposon-based approach to identify and characterize essential bacterial genes. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 7, p. 740–745, Jul 2000. English Article NAT BIOTECHNOL.
- 43 PELICIC, V. et al. Mutagenesis of neisseria meningitidis by in vitro transposition of himar1 mariner. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 19, p. 5391–5398, Oct 2000. English Article J BACTERIOL.
- 44 REICH, K. A.; CHOVAN, L.; HESSLER, P. Genome scanning in haemophilus influenzae for identification of essential genes. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 16, p. 4961–4968, Aug 1999. English Article J BACTERIOL.
- 45 WONG, S. M.; MEKALANOS, J. J. Genetic footprinting with mariner-based transposition in pseudomonas aeruginosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 18, p. 10191–10196, Aug 29 2000. English Article PROC NAT ACAD SCI USA.
- 46 BONAS, U.; ACKERVEKEN, G. van den. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: A general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant Journal*, v. 12, n. 1, p. 1–7, Jul 1997. Disponível em: <<Go to ISI>://1997XN20100001>.
- 47 DANGL, J. L. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 192, p. 99–118, 1994. Using Smart Source Parsing.
- 48 GIJSEGEM, F. van; GENIN, S.; BOUCHER, C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends in Microbiology*, v. 1, n. 5, p. 175–180, 1993.
- 49 RAHME, L. G.; MINDRINOS, M. N.; PANOPOULOS, N. J. Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in pseudomonas syringae pv. phaseolicola. *J Bacteriol*, v. 174, n. 11, p. 3499–507, 1992. Using Smart Source Parsing Jun.
- 50 FENSELAU, S.; BONAS, U. Sequence and expression analysis of the hrpb pathogenicity operon of xanthomonas campestris pv. vesicatoria which encodes eight proteins with similarity to components of the hrp, ysc, spa, and fli secretion systems. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 8, n. 6, p. 845–54, 1995. Using Smart Source Parsing Nov Dec.
- 51 CHAN, J. W.; GOODWIN, P. H. A physical map of the chromosome of xanthomonas campestris pv. phaseoli var. fuscans bxp65. *FEMS Microbiol Lett*, v. 180, n. 1, p. 85–90, 1999.

- 52 WENGELNIK, K.; BONAS, U. Hrp<sub>xv</sub>, an arac-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, v. 178, n. 12, p. 3462–9, 1996. Using Smart Source Parsing Jun.
- 53 WENGELNIK, K. et al. Expression and localization of hrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J Bacteriol*, v. 178, n. 4, p. 1061–9, 1996. Using Smart Source Parsing Feb.
- 54 BADEL, L. J. et al. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* textitavrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, n. 2, p. 99–111, 2006.
- 55 WEBER, E. et al. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J Bacteriol*, v. 187, n. 7, p. 2458–2468, Apr 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.7.2458-2468.2005>>.
- 56 DUNGER, G. et al. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *PLANT PATHOLOGY*, v. 54, n. 6, p. 781–788, dez. 2005.
- 57 COULTHURST, S. J.; LILLEY, K. S.; SALMOND, G. P. C. Genetic and proteomic analysis of the role of luxS in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, v. 7, n. 1, p. 31–45, jan. 2006.
- 58 JONES, S. et al. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J*, v. 12, n. 6, p. 2477–2482, Jun 1993.
- 59 PIRHONEN, M. et al. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J*, v. 12, n. 6, p. 2467–2476, Jun 1993.
- 60 BURR, T. et al. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the virR repressor. *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, v. 59, n. 1, p. 113–125, jan. 2006.
- 61 OCHSNER, U. A. et al. Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 12, p. 8312–8317, Jun 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082238299>>.
- 62 PRADEL, N. et al. Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, v. 71, n. 9, p. 4908–4916, Sep 2003.
- 63 DING, Z.; CHRISTIE, P. J. *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. *J Bacteriol*, v. 185, n. 3, p. 760–771, Feb 2003.
- 64 YEN, M.-R. et al. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol*, v. 177, n. 6, p. 441–450, Jun 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-002-0408-4>>.

- 65 BRONSTEIN, P. A. et al. Identification of a twin-arginine translocation system in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and its contribution to pathogenicity and fitness. *J Bacteriol*, v. 187, n. 24, p. 8450–8461, Dec 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.24%.8450-8461.2005>>.
- 66 FRANZA, T.; MAHÉ, B.; EXPERT, D. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol*, v. 55, n. 1, p. 261–275, Jan 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958%.2004.04383.x>>.
- 67 HARE, R. S. et al. Genetic footprinting in bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 5, p. 1694–1706, Mar 2001. English Article J BACTERIOL.
- 68 GEHRING, A. M. et al. Genomewide insertional mutagenesis in *Streptomyces coelicolor* reveals additional genes involved in morphological differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 17, p. 9642–9647, Aug 15 2000. English Article PROC NAT ACAD SCI USA.
- 69 THIEME, F. et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, v. 187, n. 21, p. 7254–7266, Nov 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.21%.7254-7266.2005>>.
- 70 SIMPSON, A. J. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*, v. 406, n. 6792, p. 151–157, Jul 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35018003>>.
- 71 JOARDAR, V. et al. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol*, v. 187, n. 18, p. 6488–6498, Sep 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.18%.6488-6498.2005>>.
- 72 BELL, K. S. et al. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 30, p. 11105–11110, Jul 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0402424101>>.
- 73 QIAN, W. et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res*, v. 15, n. 6, p. 757–767, Jun 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.3378705>>.
- 74 WOOD, D. W. et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, v. 294, n. 5550, p. 2317–2323, Dec 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1066804>>.
- 75 FEIL, H. et al. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 31, p. 11064–11069, Aug 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504930102>>.

