

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Mariana de Souza e Silva

“Caracterização dos genes de adesão na formação do biofilme e na patogenicidade de *Xylella fastidiosa* e expressão diferencial de proteínas”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>MARIANA DE SOUZA E SILVA</u> <u>M. Machado</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Machado

Co-Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Si38c	<p>Silva, Mariana de Souza e, 1978- Caracterização dos genes de adesão na formação do biofilme e na patogenicidade de <i>Xylella fastidiosa</i> e expressão diferencial de proteínas / Mariana de Souza e Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Marcos Antônio Machado. Coorientador: Alessandra Alves de Souza. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Xylella fastidiosa</i>. 2. Mutação (Biologia). 3. Biofilme. 4. Proteínas. I. Machado, Marcos Antônio. II. Souza, Alessandra Alves de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization of the adhesion genes in biofilm formation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* and differential expression of proteins

Palavras-chave em Inglês:

Xylella fastidiosa

Mutation (Biology)

Biofilms

Proteins Biological models

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcos Antônio Machado [Orientador]

José Camillo Novello

Helvécio Della Colletta-Filho

Siu Mui Tsai

Anete Pereira de Souza

Data da defesa: 21-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

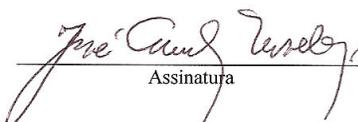
Campinas, 21 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antônio Machado (Orientador)


Assinatura

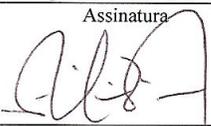
Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Helvécio Della Coletta-Filho


Assinatura

Profa. Dra. Siu Mui Tsai


Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Galembeck

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Assinatura

Agradecimentos

Aos meus pais José Antonio e Fátima por terem me ensinado o valor do trabalho, da dignidade e do respeito. Ao meu irmão Gustavo pela alegria e companheirismo.

Ao meu marido Ricardo pela cumplicidade e carinho, e por compartilharmos nossos dias de forma tão prazerosa.

Ao meu filho Matheus por tornar minha vida completa.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Machado pela orientação, pela confiança em meu trabalho e pela seriedade na formação de seus alunos.

À Dra. Alessandra Alves de Souza pela co-orientação, inclusive em minha iniciação científica, pelos muitos ensinamentos e por sua dedicação em me ensinar o “caminho” da pesquisa, além da amizade e compreensão em todos os momentos que passamos juntas nesses anos, podendo ser considerada uma segunda mãe.

Ao Prof. Elliot Kitajima-ESALQ/USP pela colaboração nos experimentos de microscopia.

Ao Prof. Carlos Labate-ESALQ/USP, pela colaboração no trabalho de estudo de expressão diferencial de proteínas e também pela ajuda de seus alunos.

Aos professores componentes da banca da qualificação pelas sugestões.

Aos pesquisadores, funcionários e colegas do Centro de Citricultura APTA-Citros “Sylvio Moreira” pelo bom convívio.

Às funcionárias Rose e Anita, pelo apoio, amizade, disponibilidade em ajudar sempre que possível e pelos “cafezinhos fresquinhos” que ajudam a acalmar e pensar melhor no trabalho.

Ao Grupo da *Xylella*, Raquel Caserta (Carques), Carolina Munari, Lígia, Jacqueline, Gabriela Carrer, Danila, Juarez, Simone, Mariana, Flávia, Marco Takita, Helvécio e Alessandra pelo compartilhamento de idéias, críticas e sugestões para que todos os trabalhos do grupo estejam sempre muito bem elaborados.

À minha grande amiga Carques, por me ajudar, escutar e apoiar em todos os momentos que passamos juntas, pelas alegrias e tristezas, pelos sucessos, pelos doces da Zuleika que sempre ajudaram na concentração e manutenção do equilíbrio emocional e principalmente pela amizade.

À Eliane Locali, uma grande amiga e companheira que desde que comecei meu estágio em 1997 no Centro de Citricultura sempre esteve presente e me apoiou em tudo. Pelos almoços divertidos e pelas gargalhadas sem fim mesmo quando tudo parecia estar “perdido”.

Aos amigos do laboratório Thiago, Giseli, Kleber, Rosângela, Valéria, Rodrigo, Karen, Layanne, Janayna, Adriano, Amélia, Kely e Silvia pelo companheirismo no laboratório.

Ao Luciano Kishi pela ajuda com as análises de bioinformática.

Aos pesquisadores Raquel Boscariol e Rodrigo Boareto pelas agradáveis viagens à Cordeirópolis e amizade.

À Capes/CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para meu aprendizado durante essa etapa.

Resumo

Xylella fastidiosa é o agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), da doença de Pierce em videiras e doenças em muitas outras culturas. Com o seqüenciamento completo do genoma de várias linhagens deste organismo, a função de cada gene, principalmente os ligados à virulência ainda estão pouco caracterizados. A fixação da *X. fastidiosa* nos vasos do xilema e no canal alimentar dos insetos vetores, cigarrinhas, é necessária para a virulência, formação de biofilme e transmissão desta bactéria. Uma vez que o gene *pilC* está envolvido na formação do pili tipo IV e este por sua vez é importante na motilidade e formação do biofilme, neste presente trabalho é mostrado dados fenotípicos obtidos com a interrupção de *pilC* na linhagem J1a12 de *X. fastidiosa*. A interrupção do gene *pilC* na linhagem J1a12 foi obtida por recombinação homóloga utilizando o plasmídeo pUCBM21oriC. Reação de polimerase em cadeia (PCR) e análises por Southern blot dos mutantes indicaram que o gene cromossômico foi substituído pelo gene truncado e com isso a produção da proteína correspondente, PilC, não foi indicada pelo Western blot. Microscopia eletrônica de varredura transmissão revelou que o tamanho e o número das fímbrias foi reduzido para os mutantes de *pilC* de *X. fastidiosa*. Esses mutantes não mostraram capacidade de colonização das regiões acima do ponto de inoculação dos vasos do xilema da planta de laranja Pêra e, além disso, não apresentaram formação de biofilme.

No estudo da formação do biofilme, a caracterização da expressão de proteínas foi realizada através do uso da eletroforese de primeira e segunda dimensão e a espectrometria de massa encontramos um total de 456 proteínas expressas na condição de biofilme maduro e 387 proteínas no crescimento planctônico, sendo que, o biofilme apresentou 37% (ou 144 proteínas) diferencialmente expressas em relação ao crescimento planctônico. As alterações encontradas no estado fisiológico das células em biofilme podem ser explicadas pela diferença no padrão de proteínas encontrado. Essas proteínas são produtos correspondentes à 31 genes presentes no biofilme maduro da linhagem isolada de citros 9a5c, esses foram envolvidos na adaptação, no metabolismo e na adesão dessa bactéria. Foi observado superexpressão de genes relacionados ao *quorum sensing*, comprovando a existência da comunicação entre células e com isso, o desenvolvimento da estruturação do biofilme (biofilme maduro) levando à obstrução dos vasos e desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*, mutantes, biofilme, expressão de proteínas.

Abstract

Xylella fastidiosa is the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC), Pierce's disease in grapevines and other diseases in many crops. With the full genome sequencing of several strains of this organism, the function of each gene, particularly those related to virulence are still poorly characterized. The setting of *X. fastidiosa* in xylem vessels and the alimentary canal of insects, leafhoppers, is required for virulence, biofilm formation and transmission of this bacterium. Once the gene is involved in the formation *pilC* of type IV pili and this in turn is important in motility and biofilm formation, this work is shown in this phenotypic data obtained with the interruption in the strain of *pilC* J1a12 *X. fastidiosa*. The interruption of the gene *pilC* in the strain J1a12 was obtained by homologous recombination using the plasmid pUCBM21oriC. Polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot analysis of mutants indicated that the chromosomal gene was replaced by the truncated gene and thereby producing the corresponding protein, PilC was not indicated by Western blot. Scanning transmission electron microscopy revealed that the size and number of fimbriae was reduced for the mutants of *pilC* *X. fastidiosa*. These mutants showed no ability to colonize the region above the inoculation of the plant xylem vessels of Pera and, moreover, did not show biofilm formation.

In the study of biofilm formation, the characterization of protein expression was performed by using electrophoresis of first and second dimension and mass spectrometry we found a total of 456 proteins expressed in condition of mature biofilm and 387 proteins in planktonic growth, and , the biofilm showed 37% (or 144 proteins) differentially expressed in relation to planktonic cells. The changes found in the physiological state of cells in biofilm can be explained by the difference in the pattern of proteins found. These proteins are products corresponding to 31 genes present in the mature biofilm of strain isolated from citrus 9a5c, they were involved in the adaptation, metabolism and adhesion of bacteria. We observed overexpression of genes related to quorum sensing, proving the existence of communication between cells and thus, the development of the biofilm structure (mature biofilm) leading to obstruction of vessels and development of disease.

Keywords: *Xylella fastidiosa*, mutation (biology), biofilm, proteins biological models.

Sumário

Lista de Ilustrações.....	x
Lista de Tabelas	xiii
Capítulo 1	1
Caracterização dos genes de adesão na formação do biofilme e na patogenicidade de <i>Xylella fastidiosa</i>	1
Resumo.....	1
1. Revisão	3
1.1 <i>Xylella fastidiosa</i> : Características gerais e impactos econômicos da CVC	3
1.2 Mecanismo de patogenicidade.....	7
1.2.1 Importância da adesão na formação de biofilme	7
1.2.2 O papel das adesinas na adesão e no <i>twitching motility</i>	12
1.3 Obtenção de mutantes de <i>Xylella fastidiosa</i>	18
2. Objetivos Gerais.....	22
2.1 Objetivos Específicos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Linhagem e cultivo das bactérias.....	23
3.2 Clonagem dos genes para transformação em <i>Xylella fastidiosa</i>	24
3.3 Obtenção e confirmação de mutantes de <i>X. fastidiosa</i>	28
3.3.1 Preparo de células competentes de <i>X. fastidiosa</i> e eletroporação.....	28
3.3.2 Confirmação do mutante por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia).....	30
3.3.3 Confirmação do mutante por Southern blot	31
3.3.4 Confirmação do mutante por Western blot	32
3.3.5 Confirmação do mutante através da microscopia.....	34
3.3.6 Análise da expressão gênica do mutante em relação à linhagem selvagem através do RT-qPCR (Transcrição Reversa procedida por Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real).....	36
3.4 Inoculação em plantas	38
4. Resultados e discussão.....	39
4.1 Análises genotípicas do mutante em relação à linhagem selvagem	39
4.1.1 A linhagem mutante de <i>X. fastidiosa</i> (J1a12 Δ <i>pilC</i>).....	39
4.1.2 Amplificações com <i>primers</i> específicos	41
4.1.3 Expressão gênica de <i>pilC</i> através de RT-qPCR.....	44
4.2 Análises fenotípicas do mutante em relação à linhagem selvagem.....	46
4.2.1 Morfologia da colônia.....	46
4.2.2 Agregação celular	48
4.2.3 Formação do biofilme	50
4.2.4 Análises por microscopia de transmissão e imunofluorescência.....	54
4.3 Movimentação da bactéria na planta.....	57
5. Conclusões	61
6. Bibliografia	62
Capítulo 2	71
Analysis of the biofilm proteome of <i>Xylella fastidiosa</i>	71
Abstract.....	72
Results and Discussion.....	75

Proteins involved in the biofilm phenotype.....	80
Conclusions.....	83
Methods	84
Bacterial strain and culture condition.....	84
Protein extraction	85
SDS PAGE.....	85
Two-Dimensional Gel Electrophoresis	85
Gel image analysis and spot detection	86
In-gel protein digestion.....	86
Protein identification and analysis by LC-MS/MS	87
References.....	89
Considerações finais.....	92

Lista de Ilustrações

Capítulo 1

- Figura 1.** Células de *Xylella fastidiosa* estirpe 9a5c no interior dos vasos do xilema de *Citrus sinensis*. (Foto: J.E. Lima).....6
- Figura 2.** Principais sintomas da CVC. A. Estágio avançado das lesões foliares com mancha cloróticas e pontos marrons. B. Tamanho reduzido do fruto devido à presença da CVC. (Fotos: Alessandra Alves de Souza).8
- Figura 3.** Fases de formação do biofilme avaliadas por microscopia de varredura. A. Fase inicial da formação do biofilme. B. Fase Madura da formação do biofilme, sendo mais denso e estruturado. C. Dispersão das células do biofilme (Fotos: Alessandra Alves de Souza).....10
- Figura 4.** Modelo dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano. 1) Neste estágio as células bacterianas aderem de forma reversível na superfície. 2) Neste estágio as células aderem na superfície de forma irreversível. 3) Estágio correspondente ao início da maturação do biofilme, indicado pelo desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. 4) Estágio de total maturação do biofilme, indicado por uma complexa arquitetura do biofilme. 5) Estágio de dispersão com o aparecimento de células móveis que deixam as microcolônias (Sauer *et al.*, 2002).....11
- Figura 5.** Modelo de colonização dos vasos da planta por *X. fastidiosa* (De Souza *et al.*, 2006). As fímbrias do tipo I responsáveis pela adesão inicial seriam mais expressas no início de formação do biofilme e durante as fases de proliferação celular. Outras adesinas afimbriais também estão envolvidas no processo de adesão. Ao atingir uma maior densidade celular (20 dias – Biofilme Maduro), algumas células desaderem do biofilme para colonizar outros ambientes, sendo as fímbrias do tipo IV responsáveis por essa movimentação, sendo mais expressas nessas fases e nas fases iniciais. Quando o biofilme atinge sua maior densidade celular (Biofilme Maduro), também são ativados sinais de *quorum sensing*.13
- Figura 6.** Estrutura do pili tipo IV em *P. aeruginosa*. As subunidades PilA são direcionadas à PilD, sendo que este realiza a clivagem do peptídeo sinal dessas proteínas, formando uma estrutura. Pil V, X e W fazem parte da base do pili e a PilQ consiste em uma proteína de membrana pela qual o pili é colocado para fora da célula. (Mattick, 2002).15
- Figura 7.** Esquema de integração utilizado para geração de mutante para o gene *pilC* de *X. fastidiosa*. O vetor (pUCBM21oriC) contendo o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção e o fragmento interno do gene *pilC* da bactéria. A integração (representada pelo X), resulta em duas cópias parcialmente deletadas do *pilC*, separadas pelo vetor pUCBM21oriC. ...40
- Figura 8.** PCR das colônias mutantes na terceira repicagem. M. marcador molecular 1Kb plus. Linhagem selvagem J1a12. 1-9. Colônias crescidas após transformação com o vetor pUCBM21oriC. Os círculos em vermelho indicam a presença do amplicom de 500pb esperado quando utilizado primers desenhados para o vetor pUCBM21oriC.41
- Figura 9.** PCR das colônias mutantes na vigésima segunda repicagem. M. marcador molecular 1Kb plus. 1-9. Colônias crescidas após transformação com o vetor pUCBM21oriC. Mx. Mistura das colônias mutantes. WT. Linhagem selvagem J1a12. V. Vetor pUCBM21oriC. Os círculos em vermelho indicam a presença do amplicom de 1.7Kb esperado quando utilizado primers desenhados para a verificação de integração.42

Figura 10. A. Southern blot da linhagem selvagem e do mutante. WT1: linhagem selvagem 9a5c, WT2: linhagem selvagem J1a12, $\Delta pilC$ e 2: mutante para o gene <i>pilC</i> . Os círculos indicam a presença dos fragmentos esperados. B. Esquema da inserção do vetor no genoma da bactéria indicado pela presença de um sítio da enzima de restrição <i>EcoRI</i> , mostrando pelo fragmento de 670pb.....	43
Figura 11. A. Gel SDS, corado com Comassie blue, contendo proteínas totais de duas linhagens selvagens de <i>X. fastidiosa</i> e da linhagem transformada. B. Western blot contendo proteínas totais extraídas das linhagens selvagens 9a5c (WT1), J1a12 (WT2) e mutante para o <i>pilC</i> ($\Delta pilC$) contra anti-PilC. M. Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). O círculo indica o fragmento referente à proteína.	44
Figura 12. Gel da RT-qPCR com o cDNA da linhagem selvagem e do mutante. M. marcador molecular 1Kb plus (GeneRuller-Fermentas). As canaletas estão identificadas com os respectivos primers testados na reação de expressão gênica. WT. Linhagem selvagem J1a12. Δ . Linhagem transformada para <i>pilC</i>	45
Figura 13. Análise da expressão gênica de XF0656 (controle endógeno) e XF2538 (<i>pilC</i>) de <i>X. fastidiosa</i> . WT. Linhagem selvagem J1a12. $\Delta pilC$. Linhagem transformada com a construção pUCBM21oriC $\Delta pilC$. O eixo X indica os genes analisados, o eixo Y indica os valores de Ct (<i>cycle threshold</i>).....	46
Figura 14. Características das colônias da linhagem selvagem -WT (A) e do mutante $\Delta pilC$ (B) crescidas em meio PW sem BSA. As setas indicam a presença das fímbrias na borda da colônia da linhagem selvagem e a ausência na colônia mutante (B).	47
Figura 15. Características das colônias da linhagem selvagem - WT (A) e do mutante $\Delta pilC$ (B) crescidas em meio PW sem BSA. A seta indica um halo (ou <i>twitching motility</i>) da suspensão bacteriana depositada em meio PW sólido sem BSA, mostrando sua expansão. Na suspensão do mutante, não foi observado a presença do halo de crescimento (B).	48
Figura 16. Comparação da movimentação observadas em microscópio, aumento 100x, das células da linhagem selvagem J1a12 (WT) onde a seta indica agregação celular e formação de biofilme, e do mutante ($\Delta pilC$) onde as células encontram-se dispersas por toda a área analisada.	49
Figura 17. Comparação da agregação celular através da observação e medição da densidade óptica. A. Gráfico mostrando a agregação medida em espaço de tempo (1 hora). B. Os círculos indicam a presença da massa celular agregada nas linhagens selvagens 9a5c e J1a12 e ausência no mutante $\Delta pilC$	49
Figura 18. Crescimento das células da linhagem selvagem J1a12 (WT) e do mutante $\Delta pilC$ em meio PW líquido para verificação da formação de biofilme. A. Células crescidas sob agitação 130rpm por 5 dias, nota-se que no mutante não ocorre a formação do biofilme. B. Células crescidas sob agitação 130rpm por 20 dias, coradas com cristal violeta.	51
Figura 19. Gráfico mostrando a diferença de quantidade de massa celular aderida ao frasco formando biofilme da linhagem selvagem J1a12 e do mutante $\Delta pilC$	51
Figura 20. A. <i>Operon</i> da <i>X. fastidiosa</i> linhagem 9a5c mostrando a posição dos genes <i>pilC</i> e <i>pilD</i> . B. Estrutura do pili tipo IV em <i>P. aeruginosa</i> (Mattick, 2002). C. Expressão gênica do <i>pilA2</i> (XF2539) da linhagem selvagem J1a12 (WT) e do mutante $\Delta pilC$. D. Western blot contendo as proteínas totais extraídas da linhagem selvagem 9a5c (WT1), J1a12 (WT2) e do mutante $\Delta pilC$ contra anti-PilA2. M. Marcador PageRuler™ Prestained Ladder Plus (Fermentas). O círculo indica o fragmento referente à proteína.	53

Figura 21. Detecção de PilC em células de *X. fastidiosa* da linhagem selvagem e do mutante. As setas em vermelho indicam a marcação da proteína pelo anticorpo anti-PilC em células da linhagem selvagem J1a12 (A), já nas células dos mutantes, nenhuma marcação foi observada (B). Os diferentes formatos que as bactérias apresentam ocorrem em função dos planos em que elas foram cortadas.....55

Figura 22. Pili da linhagem selvagem e do mutante em *X. fastidiosa*. (A) Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem selvagem mostrando a abundância dos pilis curtos (em destaque), assim como a presença de pilis longos (indicados pelas setas). (B) Células do mutante apresentam poucos pilis curtos (setas vazia) e a ausência de pilis longos (setas cheia).56

Figura 23. Expressão de PilC na linhagem selvagem de *X. fastidiosa* J1a12 (A). As setas indicam a fluorescência referente ao reconhecimento da proteína pelo anticorpo. Na linhagem mutante (B) não pode ser observada a fluorescência. Figuras da coluna da esquerda referem-se a sobreposição das imagens verdes e vermelhas correspondentes, evidenciando a expressão de PilC, em laranja. Figuras da coluna do meio referem-se as células marcadas com Syto 9 (Invitrogen). Figuras da coluna da direita referem-se as células marcadas com Rodamina (Santa Cruz). Aumento 100x.....57

Figura 24. Ramos (A) e folhas (B) de laranja Pêra, após 90 dias de inoculação com as linhagens selvagens 9a5c e J1a12, e com o mutante $\Delta pilC$. As setas e círculos destacam os sintomas característicos de clorose nas folhas inoculadas com as linhagens selvagens.....58

Figura 25. Movimentação da *X. fastidiosa* na planta. Máximas distâncias (em cm) atingidas pelas bactérias a partir do ponto de inoculação (P0=0cm), após 90 dias. O eixo Y indica a porcentagem de crescimento. O eixo X os pontos de isolamento.59

Capítulo 2

Figure 1 Protein profiles of mature biofilm cells (B) and planktonic cells (P) of *X. fastidiosa* following separation by one-dimensional SDS-PAGE and a Coomassie blue staining. *Broad Range* Bio-Rad marker was used as the molecular weight (M).76

Figure 2 2DE proteome patterns for mature biofilm cells (A) and planktonic cells (B) of *X. fastidiosa*. The horizontal axes represents pIs of the isoelectric focusing gradients, and the vertical axes represents molecular masses (MW).77

Figure 3 Summary of differentially expressed protein. Diagrams show the numbers of expressed protein only the biofilm, planktonic and in both growth conditions.....77

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados em procedimentos de clonagem.....	24
Tabela 2. Linhagens, meios de cultura , construções e condições utilizadas nas eletroporações.	29
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos desenhados através do programa QUICKPRIMER para verificação da recombinação homóloga.	30

Capítulo 2

Table 1 List of the identified proteins from mature biofilm cell protein extract	79
---	----

Capítulo 1

Caracterização dos genes de adesão na formação do biofilme e na patogenicidade de *Xylella fastidiosa*

Resumo

A clorose variegada dos citros (CVC) é considerada uma das mais importantes doenças do setor citrícola. Essa doença tem como agente causal a *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram negativa limitada aos vasos do xilema das plantas hospedeiras e ao canal alimentar das cigarrinhas (inseto vetor), responsáveis pela transmissão da bactéria planta a planta. Essa bactéria também está associada a doenças em outras culturas economicamente importantes como uva, café e ameixa (Hopkins, 1995, Lima *et al.*, 1998).

Por ter uma grande importância econômica devido a CVC, a *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma seqüenciado, gerando um grande número de informações (Simpson *et al.*, 2000) e iniciando-se assim os estudos pós-genômicos com foco no entendimento do genoma funcional.

Com esses estudos, pode-se observar que seu mecanismo de patogenicidade difere dos observados para outros fitopatógenos já estudados, por não apresentar genes (*avr* e/ou *hrp*) que conferem especificidade planta-patógeno tal como observado para *Xanthomonas*. A explicação mais plausível para isto seria o fato de a *Xylella fastidiosa* ser injetada pelo inseto vetor diretamente nos vasos do xilema da planta onde se adere e coloniza. Ao se aderir, colonizam os vasos do xilema e iniciam a produção do biofilme, considerado o principal mecanismo de patogenicidade desta bactéria (De Souza *et al.*, 2003; 2004, Osiro *et al.*, 2004).

Além de ser um mecanismo de patogenicidade, o biofilme confere à bactéria uma maior capacidade de proliferação celular devido à uma grande comunicação célula-célula, maior eficiência na aquisição de nutrientes e defesa das células contra agentes antibióticos, além de contribuir para uma maior sobrevivência da colônia (Leite *et al.*, 2001). Outro fator positivo do crescimento da bactéria em condição de biofilme é o fato de ela se manter aderida e eficientemente adaptada às condições de estresse encontrados dentro do xilema e do canal alimentar do vetor ambos caracterizados como um ambiente de forte turbulência e pressão, com escassez de nutrientes e altamente competitivo com endofíticos dos citros, além de culminar com o desenvolvimento da CVC (Lacava *et al.*, 2004).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento do envolvimento de alguns genes na formação do biofilme, o presente trabalho teve como objetivo: avaliar a expressão de genes *pilC*, *xadA1*, *xadA2*, *pilA2*, *acrA*, *msrA* e *xpsE* através de técnicas de mutagênese, observando seu papel no biofilme, na movimentação e na patogenicidade da bactéria.

1. Revisão

1.1 *Xylella fastidiosa*: Características gerais e impactos econômicos da CVC

O agronegócio citrícola tem contribuído nos sucessivos superávits comerciais no Brasil, gerando divisas e ao mesmo tempo empregos. Só no Estado de São Paulo esta atividade responde por aproximadamente 400.000 empregos diretos e indiretos, gerando 1,5 bilhões de dólares na exportação de suco concentrado congelado, suco não concentrado e sub-produtos, como pectina, pellets para ração, óleos essenciais, limoneno, terpenos entre outros. A partir de 1960, a citricultura brasileira, particularmente a paulista, voltou-se para a produção de matéria-prima para a indústria de processamento de suco, investindo menos no comércio da fruta *in natura*, devido ao grande número de barreiras técnicas e fitossanitárias impostas pelos importantes mercados consumidores de frutas frescas, como por exemplo, os Estados Unidos. Assim, o suco concentrado tornou-se o principal produto de exportação da laranja, e na década de 90, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de laranja, ocupando a mesma posição até os dias atuais (www.abecitros.com.br).