- 76 SLUYS, M. A. V. et al. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol*, v. 185, n. 3, p. 1018–1026, Feb 2003.
- 77 GOODNER, B. et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, v. 294, n. 5550, p. 2323–2328, Dec 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1066803>>.
- 78 MONTEIRO-VITORELLO, C. B. et al. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 17, n. 8, p. 827–836, Aug 2004.
- 79 SALANOUBAT, M. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, v. 415, n. 6871, p. 497–502, Jan 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/415497a>>.
- 80 RILEY, M. Genes and proteins of *Escherichia coli* K-12 (genprotecl). *Nucleic Acids Res*, v. 25, n. 1, p. 51–52, Jan 1997.
- 81 SOUTHERN, E.; MIR, K.; SHCHEPINOV, M. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics*, v. 21, p. 5–9, Jan 1999. English Review S NAT GENET.
- 82 SALLAM, K. I.; MITANI, Y.; TAMURA, T. Construction of random transposition mutagenesis system in *Rhodococcus erythropolis* using IS1415. *Journal of Biotechnology*, v. 121, p. 13–22, 2006.
- 83 GLASS, J. I. et al. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 2, p. 425–430, Jan 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510013103>>.
- 84 BENTON, B. M. et al. Large-scale identification of genes required for full virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, v. 186, n. 24, p. 8478–8489, Dec 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.24.8478-8489.2004>>.
- 85 LAASIK, E. et al. Novel mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* defective in the production of plant cell wall degrading enzymes generated by Mu transpososome-mediated insertion mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett*, v. 243, n. 1, p. 93–99, Feb 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.045>>.
- 86 GORYSHIN, I. Y. et al. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol*, v. 18, n. 1, p. 97–100, Jan 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/72017>>.
- 87 GORYSHIN, I. Y.; REZNIKOFF, W. S. Tn5 *in vitro* transposition. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 7367–7374, 1998.
- 88 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *MOLECULAR CLONING - A laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6.
- 89 ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, Sep 1 1997. English Article XU793 NUCL ACID RES. Disponível em: <<Go to ISI>://1997XU79300002>.

- 90 ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.
- 91 INNES, R. W.; HIROSE, M. A.; KUEMPEL, P. L. Induction of nitrogen-fixing nodules on clover requires only 32 kilobase pairs of DNA from the *Rhizobium trifolii* symbiosis plasmid. *J Bacteriol*, v. 170, n. 9, p. 3793–3802, Sep 1988.
- 92 YANG, M.-K.; SU wei C.; KUO, T.-T. Highly efficient transfection of *Xanthomonas campestris* by electroporation. *Bot Bull Academia Sinica*, v. 32, p. 197–203, 1991.
- 93 BROWN, J. S.; HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, n. 4, p. 390–394, Aug 1998. English Review CURR OPIN MICROBIOL.
- 94 FERREIRA, M. C. D. et al. Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Current Genetics*, v. 40, n. 1, p. 27–39, 2001. English Article AUG CURR GENETICS.
- 95 HUDSON, P. et al. Identification of a virulence-associated determinant, dihydrolipoamide dehydrogenase (lpd), in *Mycoplasma gallisepticum* through in vivo screening of transposon mutants. *Infect Immun*, v. 74, n. 2, p. 931–939, Feb 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.2.931-939.2006>>.
- 96 EPICENTRE. *EZ-Tn5 <KAN-2> Insertion Kit*. [S.l.], 2001. 14 p. Cat. No. EZI982K. Disponível em: <<http://www.epibio.com/pdftechlit/134pl065%-.pdf>>. Acesso em: 10/07/2001.
- 97 CORNELIS, G. R.; GIJSEGEM, F. V. Assembly and function of type iii secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 54, p. 735–774, 2000.
- 98 GIJSEGEM, F. van et al. *Ralstonia solanacearum* produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol Microbiol*, v. 36, p. 249–260, 2000.
- 99 JIN, Q.; HE, S. Y. Role of the Hrp pilus in type iii protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, v. 294, p. 2556–2558, 2001.
- 100 WEI, W. et al. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type iii secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, p. 2247–2252, 2000.
- 101 BONAS, U. et al. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*, v. 4, p. 81–88, 1991.
- 102 WENGELNIK, K.; ACKERVEKEN, G. Van den; BONAS, U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant-Microbe Interact*, v. 9, p. 704–712, 1996.
- 103 ROSSIER, O.; ACKERVEKEN, G. van den; BONAS, U. HrpB2 and hrpF from *Xanthomonas* are type iii-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 828–838, 2000.

- 104 SKORKO-GLONEK, J. et al. Site-directed mutagenesis of the htra (degp) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene*, v. 163, p. 47–52, 1995.
- 105 SASSOON, N.; ARIE, J. P.; BETTON, J. M. Pdz domains determine the native oligomeric structure of the degp (htra) protease. *Mol Microbiol*, v. 33, p. 583–589, 1999.
- 106 SPIERS, A. et al. Pdz domains facilitate binding of high temperature requirement protease a (htra) and tail-specific protease (tsp) to heterologous substrates through recognition of the small stable rna a (ssra)-encoded peptide. *J Biol Chem*, v. 277, p. 39443–39449, 2002.
- 107 SPIESS, C.; BEIL, A.; EHRMANN, M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, v. 97, p. 339–347, 1999.
- 108 KROJER, T. et al. Crystal structure of degp (htra) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, v. 416, p. 455–459, 2002.
- 109 LIPINSKA, B. et al. Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol*, v. 171, n. 3, p. 1574–1584, Mar 1989.
- 110 STRAUCH, K. L.; JOHNSON, K.; BECKWITH, J. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol*, v. 171, n. 5, p. 2689–2696, May 1989.
- 111 LASKOWSKA, E. et al. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. *Mol Microbiol*, v. 22, n. 3, p. 555–571, Nov 1996.
- 112 BAKKER, D. et al. Structure and function of periplasmic chaperone-like proteins involved in the biosynthesis of K88 and K99 fimbriae in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, v. 5, n. 4, p. 875–886, Apr 1991.
- 113 CAVARD, D.; LAZDUNSKI, C.; HOWARD, S. P. The acylated precursor form of the colicin A lysis protein is a natural substrate of the DegP protease. *J Bacteriol*, v. 171, n. 11, p. 6316–6322, Nov 1989.
- 114 JONES, C. H. et al. The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J*, v. 16, n. 21, p. 6394–6406, Nov 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.21.6394>>.
- 115 LIPINSKA, B.; ZYLICZ, M.; GEORGOPOULOS, C. The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J Bacteriol*, v. 172, n. 4, p. 1791–1797, Apr 1990.
- 116 JOHNSON, K. et al. The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol Microbiol*, v. 5, n. 2, p. 401–407, Feb 1991.



- 117 CHATFIELD, S. N. et al. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog*, v. 12, n. 2, p. 145–151, Feb 1992.
- 118 CORTES, G. et al. Role of the *htrA* gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect Immun*, v. 70, n. 9, p. 4772–4776, Sep 2002.
- 119 ELZER, P. H. et al. Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun*, v. 62, n. 10, p. 4135–4139, Oct 1994.
- 120 LI, S. R. et al. Construction and characterization of a *Yersinia enterocolitica* O:8 high-temperature requirement (*htrA*) isogenic mutant. *Infect Immun*, v. 64, n. 6, p. 2088–2094, Jun 1996.
- 121 YAMAMOTO, T. et al. Identification and characterization of the *Yersinia enterocolitica* *gsrA* gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. *Infect Immun*, v. 64, n. 8, p. 2980–2987, Aug 1996.
- 122 STACK, H. M. et al. Role for HtrA in stress induction and virulence potential in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n. 8, p. 4241–4247, Aug 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4241-4247.2005>>.
- 123 WILSON, R. L. et al. *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. *Infect Immun*, v. 74, n. 1, p. 765–768, Jan 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.1.765-768.2006>>.
- 124 PALLEN, M. J.; WREN, B. W. The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol*, v. 26, n. 2, p. 209–221, Oct 1997.
- 125 OTTO, M. Quorum-sensing control in *Staphylococci*—a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett*, v. 241, p. 135–141, 2004.
- 126 HAMZA, I. et al. The bacterial *irr* protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem*, v. 273, n. 34, p. 21669–21674, Aug 1998.
- 127 GILLES-GONZALEZ, M. A.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature*, v. 350, n. 6314, p. 170–172, Mar 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/350170a0>>.
- 128 LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, v. 70, n. 5, p. 705–707, Sep 1992.
- 129 VERMA, A. et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, v. 259, n. 5093, p. 381–384, Jan 1993.
- 130 MÉNDEZ, R.; MORENO, A.; HARO, C. de. Regulation of heme-controlled eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2 alpha-subunit kinase of reticulocyte lysates. *J Biol Chem*, v. 267, n. 16, p. 11500–11507, Jun 1992.

- 131 LATHROP, J. T.; TIMKO, M. P. Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science*, v. 259, n. 5094, p. 522–525, Jan 1993.
- 132 ZHANG, L.; GUARENTE, L. The yeast activator HAP1—a GAL4 family member—binds DNA in a directly repeated orientation. *Genes Dev*, v. 8, n. 17, p. 2110–2119, Sep 1994.
- 133 BEALE, S. I. Biosynthesis of hemes. In: \_\_\_\_\_. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2. ed. [S.l.]: ASM PRESS, 1996. cap. 49, p. 731–748.
- 134 MURPHY, M. J.; SIEGEL, L. M. Siroheme and sirohydrochlorin. The basis for a new type of porphyrin-related prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductases. *J. Biol. Chem.*, v. 248, p. 6911–6919, 1973.
- 135 MURPHY, M. J. et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. ii. identification of a new class of heme prosthetic group: an iron-tetrahydroporphyrin (isobacteriochlorin type) with eight carboxylic acid groups. *J. Biol. Chem.*, v. 248, p. 2801–2814, 1973.
- 136 MEYER, T. E.; CUSANOVICH, M. A. Structure, function and distribution of soluble bacterial redox proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 975, p. 1–28, 1989.
- 137 KAJIE, S.-I.; ANRAKU, Y. Purification of a hexaheme cytochrome *c*<sub>552</sub> from *Escherichia coli* k12 and its properties as a nitrite reductase. *Eur. J. Biochem.*, v. 154, p. 457–463, 1986.
- 138 KOHLER, C. et al. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 6928–6937, 2003.
- 139 EIFF, C. von et al. Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus* menD and hemB mutants with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol*, v. 188, n. 2, p. 687–693, Jan 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.2.687-693.2006>>.
- 140 FUCHS, T. M. et al. A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 15, p. 4445–4452, 1996.
- 141 SCHULEIN, R.; DEHIO, C. The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Molecular Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1053–1067, 2002.
- 142 LEROUGE, I. et al. Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v. 276, n. 20, p. 17190–17198, 2001.
- 143 WALLBRUNN, A. von; HEIPIEPER, H. J.; MEINHARDT, F. Cis/trans isomerisation of unsaturated fatty acids in a cardiolipin synthase knock-out mutant of *Pseudomonas putida* p8. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 60, p. 179–185, 2002.