No Estado de São Paulo, a laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osbeck) é a principal variedade cultivada sendo responsável por 38% da produção, seguida das outras variedades de laranjas doce como Valência (17%), Natal (25%) e Hamlin (7%) (www.cepea.esalq.usp.br).

Entretanto, o Brasil ainda possui uma produtividade de citros considerada muito baixa (80,4Kg de frutas/árvore), quando comparado ao outro produtor como por exemplo, a Flórida que produz cerca de 240Kg de frutas/árvore (Amaro *et al.*, 2001). Essa baixa produtividade esta também associada à expansão de pragas e doenças que acarretam reflexos negativos nos custos

de produção. Dentre essas, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é sem dúvida uma das mais preocupantes, afetando todas as variedades comerciais de laranjas doce, não sendo observados sintomas nas tangerinas como Poncan (*Citrus reticulata*) e Cravo (*Citrus deliciosa*), Murcott tangor (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), limões (*Citrus limon*) e lima-ácida mexicana (galego-*Citrus aurantiifolia*) em todos os Estados produtores de citros do Brasil.

Os dados de levantamento da CVC de 2010 para o Estado de São Paulo demonstram que aproximadamente 35,5% dos pomares apresentam sintomas da doença, sendo mais agravante nas regiões norte, noroeste e centro do Estado de São Paulo (www.fundecitrus.com.br). Em levantamento recente (julho de 2009) realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) foi observado que nos últimos cinco anos houve uma queda da incidência da doença no parque Citrícola do Estado de São Paulo, no entanto, mesmo com essa diminuição, a CVC ainda atingiria cerca de 39% das plantas. As estimativas dos danos econômicos causados pela CVC são da ordem de 286 – 322 milhões de dólares (Fernandes-Jr, 2003), na forma de replantio, redução da produtividade, poda de plantas infectadas e controle químico do vetor. Além disso, quando os sintomas são severos e a planta tem até dois anos de idade, é necessária a erradicação da mesma, além do atraso na produção após replantio e desuniformidade do pomar, acarretando em mais gastos (Amaro *et al.*, 2001).

Atualmente, a convivência com essa doença no setor citrícola tem demandado um uso constante de inseticidas para o controle do vetor (cigarrinhas) aumentando o custo da produção e gerando um impacto negativo ao ecossistema local. Os gastos com podas para diminuir a fonte de inóculo da bactéria, perda de árvores contaminadas e prejuízos com a CVC devido a

diminuição da produção dos frutos, têm tornado a atividade citrícula onerosa para os produtores, levando à substituição por outras culturas, como por exemplo, a cana-de-açúcar.

A *X. fastidiosa* é uma bactéria Gram negativa, não flagelada, com formato de bastonete e de tamanho variável, podendo chegar até 0,50 µm de diâmetro e 4 µm de comprimento. Caracteriza-se pelo crescimento lento em meio de cultura, sendo suas colônias circulares, discretas, medindo até 0,6 mm de diâmetro após 10 dias de incubação a 28°C, podendo alcançar 1,5 mm depois de 30 dias, com variações decorrentes do meio de cultura utilizado (Coletta-Filho, 2002). Suas condições ótimas de crescimento são de 26 °C a 28°C e pH entre 6,5 e 6,9. Pertence a Classe Proteobactéria, Ordem Lysobacteriales e Família Lysobacteriaceae, estando mais relacionada ao grupo das *Xanthomonas* (Wells *et al.*, 1987).

Possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo membros de pelo menos 28 famílias de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Hopkins & Adlerz, 1988), causando doenças em diversas plantas de importância econômica, principalmente em regiões da América do Norte e do Sul. Nos Estados Unidos, sobretudo na Califórnia, ela provoca doenças em videiras, chamada de doença de Pierce, em amendoeiras, alfafa entre outras (Lima *et al.*, 1998; Hopkins e Purcell, 2002). No Brasil, dentre outras doenças associadas a esta bactéria, a *X. fastidiosa* é a agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), sendo essa doença responsável por grandes perdas na citricultura, principalmente no Estado de São Paulo (Rossetti *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 1998).

X. fastidiosa apresenta uma grande variabilidade genética, existindo diferentes estirpes da bactéria, porém todas elas são pertencentes à mesma espécie, sendo as mesmas classificadas em diferentes patovares ou subespécies (Henderson *et al.*, 1998; Schaad *et al.*, 2004). Estudos baseados em dados de hidridização DNA-DNA, sequenciamento das regiões espaçadoras 16S-23S e dados fenotípicos foi proposta a classificação de subespécies: *X. fastidiosa* subsp. *piercie*

(linhagem de videira, alfafa, amendoeira, entre outras), *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (pessegueiro, ameixeira, etc), *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (para citros e café), *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* e *X. fastidiosa* subsp. *tashke* (Schaad *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2009).

X. fastidiosa é limitada ao xilema das plantas hospedeiras e ao lúmen do canal alimentar de insetos vetores (cigarrinhas), responsáveis pela transmissão da bactéria entre as plantas (Hopkins, 1995), sendo, no Brasil, transmitida comprovadamente por 11 espécies de cigarrinhas (*Hemiptera*, *Cicadellidae* e *Cercopidae*) (Redak *et al.*, 2004). Em citros, as espécies mais importantes que transmitem a *X. fastidiosa* são *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* (Redak *et al.*, 2004).

Uma vez dentro dos vasos do xilema, a bactéria se multiplica e causa a oclusão dos vasos (Figura 1). Isso acontece devido à produção de goma e formação de agregados bacterianos que bloqueiam o fluxo de água e de nutrientes, causando sintomas da doença na planta (Osiro *et al.*, 2004).

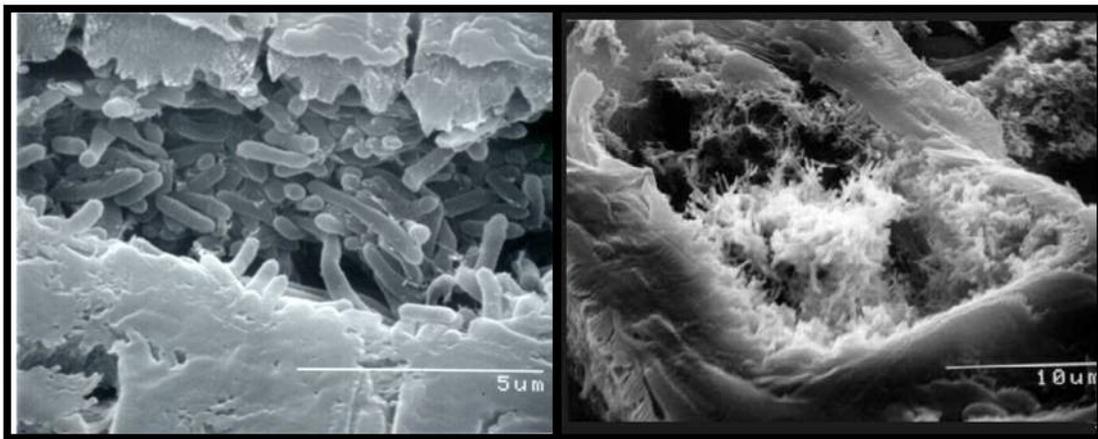


Figura 1. Células de *Xylella fastidiosa* estirpe 9a5c no interior dos vasos do xilema de *Citrus sinensis*. (Foto: J.E. Lima)

Outra forma de transmissão da bactéria para plantas de citros é via enxertia de borbulhas infectadas ou garfagem com tecidos infectados (Jacomino *et al.*, 1993), ou mesmo pelo uso de culturas puras inoculadas diretamente nas plantas.

1.2 Mecanismo de patogenicidade

1.2.1 Importância da adesão na formação de biofilme

Os principais sintomas da CVC em plantas de laranja doce podem assim ser descrito (Figura 2): *i.* inicialmente há o aparecimento de manchas cloróticas na parte dorsal das folhas correspondendo a pontos marrons com aspecto de goma na superfície ventral; *ii.* posteriormente, as plantas severamente atacadas apresentam um aspecto de debilidade geral com ramos envassourados, super brotação das gemas e folhas murchas nas horas quentes do dia, mesmo em condições de umidade, finalmente há uma redução drástica no tamanho dos frutos, tornando a planta economicamente inviável. Estes sintomas são causados pelo entupimento no xilema ocasionando principalmente o bloqueio do transporte de água e nutrientes, resultado, provavelmente, de uma eficiente capacidade de aderência e multiplicação da *X. fastidiosa* nestes vasos condutores (Machado *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 2001).

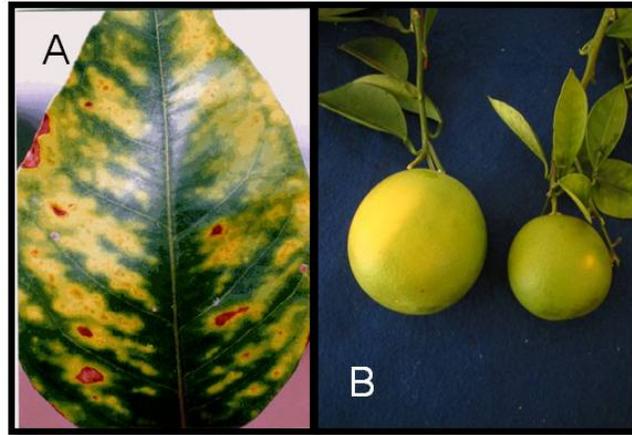


Figura 2. Principais sintomas da CVC. **A.** Estágio avançado das lesões foliares com mancha cloróticas e pontos marrons. **B.** Tamanho reduzido do fruto devido à presença da CVC. (Fotos: Alessandra Alves de Souza).

Dada a importância da CVC para o parque citrícola brasileiro, a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) apoiou um consórcio visando o completo sequenciamento do genoma da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa*, concluído em 2000 (Simpson *et al.*, 2000), sendo mundialmente reconhecido, tratando-se do primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado.

Posteriormente, foi feito o sequenciamento da linhagem Temecula (Xf-PD), agente causal da Doença de Pierce em videiras (Van Sluys *et al.*, 2003). Outras linhagens também tiveram seu genoma sequenciados como a linhagem Dixon (Xf-ALS) de amendoeira, a Ann-1 (Xf-OLS) de oleandro (Bhattacharyya *et al.*, 2002b), M12 (Xf-ALSD) e M23 (Xf-ALSD e Xf-PD) (Chen *et al.*, 2010).

A comparação das sequências dos genomas das linhagens citadas acima, permite a identificação de genes específicos de cada linhagem e com isso, pode-se comparar também com outros genomas de outras bactérias associadas às plantas e assim comparar vários processos

fisiológicos associados à interação patógeno-hospedeiro (Van Sluys *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2004).

O genoma dessa bactéria (linhagem 9a5c de *X. fastidiosa*) é composto por um cromossomo principal de 2.679.305 pb (pares de bases) sendo composto de 52,7% de G+C (guanina e citosina), dois plasmídeos menores de 51.158pb (49,6% de G+C) e de 1.285pb (55,6% de G+C), sendo identificados vários genes potencialmente envolvidos com a patogenicidade, através da homologia com outros organismos, já que nenhum gene havia sido caracterizado funcionalmente para esta bactéria (Simpson *et al.*, 2000).

Após o seqüenciamento, muitos mecanismos relacionados a patogenicidade, como a produção de polissacarídeos extracelulares, produção de fímbrias e de enzimas que degradam a parede celular puderam ser melhor estudados e compreendidos (Simpson *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000). Para que um controle para a doença possa ser encontrado, todos esses mecanismos de patogenicidade necessitam de uma abordagem experimental para serem estudados e confirmados. Uma maneira de se entender esses mecanismos é através do estudo do genoma funcional das bactérias sequenciadas, através da obtenção de mutantes e da análise da expressão gênica e produção de proteínas pelo organismo.

Com base na análise do genoma da bactéria foi visto que o mecanismo de patogenicidade dessa bactéria difere do de outras fitobactérias, uma vez que ela não apresenta genes típicos que conferem especificidade planta-patógeno (*avr* e/ou *hrp*) do sistema de secreção tipo III, clássicos em fitopatógenos Gram negativos, porém, foram encontrados vários genes relacionados a proteínas que participam do processo de adesão, as adesinas, tornando a formação do biofilme pela bactéria um possível mecanismo de patogenicidade (De Souza *et al.*, 2003, 2004).

A bactéria é injetada pelo inseto vetor diretamente nos vasos do xilema do hospedeiro, onde se adere e coloniza. O processo todo leva à formação de biofilme (Figura 3) sendo considerado um dos principais mecanismos de patogenicidade deste microrganismo (De Souza *et al.*, 2003; Osiro *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2004).

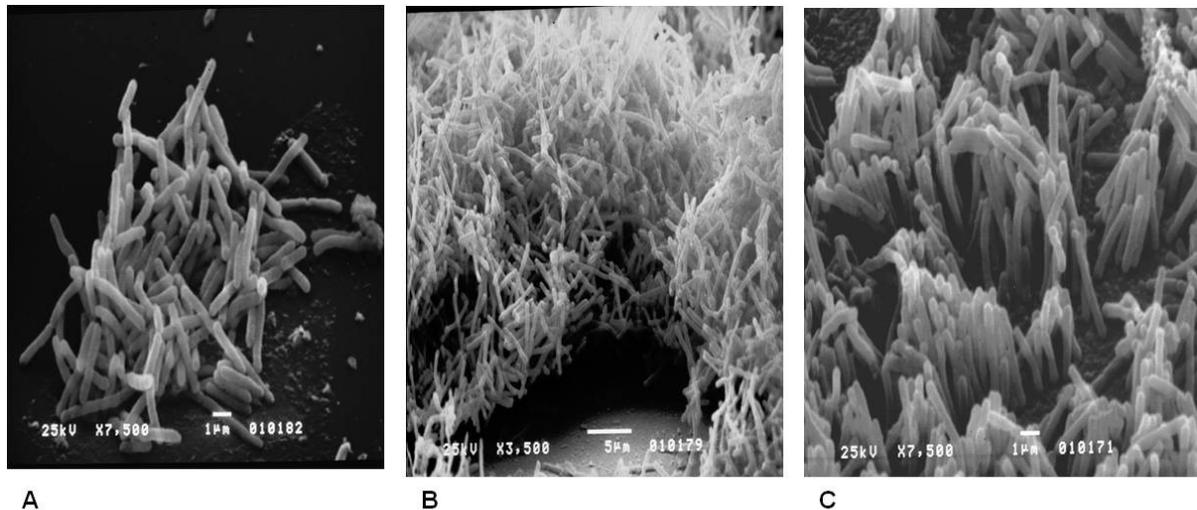


Figura 3. Fases de formação do biofilme avaliadas por microscopia de varredura. **A.** Fase inicial da formação do biofilme. **B.** Fase Madura da formação do biofilme, sendo mais denso e estruturado. **C.** Dispersão das células do biofilme (Fotos: Alessandra Alves de Souza).

Biofilmes são comunidades de microrganismos fixadas em uma superfície biótica ou abiótica podendo ser composto por uma única ou várias espécies (O'Toole *et al.*, 2000), com formato de uma estrutura tridimensionalmente organizada, cujas células são cobertas por uma matriz de exopolímeros (Nobile *et al.*, 2008). O biofilme traz várias vantagens para as colônias bacterianas, como eficiência na proliferação celular através de uma maior comunicação célula-célula, melhoria na aquisição de nutrientes e defesa contra agentes oxidativos e antibióticos, permitindo uma maior sobrevivência da colônia (Leite *et al.*, 2001). Sendo assim, o biofilme torna-se uma estratégia de sobrevivência das bactérias (Feil *et al.*, 2007).

A formação do biofilme requer uma série de diferentes e bem regulados passos (Figura 4) como fixação das células no substrato ou superfície, crescimento e agregação das células em microcolônias, maturação e manutenção de sua arquitetura (O'Toole *et al.*, 2000). Essa formação se inicia com a aderência de uma camada de células à superfície, seguida por outras camadas adicionais e produção de uma matriz extracelular, formada por exopolissacarídeos (EPS), caracterizando e organizando o biofilme tridimensionalmente (Simpson *et al.*, 2000).

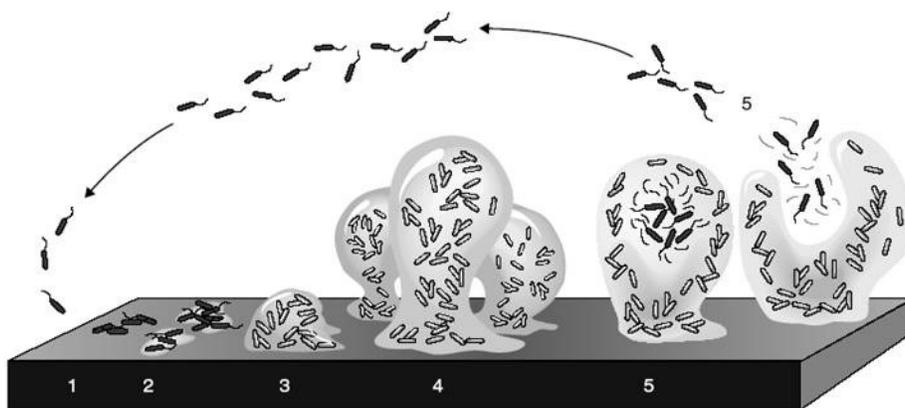


Figura 4. Modelo dos estágios de desenvolvimento de biofilme bacteriano. 1) Neste estágio as células bacterianas aderem de forma reversível na superfície. 2) Neste estágio as células aderem na superfície de forma irreversível. 3) Estágio correspondente ao início da maturação do biofilme, indicado pelo desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. 4) Estágio de total maturação do biofilme, indicado por uma complexa arquitetura do biofilme. 5) Estágio de dispersão com o aparecimento de células móveis que deixam as microcolônias (Sauer *et al.*, 2002).

Curiosamente, o mecanismo de patogenicidade de *X. fastidiosa* assemelha-se mais a bactérias causadoras de doenças em humanos que formam biofilme, como, por exemplo na fibrose cística, periodontia, otite média, endocardite, etc. Estas bactérias patogênicas freqüentemente usam mais de um mecanismo para mediar sua agregação no tecido do

hospedeiro, e muitos patógenos podem persistir e multiplicar no sistema infectado de modo a promover efeitos deletérios. Quando biofilmes bacterianos se formam em superfícies vasculares, além de ocasionarem a oclusão, também agregam componentes presentes no fluido vascular (Costerton *et al.*, 1987). Este pode ser o caso, por exemplo, da deficiência de zinco e ferro em plantas com sintomas de CVC, uma vez que foi detectada no genoma uma série de genes capazes de resgatar nutrientes do fluido vascular (Machado *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2002), e provavelmente em biofilme as células aumentem a capacidade de absorção.

Em relação ao sintomas de patogenicidade, modelos experimentais foram desenvolvidos, em *Nicotiana tabacum* (Lopes *et al.*, 2000) e em *Catharantus roseus* (Monteiro *et al.*, 2001a), plantas hospedeiras alternativas do patógeno, consideradas indicadoras dos sintomas de *X. fastidiosa* causadora de CVC.

1.2.2 O papel das adesinas na adesão e no *twitching motility*

A interação entre a *X. fastidiosa* e a superfície (vasos do xilema, canal alimentar do inseto vetor, entre outros) para a formação do biofilme é dada por adesinas. A bactéria usa essas estruturas para sua adesão ao longo da superfície de crescimento, favorecendo assim o desenvolvimento de micro colônias (O'Toole *et al.*, 2000). O sucesso da adesão é um fator importante para que ocorra a colonização dos hospedeiros, já que ambos, o xilema da planta infectada e o canal alimentar do inseto vetor, são ambientes de forte turbulência (Meng *et al.*, 2005).

Vários genes relacionados às adesinas foram encontrados através dos estudos das anotações do genoma da *X. fastidiosa*. Os mesmos foram relacionados à formação de agregados bacterianos, sendo diferencialmente expressos durante todo o processo de formação do biofilme (Figura 5)(De Souza *et al.*, 2006). As adesinas podem ser fimbriais ou afimbriais, sendo que as

fimbriais englobam os pequenos, grandes e numerosos pilis e as afimbriais formam projeções na membrana.

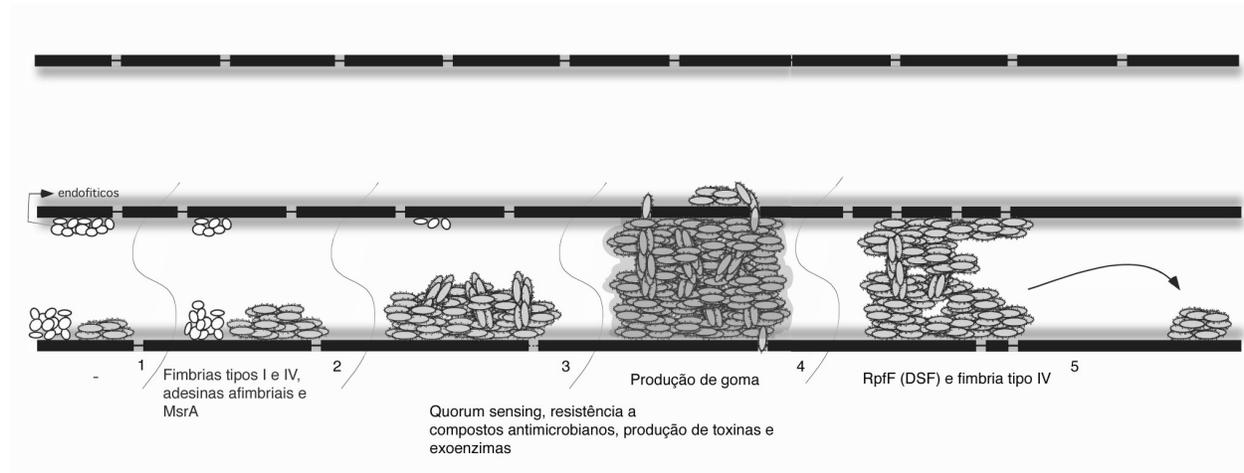


Figura 5. Modelo de colonização dos vasos da planta por *X. fastidiosa* (De Souza *et al.*, 2006). As fimbrias do tipo I responsáveis pela adesão inicial seriam mais expressas no início de formação do biofilme e durante as fases de proliferação celular. Outras adesinas afimbriais também estão envolvidas no processo de adesão. Ao atingir uma maior densidade celular (20 dias – Biofilme Maduro), algumas células desadere do biofilme para colonizar outros ambientes, sendo as fimbrias do tipo IV responsáveis por essa movimentação, sendo mais expressas nessas fases e nas fases iniciais. Quando o biofilme atinge sua maior densidade celular (Biofilme Maduro), também são ativados sinais de *quorum sensing*.

Em *X. fastidiosa* as proteínas fimbriais são codificadas pelo operon que envolve os genes *ecdD*, *fimA*, *fimC*, *fimD*, *fimE* e *fimF*, onde *FimA*, corresponde à maior subunidade e *FimF* ancora a proteína, sendo necessária para a montagem adequada da estrutura fimbrial (Feil *et al.*, 2007). Outra estrutura encontrada foi o pili tipo IV, codificados por 26 genes e pelo operon *pil* e o pili tipo I. Segundo Meng *et al.* (2005) *X. fastidiosa* possui dois tipos distintos de pili, um curto variando de 0,4 – 1,0 μm (tipo I) e um mais longo medindo 1,0 – 5,8 μm (tipo IV). O pili do tipo I foi associado a adesão celular e desempenha um papel importante na adesão ao substrato e

formação do biofilme, enquanto que o do tipo IV está associado ao movimento sistêmico da *X. fastidiosa* nos vasos do xilema, um vez que mutantes foram incapazes de se moverem por adesão superficial além do ponto de inoculação. Fato semelhante foi observado por De La Fuente e colaboradores (2007) com mutantes da linhagem Temécula-1 de *X. fastidiosa*, observando que mutantes com apenas pili tipo IV ($\Delta fimA$ – mutantes do gene *fimA*) se desgrudavam da superfície quando submetidos ao fluxo de fluido controlado, enquanto que mutantes com apenas o tipo I ($\Delta pilB$), raramente se desgrudavam da superfície quando submetidos às mesmas condições. O mesmo foi demonstrado por Schembri *et al.* (2003), onde os pili bacterianos foram mediadores específicos da adesão inicial na formação do biofilme utilizando mutantes, mostrando sua participação no desenvolvimento do biofilme (Klausen *et al.*, 2003).

Muitas bactérias Gram negativas patógenos de plantas e animais, expressam fímbria tipo IV, como *P.aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Dichelobacter nodosus* e *Ralstonia solanacearum*. Esse tipo de fímbria é importante para o *twitching motility*, na formação de biofilme, na transformação natural, na agregação e na virulência (Craig *et al.*, 2004). Embora alguns genes associados à fímbria do tipo IV tenham sido identificados em *X. fastidiosa*, pouco se conhece sobre sua regulação nessa bactéria (Meng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Em *P. aeruginosa*, sabe-se que *pilA* codifica para a unidade estrutural da fímbria tipo IV (Parker *et al.*, 2006).

Mattick (2002) relatou que em *Pseudomonas aeruginosa* os pili tipo IV (Figura 6) são compostos por uma única subunidade proteica (PilA). A montagem do pili ocorre pela sua base, sendo que PilV, X e W formariam a base da estrutura do pili, PilB se liga aos nucleotídeos, PilD, uma metilase pré-pilin e PilQ uma proteína da membrana onde o pili seria colocado para fora da

célula e estabilizado por PilQ. Já o sistema de duplo componente *pilS/R* estaria relacionado com a regulação da transcrição de *pilA* e a mobilidade do pili depende dos genes *pilG*, H e I).