- 144 AMY, M. T. et al. Precise excision and secondary transposition of Tnp<sub>HoA</sub> in non-motile mutants of a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis clinical isolate. *FEMS Microbiol Lett*, v. 245, n. 2, p. 263–269, Apr 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.018>>.
- 145 GENDEL, S. M. Instability of Tn5 inserts in cyanobacterial cloning vectors. *J Bacteriol*, v. 169, n. 10, p. 4426–4430, Oct 1987.
- 146 SCARLATO, V.; GARGANO, S. The dna polymerase-encoding gene of *Bacillus subtilis* bacteriophage spo1. *Gene*, v. 118, n. 1, p. 109–113, Sep 1992.
- 147 OLSEN, L. C. et al. Molecular cloning of human uracil-dna glycosylase, a highly conserved dna repair enzyme. *EMBO J*, v. 8, n. 10, p. 3121–3125, Oct 1989.
- 148 MUKAIHARA, T. et al. Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*, v. 54, n. 4, p. 863–875, Nov 2004.
- 149 GUINEY, D. G. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 4, p. 565–568, Feb 15 1997. English Article WK408 J CLIN INVEST.
- 150 ECKMANN, L. et al. Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria salmonella. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 19, p. 14084–14094, May 12 2000. English Article 313NZ J BIOL CHEM. Disponível em: <<Go to ISI>://000087006900013>.
- 151 IYER, V. et al. Use of DNA microarrays to monitor differential gene expression in yeast and humans. *Faseb Journal*, v. 11, n. 9, p. 1571, Jul 31 1997. English Meeting Abstract S ZK302 FASEB J. Disponível em: <<Go to ISI>://000073305602056>.
- 152 RICHMOND, C. S. et al. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 19, p. 3821–3835, Oct 1 1999. English Article 243CZ NUCL ACID RES. Disponível em: <<Go to ISI>://000082980600007>.
- 153 COTTER, P. A.; MILLER, J. F. In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, n. 1, p. 17–26, Feb 1998. English Review CURR OPIN MICROBIOL.
- 154 BOHNE, J. et al. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Molecular Microbiology*, v. 20, n. 6, p. 1189–1198, Jun 1996. English Article MOL MICROBIOL.
- 155 SOKOLOVIC, Z. et al. Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 10, p. 4008–4019, Oct 1996. English Article INFEC IMMUNITY.
- 156 SHOLBERG, P. et al. Development of a DNA microarray for detection and monitoring of economically important apple diseases. *PLANT DISEASE*, v. 89, n. 11, p. 1143–1150, Nov 2005.

- 157 SCHULTE, R.; BONAS, U. Expression of *xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* hrp cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.*, v. 174, p. 815–823, 1992.
- 158 ASTUA-MONGE, G. et al. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, v. 187, n. 3, p. 1201–1205, 2005.
- 159 OLIVEIRA, R. et al. Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *xylella fastidiosa* strains. *FEMS Microbiology Letters*, v. 216, n. 1, p. 15–21, 2002.
- 160 SOUZA, A. A. de et al. Analysis of gene expression in two growth states of *xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 16, n. 10, p. 867–875, 2003.
- 161 SLUYS, M. A. V. et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, v. 40, p. 169–189, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto-40.030402.090559>>.
- 162 LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C.; CAMPANHARO, J. ao C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 219, n. 1, p. 39–45, Feb 2003.
- 163 PASHALIDIS, S. et al. Whole-genome expression profiling of *xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *OMICS-A JOURNAL OF INTEGRATIVE BIOLOGY*, v. 9, n. 1, p. 77–90, mar. 2005.
- 164 KOIDE, T.; VÊNCIO, R. Z. N.; GOMES, S. L. Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *xylella fastidiosa*. *J Bacteriol*, v. 188, n. 16, p. 5821–5830, Aug 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.00182-06>>.
- 165 HE, Y.-W. et al. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol*, v. 59, n. 2, p. 610–622, Jan 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958%2005.04961.x>>.
- 166 BARBER, C. E. et al. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol*, v. 24, n. 3, p. 555–566, May 1997.
- 167 ZHAO, Y.; BLUMER, S. E.; SUNDIN, G. W. Identification of *erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol*, v. 187, n. 23, p. 8088–8103, Dec 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.23%2005.8088-8103>>.
- 168 OKINAKA, Y. et al. Microarray profiling of *erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 15, n. 7, p. 619–629, Jul 2002.

- 169 MARK, G. L. et al. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 48, p. 17454–17459, Nov 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506407102>>.
- 170 BALDWIN, D. N. et al. Identification of helicobacter pylori genes that contribute to stomach colonization. *Infect Immun*, v. 75, n. 2, p. 1005–1016, Feb 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/28/IAI.01176-06>>.
- 171 GIBSON, K. E. et al. The symbiosis regulator cbra modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J Bacteriol*, Jan 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/34-06>>.
- 172 KOSTIĆ, T. et al. A microbial diagnostic microarray technique for the sensitive detection and identification of pathogenic bacteria in a background of nonpathogens. *Anal Biochem*, v. 360, n. 2, p. 244–254, Jan 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006%2009.026>>.
- 173 SALAMA, N. R.; SHEPHERD, B.; FALKOW, S. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, v. 186, n. 23, p. 7926–7935, Dec 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.23%207926-7935.2004>>.
- 174 AAKRA, A. et al. A survey of genomic diversity in enterococcus faecalis by microarray based comparative genomic hybridization. *Appl Environ Microbiol*, Jan 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01599-06>>.
- 175 HAMELIN, K. et al. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in escherichia coli isolates from different aquatic ecosystems within the st. clair river and detroit river areas. *Appl Environ Microbiol*, v. 73, n. 2, p. 477–484, Jan 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01445-06>>.
- 176 WILLIAMS, E. et al. Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon pyrococcus furiosus exposed to gamma irradiation. *Extremophiles*, v. 11, n. 1, p. 19–29, Jan 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00792-006-0002-9>>.
- 177 FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of haemophilus influenzae rd. *Science*, v. 269, n. 5223, p. 496–512, Jul 1995.
- 178 SANCHEZ-CORTES, S. et al. Adsorption of polyethyleneimine on silver nanoparticles and its interaction with a plasmid dna: a surface-enhanced raman scattering study. *Biomacromolecules*, v. 3, n. 4, p. 655–660, 2002.
- 179 EHRENREICH, A. Dna microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 73, n. 2, p. 255–273, Nov 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0584-2>>.
- 180 R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2006. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.
- 181 SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. In: \_\_\_\_\_. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer, 2005. p. 397–420.

- 182 SMYTH, G. K.; MICHAUD, J.; SCOTT, H. S. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, v. 21, n. 9, p. 2067–2075, May 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti270>>.
- 183 YANG, Y. H. et al. Normalization for cDNA microarray data. In: BITTNER, M. L. et al. (Ed.). SPIE, 2001. v. 4266, n. 1, p. 141–152. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/?PSI/4266/141/1>>.
- 184 YANG, Y. H. et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*, v. 30, n. 4, p. e15, Feb 2002.
- 185 SMYTH, G. K.; SPEED, T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, v. 31, n. 4, p. 265–273, Dec 2003.
- 186 BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B*, v. 57, p. 289–300, 1995.
- 187 CONESA, A.; NUEDA, M. J. *maSigPro: Significant Gene Expression Profile Differences in Time Course Microarray Data*. [S.l.], 2005. R package version 1.6.0. Disponível em: <<http://www.ivia.es/centrogenomica/bioinformatics.htm>>.
- 188 TAI, Y. C. *timecourse: Statistical Analysis for Developmental Microarray Time Course Data*. [S.l.], 2005. R package version 1.6.0. Disponível em: <<http://www.stat.berkeley.edu/~terry/Group-research/timecourse.html>>.
- 189 PHIMISTER, B. Going global. *Nature Genetics*, v. 21, p. 1, 1999.
- 190 GRAHAM, M. R. et al. Analysis of the transcriptome of group A streptococcus in mouse soft tissue infection. *Am J Pathol*, v. 169, n. 3, p. 927–942, Sep 2006.
- 191 ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 20, p. 417a–417e, 2002.
- 192 LI, B. et al. A simple and convenient approach for isolating RNA from highly viscous plant tissue rich in polysaccharides. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 49, n. 2, p. 101–105, May 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.03.006>>.
- 193 MANICKAVELU, A. et al. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 54, n. 2, p. 254–258, Feb 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.024>>.
- 194 BAELDE, H. J. et al. High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma. *J Clin Pathol*, v. 54, n. 10, p. 778–782, Oct 2001.
- 195 CULLEY, D. E. et al. Optimization of RNA isolation from the archaeobacterium *Methanosarcina barkeri* and validation for oligonucleotide microarray analysis. *J Microbiol Methods*, v. 67, n. 1, p. 36–43, Oct 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.014>>.

- 196 RINCÓN, A. M.; VÁSQUEZ, A. M.; PADILLA, F. C. [chemical composition and bioactive compounds of flour of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela]. *Arch Latinoam Nutr*, v. 55, n. 3, p. 305–310, Sep 2005.
- 197 ARAGON, A. D. et al. Release of extraction-resistant mRNA in stationary phase *Saccharomyces cerevisiae* produces a massive increase in transcript abundance in response to stress. *Genome Biol*, v. 7, n. 2, p. R9, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-2-r9>>.
- 198 JOHNSON, D. E. Inhibition of RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by beta-exotoxin. *Can J Microbiol*, v. 24, n. 5, p. 537–543, May 1978.
- 199 QIU, J. et al. Microarray expression profiling of *Yersinia pestis* in response to chloramphenicol. *FEMS Microbiol Lett*, v. 263, n. 1, p. 26–31, Oct 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968%2006.00394.x>>.
- 200 LAWSON, J. N.; LYONS, C. R.; JOHNSTON, S. A. Expression profiling of *Yersinia pestis* during mouse pulmonary infection. *DNA Cell Biol*, v. 25, n. 11, p. 608–616, Nov 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/dna.2006.25.608>>.
- 201 CIESIOLKA, L. D. et al. Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBst*. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 12, n. 1, p. 35–44, Jan 1999.
- 202 KNOOP, V.; STASKAWICZ, B.; BONAS, U. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J Bacteriol*, v. 173, n. 22, p. 7142–50, 1991. Using Smart Source Parsing Nov.
- 203 PARKER, J. E. et al. Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X. c.* pv. *raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 6, n. 2, p. 216–224, 1993.
- 204 CARVALHO, F. M. de S. *Expressão gênica em Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- 205 ANTHONY, K. G. et al. Analysis of the *tralekbp* sequence and the trap protein from three *f*-like plasmids: *F*, *r100-1* and *colb2*. *J Bacteriol*, v. 178, n. 11, p. 3194–3200, Jun 1996.
- 206 KORTT, A. A.; STEWART, D. J. *Dichelobacter* (sheep foot-rot) basic serine proteinase. In: \_\_\_\_\_. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2. ed. London: Elsevier, 2004. p. 1811–1813.
- 207 RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. Merops: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, v. 34, n. Database issue, p. D270–D272, Jan 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj089>>.
- 208 TANS-KERSTEN, J.; HUANG, H.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol*, v. 183, n. 12, p. 3597–3605, Jun 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.12%2001>>.