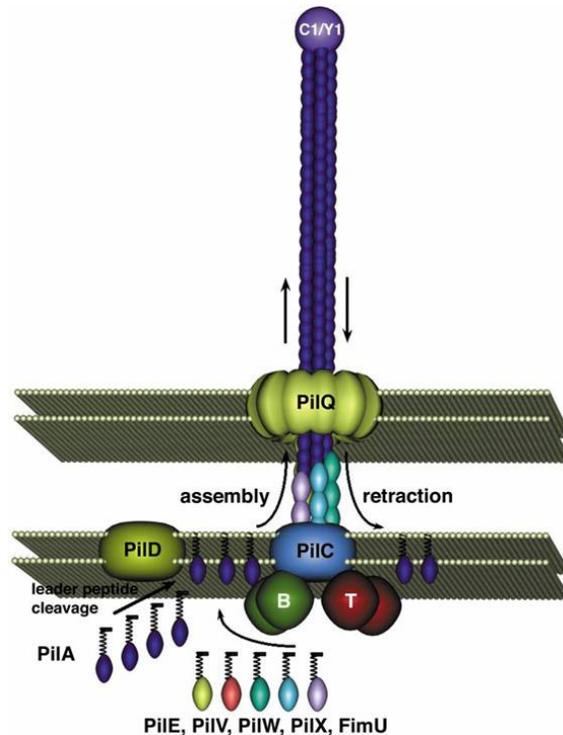


Figura 6. Estrutura do pili tipo IV em *P. aeruginosa*. As subunidades PilA são direcionadas à PilD, sendo que este realiza a clivagem do peptídeo sinal dessas proteínas, formando uma estrutura. Pil V, X e W fazem parte da base do pili e a PilQ consiste em uma proteína de membrana pela qual o pili é colocado para fora da célula. (Mattick, 2002).

A mobilidade relacionada ao pili tipo IV, assim nomeada de *twitching motility*, é dada através da retração do pili é importante na formação do biofilme, sendo que para isso, depende do contato célula-célula. Os fatores ambientais que controlam esse movimento ainda não são muito bem compreendidos, porém supõe-se que haja influência do estresse nutricional, densidade celular e desenvolvimento de microcolônias (Mattick, 2002).

Meng *et al.* (2005) estudaram o papel biológico dos genes de pili quando a bactéria foi inoculada em plantas de videira, demonstrando que mutantes da estirpe Temecula que só expressavam o pili tipo IV, formaram biofilmes aderidos à parede de frascos, assim como apresentaram movimentação no substrato (meio de cultura e vasos do xilema). Tais características sugerem que a adesão dessas bactérias é eficiente, confirmando a função de movimentação celular e comprovada por recuperação de mutantes, através do isolamento da bactéria, em curtas distâncias após o ponto de inoculação na planta. Esse fenômeno de agregação in *X. fastidiosa* claramente requer a presença do pili tipo IV, o qual também é responsável pelo *twitching motility*.

De La Fuente e seus colaboradores (2008) mostraram, através da obtenção de mutantes para os pilis tipo I e tipo IV, que as células bacterianas precisam estar nos vasos do xilema das plantas em alta densidade celular, formando grandes agregados, entupindo os vasos e levando ao desenvolvimento e expressão dos sintomas. Em meio de cultura, mutantes deficientes do pili tipo IV formaram biofilmes mais espessos do que os formados pela linhagem selvagem, enquanto que os mutantes para o pili tipo I, desenvolveram biofilmes muito mais frágeis e fracamente aderidos. Esses resultados sugerem que tanto o pili tipo I como o tipo IV são necessários para a formação de agregados estaveis, os quais contribuem na formação do biofilme.

Estudos do tipo selvagem de *Vibrio cholerae* e mutantes de pili mostram a importância destas estruturas na colonização da superfície. O pili IV tem se mostrado um fator importante na colonização do aparelho bucal de animais vetores e como fator de virulência (O'Toole *et al.*, 2000). Purcell e colaboradores (1979) visualizaram, através da microscopia eletrônica de varredura, agregados da bactéria sobre o forro cuticular do trato digestivo das cigarrinhas. Essa

colonização não traz nenhuma vantagem ao inseto, podendo ser prejudicial ao mesmo atrapalhando seu processo de alimentação (Marucci *et al.*, 2005).

Um outro mecanismo de adesão é dado pela expressão de adesinas afimbriais, relatadas como importantes para agregação bacteriana, constituindo-se em um fator essencial para sua sobrevivência e/ou virulência (St. Geme *et al.*, 1996). Bactérias patogênicas têm demonstrado uma variação na produção de adesinas fimbriais e afimbriais, as quais contribuem na sua virulência e fixação (Guilhabert & Kirkpatrick, 2005). Esses autores demonstraram que o movimento da bactéria nos vasos do xilema é um importante componente de patogenicidade, uma vez que mutantes hipervirulentos movimentaram-se mais rapidamente pelos vasos. As adesinas afimbriais são proteínas de membrana que contribuem para ligação célula-célula ou das células à superfície, codificadas pelos genes *xadA1* e *xadA2*, até então chamados de *uspA1* e *hsf*. A expressão desses genes é maior no início da formação do biofilme e no estágio intermediário, estando envolvidos na formação da arquitetura do biofilme (De Souza *et al.*, 2003, 2005).

X. fastidiosa também apresenta várias hemaglutininas, como os homólogos a HecA de *Erwinia chrysanthemi*, essencial para máxima adesão na superfície das plantas, agregação celular, morte celular e virulência em plantas de tabaco. Na estipe Temecula-1 de *X. fastidiosa* as hemaglutininas estão envolvidas na adesão célula-célula uma vez que seus mutantes apresentaram biofilmes em monocamadas (Guilhabert *et al.*, 2005).

Após o seqüenciamento, foram encontrados no genoma da *X. fastidiosa* vários genes putativos responsáveis pela adesão da bactéria na superfície do hospedeiro, inclusive genes anteriormente detectados apenas no processo de adesão de patógenos em humanos (Simpson *et al.*, 2000). De Souza *et al.* (2003) detectaram através de análises de microarranjos uma maior expressão de dois genes similares a adesinas afimbriais de patógenos de humanos na condição

mais patogênica de *X. fastidiosa*. Além destes, também foram detectados adesinas fimbriais e genes relacionados com a adaptação e competitividade no ambiente do hospedeiro. Através da análise da expressão destes genes utilizando PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), foi observado que o nível de expressão das adesinas fimbrial (*fimA*) e afimbriais (*xadA1* e *xadA2*) de *X. fastidiosa* são maiores nos estádios iniciais da colonização *in planta* e nos estádios iniciais da formação do biofilme *in vitro* (nas paredes dos frascos de erlenmeyers) (De Souza *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2005). Entretanto, o papel biológico destas adesinas no biofilme de *X. fastidiosa* ainda é desconhecido, sendo necessário a obtenção de mutantes para verificação da importância das adesinas no biofilme.

1.3 Obtenção de mutantes de *Xylella fastidiosa*

O primeiro transformante da *X. fastidiosa* foi inicialmente obtido em linhagem de citros com a utilização de plasmídeos contendo a origem de replicação (*oriC*) do cromossomo da bactéria (Monteiro *et al.*, 2001b) ou dos plasmídeos endógenos da bactéria ligados a vetores de *E.coli* (Qin e Hartung, 2001). Outro ponto observado foi que a transformação genética por recombinação homóloga utilizando vetores suicidas para a interrupção dos genes alvos não funcionavam em *X. fastidiosa* de citros (Da Silva Neto *et al.*, 2002).

Uma estratégia utilizada em trabalhos recentes, foi o uso de vetores replicativos os quais já vinham sendo utilizados para outras bactérias de crescimento lento, como a *Mycobacterium bovis* e a *Borrelia burgdorferi* (Li *et al.*; 2007), acrescidos da origem de replicação (*oriC*) do cromossomo (Gaurivaud *et al.*, 2002) ou do plasmídeo endógeno da bactéria (Da Silva Neto *et al.*, 2002), obtendo-se assim os primeiros mutantes de *X. fastidiosa* por recombinação homóloga.

Para a linhagem de videira, foi descrita a obtenção de mutantes pelo sistema de dupla recombinação com vetor suicida em genes de fímbrias (Feil *et al.*, 2003) e também, pelo sistema

de *transposome* (Guilhabert *et al.*, 2001), sistema esse também utilizado com sucesso para a linhagem J1a12 de *X. fastidiosa* de citros (Koide *et al.*, 2004b).

Recentemente, um homólogo do gene *uspA1* denominado *xadA1*, adesina afimbrial, foi caracterizado em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ray *et al.*, 2002). Mutantes *xadA* são menos virulentos e apresentam morfologia da colônia alterada. Feil *et al.*(2003) estudaram o papel dos genes *fimA* e *fimF*, caracterizando-os em *X. fastidiosa* causadora de doença de Pierce. Mutantes *fimA* e *fimF* apresentaram população bacteriana bastante reduzida na planta, menor tamanho e número de fimbrias, e menor agregação celular; contudo a virulência não foi alterada quando comparado ao tipo selvagem (Feil *et al.*, 2003). Isto pode ser devido à presença de outras cópias destes genes presentes no genoma de *X. fastidiosa*, o que pode ter suplementado o papel biológico da cópia mutada.

Dados recentes mostram que a adesão e a motilidade da *X. fastidiosa* desempenham papel importante no estabelecimento das relações bactéria-bactéria, bactéria-planta e bactéria-vetor, contribuindo na virulência nas plantas hospedeiras (Guilhabert e Kirkpatrick, 2005; Meng *et al.*, 2005). Bactérias usam várias adesinas da superfície celular para se aderir e colonizar seus hospedeiros, sendo elas fimbrias (pili), hemaglutininas e polissacarídeos extracelulares (EPS), encontrados também no proteoma *X. fastidiosa* (Smolka *et al.*, 2003).

Já Newman *et al.* (2004) observaram que a *X. fastidiosa* pode modular seu parasitismo e patogenicidade, pois mutantes do gene *rpf* (regulation of pathogenicity factors), envolvidos na síntese de um fator difusível de sinalização (DSF), mediador da sinalização célula-célula (*quorum sensing*), mostrou fenótipo hipervirulento. Chatterjee e colaboradores (2007), observaram também que essa comunicação é essencial para a virulência da bactéria e sua

transmissão através de insetos vetores, uma vez que esses sinais codificados pelos genes *rpf* interferem na expressão de vários genes relacionados à formação do biofilme.

O mesmo foi visto por Willians *et al.* (2000) ao observarem que, ao atingir o estágio de biofilme maduro, é ativado o sistema de sinalização denominado de *quorum sensing*, o qual envolve a interação entre moléculas de sinal difusível (DSF) com um sensor ou ativadores de transcrição, permitindo que a bactéria sincronize a expressão de certos genes com a sua densidade populacional. Essa sinalização permite que as bactérias regulem a expressão dos genes específicos como os associados ao fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, respostas de defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e transferência de plasmídeos por conjugação (Molin, 2003). Ainda em relação à virulência, foi observado que mutantes dos genes de hemaglutininas, uma importante adesina de patógenos animais, media a agregação célula-célula *in vitro* e *in planta* e influencia a patogenicidade de *X. fastidiosa* por limitar sua capacidade de colonização, apresentam fenótipo hipervirulento, obstruindo completamente os vasos do xilema (Guilhabert e Kirkpatrick, 2005).

O seqüenciamento completo do genoma da *X. fastidiosa* e a disponibilidade das diferentes técnicas de análise de expressão gênica e de transformação genética permitem caracterizar as funções de diferentes genes desvendando os mecanismos regulatórios nesta bactéria, principalmente os envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. O uso de ferramentas para análise em larga escala como microarranjos de DNA e proteoma tem impulsionado os estudos de expressão gênica e proteica. Usando essas ferramentas podemos identificar genes ainda não caracterizados, testar e identificar genes possivelmente relacionados à adaptação e virulência do patógeno. Outro ponto também a ser explorado é uma maior eficiência nas técnicas de mutagênese, ferramenta importante utilizada para caracterização da função de genes e para

descobrir e relacionar os mecanismos regulatórios da *X. fastidiosa* envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

Para isso, foram escolhidos os genes envolvidos na adesão celular como o *pilC* e *pilA2* (adesinas fimbriais), *xadA1* e *xadA2* (adesinas afimbriais) (De Souza *et al.*, 2003, 2004), *msrA* que também está envolvido na manutenção da adesão destas estruturas na superfície (Leite *et al.*; 2002) e os genes *acrA* que estão relacionados à resistência a multidrogas (Rodrigues *et al.*; 2008) e *xpsE*, envolvido na adaptação e patogenicidade da bactéria (Chen *et al.*, 2005).

2. Objetivos Gerais

Caracterizar a participação das adesinas no processo de formação de biofilme e na patogenicidade de *Xylella fastidiosa*.

2.1 Objetivos Específicos

- Obter mutantes dos genes *pilC*, *xadA1*, *xadA2*, *pilA2*, *acrA*, *msrA* e *xpsE* envolvidos no processo de adesão de *X. fastidiosa* e avaliar seu efeito na formação de biofilme e patogenicidade.
- Avaliar o genótipo do mutante comparado ao tipo selvagem.
- Avaliar o fenótipo do mutante comparado ao tipo selvagem pela morfologia da colônia e arquitetura do biofilme nas diferentes fases de formação *in vitro*.
- Determinar o efeito da mutação na patogenicidade avaliando-se a capacidade de colonização nos hospedeiros e sintomatologia.

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagem e cultivo das bactérias

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram *Escherichia coli* DH5α para todos os procedimentos de clonagem e *Xylella fastidiosa* estirpes J1a12, 9a5c, 11399 e U24D para obtenção de mutantes dos genes de interesse. O isolamento das diferentes linhagens estudadas de *X. fastidiosa* foi feito a partir de plantas de tabaco (linhagem J1a12) e de plantas de citros (linhagens 9a5c, U24D e 11399) com sintomas da CVC mantidas em casa-de-vegetação no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – CCSM. O isolamento das bactérias foi feito a partir de tecidos do pecíolo e da nervura central das folhas, após desinfestação com hipoclorito (2%) por 2 minutos, etanol 70% por 2 minutos e duas lavagens com água autoclavada também por 2 minutos cada. Após esse processo, a nervura e o pecíolo foram picotados e macerados com 500μL de água estéril. Para o isolamento foi feita diluição seriada até a 10^{-4} , tendo sido plaqueadas 6 placas da diluição 10^{-3} e 4 placas da diluição 10^{-4} em meio PW sólido (Davis *et al.*, 1981). As placas foram mantidas à 28°C por 20 dias até o crescimento de colônias.

X. fastidiosa foi cultivada de acordo com Davis *et al.* (1981) em meio PW (contendo fitona peptona 4g/l, tripcase peptona 1g/l, cloreto de hemina 0,001%, K₂HPO₄ 1,2g/l, KH₂PO₄ 1g/l, MgSO₄.7H₂O 0,4g/l, glutamina 0,4%, BSA 0,6% e agar 1,0%) quando isolada da planta. Para o preparo de células competentes e cultivo após a eletroporação utilizou-se o meio PWG líquido (fitona peptona 4g/l, tripcase peptona 1g/l, cloreto de hemina 0,001%, K₂HPO₄ 1,2g/l, KH₂PO₄ 1g/l, MgSO₄.7H₂O 0,4g/l, glutamina 0,4% e glicose 0,5%), e para a manutenção das culturas o meio PWG sólido, acrescido de 1.2% ágar.

3.2 Clonagem dos genes para transformação em *Xylella fastidiosa*

Para obtenção do gene de interesse foram feitas ampliações por PCR com oligonucleotídeos específicos adicionados aos sítios da enzima de restrição a qual seria posteriormente utilizada em todo processo de clonagem (Tabela 1). Os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar a região interna do gene a partir de DNA total da bactéria. As ampliações foram feitas utilizando cerca de 0,5ng de DNA genômico total da linhagem 9a5c, 1µM da cada oligonucleotídeo, 0,3 mM de cada dNTP, 1 mM de MgCl₂, 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1x o tampão PCR fornecido pelo fabricante. As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e um último passo de 72 °C por 10 minutos.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados em procedimentos de clonagem.

Nome	Seqüência (5'- 3')	Finalidade
xadA1-FXhoI	AACTCGAGAGCAGGCCGCGGTGATAGCAGTA	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
xadA1-RXhoI	AGACGCTCGAGCCCCCGCCAAGAT	
acrA-FXhoI	CTCTCGAGCACGCGTGGCTGGAATA	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
acrA-RXhoI	AGCTCGAGCGCCTTCTTGACTTTT	
pilA2-FXhoI	CCCTCGAGCCAAAATTATGTCGCCAGA	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
pilA2-RXhoI	CACTCGAGGTGACGGTGGAGGAGCAG	
xadA2-FXhoI	CGCTCGAGGGTCTTTGTATGT	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
xadA2-RXhoI	GGCTCGAGACGCTGTGAGGTTT	
msrA-FXhoI	AATCTCGAGTGGGACGTAGTGAAC	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
msrA-RXhoI	AAGCTCGAGCCGGATGGAGTA	
xpsE-FXhoI	GTCTCGAGTTGTTGGCGGAAGTATGAA	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
xpsE-RXhoI	CCCTCGAGCCAGTGACCAGCAAAATG	
pilC-FXhoI	AGCTCGAGATAAGCGCGGTGTCAAAATCAAG	Clonagem do fragmento interno do gene para mutagênese.
pilC-RXhoI	TCCTCGAGCTGCGGCACCACGTATATCAACAAA	
pUC-F	AGCGGATAACAATTTACACAG	Confirmação da presença do vetor na bactéria transformada.
pUC-R	GTAAAACGACGGCCAGT	

Os genes de interesse (*pilC*, *xadA1*, *xadA2*, *pilA1*, *acrA*, *msrA* e *xpsE*) foram ligados ao plasmídeo pGEM-T (Promega) e introduzidos em *E.coli*, cultivada a 37°C em meio LB (triptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l, NaCl 10g/l sendo o pH ajustado para 7,4) adicionado de 8µL

IPTG (concentração 20mg/ml) e 40µL Xgal (concentração 24mg/mL) e supridos de ampicilina (100µg/ µL), quando necessário para seleção das colônias transformadas. As colônias que apresentaram coloração branca foram inoculadas em meio líquido para aumentar sua densidade celular.

A seleção das colônias transformantes foi feita através da PCR. Células bacterianas da linhagem transformada de *E. coli* foram ressuspensas em 10µL de água milli-Q e utilizadas como molde para PCR, sendo adicionadas 1µM de cada oligonucleotídeo, 0,3mM de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1x o tampão fornecido pelo fabricante. As condições da reação foram as mesmas como já descrito acima para obtenção dos genes de interesse.

Os fragmentos obtidos através da amplificação por PCR ou da digestão do plasmídeo, com enzimas de restrição (Invitrogen ou Promega), de acordo com as instruções do fabricante, foram separados em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE 1x (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM e pH 8.0) a 100 volts. O gel foi corado em brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados em luz ultravioleta (UV), e documentadas em fotodocumentador (GE Healthcare). Os fragmentos de DNA de interesse foram isolados do gel e purificados através do *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification kit* (GE Healthcare) e ressuspensas em 20µL de água milli-Q.

Os fragmentos de DNA obtidos após a purificação foram ligados aos plasmídeos utilizando cerca de 200ng de inserto, 60ng do vetor e 1U de T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante, sendo um volume final de 20µL. As reações foram incubadas no termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research Inc.) a 16°C por 16 horas.

As células competentes da linhagem de *E.coli* DH5 α foram preparadas de acordo com Ausubel *et al.*(1992). Para transformação, 10 μ L da reação de ligação foi adicionado em 50 μ L da bactéria e incubado por 1 hora no gelo. Após esse período, incubou-se por 90 segundos à 42°C e transferido rapidamente para o gelo. Adicionou-se 800 μ L de meio SOC e foi mantido sob agitação à 37°C por 1 hora. Após esse período, a amostra foi plaqueada em meio LB suprido de antibiótico (ampicilina) e incubada “overnight” à 37°C. As colônias foram inoculadas em meio liquido para obtenção de uma maior concentração da bactéria transformada. Posteriormente, o DNA (inserto+plasmídeo) foi extraído em maior escala em placa, foi adicionado 25 μ L de água autoclavada e vortexado por 20 segundos, adicionado em seguida 70 μ L de solução lise (STET-Tween 20) e vortexado por mais 1 minuto. Em seguida, mantido em temperatura ambiente por 5 minutos e aquecido em forno de microondas por 30 segundos. Adicionado 400 μ L de água, vortexado e incubado no gelo por 15 minutos. Após isso, centrifugado por 45 minutos à 3000xg e transferido 50 μ L tubos de Eppendorf, mantendo os mesmos a -20°C.

As extrações de plasmídeo foram feitas utilizando os sistemas de minipreparação de plasmídeo *plasmidPrep Midi Flow kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, ou do *RPM kit* (Bio 101, Inc.).

O DNA de interesse, clonado no vetor pGEM-T (promega) foi extraído com o sistema de minipreparação de plasmídeo do *RPM kit* (Bio 101, Inc.) para sequenciamento direto dos insertos. Foram utilizados os oligonucleotídeos que flanqueiam direto e reverso do gene de interesse que amplificado do genoma. As reações de sequenciamento foram feitas com 0,2 μ g de cada minipreparação de DNA de plasmídeo, 3,2 pmoL de um dos oligonucleotídeos, 1 μ L de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e tampão fornecido pelo fabricante. As condições de PCR foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos,

52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações foram precipitadas com isopropanol 75% e lavadas duas vezes com etanol 70%. O sequenciamento foi feito no aparelho ABI 3730 DNA sequencer. Os fragmentos foram comparados com banco de dados de sequencia de DNA (*GenBank*), usando o programa BLAST.

Para mutagênese por recombinação homóloga em *X. fastidiosa* foi utilizado o vetor pUCBM21oriC (Da Silva Neto *et al.*, 2008) o qual é replicativo, sendo necessárias diversas passagens da bactéria após a eletroporação para que a recombinação homóloga no genoma ocorra, e também foram usados os vetores pNPTS, pSP3 (Da Silva Neto *et al.*, 2002) e transposon Tn5. Dessa forma, o vetor foi transformado em *E. coli* DH5 α (já descrito anteriormente) e extraído em maior escala com o *kit plasmidPrep Midi Flow* (GE Healthcare), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

O vetor foi posteriormente linearizado através da digestão com a enzima de restrição *SalI* (a qual possui sítio de restrição competível com *XhoI*), defosforilado com a enzima fosfatase alcalina e seguido de purificação utilizando o sistema *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

Os genes *pilC*, *xadA1*, *xadA2*, *pilA1*, *acrA*, *msrA* e *xpsE* foram ligados ao plasmídeo pUCBM21oriC, pSP3, pNPTS (6 μ L de DNA em concentração de 30ng/ μ L, 6 μ L do vetor em concentração de 10ng/ μ L, 1,5 μ L de tampão, 1 μ L da enzima ligase e completado com água para um volume final de 15 μ L, mantidos por 16 horas à 16°C) e inserção do Tn5 conforme condições indicadas pelo fabricante, seguidos de transformação em *E. coli*.

Os clones transformados foram confirmados ou não através de PCR utilizando *primers* específicos para os genes. Confirmadas as inserções, os clones positivos tiveram seus plasmídeos

extraídos em microplacas de filtro (Millipore), seguidos de transformação de *X. fastidiosa* por eletroporação.

3.3 Obtenção e confirmação de mutantes de *X. fastidiosa*

3.3.1 Preparo de células competentes de *X. fastidiosa* e eletroporação

As células competentes de *X. fastidiosa* foram preparadas da seguinte forma: o crescimento bacteriano foi aliqotado em tubos de 50mL de polipropileno gelado e coletadas por centrifugação por 15 minutos a 600xg à 4°C. As células peletadas foram lavadas duas vezes com 30mL de água gelada e uma vez com glicerol 10% gelado por 15 minutos. A cada etapa de lavagem as células foram centrifugadas a 6000xg à 4°C. As células foram ressuspendidas em 40µL de glicerol 10% e misturadas com cerca de 1-5µg de DNA de interesse em cubetas de eletroporação de 0,1 e de 0,2cm. As células foram eletroporadas nas condições de 1,8Kv, 200Ω e 25µF (Monteiro *et al.*, 2001b) e 1,8Kv, 400Ω e 25µF (Li *et al.*; 2007), duas condições utilizadas em bactérias de crescimento lento, sendo imediatamente incubadas em 1mL de meio PWG por 16 horas a 27°C (Tabela 2). Após esse período, 200µL das células foram plaqueadas em placas de meio PWG com antibiótico adequado (ampicilina 10µg/mL) e mantidas em 27°C por até 2 meses até o aparecimento de colônias transformantes ou serem descartadas sem crescimento.

Tabela 2. Linhagens, meios de cultura , construções e condições utilizadas nas eletroporações.

Genes	Vetores	Linhagens	Condições de Eletroporação
<i>pilA2</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	
<i>pilC</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	
<i>xadA1</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	
<i>xadA2</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	
<i>acrA</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	
<i>xpsE</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	
<i>msrA</i>	pNPTS	9a5c	1.8Kv, 200Ω, 25μF
	pSP3	J1a12	
	pUCBM21oriC	11399	1.8Kv, 400Ω, 25μF
	Tn5	U24D	

Após o preparo das células competentes, foram feitas diluições seriadas para observar a população das mesmas. Todas as células que sobreviveram após o processo de eletroporação apresentaram crescimento na diluição 10^7 e 10^8 ufc/mL.