- 209 MACNAB, R. M. Flagella and motility. In: \_\_\_\_\_. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2. ed. Washington, D. C.: ASM Press, 1996. v. 1, p. 123–145.
- 210 AKIBA, T.; YOSHIMURA, H.; NAMBA, K. Monolayer crystallization of flagellar l-p rings by sequential addition and depletion of lipid. *Science*, v. 252, n. 5012, p. 1544–1546, Jun 1991.
- 211 HOMMA, M. et al. The flafix gene product of salmonella typhimurium is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J Bacteriol*, v. 169, n. 4, p. 1493–1498, Apr 1987.
- 212 JONES, C. J.; HOMMA, M.; MACNAB, R. M. L-, p-, and m-ring proteins of the flagellar basal body of salmonella typhimurium: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol*, v. 171, n. 7, p. 3890–3900, Jul 1989.
- 213 HIZUKURI, Y. et al. Role of the intramolecular disulfide bond in flgi, the flagellar p-ring component of escherichia coli. *J Bacteriol*, v. 188, n. 12, p. 4190–4197, Jun 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.01896-05>>.
- 214 NAMBU, T.; KUTSUKAKE, K. The salmonella flga protein, a putativeve periplasmic chaperone essential for flagellar p ring formation. *Microbiology*, v. 146 ( Pt 5), p. 1171–1178, May 2000.
- 215 JONES, C. J. et al. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of salmonella typhimurium. *J Mol Biol*, v. 212, n. 2, p. 377–387, Mar 1990.
- 216 KUBORI, T. et al. Morphological pathway of flagellar assembly in salmonella typhimurium. *J Mol Biol*, v. 226, n. 2, p. 433–446, Jul 1992.
- 217 SOSINSKY, G. E. et al. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of salmonella typhimurium by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, n. 11, p. 4801–4805, Jun 1992.
- 218 CHAO, X. et al. A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation. *Cell*, v. 124, n. 3, p. 561–571, Feb 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.046>>.
- 219 JONES, B. D.; LEE, C. A.; FALKOW, S. Invasion by salmonella typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun*, v. 60, n. 6, p. 2475–2480, Jun 1992.
- 220 STECHER, B. et al. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of salmonella enterica serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*, v. 72, n. 7, p. 4138–4150, Jul 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>>.
- 221 BORKOVICH, K. A.; SIMON, M. I. The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell*, v. 63, n. 6, p. 1339–1348, Dec 1990.
- 222 CONLEY, M. P. et al. Both chea and chew are required for reconstitution of chemotactic signaling in escherichia coli. *J Bacteriol*, v. 171, n. 9, p. 5190–5193, Sep 1989.
- 223 PARKINSON, J. S. chea, cheb, and chec genes of escherichia coli and their role in chemotaxis. *J Bacteriol*, v. 126, n. 2, p. 758–770, May 1976.



- 224 REIZER, J. et al. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of pts proteins encoded within the genome of bacillus subtilis. *Microbiology*, v. 145 ( Pt 12), p. 3419–3429, Dec 1999.
- 225 WYLIE, J. L.; WOROBEK, E. A. The oprb porin plays a central role in carbohydrate uptake in pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, v. 177, n. 11, p. 3021–3026, Jun 1995.
- 226 MOREIRA, L. M. et al. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, v. 42, p. 163–184, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto.42.040803.140310>>.
- 227 RENSING, C.; PRIBYL, T.; NIES, D. H. New functions for the three subunits of the czcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol*, v. 179, n. 22, p. 6871–6879, Nov 1997.
- 228 WAIDNER, B. et al. Identification by rna profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants crda (hp1326), crdb (hp1327), and czcb (hp1328) in helicobacter pylori. *J Bacteriol*, v. 184, n. 23, p. 6700–6708, Dec 2002.
- 229 NIES, D. H. et al. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from alcaligenes eutrophus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 19, p. 7351–7355, Oct 1989.
- 230 GIJSEGEM, F. V. In planta regulation of phytopathogenic bacteria virulence genes: relevance of plant-derived signals. *European Journal of Plant Pathology*, v. 103, p. 291–301, 1997.
- 231 BACKERT, S.; MEYER, T. F. Type iv secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, v. 9, n. 2, p. 207–217, Apr 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.008>>.
- 232 HUBBER, A. et al. Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the mesorhizobium loti strain r7a virb/d4 type iv secretion system. *Mol Microbiol*, v. 54, n. 2, p. 561–574, Oct 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958%.2004.04292.x>>.
- 233 VERGUNST, A. C. et al. Virb/d4-dependent protein translocation from agrobacterium into plant cells. *Science*, v. 290, n. 5493, p. 979–982, Nov 2000.
- 234 VERGUNST, A. C. et al. Recognition of the agrobacterium tumefaciens vire2 translocation signal by the virb/d4 transport system does not require vire1. *Plant Physiol*, v. 133, p. 978–988, 2003.
- 235 SCHRAMMEIJER, B. et al. Analysis of vir protein translocation from agrobacterium tumefaciens using saccharomyces cerevisiae as a model: evidence for transport of a novel effector protein vire3. *Nucleic Acids Res*, v. 31, p. 860–868, 2003.
- 236 ALEGRIA, M. C. et al. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type iv secretion loci of the phytopathogen xanthomonas axonopodis pv. citri. *J Bacteriol*, v. 187, n. 7, p. 2315–2325, Apr 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.7.2315-2325.2005>>.