Foi feita a eletroporação das diferentes construções nas diferentes linhagens de *X. fastidiosa* e mantidos em camara de crescimento até o aparecimento de candidatos a transformantes. Os transformantes foram selecionados em placas com meio PWG acrescidas de ampicilina. As colônias transformadas foram passadas individualmente para uma nova placa aumentando sua massa celular. Esse procedimento foi repetido várias vezes, sendo que cada vez consiste em uma repicagem. Ao longo das repicagens, amostras de células foram retiradas e utilizadas para detecção de integração dos plasmídeos nos genes de interesse.

3.3.2 Confirmação do mutante por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia)

Para detecção de integração, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos pUCBM21oriC direto e reverso que amplificam um amplicom de 500pb, indicando a presença do vetor nas células; e outro par referente ao gene de interesse, sendo que o oligonucleotídeo direto hibridiza com parte do gene de interesse mantida na linhagem selvagem (Tabela 3) e o reverso, com o vetor, gerando um amplicom de 1.700pb para o *pilC*, de 1.048pb para o *uspA1* (*xadA1*), de 1,064pb para o *acrA*, 1,078pb para o *xpsE*, 426pb para *fimA* (*pilA2*), 587pb para o *msrA* e 738pb para o *hsf* (*xadA2*) no caso de integração. Esse último amplifica o amplicom esperado somente se tiver ocorrido a integração no gene alvo pois hibridizam uma região no genoma fora do inserto clonado e outra no vetor.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos desenhados através do programa QUICKPRIMER para verificação da recombinação homóloga.

Identificação	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho
xadA1_F_integr	TCTGTGGGTAGTGGTGATG	1,048pb
acrA_F_integr	ATCGTCGAAGCAAAGCC	1,064pb
xpsE_F_integr	CGACAATACGTTGCTGTG	1,078pb
pilA2_F_integr	TGTCCTAGCAGCCATCG	426pb
msrA_F_integr	GGTGCTCATTCTCAGCATAG	587pb
xadA2_F_integr	CAGCAAGGAGCATCAAGA	738pb
pilC_F_integr	CTGCGGTAAATGCTTCG	1,700pb

Uma vez verificada a integração nos genes, colônias isoladas foram novamente obtidas e confirmadas por uma nova PCR. Estas linhagens foram então analisadas por Sourthen blot (Ausubel *et al.*, 1992), para confirmação da integração do plasmídeo.

3.3.3 Confirmação do mutante por Southern blot

Para o Southern blot, as colônias transformantes de *X. fastidiosa* e a linhagem selvagem foram crescidas em meio PWG líquido para extração de DNA genômico e detecção de recombinação. As amostras foram digeridas com a enzima de restrição *EcoRI*, sendo que os fragmentos correspondentes aos genes *pilC*, *xadA1*, *hsF*, *pilA2*, *acrA*, *msrA* e *xpsE*, gerados por PCR, foram marcados com digoxigenina (Dig DNA labeling kit – Roche) e utilizados como sondas. Outro fragmento marcado e utilizado como sonda foi o correspondente ao vetor pUCBM21oriC.

Alíquotas do DNA digerido foram aplicadas em gel de agarose 1% e feita uma corrida eletroforética por 6 horas à 80 volts. Após isso, foi feita a transferência do DNA para uma membrana de nylon Hybond-N (Amersham) e posteriormente fixadas. A membrana foi colocada em solução padrão de hibridação à 65°C por 3 horas (pré-hibridação), a sonda foi denaturada à 95°C por 20 minutos (\pm 50 ml) e utilizada para incubar a membrana por uma noite à 65°C (hibridação). No dia seguinte, a membrana foi lavada 2 vezes por 5 minutos em solução 2xSSC/0,1% SDS em temperatura ambiente e 2 vezes por 15 minutos em 0,1% SSC/0,1% SDS. Enxaguada por 5 minutos em Washing Buffer (Buffer 1 + 0,3 % (v/v) Tween 20) e incubada por 30 minutos em 100 ml de Buffer 2 (Stock Solution: buffer 1 (1:10)) temperatura ambiente. A membrana foi incubada por 40 minutos em 50 ml da solução anti-digoxigenina, lavada 2 vezes com 100 ml de Washing Buffer por 15 minutos e equilibrada por 5 minutos em 20 ml de Buffer 3 (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl₂ 50 mM, H₂O (completar para 1L), ajustar pH 9,5). Após isso, incubada novamente por 5 minutos em 1-2 ml da solução CSPD em temperatura ambiente. Depois de secas, as membranas foram expostas a filme radiográfico (Kodak) por 1 hora à 37°C e revelada em sala escura.

3.3.4 Confirmação do mutante por Western blot

Outra abordagem utilizada para confirmação do mutante foi avaliação da presença das correspondentes proteínas em diferentes condições de biofilme. Para tanto, culturas dos candidatos a mutantes de *X. fastidiosas* foram mantidas em 50mL de meio PW a 28°C e sob agitação de 130rpm. Uma alíquota de 10mL de um pré-inóculo com uma medida de absorbância igual a DO600 = 0,1, correspondente a 10^8 UFC/mL, contendo células crescidas durante sete dias, foi adicionado a 50mL de meio PW sem BSA para a formação dos biofilmes a serem coletados. Foram coletadas proteínas totais de biofilmes de bactérias crescidas por cinco dias. A coleta foi feita lavando-se as células em biofilme três vezes com 1mL de tampão de lavagem (10mM de TrisHCl pH 8,8, 3mM de KCl, 50mM de NaCl, 1 mM de PMSF e 5mM de EDTA pH 8,0) e centrifugação por 2 min a 5000xg. Ao pellet foram adicionados 50µL de solução de lise (1mM de TrisHCl pH 8,8, 1% w/v de SDS, 5mM de EDTA e 1mM de PMSF) e 100mM de DTT (Invitrogen), as amostras foram fervidas por 3 min e estocadas a -80°C. Esse método também foi utilizado para coletar proteínas de *X. fastidiosa* na condição planctônica de crescimento, ou seja, a condição na qual a bactéria não se encontra aderida na forma de biofilme, mas cresce livre no meio de cultura.

As proteínas extraídas dos biofilmes foram quantificadas para que erros de medida da intensidade das bandas após Western blot fossem minimizados. A quantificação foi feita pelo método de Lowry, utilizando-se como comparação uma curva padrão com concentrações de albumina (BSA) entre 25µg/mL e 500µg/mL. Para 100µL de cada solução de BSA foi adicionado 100µL do reagente de Lowry (Invitrogen) e homogeneizado com o auxílio de vortex; essa mistura foi deixada por 20 min a temperatura ambiente. Foi feita nova homogeneização e

foram adicionados 50µL do reagente Folin e Ciocauteu fenol. Após isso, a mistura foi incubada no escuro e a temperatura ambiente por 30 min. A leitura da absorbância foi feita a 740nm.

Amostras com proteínas totais foram padronizadas para uma mesma concentração e aplicadas para eletroforese em acrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Terminada a corrida o gel foi incubado duas vezes, por 30 min, em tampão de transferência (48mM Trisma-base; 39mM glicina; 0,04% SDS; 20% metanol) à temperatura ambiente. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham), de acordo com as especificações da LKB (LKB-Produkter, Bromma, Sweeden), no aparelho Multiphor II Novablot, durante 2 horas, a 0,8 mA/cm². Após a transferência, as membranas foram saturadas com proteínas por 3 horas, sob agitação, em tampão TBS (0,1M Trisma-base; 0,9% NaCl; pH7,6) contendo 5% de leite em pó desnatado. As membranas foram incubadas durante 16 horas a temperatura ambiente, em tampão contendo TBS, 0,1% de Tween 20 (TBS-T), 5% de leite em pó desnatado e os anticorpos específicos para as proteínas, que haviam sido previamente expressas em sistema heterólogo (Caserta *et al.*, 2010). Após 16 horas de incubação, as membranas foram lavadas por três vezes com TBS-T e incubadas por 1 hora em TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado e o conjugado IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA). A revelação das membranas foi feita em solução contendo 25mL de tampão de reação (0,1M Tris-HCl pH 9,5; 0,1M NaCl; 5mM MgCl₂), 2mg de BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate) e 4mg de NBT (nitro blue tetrazolium). Após a revelação, as membranas foram lavadas em água destilada e secas em papel absorvente.

3.3.5 Confirmação do mutante através da microscopia

A capacidade de formar biofilme estruturado também foi uma das características fenotípicas avaliadas. Para tanto, o biofilme foi monitorado através de marcação imunofluorescente com anticorpos contra as proteínas avaliadas. Para o crescimento aderido, típico do biofilme, as células foram crescidas em meio PW utilizando-se lamínulas de vidro como suporte. Lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro foram colocadas em placas NUNC de 24 poços (Nunclon delta SI Multidish 24 wells - Nunc A/S, Roskilde, Denmark) contendo 900µL de meio PW por poço. Sobre as lamínulas foram adicionados 100µL de um pré – inóculo da linhagem selvagem como controle e também dos transformantes de *Xylella fastidiosa*, ajustado para DO600 = 0,1. Essas culturas foram deixadas a 28°C sem agitação e foram analisadas aos 5 dias de crescimento, correspondentes às fases de formação do biofilme. As análises de imunofluorescência foram realizadas segundo Roper (2007). Para a análise ao microscópio de fluorescência, o meio PW foi retirado gentilmente com uma pipeta e o biofilme foi marcado com os anticorpos separadamente em uma diluição de 1:1.000 em solução contendo 1% de BSA em PBS. A placa foi envolvida em papel alumínio e incubada por 1 hora a 37°C, após isso, foram feitas 2 lavagens com 1mL de PBS contendo 0,2% de BSA. Para a localização das proteínas no biofilme, foi utilizado uma diluição de 1:1.000 em tampão PBS contendo 0,2% de BSA do anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com rodamina. A placa foi envolvida com papel alumínio e incubada por 1 hora a 37°C. Novas lavagens foram feitas. A contrastação das células do biofilme foi feita com o corante para ácido nucléico Syto 9, diluído 600 vezes em água MilliQ autoclavada. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 min, no escuro. As imagens foram feitas no microscópio Olympus UIS2 Fluorescence utilizando os filtros U-MWB2 e U-MWG2, em um aumento de 10.000 vezes.

Outro método utilizado para avaliação pela microscopia foi a coleta da suspensão bacteriana com 5 dias de crescimento, através da centrifugação. O pellet bacteriano foi ressuspenso em 20µL de agarose 0.3%, uma alíquota foi plotada na lâmina de microscopia e fixada com fogo. Após isso, foi feito todo o procedimento de marcação diretamente na lâmina como descrito acima.

Para imunolocalização celular da proteína fimbrial, o crescimento celular da *X. fastidiosa* em meio líquido foi coletado através de centrifugação à 3000xg por 5 minutos. Cada *pellet* foi desidratado utilizando soluções de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, na sequência, deixando a amostra durante 10 min em cada solução. Depois de desidratadas, as amostras foram emblocadas em resina LR White (London Resin Company). Secções ultrafinas das amostras foram obtidas utilizando micrótomo, as quais foram colocadas sobre grades de níquel recobertas com Formvar para a realização da imunomarcação. Para este processo, as grades com as secções foram incubadas em gotas de tampão de pré-incubação (PBS 0,01M contendo 0,15M de cloreto de sódio, 1% de BSA e 0,05M de glicina) por 40 min em câmara úmida. Após isso, as grades foram colocadas em contato com gotas de solução (PBS 0,01M; 0,15M de cloreto de sódio e 0,1% de BSA) contendo o anticorpo desejado na diluição de 1:100 ou 1:200, onde foram deixadas por 5 horas na câmara úmida e temperatura ambiente. As grades foram lavadas em tampão de lavagem (PBS 0,01M; 0,15M de cloreto de sódio e 1% de BSA) três vezes, deixando-as 5 minutos em contato com cada gota e transferidas para gotas de solução para diluição de anticorpos conjugados com ouro coloidal (PBS 0,01M; 0,15M de cloreto de sódio; 0,1% de BSA; 1% de polietilenoglicol e 2,22% de gelatina de peixe), contendo anticorpos IgG anti-rabbit (Sigma) na diluição de 1:50. A incubação dessa etapa foi feita por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Foi feita nova lavagem no tampão de lavagem, como descrito anteriormente,

além de outras três lavagens em gotas de água destilada. A contrastação das grades foi feita em gotas de acetato de uranila 3% e citrato de chumbo, incubando-as por 15 min em cada gota. O excesso foi retirado em lavagens com água, deixando as grades por 5 min em cada gota. Após secagem, as grades foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Zeiss EM 900 (Caserta *et al.*, 2010). Para a observação das estruturas ou pili pertencentes as células bacterianas, foi utilizada a microscopia de transmissão contrastando as células bacterianas fixadas nas grades de níquel cobertas por Formvar e contrastadas com o ácido fosfotúngstico, deixando as células com sua estruturas mais escuras, contrastando com todo o resto da amostra, tal como realizado por Meng *et al.* (2005), quando analisou estruturas das células mutantes da linhagem Temecula da *X. fastidiosa*. Toda esta etapa do trabalho foi feita na ESALQ/USP, em colaboração com o professor Dr. Elliot Watanabi Kitajima, no laboratório de Microscopia Eletrônica NAP/ MEPA.

3.3.6 Análise da expressão gênica do mutante em relação à linhagem selvagem através do RT-qPCR (Transcrição Reversa procedida por Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real)

As células bacterianas com crescimento em meio líquido, sob 130rpm de agitação foram coletadas no quinto dia de incubação. O RNA total das células crescidas da linhagem selvagem e do mutante foram extraídos utilizando o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen). Posteriormente o RNA foi tratado com DNase utilizando o sistema de coluna DNase Qiagen e RDD Buffer (Qiagen). A concentração do RNA extraído foi medida pela leitura de absorbância, a 260nm. A integridade do RNA foi avaliada por corrida eletroforética em gel desnaturante de agarose 1%. Para síntese do cDNA foram utilizados os seguintes reagentes: tampão da SuperScript II (segundo protocolo da Invitrogen), 2µL do 0.1M DTT (dithiothreitol), 1µg de

random *primers* (Gibco BRL), 2 μ L dNTP 10mM, 1 μ L do inibidor da RNase (Invitrogen) e 1 μ L of SuperScript II reverse transcriptase (200U/ μ L Invitrogen). A síntese do cDNA foi procedida a 42°C por 60 min.

Para avaliação da expressão gênica foi realizada a qPCR. Foram utilizados pares de oligonucleotídeos para o gene alvo e para um controle endógeno (XF0656). O controle endógeno foi utilizado para normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA. Para certificação da não ocorrência de contaminação de DNA nas amostras foram feitas reações de PCR utilizando *primers* para o gene alvo e o RNA total como molde. As reações prévias com o controle endógeno em diferentes experimentos para normalizar o Ct (definido como o primeiro ciclo de amplificação em que a fluorescência emitida do produto de PCR é detectada acima do ‘threshold’) já haviam sido feitas em outros trabalhos do grupo de pesquisa (Rodrigues *et al.*, 2008). As reações de amplificações foram feitas utilizando o ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems), em triplicatas, utilizando sempre controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações. Para cada reação, utilizou-se aproximadamente 2 μ L de cDNA (sendo que a concentração foi previamente padronizada), 1 μ M de cada primer (direto e reverso) e 12,5 μ L do “SYBR green PCR master mix” (Applied Biosystems), sendo o volume final ajustado para 25 μ L. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C. As amplificações foram checadas no ABI PRISM 7500 durante a reação e as concentrações relativas foram calculadas através do Δ Ct. Para todas as reações feitas no qPCR foi realizada uma curva de dissociação através do aparelho ABI 7500 para a verificação de amplificações inespecíficas decorrentes de possíveis contaminações.

3.4 Inoculação em plantas

Para avaliação da patogenicidade da linhagem mutante foram utilizadas 15 plântulas de laranja doce, cultivar Pêra (*Citrus sinensis*) e 15 plântulas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) para cada estirpe (mutante e tipo selvagem). As células de *X. fastidiosa* foram ressuspensas em PBS em uma concentração de 10^8 UFC/mL. Uma alíquota de 40 μ L foi inoculada no caule das plantas através de pequenas perfurações utilizando agulhas entomológicas. Plantas controle foram inoculadas apenas com PBS. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até aparecimento de sintomas. A colonização dentro dos hospedeiros da bactéria mutante e do tipo selvagem foram acompanhadas através de isolamento em meio PW sólido. Para tal, foram coletados os caules das plântulas de laranja doce e de tabaco infectados com as estirpes em avaliação, divididos a cada 5 cm, a partir do ponto de inoculação, e feito isolamento de cada parte correspondente, observando assim a colonização e movimentação da bactéria na planta.

4. Resultados e discussão

Com o completo sequenciamento do genoma de um organismo, muitas informações podem ser exploradas, abrindo portas para inúmeras possibilidades de conhecimento de sua biologia. Embora no presente trabalho tenha sido proposto trabalhar com os genes *xadA1*, *xadA2*, *pilA2*, *pilC*, *acrA*, *msrA* e *xpsE*, utilizando-se de diferentes linhagens de *X. fastidiosa* (9a5c, J1a12, 11399 e U24D), devido as dificuldades eminentes à transformação de *X. fastidiosa*, agente causal da CVC, somente foram obtidos mutantes para o gene *pilC*, na linhagem J1a12, sobre o qual o trabalho foi então conduzido.

4.1 Análises genotípicas do mutante em relação à linhagem selvagem

4.1.1 A linhagem mutante de *X. fastidiosa* (J1a12 Δ *pilC*)

A mutagênese por recombinação homóloga tem sido utilizada com sucesso na obtenção de mutantes de bactérias de difícil transformação como *Lactobacillus sake* (Leloup *et al.*, 1997), *Streptococcus pneumoniae* (Lee *et al.*, 1998), *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton *et al.*, 2001), a *Borrelia burgdorferi* (Baulard *et al.*, 1996; Li *et al.*; 2007) e a própria *X. fastidiosa* (Da Silva Neto *et al.*, 2008).

Dentre os vários métodos utilizados para obtenção de mutantes de *X. fastidiosa* da CVC testados neste trabalho, somente o baseado em mutagênese por recombinação homóloga apresentou resultados satisfatórios, onde 9 colônias foram obtidas.

A Figura 7 representa um esquema simplificado de como ocorre a recombinação do gene e a obtenção do mutante. A obtenção do mutante depende de um único evento de recombinação no qual a construção é inserida no gene alvo gerando duas cópias parcialmente truncadas.

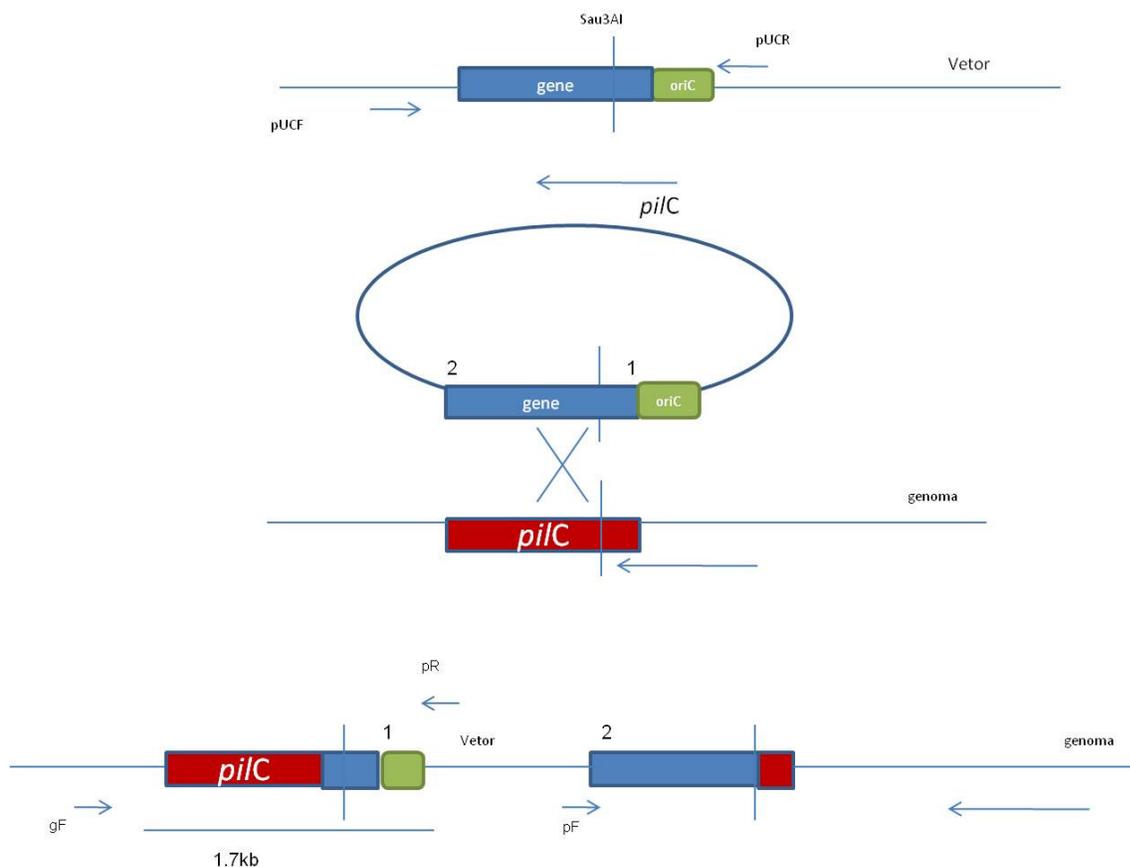


Figura 7. Esquema de integração utilizado para geração de mutante para o gene *pilC* de *X. fastidiosa*. O vetor (pUCBM21oriC) contendo o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção e o fragmento interno do gene *pilC* da bactéria. A integração (representada pelo X), resulta em duas cópias parcialmente deletadas do *pilC*, separadas pelo vetor pUCBM21oriC.

As análises dos mutantes foram feitas a cada três repicagens de sete dias. As PCRs, utilizando *primers* específicos (Tabela 3) foram feitas com as colônias nas terceira, oitava e décima segunda passagem, quando foi detectado o amplicom de 1.7kb (1,700pb), indicando integração no gene *pilC*.

4.1.2 Amplificações com *primers* específicos

Inicialmente foi feita a verificação da presença do vetor na célula através de PCR com *primers* específicos para o plasmídio (Figura 8). Em seguida, para verificação de integração, os clones foram analisados com *primers* que amplificam as bandas esperadas somente se houver integração do gene, pois um dos *primers* hibridiza com uma região no genoma fora do inserto clonado e outro no vetor.

O gel mostrando o produto da amplificação na Figura 9 foi feito com a cultura mutante na vigésima segunda repicagem, indicando a banda de integração (ou amplicom), de 1,7kb, do vetor no genoma da bactéria. Em todas as PCRs foi utilizado como controle a linhagem do tipo selvagem.

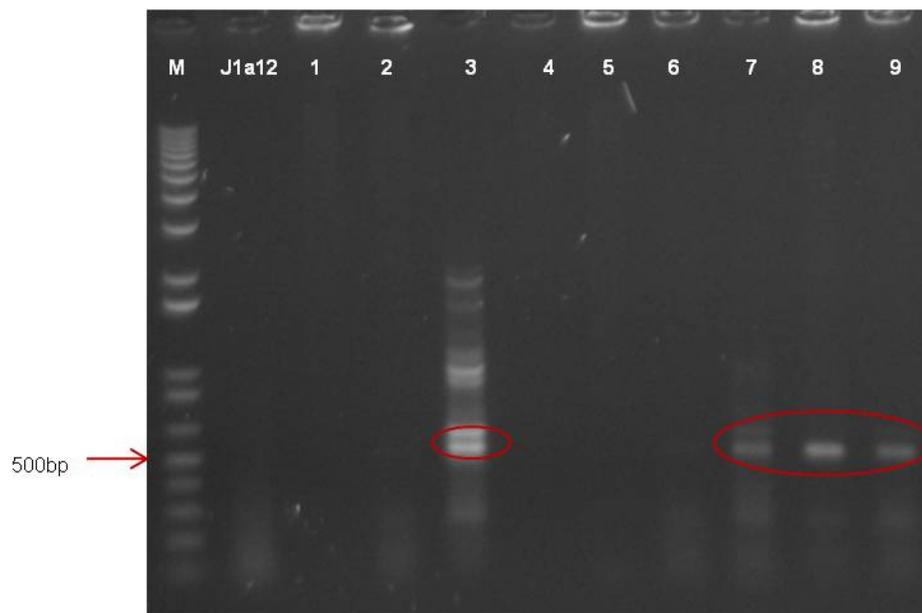


Figura 8. PCR das colônias mutantes na terceira repicagem. M. marcador molecular 1Kb plus. Linhagem selvagem J1a12. 1-9. Colônias crescidas após transformação com o vetor pUCBM21oriC. Os círculos em vermelho indicam a presença do amplicom de 500pb esperado quando utilizado primers desenhados para o vetor pUCBM21oriC.

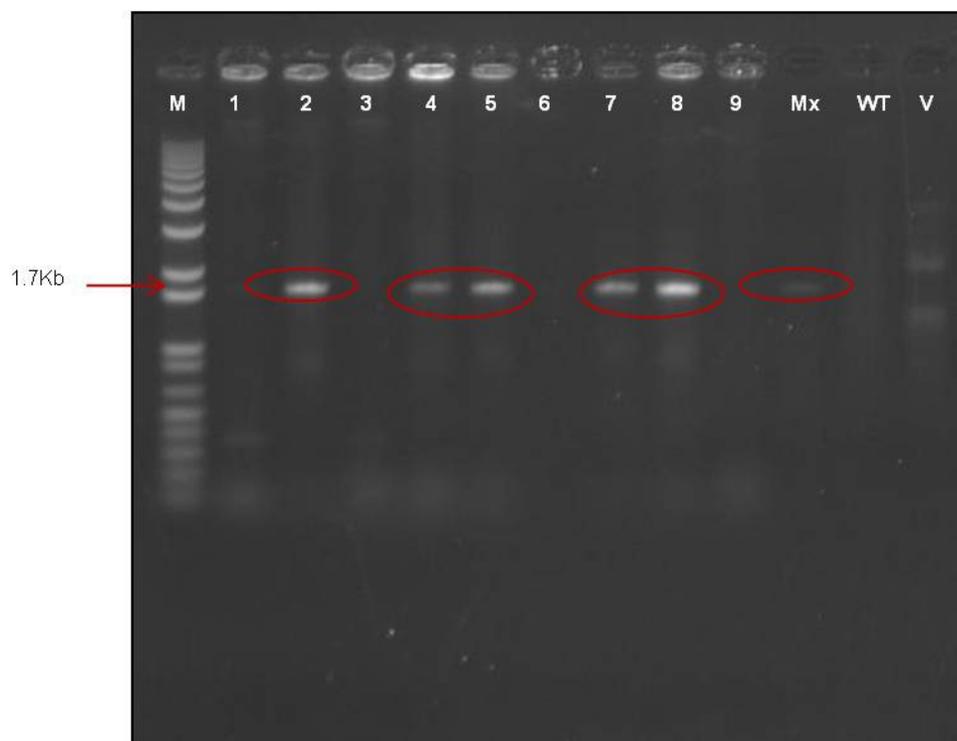


Figura 9. PCR das colônias mutantes na vigésima segunda repicagem. M. marcador molecular 1Kb plus. 1-9. Colônias crescidas após transformação com o vetor pUCBM21oriC. Mx. Mistura das colônias mutantes. WT. Linhagem selvagem J1a12. V. Vetor pUCBM21oriC. Os círculos em vermelho indicam a presença do amplicom de 1.7Kb esperado quando utilizado primers desenhados para a verificação de integração.

Os clones considerados positivos para recombinação foram analisados por Southern blot utilizando como sonda o gene alvo identificando o clone onde o gene foi corretamente interrompido pela inserção do vetor (Figura 10). Outra sonda utilizada foi um fragmento do vetor, indicando a presença do mesmo no genoma da bactéria. Esse tipo de análise permitiu confirmar a correta integração da construção pUCBM21oriC*pilC* dentro da região do gene *pilC* no cromossomo da bactéria. A sonda do gene *pilC* reconheceu o fragmento *EcoRI* de 3.500 pb na linhagem selvagem J1a12 e os fragmentos de 3.450pb e 670pb na bactéria transformada (Figura 10). Estas duas bandas indicam a presença de um sítio da enzima *EcoRI* na construção integrada, confirmando a inserção dentro do gene *pilC*, gerando um mutante.

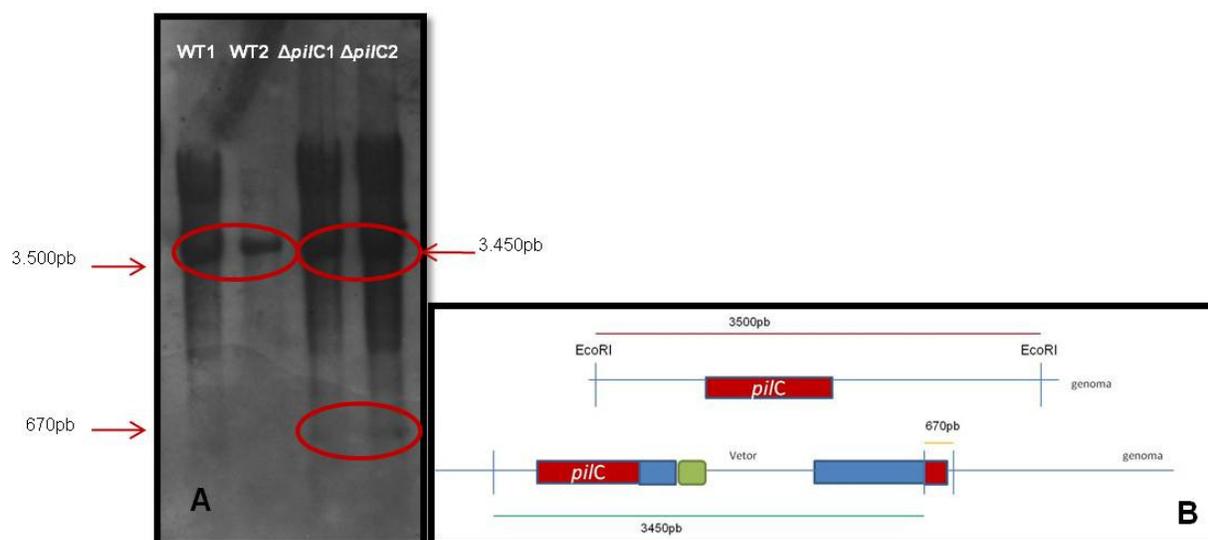


Figura 10. A. Southern blot da linhagem selvagem e do mutante. WT1: linhagem selvagem 9a5c, WT2: linhagem selvagem J1a12, $\Delta pilC1$ e 2: mutante para o gene *pilC*. Os círculos indicam a presença dos fragmentos esperados. B. Esquema da inserção do vetor no genoma da bactéria indicado pela presença de um sítio da enzima de restrição *EcoRI*, mostrando pelo fragmento de 670pb.

Posteriormente, o mutante foi analisado por Western blot (Figura 11), para demonstrar que a inserção do vetor no gene aboliu totalmente a produção da proteína correspondente. Juntamente com o gel de transferência, foi feito outro gel para SDS (Figura 11A), corado com Comassie blue para verificar se as proteínas não estavam degradadas e se a concentração aplicada das proteínas do mutante foi a mesma das linhagens selvagens, validando assim o resultado do Western blot. Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-PilC de *X. fastidiosa* (Caserta *et al.*, 2010). O anticorpo contido no soro anti-PilC reconheceu na linhagem selvagem a proteína de aproximadamente 56kDa, não detectando nada no mutante, confirmando a ocorrência da mutação.

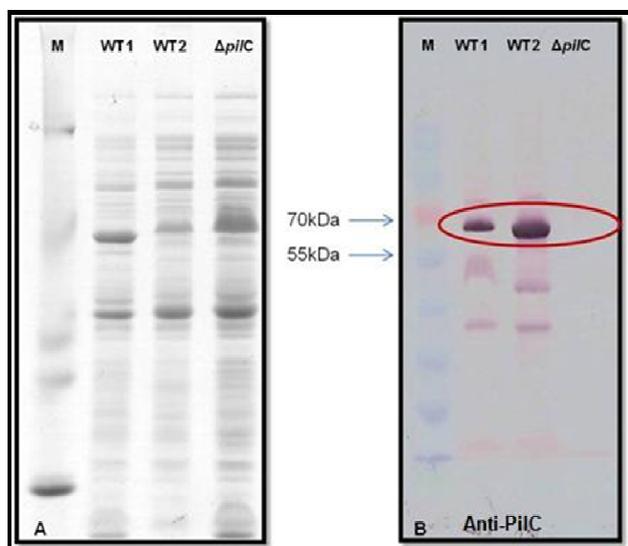


Figura 11. A. Gel SDS, corado com Comassie blue, contendo proteínas totais de duas linhagens selvagens de *X. fastidiosa* e da linhagem transformada. B. Western blot contendo proteínas totais extraídas das linhagens selvagens 9a5c (WT1), J1a12 (WT2) e mutante para o *pilC* ($\Delta pilC$) contra anti-PilC. M. Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). O círculo indica o fragmento referente à proteína.

PilC, é uma proteína com tamanho predito de 56kDa e, segundo análises da sua sequência de aminoácidos faz parte da montagem de pili tipo IV. A massa molecular aparente observada após Western blot correspondeu ao tamanho predito. Li *et al.*(2007) discutem que pili tipo IV, como é o caso de PilC, também participa de adesão inicial da bactéria ao substrato.

4.1.3 Expressão gênica de *pilC* através de RT-qPCR

Após detectada a integração, foi feita uma avaliação da expressão gênica do gene *pilC* (XF2538) da linhagem selvagem J1a12 em relação ao mutante através da PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Controles endógenos (*petC*, *acrA*, 0656, *pilA2*, *pilA* e *pilD*) foram utilizados para normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA. Para certificação da não ocorrência de contaminação de DNA nas amostras foram feitas PCR

utilizando *primers* para o gene alvo e o DNA total como molde (Figura 12), onde foi observado ampliações esperadas para cada par de *primers* do genes alvo (*petC*, *acrA*, 0656, *pilA2*, *pilA*, *pilD* e *pilC*).

As análises de RT-qPCR mostraram que a inserção do vetor bloqueou a expressão do gene XF2538 (*pilC*) nas células transformadas de *X. fastidiosa*, ao contrário da expressão na linhagem selvagem (Figura 13). A repressão da expressão do gene XF2538 (Figura 13) confirma que este gene está envolvido na formação do biofilme e no *twitching motility* de *X. fastidiosa*. Os pili tipo IV são envolvidos na adesão de bactérias ao hospedeiro, motilidade celular e são considerados fatores de virulência (Meng *et al.*, 2005). De Souza *et al.* (2004, 2005) reportaram que *pilC* é expresso na condição de biofilme.

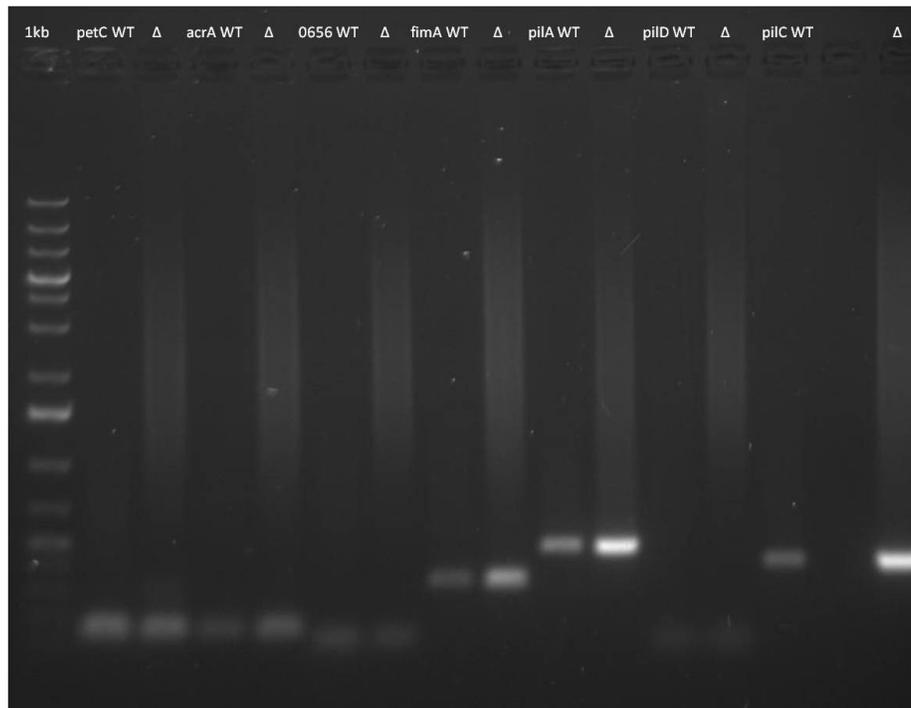


Figura 12. Gel da RT-qPCR com o cDNA da linhagem selvagem e do mutante. M. marcador molecular 1Kb plus (GeneRuller-Fermentas). As canaletas estão identificadas com os respectivos primers testados na reação de expressão gênica. WT. Linhagem selvagem J1a12. Δ. Linhagem transformada para *pilC*.

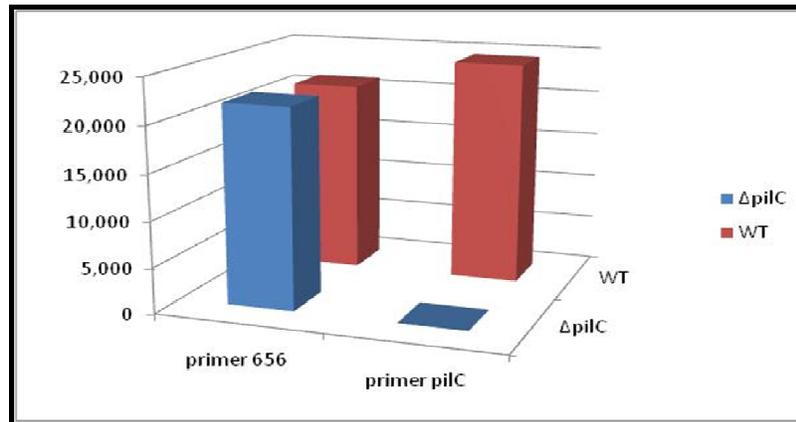


Figura 13. Análise da expressão gênica de XF0656 (controle endógeno) e XF2538 (*pilC*) de *X. fastidiosa*. WT. Linhagem selvagem J1a12. $\Delta pilC$. Linhagem transformada com a construção pUCBM21oriC $\Delta pilC$. O eixo X indica os genes analisados, o eixo Y indica os valores de Ct (*cycle threshold*).

4.2 Análises fenotípicas do mutante em relação à linhagem selvagem

4.2.1 Morfologia da colônia

As colônias mutantes foram mantidas em meio PW sem BSA, para melhor observação das estruturas celulares. Visualizações sob microscópio estereoscópio revelaram alterações fenotípicas destes mutantes, principalmente nas bordas, quando comparadas à linhagem selvagem (Figura 14). As bordas das colônias da linhagem selvagem apresentaram formato irregular mostrando a presença de fímbrias periféricas, a qual indica a presença do *twitching motility* mediado pela fímbria tipo 4 (Galvani *et al.*, 2007). Já as colônias do mutante J1a12 $\Delta pilC$ apresentaram bordas mais lisas e bem demarcadas, mostrando a ausência das fímbrias e que, segundo Galvani *et al.*, 2007 e Meng *et al.*, 2005, pode ter efeito no *twitching motility*. Galvani *et al.* (2007) mostraram que células de *X. fastidiosa* mutantes para fímbria tipo 4 apresentavam

colônias com bordas lisas, sem a presença das fímbrias e também não apresentavam *twitching motility*.

Um outro método utilizado para verificação de movimento foi feito através da deposição da suspensão bacteriana da linhagem selvagem J1a12 e do mutante em placas contendo meio PW sólido sem BSA. Após 5 dias em câmara de crescimento à 28°C pode-se observar sob microscopia que a linhagem selvagem apresentou um halo, suposta zona de expansão das células, em volta da área onde foi depositada, indicando um crescimento ou expansão da suspensão bacteriana como consequência do *twitching motility* segundo Mattick, 2002. Já no mutante, a expansão do crescimento não foi observado, apenas a borda apresentou um aumento da massa celular, mostrando que a houve um crescimento bacteriano mas não a expansão de sua área (Figura 15).

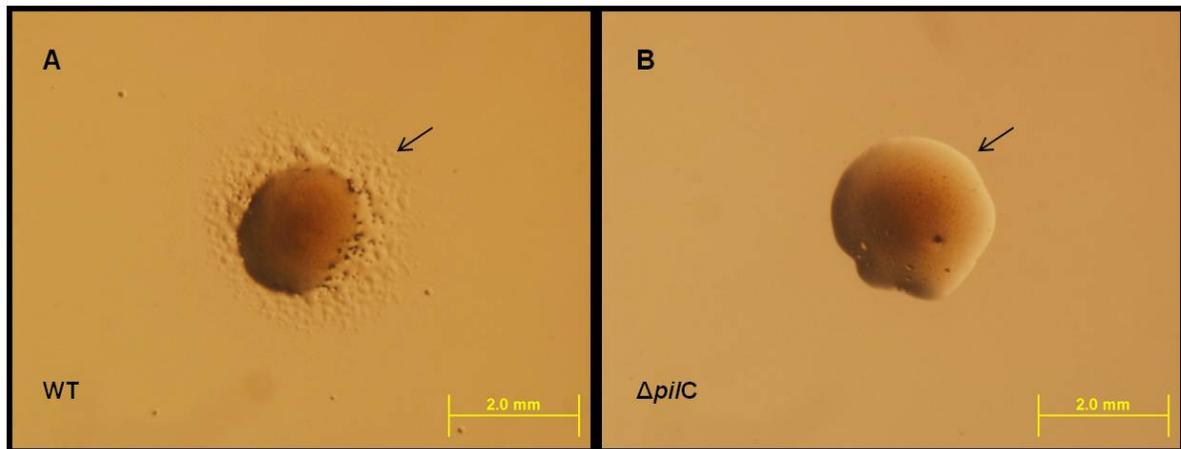


Figura 14. Características das colônias da linhagem selvagem -WT (A) e do mutante $\Delta pilC$ (B) crescidas em meio PW sem BSA. As setas indicam a presença das fímbrias na borda da colônia da linhagem selvagem e a ausência na colônia mutante (B).

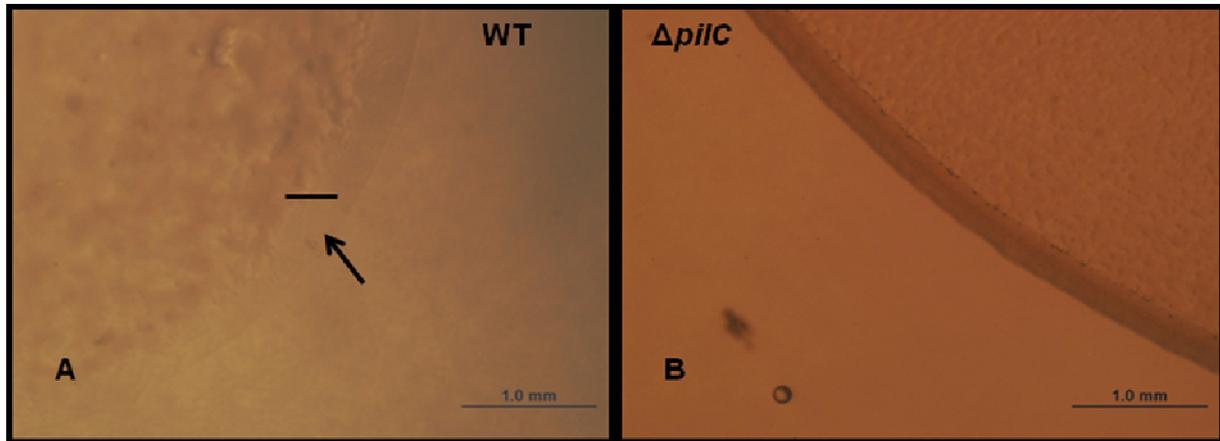


Figura 15. Características das colônias da linhagem selvagem - WT (A) e do mutante $\Delta pilC$ (B) crescidas em meio PW sem BSA. A seta indica um halo (ou *twitching motility*) da suspensão bacteriana depositada em meio PW sólido sem BSA, mostrando sua expansão. Na suspensão do mutante, não foi observado a presença do halo de crescimento (B).

4.2.2 Agregação celular

Células da linhagem selvagem de *X. fastidiosa* J1a12 e do mutante $\Delta pilC$ foram ressuspendidas em agarose 0,3% e posteriormente depositadas em lâminas para microscopia, com o objetivo de observar a movimentação das mesmas e a capacidade de adesão ou agregação célula-célula. A Figura 16 mostra que as células da linhagem selvagem se agregaram e rapidamente formaram grumos indicando a formação de biofilme. Já as células do mutante não demonstraram esse mesmo comportamento, podendo-se observar apenas células dispersas em toda a área analisada.

Outra metodologia utilizada para observação de capacidade de agregação foi através da observação temporal da suspensão bacteriana, a cada hora durante 6 horas, e medição da mesma através da densidade óptica. A capacidade de agregação das células das linhagens selvagens 9A5c e J1a12 foi diferenciada, através da DO_{600} , quando comparada à do mutante. A Figura 17 mostra a diferença de agregação entre as suspensões bacterianas.

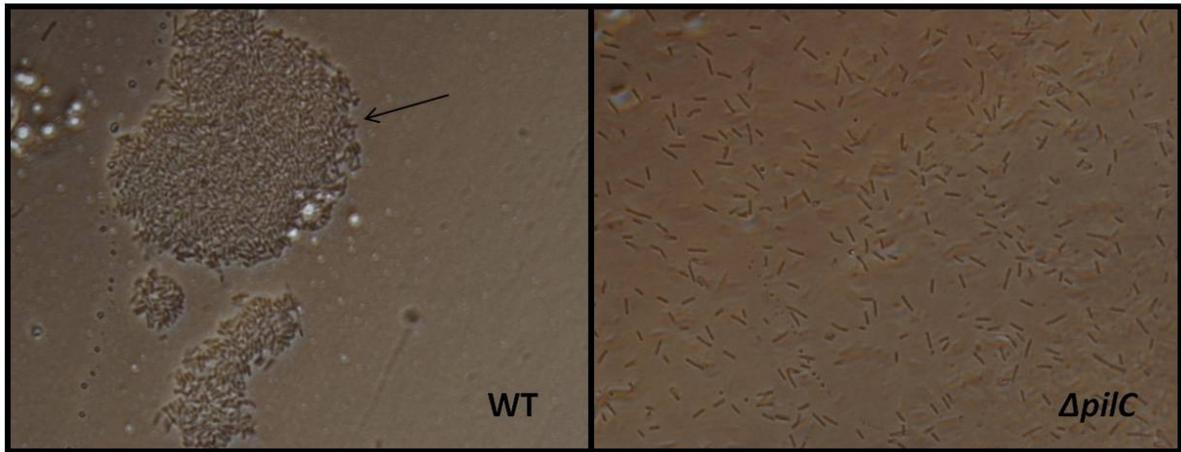


Figura 16. Comparação da movimentação observadas em microscópio, aumento 100x, das células da linhagem selvagem J1a12 (WT) onde a seta indica agregação celular e formação de biofilme, e do mutante ($\Delta pilC$) onde as células encontram-se dispersas por toda a área analisada.

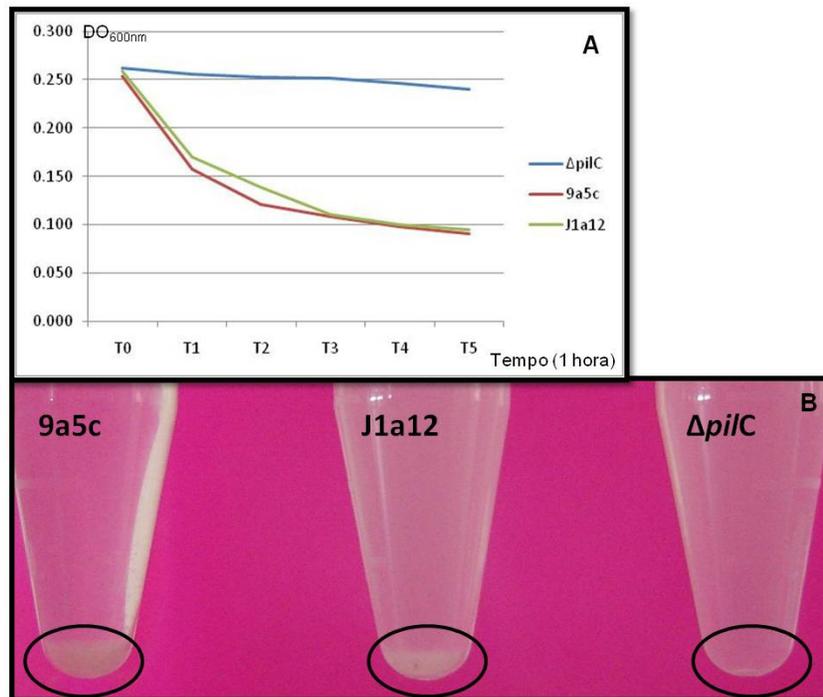


Figura 17. Comparação da agregação celular através da observação e medição da densidade óptica. A. Gráfico mostrando a agregação medida em espaço de tempo (1 hora). B. Os círculos indicam a presença da massa celular agregada nas linhagens selvagens 9a5c e J1a12 e ausência no mutante $\Delta pilC$.

4.2.3 Formação do biofilme

Após as análises por microscopia, a linhagem selvagem e o mutante foram transferidos para o meio PW líquido para monitoramento da formação do biofilme. Pode-se observar que após 5 dias de crescimento sob agitação, a linhagem selvagem apresentou a formação de um biofilme denso e muito bem aderido ao frasco (Figura 18A), evidenciado pela deposição na parede do frasco e pela coloração com cristal violeta (Cloreto de hexametilenopararosanilina) (Figura 18B). O mesmo não pode ser dito quando observado o crescimento e o biofilme do mutante. As poucas células que pareciam estar aderidas ao frasco, quando lavadas e coradas com o cristal violeta se soltaram, evidenciando a baixa capacidade de adesão e formação do biofilme (Figura 18A e B). Esses resultados não condizem com os apresentados por Meng *et al.* (2005) no qual, quando testado a formação do biofilme pelo mutante para um gene de fímbria tipo 4 para linhagem Temecula de *X. fastidiosa*, o biofilme foi muito mais denso e estruturado do que o apresentado pela linhagem selvagem. Porém, o gene usado para os estudos apresentado neste trabalho não é o mesmo estudado pelo referido autor, o que explica o fenótipo diferente da bactéria.