- 237 SCHNEIKER, S. et al. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid psb102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. *Nucleic Acids Res*, v. 29, n. 24, p. 5169–5181, Dec 2001.
- 238 LIU, P.; NESTER, E. W. Indoleacetic acid, a product of transferred dna, inhibits vir gene expression and growth of agrobacterium tumefaciens c58. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 12, p. 4658–4662, Mar 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600366103>>.
- 239 SAHI, S. V.; CHILTON, M. D.; CHILTON, W. S. Corn metabolites affect growth and virulence of agrobacterium tumefaciens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, n. 10, p. 3879–3883, May 1990.
- 240 ZHANG, J. et al. At the maize/agrobacterium interface: natural factors limiting host transformation. *Chem Biol*, v. 7, n. 8, p. 611–621, Aug 2000.
- 241 MORÉ, M. I. et al. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, v. 272, n. 5268, p. 1655–1658, Jun 1996.
- 242 JIANG, Y. et al. In vitro biosynthesis of the pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule n-butanoyl-l-homoserine lactone. *Mol Microbiol*, v. 28, n. 1, p. 193–203, Apr 1998.
- 243 TELFORD, G. et al. The pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule n-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun*, v. 66, n. 1, p. 36–42, Jan 1998.
- 244 GARDINER, S. M. et al. Haemodynamic effects of the bacterial quorum sensing signal molecule, n-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone, in conscious, normal and endotoxaemic rats. *Br J Pharmacol*, v. 133, n. 7, p. 1047–1054, Aug 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704174>>.
- 245 POPLAWSKY, A. R. et al. A gene for a dioxygenase-like protein determines the production of the df signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Pathol*, v. 6, p. 653–657, 2005.
- 246 TANG, J. L. et al. Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet*, v. 226, n. 3, p. 409–417, May 1991.
- 247 SLATER, H. et al. A two-component system involving an hd-gyp domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*, v. 38, p. 986–1003, 2000.
- 248 WANG, L.-H. et al. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol*, v. 51, n. 3, p. 903–912, Feb 2004.
- 249 NEWMAN, K. L. et al. Cell-cell signaling controls xylella fastidiosa interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 6, p. 1737–1742, Feb 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308399100>>.

- 250 CROSSMAN, L.; DOW, J. M. Biofilm formation and dispersal in *xanthomonas campestris*. *Microbes Infect*, v. 6, n. 6, p. 623–629, May 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2004.01.013>>.
- 251 WILSON, T. J. et al. The *rpfa* gene of *xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. *Mol Microbiol*, v. 28, n. 5, p. 961–970, Jun 1998.
- 252 DOW, J. M. et al. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *xanthomonas campestris*. *Microbiology*, v. 146 ( Pt 4), p. 885–891, Apr 2000.
- 253 DOWNING, K. J. et al. Mutants of *mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect Immun*, v. 73, n. 5, p. 3038–3043, May 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.5.3038-3043.2005>>.
- 254 ANDRADE, M. O. et al. The *hd-gyp* domain of *rpfG* mediates a direct linkage between the *rpf* quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 537–551, 2006. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2006.05386.x>>.
- 255 JAIN, R.; GOMER, R. H. A developmentally regulated cell surface receptor for a density-sensing factor in *dictyostelium*. *J Biol Chem*, v. 269, n. 12, p. 9128–9136, Mar 1994.
- 256 JAIN, R. et al. A density-sensing factor controls development in *dictyostelium*. *Genes Dev*, v. 6, n. 3, p. 390–400, Mar 1992.
- 257 DEERY, W. J.; GOMER, R. H. A putative receptor mediating cell-density sensing in *dictyostelium*. *J Biol Chem*, v. 274, n. 48, p. 34476–34482, Nov 1999.
- 258 KOONIN, E. V.; GALPERIN, M. Y. *Sequence - Evolution - Function. Computational Approaches in Comparative Genomics*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- 259 HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. Type iii protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1694, p. 181–206, 2004.
- 260 BLOCKER, A.; KOMORIYA, K.; AIZAWA, S.-I. Type iii secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 6, p. 3027–3030, Mar 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0535335100>>.
- 261 NAVARRO, L.; ALTO, N. M.; DIXON, J. E. Functions of the *yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol*, v. 8, p. 21–27, 2005.
- 262 CHANG, J. H. et al. A high-throughput, near-saturating screen for type iii effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 2549–2554, 2005.
- 263 MUDGETT, M. B. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type iii effectors in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 56, p. 509–531, 2005.

- 264 ALEGRIA, M. C. et al. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type iii secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *J Bacteriol*, v. 186, n. 18, p. 6186–6197, Sep 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.18.6186-6197.2004>>.
- 265 B'UTTNER, D.; BONAS, U. Port of entry – the type iii secretion translocon. *Trends in Microbiology*, v. 10, p. 186–192, 2002.
- 266 B'UTTNER, D. et al. Functional analysis of hrpf, a putative type iii translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 9, p. 2389–+, May 2002. English Article 541TK J BACTERIOL. Disponível em: <<Go to ISI>://000175000400007>.
- 267 PETNICKI-OCWIEJA, T.; DIJK, K. van; ALFANO, J. R. The hrpk operon of *Pseudomonas syringae* pv. tomato dc3000 encodes two proteins secreted by the type iii (hrp) protein secretion system: Hopb1 and hrpk, a putative type iii translocator. *J Bacteriol*, v. 187, p. 649–663, 2005.
- 268 SUGIO, A.; YANG, B.; WHITE, F. F. Characterization of the hrpf pathogenicity peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. *Mol Plant Microbe Interact*, v. 18, p. 546–554, 2005.
- 269 KUBORI, T. et al. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type iii protein secretion system. *Science*, v. 280, p. 602–605, 1998.
- 270 GALÁN, J. E.; COLLMER, A. Type iii secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, v. 284, p. 1322–1328, 1999.
- 271 WENGELNIK, K.; ROSSIER, O.; BONAS, U. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria result in constitutive expression of all *hrp* genes. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 6828–6831, 1999.
- 272 ALDON, D. et al. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal*, v. 19, p. 2304–2314, 2000.
- 273 BRITO, B. et al. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by *prha* in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, v. 31, p. 237–251, 1999.
- 274 BRITO, B. et al. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, p. 109–119, 2002.
- 275 CORNELIS, G. R. The type iii secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, v. 4, n. 11, p. 811–825, Nov 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1526>>.
- 276 AIZAWA, S. I. Bacterial flagella and type iii secretion systems. *FEMS Microbiol Lett*, v. 202, n. 2, p. 157–164, Aug 2001.
- 277 MACNAB, R. M. Type iii flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta*, v. 1694, n. 1-3, p. 207–217, Nov 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer-2004.04.005>>.