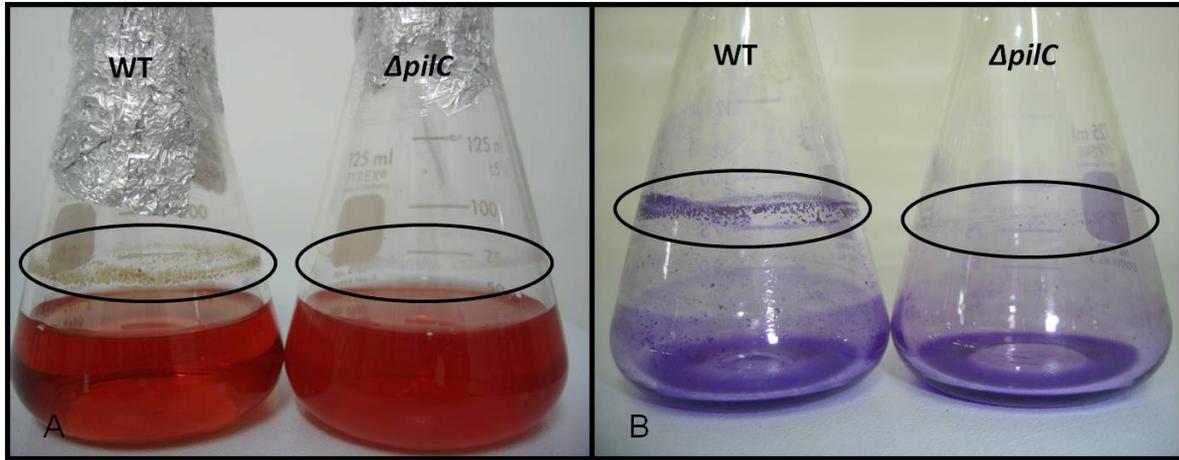


Figura 18. Crescimento das células da linhagem selvagem J1a12 (WT) e do mutante $\Delta pilC$ em meio PW líquido para verificação da formação de biofilme. A. Células crescidas sob agitação 130rpm por 5 dias, nota-se que no mutante não ocorre a formação do biofilme. B. Células crescidas sob agitação 130rpm por 20 dias, coradas com cristal violeta.

As células aderidas ao frasco (3 réplicas de cada linhagem) foram coletadas e medidas suas quantidades através da absorbância a 560nm. Pode-se ser observado que a quantidade de massa celular da linhagem selvagem foi superior a do mutante, mostrando mais uma vez que as células do mutante não são capazes de aderir ao frasco.

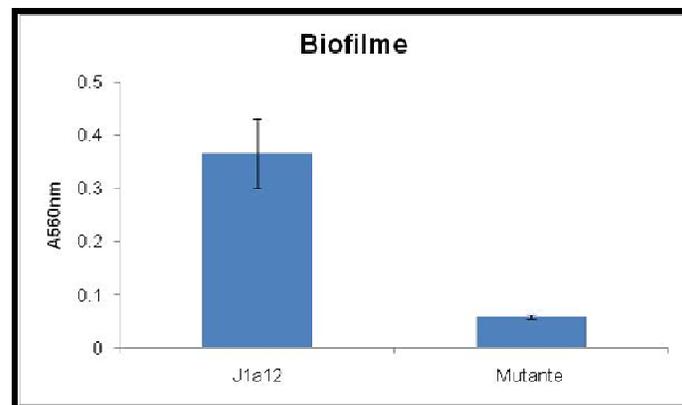


Figura 19. Gráfico mostrando a diferença de quantidade de massa celular aderida ao frasco formando biofilme da linhagem selvagem J1a12 e do mutante $\Delta pilC$.

Como observado no frasco (erlenmeyer), a linhagem mutante não formou biofilme e comparado aos dados publicados sobre esta estrutura, mutantes para a fimbria tipo IV apresentam biofilme mais denso e estruturado do que o formado pela linhagem selvagem Temécula de *X. fastidiosa* em videira. Como nosso sistema é muito parecido com *P. aeruginosa*, foi visto que para essa bactéria, quando transformada para a fimbria tipo IV também perdeu a capacidade de adesão e formação desta estrutura (Mattick, 2002). Esse autor mostra com a interrupção do gene *pilC* ocorreu uma mudança na leitura do *operon* do gene estudado (Figura 20A), alterando também a expressão dos outros genes ali presentes. O gene *pilD*, localizado *dowstream* ao *pilC* também teve sua expressão alterada, não exercendo sua função de clivar as proteínas PilA em subunidades que fazem parte da montagem da estrutura do pili tipo I e tipo IV. Como *pilD* parou de clivar PilA, houve um acúmulo dessa proteína no citoplasma, interrompendo sua expressão (Figura 20B). A não formação desta estrutura leva à ausência de movimentação sistêmica, adesão e conseqüentemente, ausência de sintomas.

Um fato interessante observado foi que, assim como em *P. aeruginosa*, a inserção do vetor também reprimiu a expressão do gene *pilA2* (XF2539), envolvido na montagem do pili (pilin) e presente no mesmo operon de *pilC*. A repressão da expressão dos genes XF2538 e XF2539 (Figura 20C) confirma que estes genes estão envolvidos na formação do biofilme e no *twitchig motility* de *X. fastidiosa*. Os pili tipo IV são envolvidos na adesão de bactérias ao hospedeiro, motilidade celular e são considerados fatores de virulência (Meng *et al.*, 2005). De Souza *et al.* (2004, 2005) reportaram que tanto *fimA* (*pilA2*) quanto *pilC* são expressos na condição de biofilme.

Na Figura 20D, foi observado nos resultados do Western blot quando utilizado o anticorpo contra PilA2, a proteína cujo tamanho predito é de 15kDa. Essa proteína PilA2 é uma

subunidade protéica que compõe a haste do pili, e é similar a FimA de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Neste microrganismo foi demonstrado que FimA forma o feixe que constitui a haste da fimbria tipo IV (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997). De Souza *et al.* (2005) observaram uma maior expressão de *fimA* ao terceiro, quinto e décimo dias de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, sugerindo que FimA é uma proteína importante para as fases iniciais da formação do biofilme, provavelmente pela função de aderência das bactérias ao substrato, já que na sua sequência são encontradas diversas cisteínas que poderiam formar pontes dissulfeto com a superfície, promovendo adesão celular (Leite *et al.*, 2002).

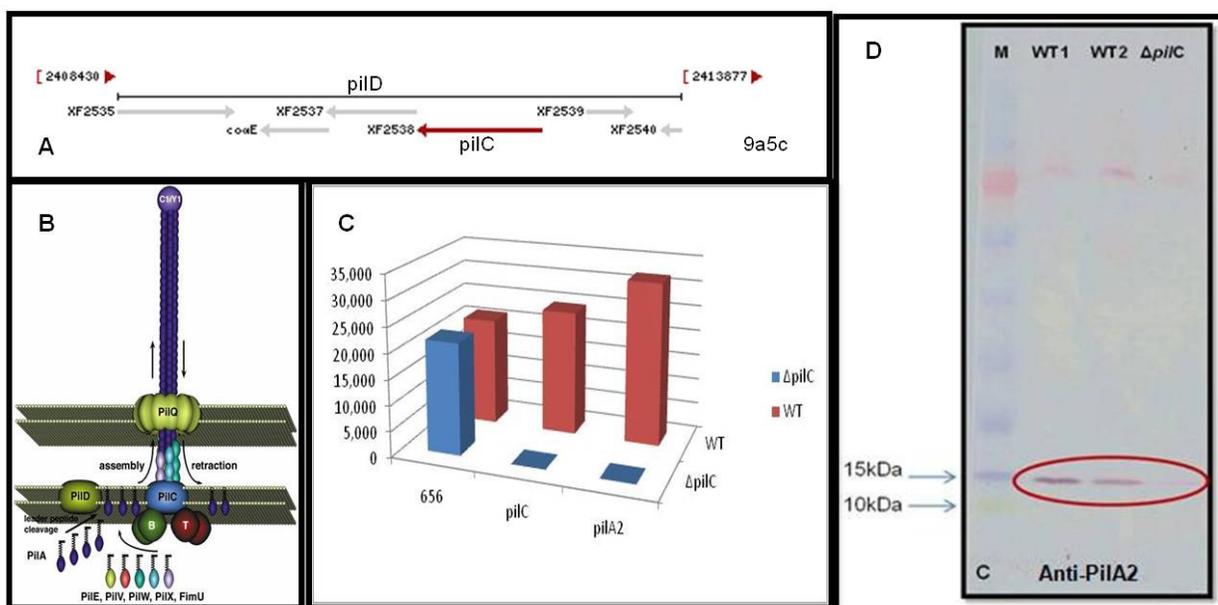


Figura 20. A. Operon da *X. fastidiosa* linhagem 9a5c mostrando a posição dos genes *pilC* e *pilD*. B. Estrutura do pili tipo IV em *P. aeruginosa* (Mattick, 2002). C. Expressão gênica do *pilA2* (XF2539) da linhagem selvagem J1a12 (WT) e do mutante $\Delta pilC$. D. Western blot contendo as proteínas totais extraídas da linhagem selvagem 9a5c (WT1), J1a12 (WT2) e do mutante $\Delta pilC$ contra anti-PilA2. M. Marcador PageRuler™ Prestained Ladder Plus (Fermentas). O círculo indica o fragmento referente à proteína.

4.2.4 Análises por microscopia de transmissão e imunofluorescência

As bactérias, linhagem selvagem e mutante foram então analisadas por microscopia de transmissão e imunofluorescência. A microscopia de transmissão foi feita através da análise de secções da suspensão bacteriana coletada por centrifugação e emblocada em resina (LRWrite). As secções foram marcadas com o anticorpo anti-PilC de *X. fastidiosa*, como já descrito na metodologia, e posteriormente analisadas por microscopia de transmissão. Por ser uma proteína envolvida na montagem de pili tipo IV, ela é encontrada na parede da célula bacteriana, e a marcação da proteína PilC esta associada à parede das células de *X. fastidiosa* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp), local onde foi encontrada a marcação na linhagem J1a12. O mesmo resultado foi observado por Caserta *et al.* (2010) ao analisar secções da linhagem selvagem 9a5c. Já no mutante, a marcação na parede das células não foi observada indicando que a proteína não esta sendo produzida (Figura 21).

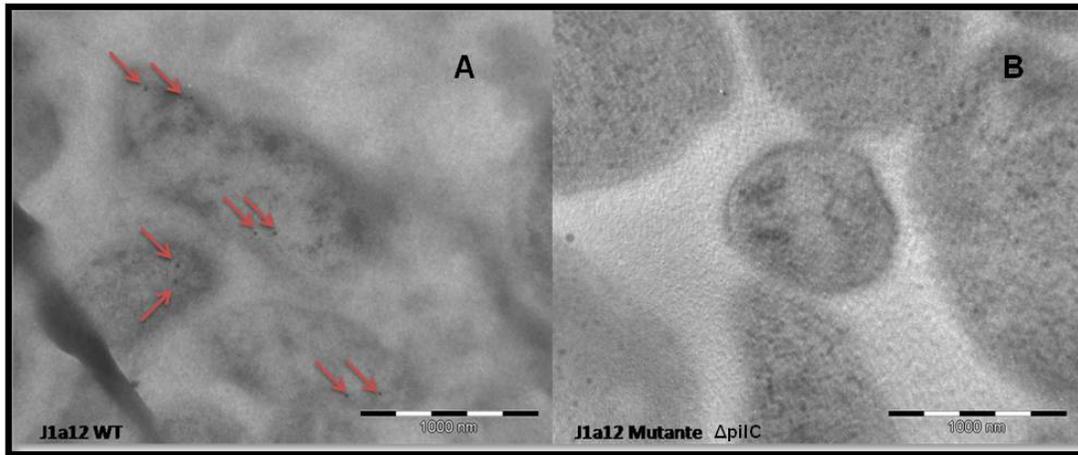


Figura 21. Detecção de PilC em células de *X. fastidiosa* da linhagem selvagem e do mutante. As setas em vermelho indicam a marcação da proteína pelo anticorpo anti-PilC em células da linhagem selvagem J1a12 (A), já nas células dos mutantes, nenhuma marcação foi observada (B). Os diferentes formatos que as bactérias apresentam ocorrem em função dos planos em que elas foram cortadas.

Outra metodologia utilizada para comparar e demonstrar as diferenças entre as células da linhagem selvagem e do mutante foi a microscopia de transmissão mostrando a presença ou ausência da fimbria tipo IV. Em um artigo para a linhagem Temecula de *X. fastidiosa*, Meng *et al.* (2005), demonstraram a presença de dois tipos de fímbrias na célula, a do tipo I (curta) com papel na formação do biofilme e do tipo IV (longa) importante no movimento do tipo *twitching motility* e migração na planta. A suspensão de células foram depositadas em grades para microscopia, cobertas por Formvar e contrastadas com ácido fosfotungústico. As fotos da microscopia indicaram claramente a presença das fímbrias tipo IV nas células da linhagem selvagem e uma grande quantidade de fímbrias mais curtas. Já no mutante houve uma diminuição na quantidade de fímbrias na células e a ausência das fímbrias tipo IV (Figura 22).

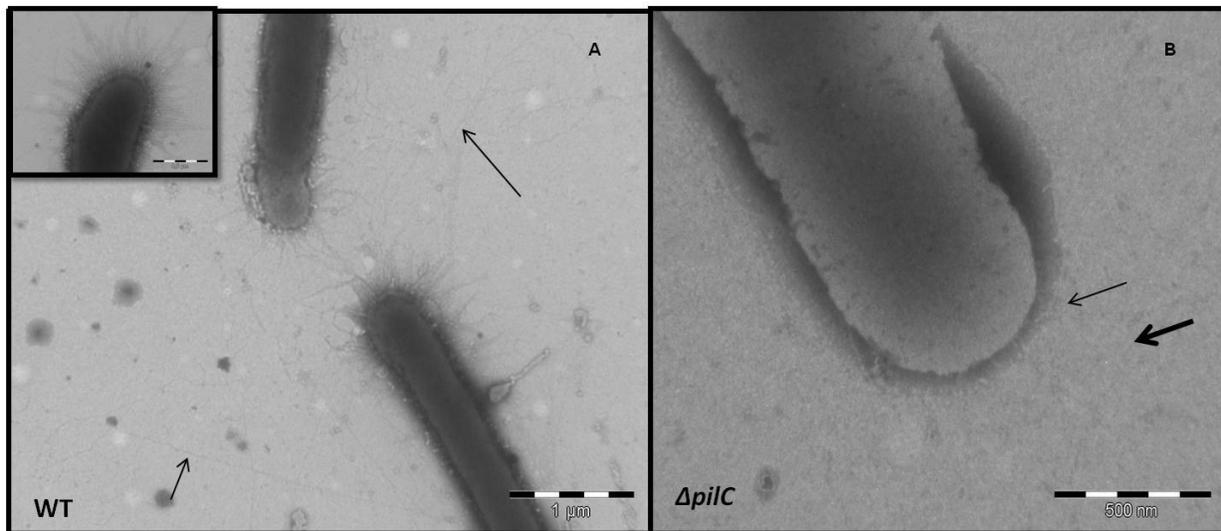


Figura 22. Pili da linhagem selvagem e do mutante em *X. fastidiosa*. (A) Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem selvagem mostrando a abundância dos pilis curtos (em destaque), assim como a presença de pilis longos (indicados pelas setas). (B) Células do mutante apresentam poucos pilis curtos (setas vazia) e a ausência de pilis longos (setas cheia).

Para a marcação por imunofluorescência, foi realizada a microscopia de fluorescência utilizando o anticorpo anti-PilC e outro secundário conjugado com um fluoróforo. Tanto na linhagem selvagem, como no mutante, foram observadas células com crescimento de cinco dias. Foi escolhido esse tempo de crescimento pois é a fase de formação do biofilme em que a proteína é mais expressa (Caserta *et al.*, 2010). Na linhagem selvagem, pode ser observada diferentes pontos com a marcação do anti-soro (Figura 23A) através de pontos laranja e também a formação de biofilme. Já no mutante, as células foram encontradas dispersas e nenhum ponto marcado com o anti-soro contra a proteína PilC foi observado (Figura 23B). Esses resultados são condizentes com os observados na microscopia de transmissão, onde nenhuma marcação foi encontrada.

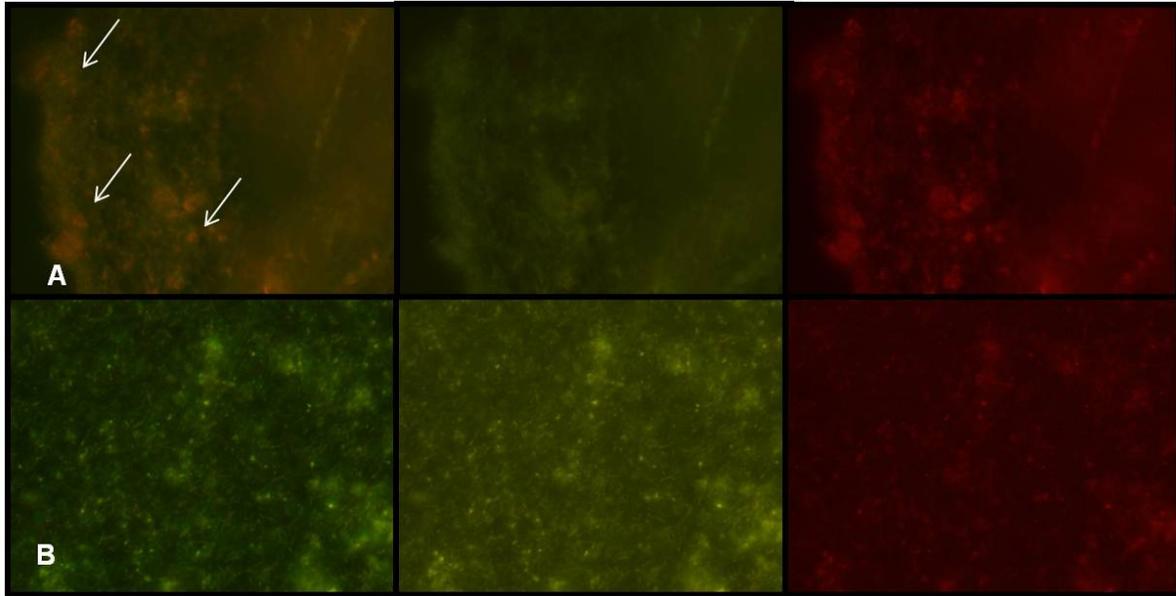


Figura 23. Expressão de PilC na linhagem selvagem de *X. fastidiosa* J1a12 (A). As setas indicam a fluorescência referente ao reconhecimento da proteína pelo anticorpo. Na linhagem mutante (B) não pode ser observada a fluorescência. Figuras da coluna da esquerda referem-se a sobreposição das imagens verdes e vermelhas correspondentes, evidenciando a expressão de PilC, em laranja. Figuras da coluna do meio referem-se as células marcadas com Syto 9 (Invitrogen). Figuras da coluna da direita referem-se as células marcadas com Rodamina (Santa Cruz). Aumento 100x.

4.3 Movimentação da bactéria na planta

As plantas de laranja Pêra que foram inoculadas com as linhagens selvagens apresentaram manchas cloróticas no limbo foliar em diferentes partes dos ramos, já nas plantas inoculadas com o mutante, nenhum sintoma foi observado (Figura 24). As diferenças de intensidade dos sintomas entre as linhagens selvagens podem ser explicados devido a diferença de severidade entre as linhagens 9a5c e J1a12, pois a primeira, é considerada a mais severa das linhagens patogênicas de citros (Koide *et al.*, 2004a), provavelmente devido à sua eficaz agregação, formação de biofilme e movimentação no xilema da planta. Já a segunda, tem um

crescimento mais lento e, até o presente momento, é considerada como uma bactéria não-patogênica ao citros (Koide *et al.*, 2004a), porém, sintomas característicos da CVC foram observados em plantas inoculadas com esta linhagem no presente trabalho. Quanto ao mutante provavelmente por não apresentar a fimbria do tipo IV, não foi capaz de se aderir nas paredes do xilema das plantas e conseqüentemente absorver nutrientes necessários para sua sobrevivência, não entupindo os vasos e não expressado os sintomas característicos da doença.



Figura 24. Ramos (A) e folhas (B) de laranja Pêra, após 90 dias de inoculação com as linhagens selvagens 9a5c e J1a12, e com o mutante $\Delta pilC$. As setas e círculos destacam os sintomas característicos de clorose nas folhas inoculadas com as linhagens selvagens.

As avaliações para observação da migração das bactérias no xilema das plantas foram feitas através de uma série de isolamentos de diferentes pontos do caule da planta a partir do primeiro ponto de inoculação (Figura 25). Foram feitos seis pontos de isolamento, a cada 5cm, sendo o ponto inicial (P0) o lugar escolhido para inoculação.

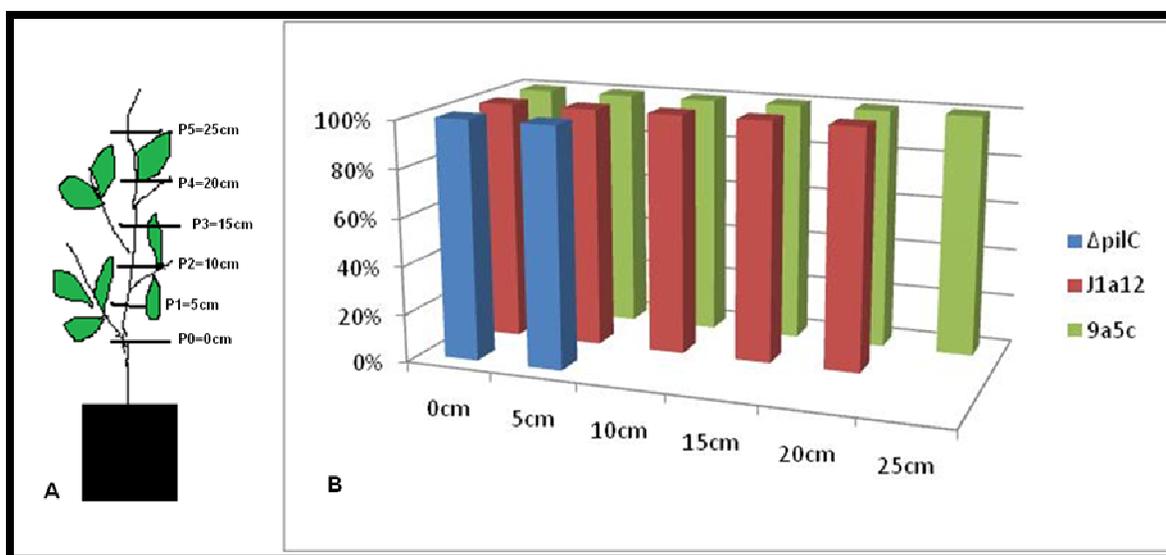


Figura 25. Movimentação da *X. fastidiosa* na planta. Máximas distâncias (em cm) atingidas pelas bactérias a partir do ponto de inoculação (P0=0cm), após 90 dias. O eixo Y indica a porcentagem de crescimento. O eixo X os pontos de isolamento.

A linhagem selvagem 9a5c apresentou migração mais rápida e eficiente em relação a linhagem selvagem J1a12 e ao mutante $\Delta pilC$. O interessante foi que, o $\Delta pilC$ apresentou crescimento apenas quando recuperado do primeiro ponto (P1=5cm) após o ponto inoculado (Figura 25B). Isso pode ser explicado devido à ausência da proteína PilC e diminuição da PilA2, responsável pelo *twitching motility* e pela aderência ao substrato ou paredes do xilema, respectivamente.

Em um trabalho publicado com a linhagem Temecula de *X. fastidiosa*, Meng *et al.* (2005) observaram que a movimentação da bactéria ocorre com a extensão e retração das fímbria do tipo IV. Os autores demonstraram que mutantes da estirpe Temecula que só expressavam esse tipo de pili (estirpe 6E11) formaram biofilmes aderidos à parede de frascos, assim como apresentaram movimentação no substrato, mostrando a eficiência da adesão dessas bactérias. De fato, pili tipo IV são proteínas que têm função de movimentação celular, comprovada por curvas

distâncias de recuperação de mutantes para esse tipo de pili após inoculação das bactérias em videiras (Meng *et al.*, 2005), mostrando que proteínas fimbriais são fatores de patogenicidade de *X. fastidiosa*, uma vez que atuam na adesão inicial da bactéria ao substrato e movimentação, auxiliando também na formação do biofilme.

5. Conclusões

Com as análises morfológicas, transcricionais e biológicas do mutante J1a12 Δ *pilC*, pode-se inferir que:

- ✓ A partir da interrupção do gene *pilC*, foi observado que as adesinas fimbriais são mais necessárias nas fases iniciais do biofilme, onde ocorre a adesão da bactéria à superfície, e também, adesão entre as células.
- ✓ A interrupção do gene foi responsável pela ausência da fímbria tipo 4, alterando a movimentação da bactéria na superfície (meio de cultura e vasos do xilema da planta).
- ✓ A colonização da planta foi possível somente para as linhagens selvagens 9a5c e J1a12 pois ambas possuíam fímbrias tipo I e tipo IV, responsáveis pela adesão e movimentação celular.
- ✓ Considerando-se que a formação do biofilme é a única condição em que a bactéria é capaz de colonizar com sucesso o hospedeiro e, por consequência causar a CVC, as adesinas podem ser consideradas fatores importantes de patogenicidade e alvos importantes para o estudo de um maior controle desta bactéria.

6. Bibliografia

Alves, E. 2003. *Xylella fastidiosa*: adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. Tese apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Usp para obtenção do grau de doutor em Agronomia, Piracicaba.

Amaro, A.A.; Salva, R. A. 2001. Production of citrus nursery trees in São Paulo State: an economic vision. In: **INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN**, Ribeirão Preto. Proceedings. Ribeirão Preto, 6:55-66.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (Ed). 1992. **Short Protocols in molecular biology**. 3rd. Ed. John Wiley Associates.

Baulard, A.; Kremer, L.; Loch, C. 1996. Efficient homologous recombination in fast growing and slow growing mycobacteria. **J. Bacteriol.**, 178:3091-3098.

Bhattacharyya, A.; Stilwagen, S.; Ivanova, N.; D’Souza, M.; Bernal, A.; Lykidis, A.; Kapatral, V. *et al.* 2002a. Whole genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99(19):12403-12408.

Caserta, R.; Takita, M. A.; Targon, M. L.; Rosselli-Murai, L.K.; de Souza, A. P.; Peroni, L.; Stach-Machado, D.R.; Andrade, A.; Labate, C. A.; Kitajima, E. W.; Machado, M. A.; de Souza, A. A. 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. **Appl Environ Microbiol.**, 76(13):4250-9.

Chatterjee, S.; Newman, K. L.; Lindow, S. E. 2008. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppress movement and xylem vessel colonization in grape. **MPMI**, 21: 1309-1315.

Chen, Y.; Shiue, S. J.; Huang, C. W.; Chang, J. L.; Chien, Y. L.; Hu, N. T.; Chan, N. L. 2005. Structure and Function of the XpsE N-Terminal Domain, an Essential Component of the *Xanthomonas campestris* Type II Secretion System. **The J. of Biol. Chem.** 280(51):42356-42363.

- Chen, J.; Xie, G.; Han, S.; Chertkov, O.; Sims, D.; Civerolo, E. L. 2010. Whole genome sequences of two *Xylella fastidiosa* strains (M12 and M23) causing almond leaf scorch disease in California. **J. Bacteriol.** 192(17):4534.
- Coletta-Filho, H. D.; Diversidade e estrutura genética de populações de *Xylella fastidiosa* analisadas através de RAPD e VNTR. Campinas, São Paulo, 2002. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia. p 88.
- Costerton, J. WW.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in Nature and Disease. **Ann. Rev. Microbiol.**, 41: 435-464.
- Craig, L.; Pique, M. E.; Tainer, J. A. 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2:363-378.
- Davis, M. J. French, W. J.; Schaad, N. W. 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum scald. **Curr. Microbiol.**, 5: 311-316.
- Da Silva Neto, J. F.; Koide, T.; Gomes, S. L.; Marques, M. V. 2002. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 210:105-110.
- Da Silva Neto, J. F.; Koide, T.; Abe, C. M.; Gomes, S. L.; Marques, M. V. 2008. Role of sigma54 in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. **Arch Microbiol.**, 189(3):249-61.
- De La Fuente, L.; Burr, T. J.; Hoch, H. C. 2007. Mutations in type I and IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. **J. Bacteriol.**, 189:7507-7510.
- De La Fuente, L.; Burr, T. J.; Hoch, H. C. 2008. Autoaggregation of *Xylella fastidiosa* cells is influenced by type I and type IV pili. **Appl. Environ. Microbiol.**
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Goldman, G. H.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2003 Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **MPMI** 16(10):867–875.

- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiol Lett.** 237:341-353.
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Pereira, E. O.; Coletta-Filho, H. D.; Machado, M. A. 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Current Microbiol.** 50:223–228.
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Barata, R. M.; Camargo, L. E. A.; Machado, M. A. 2006. Genômica Funcional de Bactérias Fitopatogênicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas RAPP**, 14:1-58.
- Feil, H.; Feil, W. S.; Detter, J. C.; Purcel, A. H.; Lindow, S. E. 2003. Site-Directed Disruption of the *fimA* and *fimF* Fimbrial Genes of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology** 93(6):675-682.
- Feil, H.; Feil, W. S.; Lindow, S. E. 2007. Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastidiosa* to attachment to surfaces and virulence to grape. **Phytopathology**, 97: 3.
- Fernandes Jr., W.B.” Analyses of the world processed orange industry.” Ph.D. Dissertation. Gainesville, FL: University of Florida, August 2003. P. 108.
- Galvani, C. D.; Li, Y.; Burr, T. J.; Hoch, H. C. 2007. Twitching motility among pathogenic *Xylella fastidiosa* isolates and the influence of bovine serum albumin on twitching-dependent colony fringe morphology. **FEMS Microbiol Lett.** 268(2):202-8.
- Gaurivaud, P.; Souza, L. C.; Virgilio, A. C.; Mariano, A. G.; Palma, R. R.; Monteiro, P. B. 2002. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis Strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 68:4658-4665.
- Guilhabert, M. R. & Kirkpatrick, C. B. 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. **MPMI** 18 (8):856–868.

Hamilton, H. L.; Schwartz, K. J.; Dillard, J. P. 2001. Insertion-duplication mutagenesis of neisseria: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. **J. Bacteriol.**, 183:4718-4726.

Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Nataro, J. P. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.** 6:370-378

Hopkins, D. L.; Adlerz, W. C. 1988. Natural host of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, 72: 271-290.

Hopkins, D. L. 1995. *Xylella fastidiosa*. In: Singh, R. P., Kohmoto, K. (eds). Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Vol. 1-Prokaryotes. **Elsevier Science Ltda.** Great Britain, 185-197.

Hopkins, D. L.; Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, 86: 1056-1066.

Jacomino, A. P.; Modesto, J. C.; Beretta, M. J. G. *et al.* 1993. Transmissão controlada da clorose variegada dos citrus (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, suplemento.

Klaussen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S and Tolker-Nielsen T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type flagella and type IV pili mutants. **Mol. Microbiol.**, 48:1511-1524.

Koide, T.; Zaini, P. A.; Moreira, L. M.; Vêncio, R. Z. N.; Matsukuma, A. Y.; Durham, A. M.; Teixeira, D. C.; El-Dorry, H.; Monteiro, P. B.; Da Silva, A. C. R.; Verjovski-Ameida, S.; Da Silva, A. M.; Gomes, S. L. 2004a. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. **J. Bacteriol.**, 186: 5442-5449.

Koide, T.; Da Silva Neto, J. F.; Gomes, S. L.; Marques, M. V. 2004b. Insertional transposon mutagenesis in the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis strain with transposome. **Current. Microbiol.**, 48:247-250.

- Lacava, P. T.; Araujo, W. L.; Marcon, J.; Maccheroni, W. Jr.; Azevado, J. L. 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Lett. Appl. Microbiol.**, 39: 55-59.
- Lambais, M. R.; Goldman, M. H.; Camargo, L. E.; Goldman, G. H. 2000. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Curr. Opin. Microbiol.** 3:459-462.
- Lee, M. S.; Seok, C.; Morrison, D. A. 1998. Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64:4796-4802.
- Leite, B.; Pascholati, S. F.; Kitajima, E. W.; Ishida, M. I. 2001. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas RAPP**, 9: 1-41.
- Leite, B.; Ishida, M. L.; Alves, E.; Carrer, H.; Pascholati, S. F.; Kitajima, E. W. 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journ of Medical and Biological Research** 35: 645-650.
- Leloup, L.; Ehrlich, S. D.; Zagorec, M.; Morel-Deville, F. 1997. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *pstI* and *lacL* genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63:2117-2123.
- Li, Y.; Hao, G.; Galvani, C. D.; Meng, Y.; De La Fuente, L.; Hoch, H. C. and Burr, T. J. 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. **Microbiology** 153:719-726.
- Lima, J. E. O.; Miranda, V. S.; Hartung, J. S.; Brlansky, R. H.; Coutinho, A.; Roberto, S. R.; Carlos, E. F. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, 82: 94-97.
- Lopes, S. A.; Ribeiro, D. M.; Roberto, P. G.; França, S. C.; Santos, J. M. 2000. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, 84:827-830.

- Machado, E. C.; Quaggio, J. A.; Lagôa, A. M. M. A.; Ticelli, M.; Furlani, P. R. 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 6 (1):53-57.
- Machado, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Souza, A. A. de; Takita, M. A.; Kuramae-Izioka, E. E. 2001. O Projeto Genoma da *Xylella fastidiosa*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas RAPP**, 9 (1):63-77.
- Marucci, R. C.; Lopes, J. R. S.; Vendramim, J. D.; Corrente, J. C. 2005. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. **Entomol. Exp. Appl.**, 117: 95-103.
- Mattick, J. S. 2002. Type IV pili and twitching motility. **Annu. Rev. Microbiol.**, 56: 289-314
- Meng, Y.; Li, Y.; Galvani, C. D.; Hão, G.; Turner, J. N.; Burr, T. J.; Hoch, H. C. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **J. Bacteriol.** 187(16): 5560–5567.
- Miller, M.B.; Bassler, B.L. (2001). "Quorum sensing in bacteria". **Annu. Rev. Microbiol.** 55: 165–99.
- Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 14:255-261.
- Monteiro, P. B.; Renaudin, J.; Jagoueix-Eveillard, S.; Ayres, A. J.; Garnier, M.; Bove, J. M. 2001a. *Catharantus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, 85: 246-251.
- Monteiro, P. B.; Teixeira, D. C.; Palma, R. R.; Garnier, M.; Bove, J. M.; Renaudin, J. 2001b. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 2263-2269.

- Moreira, L. M.; de Souza, R. F.; Almeida Jr, N. F.; Setubal, J. C.; Oliveira, J. C. F.; Furlan, J. A. F.; da Silva, A. C. R. 2004. Comparative genomics analyses os citrus – associated bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.** 42: 163-84.
- Newman, K. L.; Almeida, R. P.; Purcell, A. H.; Lindow, S. E. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proc. Natl Acad. Sci USA**, 101:1737-1742.
- Nobile, C.; Schneider, H. A.; Nett, J. E.; Sheppard, D. C.; Filler, S. G.; Andes, D. R.; Mitchell, A. P. 2008. Complementary adhesion function in prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.**, 27:313-339.
- Ojanen-Reuhs, T.; Kalkkinen, N.; Westerlund-Wikstrom, B.; van Doorn, J.; Haahtela, K.; Nurmiaho-Lassila, E. L.; Wengelnik, K.; Bonas, U.; Korhonen T. K. 1997. Characterization of the fimA gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **J. Bacteriol.** 179 (4):1280-1290.
- Osiro, D.; Muniz, J. R. C.; Coleta Filho, H. D.; de Sousa, A. A.; Machado, M. A.; Garratt, R. C., Colnago, L. A. 2004. Fatty acid synthesis in *Xylella fastidiosa*: correlations between genome studies, 13C NMR data, and molecular models. **Biochem. and Biophys. Research Commun.** 323(3): 987-995.
- O’Toole, G. A.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.** 54:49–79.
- Parker, D.; Kennan, R. M.; Myers, G. S.; Paulsen, I. T.; Songer, J. G.; Rood, J. I. Regulation of type IV fimbrial biogenesis in *Dichelobacter nodosus*. **J. Bacteriol.**, 188: 4801-4811.
- Purcell, A. H.; Finalay, A. H. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce’s disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, 69:393-395.
- Qin, X.; Hartung, J. S. 2001. Construction of a shuttle vector and transformation of *Xylella fastidiosa* with plasmid DNA. **Curr. Microbiol.** 43:158-162.

- Randall, J.J.; Goldberg, N. P.; Kemp, J. D.; Radionenko, M.; French, J. M.; Olsen, M. W. and Hanson, S. F. 2009. Genetic Analysis of a Novel *Xylella fastidiosa* Subspecies Found in the Southwestern United States. **Appl. and Environ. Microbiol.** 75 (17):5631-5638.
- Redak, R. A.; Purcell, A. H.; Lopes, J. R.; Blua, M. J.; Mizell, R. F.^{3rd}; Andersen, P. C. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annu. Rev. Entomol.**, v.49:243-270.
- Rodrigues. C. M.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Olivato, J. C.; Caserta, R.; Machado, M. A. and de Souza, A. A. 2008. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 77:1145-1157.
- Roper, M. C.; Greve, L. C.; Labavitch, M. J.; Kirkpatrick, C. B. 2007. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Appl. and Environ. Microbiol.** 73 (22):7252–7258.
- Ray, S.K., Rajeshwari, R., Sharma, Y., and Sonti, R.V. (2002). A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacterial and is required for optimum virulence. **Mol. Microbiol.** 46: 637-647.
- Rossetti, V.; Garnier, M.; Bove, J. M.; Bereta, M. J. G.; Teixeira, A. R. R.; Quaggio, J. A.; Denegri, J. D. 1990. Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. **Comptes Rendus De La Academie Des Science Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences**, 310:345-349.
- Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J. Bacteriol.** 184:1140–54.
- Schaad, N. W. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 27:290-300.

Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Mol. Microbiol.** 48: 253-267.

Simpson, A. J.; Reinach, F. C.; Arruda, P.; *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, 406: 151-159.

Smolka MB, Martins D, Winck FV, Santoro CE, Castellari RR, Ferrari F, Brum I J, Galembeck E, Coletta-Filho HD, Machado MA, Marangoni S and Novello, JC. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics** 2003, 3: 224-237.

St. Geme, J. W.; Cutter, D.; Barenkamp, S. J. 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. **J. Bacteriol.**, 178:6281-6287.

Van Sluys, M. A.; De Oliveira, M. C.; Monteiro-Vitorello, C. B. *et al.* 2003. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. **J. Bacteriol.** 185: 1018-1026.

Weels, H. J.; Raju, B. C.; Hung, H. Y. *et al.* 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. Nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* ssp. **International Journal of Systematic Bacteriology, Washington**, 37: 136-143.

Willians, P.; Camara, M.; Hardman, A. *et al.* 2000. Quorum sensing and population dependent control of virulence. **Philos. Trans. R. Sect. B**, 355: 667-680.

Capítulo 2

Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*

Silva, M. S.^{1,2}; Souza, A. A.²; Takita, M.A.²; Labate, C. A.³; Machado, M. A.^{2*}

1.Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil; 2.Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’(CCSM), Cordeirópolis, SP, Brazil; 3. Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brazil.

Submission for:

Article title: Analysis of biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*

MS ID : 4464274364824416

Authors : Mariana Souza MS Silva, Alessandra Alves AA Souza, Marco Aurelio MA Takita, Carlos Alberto CA Labate and Marcos Antonio MA Machado

Journal : Proteome Science

Corresponding author: marcos@centrodecitricultura.br

Email addresses:

MSS: mariana@centrodecitricultura.br

AAS: alessandra@centrodecitricultura.br

MAT: takita@centrodecitricultura.br

CAL: calabate@esalq.usp.br

MAM: marcos@centrodecitricultura.br

Abstract

The bacterium *Xylella fastidiosa* is the causal agent of a large number of economically important diseases such as citrus variegated chlorosis (CVC) and Pierce's disease. The bacterium is limited to the xylem of the plant host and the foregut of insect vectors (sharpshooters). The mechanism of pathogenicity of this bacterium differs from other plant pathogens, since it does not present typical genes that confer specific interactions between plant and pathogens (avr and / or hrp). The bacterium is injected directly into the xylem vessels where it adheres and colonizes. The whole process leads to the formation of biofilms, which are considered the main mechanism of pathogenicity. Cells in biofilms are metabolically and phenotypically different from their planktonic condition. The mature biofilm stage (phase of higher cell density) presents high virulence and resistance to toxic substances such as antibiotics and detergents. Although the genome has been sequenced, the biochemical study on the protein biofilm of *X. fastidiosa* has been scarcely explored. Here we performed proteomic analysis of proteins exclusively in the mature biofilm of *X. fastidiosa* strain 9a5c, compared to planktonic growth condition. We found a total of 456 proteins expressed in the biofilm condition, which correspond to approximately 10% of total protein in the genome. The biofilm showed 37% (or 144 proteins) more protein than that found in the planktonic growth condition. The large difference in protein pattern in the biofilm condition may be responsible for the physiological changes of the cells in the biofilm of *X. fastidiosa*. Mass spectrometry was used to identify these proteins. Most of proteins expressed in the bacteria were associated with metabolism, adhesion, pathogenic and stress condition. Even though the biofilm cells in this work were not submitted to any stress condition, some stress related proteins were expressed only in the biofilm condition, suggesting that the biofilm cells would constitutively express proteins in different adverse environments. This paper reports a first proteomic analysis of mature biofilm of *X. fastidiosa*, opening new perspectives for understanding the biochemistry of this form of growth in a plant pathogen.

Introduction

Xylella fastidiosa is a slow growing Gram-negative bacteria involved in many economically important plant diseases, such as citrus variegated chlorosis (CVC) in sweet orange, Pierce's disease (PD) in grapevine and other species such as coffee and plum. In all cases, *X. fastidiosa* is transmitted by leafhoppers into the xylem vessel where it colonizes and blocks the movement of water and nutrients, causing typical disease symptoms according to the host.

It is generally accepted that microbial populations use cell attachment to adhere to solid supports, surfaces and particles where they grow and survive in the natural state [1]. Biofilms consist of intricate three-dimensional matrices containing channels, presumably to let nutrients diffuse in and waste products diffuse out [2]. Biofilm development involves a number of changes in gene regulation that cause the adhering cells to become phenotypically and metabolically distinct from their planktonic counterparts [3].

The mechanisms involved in the resistance of biofilm cells to antimicrobial agents are complex and only partially understood. Important factors include cell density, as well as the extent and duration of cell-to-cell contact, the concentrations of diffusible substances and/or the ability to establish concentration gradients of diffusible substances and oxygen availability.

In other Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm development and the expression of virulence factors are dependent on quorum sensing. Similarly, the requirement of a *X. fastidiosa* cell density threshold in the xylem for CVC development, as well as its occurrence as biofilms, suggests that synthesis of pathogenicity determinants by these bacteria is dependent on quorum sensing [4], a cell-cell communication mechanism which plays an important role in the virulence of many plant pathogenic bacteria [5].

X. fastidiosa must be able to adhere to both plant and insect hosts. To colonize the insect's foregut the bacteria needs to adhere to the insect tissue so that it can resist the high flow of the xylem sap passing through. In plants, adhesion to the xylem walls enable appropriate conditions for bacterial growth and biofilm formation. An important aspect of bacterial pathogenesis is cell aggregation (bacterium-bacterium interaction), which has been proposed to lead to vascular occlusion of the xylem, causing water and nutrient stress in the plant [6,7].

Most of the proteomic work performed on biofilm cells has consisted of comparing the crude protein patterns of sessile and planktonic organisms [8]. In *P. aeruginosa*, the transition from mature-stage biofilm to the dispersion stage resulted in a reduction in 35% of detectable proteins. According to their protein profiles, dispersed bacteria were closer to planktonic cells than to mature-stage biofilm organisms [9]. The most significant proteomic alterations were observed when planktonic bacteria were compared to mature biofilm cells or to dispersing biofilm cells, with more than 800 detectable proteins exhibiting more than a six-fold change.

The protein based approaches suggest that a large number of genes are differentially regulated during biofilm development.

The different proteomic investigations performed on biofilm bacteria have enabled the characterization of some up- and down-regulated proteins in sessile cells. These proteins can be distributed into three main classes. The first class involves membrane proteins that have been reported to have a substantial influence on attachment and may also play a role in early biofilm development [10]. It has been shown that the adhesion of *Escherichia coli* cells to hydrophobic surfaces activates the Cpx two-component signal transduction system that has also been implicated in the modulation of expression of curli, bacterial structures intimately involved in adhesion and biofilm formation [11].

The second class includes proteins involved in metabolic processes, such as amino acid metabolism, carbon metabolism and cofactor biosynthesis, revealing that the central metabolism is affected by the sessile mode of growth. The third class includes proteins involved in adaptation and protection. While it is difficult to discriminate an expression tendency in proteins belonging to the first two classes, most adaptation proteins are accumulated by biofilm bacteria. It has been suggested that this general stress response initiated by growth within a biofilm might explain the resistance of sessile cells to environmental stresses.

In this work, we describe the phenotypic changes in the biofilm growth mode of a systemic plant pathogen, *X. fastidiosa*. Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) was used to demonstrate phenotypic differences between biofilm cells and planktonic cells. Comparative analysis of the proteomes indicated that there were distinct differences between the protein profiles involving changes in proteins expressed for metabolism, motility, attachment and stress condition.

Results and Discussion

It has been reported that *X. fastidiosa* biofilm presents at least 5 phases of biofilm formation where 20 days corresponds to a mature biofilm [12]. That condition displays several characteristics known to confer advantages to the bacterial population. The authors [12] observed an increase in the expression of genes involved in energy metabolism, regulatory functions, protein metabolism, plasmid maintenance and biosynthesis of amino acids, cofactors, surface polysaccharides, lipopolysaccharides, antigens and transport proteins in the same condition.

The proteins of mature biofilm and the planktonic cells of *X. fastidiosa* were compared after separation by one dimensional gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie blue

staining. The results obtained from the one-dimensional gel presented no relevant differences between biofilm and planktonic cells (Fig. 1).

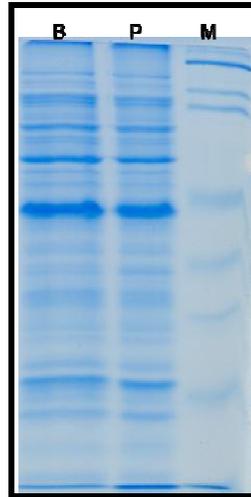


Figure 1 Protein profiles of mature biofilm cells (B) and planktonic cells (P) of *X. fastidiosa* following separation by one-dimensional SDS-PAGE and a Coomassie blue staining. *Broad Range* Bio-Rad marker was used as the molecular weight (M).

For further characterization of differences in protein expression between the biofilm and the planktonic cells, high-resolution 2DE of whole-cell protein extracts was performed (Fig.2). The reproducibility of separation of the total proteins was the same in all triplicate gels (data not shown). By matching and comparing the 2DE proteomes, a total of 456 protein spots in the biofilm were observed in pH ranging from 3 to 10 after Coomassie blue staining. For the planktonic cells, 387 protein spots were observed. And of those, 144 protein spots were expressed only in the biofilm condition (Fig.3).

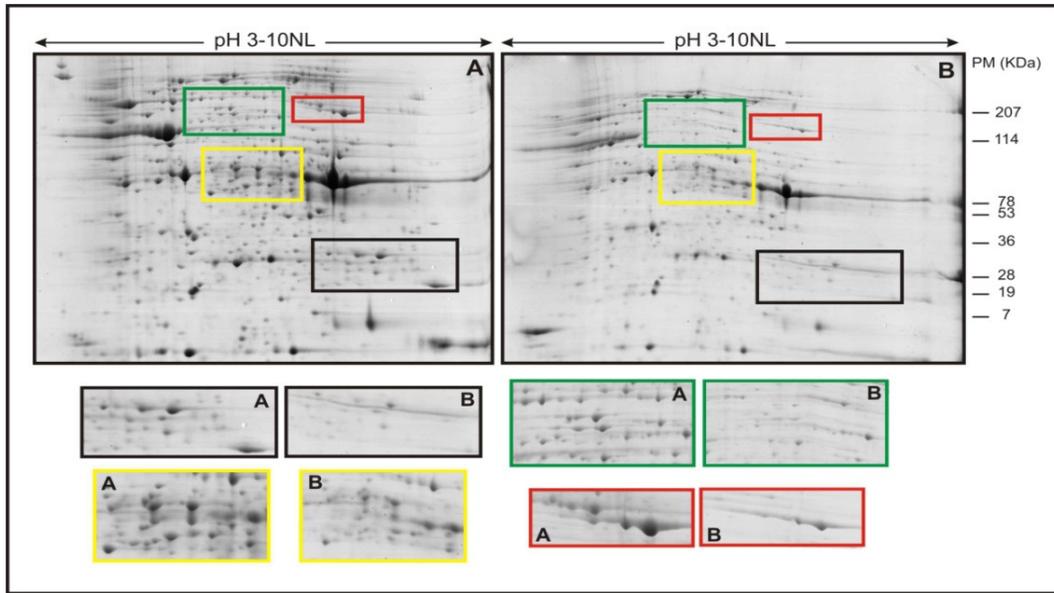


Figure 2 2DE proteome patterns for mature biofilm cells (A) and planktonic cells (B) of *X. fastidiosa*. The horizontal axes represents pIs of the isoelectric focusing gradients, and the vertical axes represents molecular masses (MW).

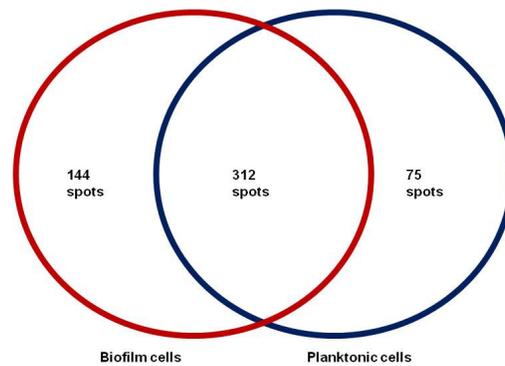


Figure 3 Summary of differentially expressed protein. Diagrams show the numbers of expressed protein only the biofilm, planktonic and in both growth conditions.