## ***ANEXO A – Categorias gênicas definidas para Xanthomonas axonopodis pv. citri***

- I. Metabolismo intermediário
  - A. Degradation
    - \* 1. Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos
    - \* 2. Degradação de pequenas moléculas
    - \* 3. Degradação de lipídios
  - B. Metabolismo intermediário central
    - \* 1. Açúcares amino
    - \* 2. “Entner-Doudoroff”
    - \* 3. Gliconeogênese
    - \* 4. Ciclo do glioxilato
    - \* 5. Metabolismo variado da glicose
    - \* 6. Via não oxidativa, via das pentoses
    - \* 7. Hidrólise de nucleotídeos
    - \* 8. Interconversão de nucleotídeos
    - \* 9. Compostos fosfatados
    - \* 10. Conversões com propósitos múltiplos
    - \* 11. Açúcar nucleotídeo biossíntese, conversão
    - \* 12. Metabolismo de enxofre
  - C. Metabolismo energético, carbono
    - \* 1. Respiração aeróbica

- \* 2. Fermentação e respiração anaeróbica
- \* 3. Transporte de elétrons
- \* 4. Glicólise
- \* 5. Via oxidativa, via das pentoses
- \* 6. Piruvato desidrogenase
- \* 7. Ciclo do ácido tri-carboxílico
- \* 8. Fluxo de elétrons interconversão
- D. Funções regulatórias
  - \* 1. Sistema de dois componentes
  - \* 2. Ativadores–repressores
  - \* 3. Cinases–fosfatases
  - \* 4. Fatores sigmas e outros componentes regulatórios
  - \* 5. Não usado
- II. Biossíntese de pequenas moléculas
  - A. Biossíntese de aminoácidos
    - \* 1. Família do glutamato | assimilação de nitrogênio
    - \* 2. Famílias do aspartato e do piruvato
    - \* 3. Família da glicina–serina | metabolismo de enxofre
    - \* 4. Família dos aminoácidos aromáticos
    - \* 5. Histidina
  - B. Biossíntese de nucleotídeos
    - \* 1. Ribonucleotídeos purínicos
    - \* 2. Ribonucleotídeos pirimidínicos
    - \* 3. 2'–Deoxirribonucleotídeos
    - \* 4. Salvamento de nucleosídeos e nucleotídeos
  - C. Biossíntese de açúcares e de açúcar nucleotídeo
  - D. Biossíntese de carreadores, grupos prostéticos e de cofatores
    - \* 1. Biotina
    - \* 2. Ácido fólico

- \* 3. Lipoato
- \* 4. Molibdopterina
- \* 5. Pantotenato
- \* 6. Piridoxina
- \* 7. Nucleotídeos de piridina
- \* 8. Tiamina
- \* 9. Riboflavina
- \* 10. Tioredoxina, glutaredoxina, glutationa
- \* 11. Menaquinona, ubiquinona
- \* 12. Heme, porfirina
- \* 13. Proteína transportadora de carboxibiotina (BCCP)
- \* 14. Cobalamina
- \* 15. Enteroquelina
- \* 16. Biopterina
- \* 17. Outras
- E. Biossíntese de ácidos graxos e de ácidos fosfatídicos
- F. Biossíntese de poliaminas
- III. Metabolismo de macromoléculas
  - A. Metabolismo de DNA
    - \* 1. Replicação
    - \* 2. Proteína estrutural de ligação de DNA
    - \* 3. Recombinação
    - \* 4. Reparo
    - \* 5. Restrição, modificação
  - B. Metabolismo de RNA
    - \* 1. RNAs estável e ribossomal
    - \* 2. Proteínas ribossomais
    - \* 3. Ribossomos – maturação e modificação
    - \* 4. RNAt aminoacil sintetase, modificação de RNAt

- \* 5. Síntese de RNA, modificação, transcrição de DNA
- \* 6. Degradação de RNA
- C. Metabolismo de proteína
  - \* 1. Tradução e modificação
  - \* 2. Chaperonas
  - \* 3. Degradação de proteína
- D. Metabolismo de outras macromoléculas
  - \* 1. Polissacarídeos
  - \* 2. Fosfolipídeos
  - \* 3. Lipoproteína
- IV. Estrutura celular
  - A. Componentes de membrana
    - \* 1. Membrana interna
    - \* 2. Constituintes de membrana externa
  - B. Saco de mureína, peptidoglicano
  - C. Polissacarídeos de superfície, lipopolissacarídeos e antígenos
  - D. Estruturas de superfícies
- V. Processos celulares
  - A. Transporte
    - \* 1. Aminoácidos, amins
    - \* 2. Ânions
    - \* 3. Carboidratos, ácidos orgânicos, álcoois
    - \* 4. Cátions
    - \* 5. Nucleosídeos, purinas, pirimidinas
    - \* 6. Proteína, secreção de peptídeo
    - \* 7. Outro
  - B. Divisão celular
  - C. Mobilidade e quimiotaxia



- D. Adaptação osmótica
- E. Morte celular
- VI. Elementos genéticos móveis
  - A. Funções relacionadas a fagos e profagos
  - B. Funções relacionadas a plasmídeos
  - C. Funções relacionadas a transposons e a íntrons
- VII. Patogenicidade, virulência e adaptação
  - A. Avirulência
  - B. Resposta hipersensível e patogenicidade
  - C. Produção de toxinas e detoxificação
  - D. Degradação da parede celular do hospedeiro
  - E. Exopolissacarídeos
  - F. Proteínas de superfície
  - G. Adaptação, condições atípicas
  - H. Outro
- VIII. Hipotética
  - A. Proteínas hipotéticas conservadas
  - B. Proteínas hipotéticas (incluí “no hits” ou somente baixo “score hits”)
  - C. Proteínas hipotéticas conservadas em *Xanthomonas*
- IX. ORFs com categoria indefinida

# 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](#)