We chose a total of 144 proteins that were expressed only in the biofilm condition for sequencing and analysis. A total of 41 spots were identified in the databank. Among them, 31 differentially expressed genes (1.41% of total genome) were found to express protein in the biofilm. The genes are distributed throughout the different categories into functional groups according to the *Xyella* database (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>), as summarized in Table 1. The N-terminal sequence of the 103 proteins spots did not display significant similarity to proteins in

the database and approximately 4% of the proteins did not show significant homologies and were classified as hypothetical proteins, using programs for protein localization site. Under the biofilm condition, we observed an expression of genes involved in energy metabolism, biosynthesis of amino acids, attachment, pathogenicity and adaptation to environment. Sauer et al. indicate that in *P. aeruginosa*, physiological changes in the transition from mature stage biofilm to planktonic growth resulted in a 35% reduction in the protein pattern. Protein based approaches suggest that a large number of genes are differentially regulated during biofilm development. On the contrary, transcriptome analyses led to the conclusion that only 1% (73 genes) of *P. aeruginosa* genes showed differential expression in biofilm and planktonic cells [13]. The authors assigned the identified genes into classes such as motility, attachment, translation and metabolism. The low number of genes altered in expression following bacterial adhesion was confirmed using DNA microarray technology where 79 genes (1.8% of the total genome) changed in the biofilm compared to planktonic growth [14]. In *X. fastidiosa*, the authors [12] compared the gene expression profile between biofilm and planktonic growth using DNA microarrays and found that gene expression in biofilm is different from that observed in planktonic cells. Many genes (approximately 9.18%) were up-regulated in biofilm and these ORFs were distributed in several functional categories.

Table 1 List of the identified proteins from mature biofilm cell protein extract

spot	mascotID	Function	mass	pI	score	Gene_Categ
Bio 608	gi9106244 XF1259	Phosphoenolpyruvate Synthase [Xylella]	87677	5.58	52	I.B.3
Bio 421	gill5837735 XF 1136	tryptophan repressor binding protein [Xylella fastidiosa 9a5c]	20453	6.29	104	I.C.2
Bio 490	gill5836858 XF 0253	electron transfer flavoprotein alpha subunit [Xylella fastidiosa 9a5c]	33021	5.55	52	I.C.3
Bio 560	gill5839136 XF2547	succinyl-CoA synthetase subunit beta [Xylella fastidiosa 9a5c]	41133	5.08	52	I.C.7
Bio 572	gill5837745 XF1143	F0F1 ATP synthase subunit beta [Xylella fastidiosa 9a5c]	50747	5.0	539	I.C.8
Bio 606	gill5837745 XF1143	F0F1 ATP synthase subunit beta [Xylella fastidiosa 9a5c]	50747	5.0	211	I.C.8
Bio 464	gill5836991 XF0389	two-component system, regulatory protein [Xylella fastidiosa 9a5c]	25364	5.27	404	I.D
Bio 538	gill5838028 XF1427	bifunctional N-succinyl-diaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein [Xylella fastidiosa 9a5c]	44116	5.47	104	II.A.1
Bio 509	gi9104896 XF0114	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase [Xylella fastidiosa 9a5c]	32566	6.0	136	II.A.2
Bio 522	gi9106901 XF1822	ketol-acid reductoisomerase [Xylella fastidiosa 9a5c]	40369	6.17	127	II.A.2
Bio 589	gill5838419 XF1821	acetolactate synthase 2 catalytic subunit [Xylella fastidiosa 9a5c]	62856	5.77	100	II.A.2
Bio 445	gill5837364 XF0762	deoxycytidine triphosphate deaminase [Xylella fastidiosa 9a5c]	21803	6.82	175	II.B.3
Bio 461	gill5838579 XF 1985	tRNA/rRNA methyltransferase [Xylella fastidiosa 9a5c]	26787	6.24	99	III.B.3
Bio 563	gill5837030 XF0428	tryptophanyl-tRNA synthetase [Xylella fastidiosa 9a5c]	48164	5.78	224	III.B.4
Bio 604	gill5836844 XF0239	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase [Xylella fastidiosa 9a5c]	78268	5.56	282	III.B.6
Bio 600	gill5837178 XF0576	metallopeptidase [Xylella fastidiosa 9a5c]	78441	6.94	99	III.C.1
Bio 499	gill5838206 XF1605	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Xylella fastidiosa 9a5c]	31590	5.66	63	III.C.1
Bio 505	gill5838206 XF 1605	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Xylella fastidiosa 9a5c]	31590	5.66	80	III.C.1
Bio 527	gill5839217 XF2628	elongation factor Tu [Xylella fastidiosa 9a5c]	43077	5.48	389	III.C.1
Bio 553	gill5839217 XF2628	elongation factor Tu [Xylella fastidiosa 9a5c]	43077	5.48	76	III.C.1
Bio 561	gill5839217 XF2628	elongation factor Tu [Xylella fastidiosa 9a5c]	43077	5.48	354	III.C.1
Bio 562	gill5839217 XF2628	elongation factor Tu [Xylella fastidiosa 9a5c]	43077	5.48	363	III.C.1
Bio 569	gill5837788 XF1186	trigger factor [Xylella fastidiosa 9a5c]	48623	5.34	67	III.C.2
Bio 571	gill5837788 XF1186	trigger factor [Xylella fastidiosa 9a5c]	48623	5.34	143	III.C.2
Bio 587	gill5837217 XF0615	chaperonin GroEL [Xylella fastidiosa 9a5c]	57835	5.45	252	III.C.2
Bio 588	gill5837217 XF0615	chaperonin GroEL [Xylella fastidiosa 9a5c]	57835	5.45	61	III.C.2
Bio 593	gill5837217 XF0615	chaperonin GroEL [Xylella fastidiosa 9a5c]	57835	5.45	133	III.C.2
Bio 575	gill5836743 XF0138	leucyl aminopeptidase [Xylella fastidiosa 9a5c]	52147	6.07	77	III.C.3
Bio 610	gill5836983 XF0381	ATP-dependent Clp protease subunit [Xylella fastidiosa 9a5c]	95805	5.36	211	III.C.3

Table 1. Continued.

Bio 481	gill5836861 XF0256	glucose-1-phosphate thymidyltransferase [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	32757	5.70	164	IV.A.1
Bio 555	gill5836945 XF0343	outer membrane protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	42433	8.45	379	IV.A.2
Bio 558	gill5836945 XF0343	outer membrane protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	42433	8.45	99	IV.A.2
Bio 567	gill5836945 XF0343	outer membrane protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	42433	8.45	266	IV.A.2
Bio 523	gill5838234 XF1633	twitching motility protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	38644	6.43	50	IV.D
Bio 471	gill5837922 XF 1321	septum site-determining protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	29033	5.10	360	V.B
Bio 454	gill5837739 XF 1137	NonF-related protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	24763	5.55	165	VII.C
Bio 423	gill5838825 XF 2234	low molecular weight heat shock protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	17848	5.55	75	VII.G
Bio 425	gill5836801 XF 0196	hypothetical protein XF0196 [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	19940	6.92	139	VIII.A
Bio 501	gill5838874 XF2283	hypothetical protein XF2283 [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	34449	5.91	193	VIII.B
Bio 530	gill5837527 XF0925	hypothetical protein XF0925 [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	43291	6.21	67	VIII.B
Bio 599	gi9106187 XF1213	GTP-binding elongation factor protein [<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c]	71702	5.65	193	IX

Proteins involved in the biofilm phenotype

The proteomic investigation performed on biofilm bacteria enabled the characterization of some upregulated proteins. These proteins can be distributed in 3 main classes.

One of them involves membrane proteins and has been reported by Coquet et al. [10] to have a substantial influence on attachment and also play a role in early biofilm development. In nonpiliated mutants of a *P. aeruginosa* strain, Vallet et al. [15] identified genes involved in bacterial adherence, like the genes specifying the components of a chaperone usher pathway involved in assembly of fimbrial subunits in microorganisms. This explains the overexpression of XF0615 when *X. fastidiosa* was in mature biofilm growth stage. We detected a two-component system regulatory protein (XF0389). In *E. coli* cells, the adhesion to hydrophobic surfaces activates the Cpx two-component signal transduction system that has been implicated in the modulation of the expression of curli, bacterial structures involved in adhesion and biofilm formation [16].

Some of the noteworthy changes in the outer membrane profiles point to the existence of environmental alterations within biofilms. The overexpression of *mopB* (XF0343) in *X. fastidiosa*, an anaerobically induced porin, suggests that biofilm cells are deprived of oxygen, as discussed by Sauer et al. [9].

Among the proteins involved in biofilm formation, the expression of PilC and PilA was not detected. Type IV fimbriae are known to be required for the initial attachment to the surfaces and these appendages act also in biofilm development [17]. On the other hand, PilT, another protein of the type IV fimbriae is present in this analysis. This protein is supposedly responsible for retracting and extending the fimbriae in a twitching motility. This motility is important for colonization, allowing the bacteria to move around the plant vascular system [18].

Another class of proteins upregulated in biofilm condition includes proteins implicated in the metabolic process, such as amino acid metabolisms, carbon metabolism and cofactor biosynthesis. The overexpressed genes XF1605 and XF1186, peptidylprolyl *cis-trans* isomerases, were involved in the folding and degradation of proteins [19] and involved in quorum sensing, which is involved in the production of DSF in many species of *Xanthomonas* [5]. DSF was required for biosynthesis of a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) that accelerated the rate limiting isomerization of *cis-trans* peptidyl-prolyl bonds during protein folding and possessed a chaperone-like function [5]. In the 2DE protein profile it was possible to observe the presence of the cellular protein XF0615 (*groEL*), of the 60kDa chaperone family, which promotes refolding of misfolded polypeptides, especially under stressful conditions. Many bacteria have multiple copies of the *groEL* gene, which is active under different environmental conditions. The other protein, XF2628, an elongation factor, has an essential function in the elongation phase of mRNA translation and promotes GTP-dependent binding of aminoacyl-

tRNA, as does XF1213, to the A-site of ribosomes during protein biosynthesis. A polynucleotide phosphorylase (XF0239) degrades plant chloroplasts to provide carbon sources or to facilitate the migration of the bacteria within xylem vessels [20]. XF0138 belongs to a cytosol aminopeptidase family and plays a key role in protein degradation and in the metabolism of biologically active peptides. The protein XF0576 is a predicted metalloendopeptidase and the role is posttranslational modification, protein turnover and chaperones. XF1186 promotes the folding of newly synthesized proteins and XF1321 participates in cell division and chromosome partitioning [18].

The third class of proteins in the biofilm condition includes those involved in adaptation and protection. Most adaptation proteins are accumulated by biofilm bacteria, strengthening the idea that these proteins are expressed in biofilm showing high cell density and could be conferring advantages to the bacterial population like an inherent resistance to environmental factors that could harm the biofilm. In this sense, we observed the expression of toxin production (XF1137), involved in the production of polyketides, which are frequently referred to as virulence factors in bacterial pathogens [18, 21]. The other gene, XF2234, expresses a low molecular weight heat shock protein. sHsps are small stress induced proteins generally active as large oligomers consisting of multiple subunits, and are believed to be ATP-independent chaperones that prevent aggregation and are important in refolding in combination with other Hsps. Koide et al. [20] observed the induction of the gene XF0615, which encodes proteins from different Hsp families that are involved in the heat shock response and activated during environmental stress conditions for organism adaptation. We also found XF1213, a predicted membrane GTPase, which is involved in stress response in a signal transduction mechanism. The other protein observed in this category is the product of the gene XF0389 (popP or feuP or

phoP), which is required for virulence in several bacterial species, such as *Samonella* and the plant pathogen *Erwinia carotovora* [22].

Conclusions

Since *X. fastidiosa* was associated with CVC, there has been significant progress in the study of this plant pathogen in terms of morphological characterization, epidemiology and diagnosis, but the information related to molecular characterization was very limited until the complete sequencing of the genome in 2000.

In this work, after the analysis of proteins expressed only in biofilm growth, we observed an overexpression of proteins related to metabolism, adhesiveness, stress condition and adaptation to the environment.

Genes related to nonfimbrial adhesins, genes encoding hemagglutinin-like secreted proteins and genes involved in exopolysaccharides (EPS) production were not found expressed only in the biofilm condition. These genes were probably expressed in both growth conditions or overexpressed during phases before 20 days of biofilm formation. It was suggested that these proteins might play a role in mediating cell-cell aggregation to form colonies and contribute to the biofilm maturation process in *Xylella*.

Some of the proteins identified in this work showed significant importance for the growth of biofilm. Posttranslation modifications and proteins functions demonstrated that a small variation in mRNA could represent a significant variation in protein transcription and depending the function, this could result in an important biological response. Overexpression of proteins was observed to be linked to quorum sensing and pathogenicity of the bacterium. Because of the

condition of mature biofilm, there is high cell-cell communication and structure of the biofilm, leading to vessel blockage and disease development.

This study is the first report to use proteomic analysis to compare protein expression between biofilm and planktonic growth in *X. fastidiosa*. The proteins expressed in the biofilm of *Xylella* do not differ from the proteins of other bacterial species like *P. aeruginosa* and *E. coli*, corroborating the idea that proteins associated with adaptation and competitiveness are important factors in the maintenance of biofilms.

Methods

Bacterial strain and culture condition

The pathogenic strain 9a5c of *X. fastidiosa*, originally isolated from sweet orange CVC diseased trees (*Citrus sinensis* L. Osb.), was isolated and grown in PW medium [23]. The first colonies were observed between 10 and 15 days. To obtain cells in biofilm, primary colonies were transferred to a polypropylene tube containing 3 mL of PW broth. When the OD_{600nm} reached 0.3, the cells were transferred to a 1L flask containing 300ml of PW broth, previously described, to promote *X. fastidiosa* biofilm formation *in vitro* [24]. The sample was collected after 20 days, corresponding to the mature phase of *X. fastidiosa* biofilm [12], when the most abundant layer of biofilm formation was observed in the glass at the medium-air interface. The biofilm layer was scraped from the flask and washed by centrifugation at 8000g for 5 min at 4°C with water and storage at -80°C for later processing.

To obtain *X. fastidiosa* in planktonic growth, cells not attached to the glass were transferred weekly to another flask until they completely lost their capacity to adhere to the glass surface. This characteristic is obtained after approximately 10 passages. The cells were collected

after 10 days (stationary phase) and washed with water under the same conditions as the biofilm cells.

Protein extraction

Total proteins from *X. fastidiosa* were extracted according to Damerval et al. [25]. The whole cell protein was homogenized with 10% TCA (trichloroacetic acid) in acetone. Proteins were precipitated for 1h at -20°C. After centrifugation at 15000 g for 15 min, the protein pellets were rinsed with acetone containing 0.07% 2-mercaptoethanol for 1h at -20°C. The supernatant was removed and protein pellet vacuum-dried and solubilized in 1 mL of solubilization buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 0.4% (v/v) Triton-X 100, 4% (w/v) CHAPS, 50 mM DTE and 1% (v/v) Pharmalyte pH 3-10]. Proteins were quantified using the Bradford method [26].

SDS PAGE

For the analysis of high molecular weight proteins, 8µL (approximately 120µg of protein) of whole cell protein extract was added to 8µL of sample buffer 1D [6% w/v SDS, 100 mM Tris (pH 6.8), 30% glycerol, 100 mM DTT and 0.001% w/v bromophenol blue (BPB)], boiled for 5 min and separated on 9%T polyacrylamide gels (14cm x 16cm x 0.15cm) containing 10% glycerol. Proteins were visualized using Coomassie blue staining [27].

Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Protein samples (750µg of protein/350µL) were applied onto 3-10 non-linear immobilized pH gradient strips (18cm, GE Amersham Biosciences). Strips were rehydrated for 12 h at room temperature at 50V. Isoelectric focalizations (IEF) were performed on an IPGphor apparatus (GE Amersham Biosciences) at 75 KVh. After the IEF, the strips were kept at -80°C until needed. Before the second dimension, strips were kept at room temperature for 12 min in equilibration

buffer [6 M urea, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% (v/v) glycerol, 0.001% (w/v) bromophenol blue] with 2% (w/v) DTT, and then, for 10 min with 4% (w/v) iodoacetamide. The second dimension was performed in vertical gradient 10-18% (w/v) polyacrylamide gels at 30 mA per gel until the dye reached the bottom of the gel. Three replicates were performed for each sample. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). Gels were fixed in a solution containing 40% (v/v) ethanol and 10% (v/v) acetic acid for 60 min and washed with water (2 x 10 min). For protein detection, the gels were kept overnight in staining solution [20% (v/v) methanol, 10% (w/v) ammonium sulfate, 2% (v/v) phosphoric acid and 0.1% (w/v) CBB]. After 3 washes in water (10 min each), the gels were stored in 1% (v/v) solution of acetic acid for image analysis and spot selection for sequencing.

Gel image analysis and spot detection

Gels were scanned using a UTA-1100 scanner and Labscan v 6.0 software (GE Amersham Biosciences). Image analysis was performed automatically using Melanie software v.3 (GeneBio, Geneva, Switzerland). For each sample analyzed, the average spot volume of the three replicate gels was determined, followed by the normalization of the data (individual spot volume/total spot volume x 100). The spots were excised from the gels and identified by LC-MS/MS.

In-gel protein digestion

Protein spots were excised from the gels, cut into 1 mm cubes and washed with water for 15 min. For destaining, the gel pieces were washed several times with a solution of 50% (v/v) ACN and 50mM ammonium bicarbonate, until complete removal of the CBB. The 2DE gel spots were completely dehydrated with 100% (v/v) ACN, rehydrated with 20 mM DTT, and

maintained for 40 min at 60°C. This solution was then discarded and replaced by 55mM iodoacetamide before keeping the tubes, in darkness, for 30 min. The gel pieces were dehydrated again with 100% ACN and left to air-dry for complete removal of the solvent. The protein digestion was carried out with a solution of 10ng μ L⁻¹ trypsin (Promega) in 25mM ammonium bicarbonate. The gel pieces were rehydrated with trypsin solution and the tubes were incubated for 12h at 37°C. After digestion, the gel plugs were extracted twice with 50 μ L of 60% (v/v) ACN, 1% (v/v) FA and once with 50 μ L of ACN. All supernatants were combined and vacuum dried. Peptides were then suspended in 12 μ L of 1% (v/v) FA for mass spectrometry analysis.

Protein identification and analysis by LC-MS/MS

Peptide mixtures were identified by on-line chromatography using a Cap-LC coupled to a Q-TOF Ultima API mass spectrometer (Waters). Five microliters of sample were loaded onto a nanoease trapping column (0.18mm x 23.5mm, Waters) for pre-concentration, followed by peptide separation in a LC nanoease column Symmetry 300 C18 (3.5 μ m, 75mm x 100mm, Waters). Peptides were eluted in a 60 min linear gradient of solvent B [95 % (v/v) ACN, 0.1% (v/v) formic acid in water] at a flow rate of 250 nLmin⁻¹. Solvent A consisted of 5 % (v/v) ACN and 0.1% (v/v) formic acid in water. All analysis was performed using a positive ion mode at a 3kV needle voltage. The mass range was set from 300 to 2000 m/z, and the MS/MS spectra was acquired for the most intense peaks (≥ 15 counts). Multiply charged precursor ions were selected for fragmentation and peptide sequencing using automated data dependent acquisition (DDA) MassLynx software (Waters), switching from the MS to MS/MS mode and then returning to MS. The resulting fragmented spectra were processed using ProteinLynx v4.0 software (Waters) and the MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com) was used to compare the similarity of the sequences against the SwissProt and NCB/protein databases. Combined MS-MS/MS

searches were conducted with a parent ion mass tolerance of 50ppm, MS/MS mass tolerance of 0.2Da, carbamidomethylation of cysteine (fixed modification) and methionine oxidation (variable modification). According to MASCOT probability analysis, only significant ($P < 0.05$) hits were accepted.

Abbreviations

ACN: acetonitrile; **FA:** formic acid; **MS:** mass spectrometry; **SDS:** sodium dodecyl sulfate; **DTT:** Dithiothreitol; **IAA:** iodoacetamide; **2DE:** two-dimensional electrophoresis ; **TCA:**trichloroacetic acid ; **LC-MS/MS:** two-dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry ; **LBI:** databank of Laboratory for Bioinformatics ; **LNCC:** databank of National Laboratory of Computer Science.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MSS carried out the proteomics experiments, bioinformatic analysis and have been involved in drafting the manuscript. AAS, MAT, CAL and MAM made substantial contributions to the study conception and design and critically revised the manuscript for intellectual content. All authors edited the manuscript and approved the final version.

Acknowledgments

We thank Luciano Kishi from Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' for assistance on the blast analysis. This work was supported by CAPES/CNPq.

References

1. Dunne WMJr: **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**: 155-166.
2. Donlan, RM: **Biofilms: microbial life on surfaces.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**: 881-90.
3. Davey ME and O'Toole GA **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**:847-867.
4. Scarpari LM, Lambais MR, Silva DS, Carraro DM and Carrer H: **Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro.** *FEMS Microbiology Letters* 2003, **222**: 83-92.
5. Zhao Y, Qian G, Yin F, Fan J, Zhai Z, Liu C, Hu B and Liu F: **Proteomic analysis of the regulatory function of DSF-dependent quorum sensing in *Xhantomonas oryzae* pv. *oryzicola*.** *Microbial Pathogenesis* 2010, doi: 10.1016.
6. Hopkins DL: ***Xylella fastidiosa*- Xilem limited bacteria pathogen of plants.** *Annu Review of Phytopathology* 1989, **27**:271-290.
7. Purcell AH, Hopkins DL: **Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens.** *Annu Rev Phytopathol* 1996, **34**: 131-151.
8. Jouenne T, Vilain S, Cosette P and Junter GA: **Proteomics of biofilm bacteria.** *Current Proteomics* 2004, **1**:211-219.
9. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW and Davies DG: ***Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm.** *J Bacteriol* 2002, **184**:1140-54.
10. Coquet L, Cosette P, Quillet L, Petit F, Junter GA and Jouanne T: **Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:470-5.
11. Dorel C, Vidal O, Prigent-Combaret C, Vallet I and Lejeune P: **Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E.coli* in biofilm formation.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **178**: 169-75.
12. de Souza AA, Takita MA, Colleta-Filho HD, Caldana C, Yanai GM, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR and Machado MA: **Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during the biofilm formation in vitro.** *FEMS Microbiol Lett* 2004, **237**: 341-353.

13. Whiteley M, Bangerla MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S and Greenberg EP: **Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** *Nature* 2001, **413**:860-4.
14. Schrembi MA, Kjaergaard K and Klemm, P: **Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms.** *Mol Microbiol* 2003, **48**: 253-267.
15. Vallet I, Olson JW, Lory S, Lasdunski A and Filloux A: **The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2001, **98**: 6911-6916.
16. Otto K, Norbeck J, Larson T, Karisson KA and Hermansson M: **Adhesion of type I-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins.** *J Bacteriol* 2001, **183**: 2445-2453.
17. Klaussen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S and Tolker-Nielsen T: **Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type flagella and type IV pili mutants.** *Mol Microbiol* 2003, **48**:1511-1524.
18. Smolka MB, Martins D, Winck FV, Santoro CE, Castellari RR, Ferrari F, Brum I J, Galembeck E, Colleta-Filho HD, Machado MA, Marangoni S and Novello, JC: **Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution.** *Proteomics* 2003, **3**: 224-237.
19. da Silva Neto JF, Koide T, Gomes SL and Marques MV: **The single extracytoplasmatic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism.** *J. Bacteriol* 2007, **189**: 551-560.
20. Koide T, Vêncio RZN and Gomes SL: **Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*.** *J Bacteriol* 2006, **188**: 5821-5830.
21. Simpson A J, Reinach FC, Arruda A, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LM, Araya JE, Baia GS, Baptista CS, Barros MH, Bonaccorsi ED, Bordin S, Bove JM, Briones MR, Bueno MR, Camargo AA, Camargo LE, Carraro DM, Carrer H, Colauto NB, Colombo C, Costa FF, Costa MC, Costa-Neto CM, Coutinho LL, Cristofani M, Dias-Neto E, Docena C, El-Dorry H, Facincani AP, Ferreira AJ, Ferreira VC, Ferro JA,

- Fraga JS, Franca SC, Franco MC, Frohme M, Furlan LR, Garnier M, Goldman GH, Goldman MH, Gomes SL, Gruber A, Ho PL, Hoheisel JD, Junqueira ML, Kemper EL, Kitajima JP, Krieger JE, Kuramae EE, Laigret F, Lambais MR, Leite LC, Lemos EG, Lemos MV, Lopes SA, Lopes CR, Machado JA, Machado MA, Madeira AM, Madeira HM, Marino CL, Marques MV, Martins EA, Martins EM, Matsukuma AY, Menck CF, Miracca EC, Miyaki CY, Monteriro-Vitorello CB, Moon DH, Nagai MA, Nascimento AL, Netto LE, Nhani A Jr, Nobrega FG, Nunes LR, Oliveira MA, de Oliveira MC, de Oliveira RC, Palmieri DA, Paris A, Peixoto BR, Pereira GA, Pereira HAJr., Pesquero JB, Quaggio RB, Roberto PG, Rodrigues V, de M Rosa AJ, de Rosa VEJr., de Sa RG, Santelli RV, Sawasaki HE, da Silva AC, da Silva AM, da Silva FR, da Silva WAJr., da Silveira JF, Silvestri MLZ, Siqueira WJ, de Souza AA, de Souza AP, Terenzi MF, Truffi D, Tsai SM, Tsuako MH, Vallada H, Van Sluys MA, Verjovski-Almeida S, Vettore AL, Zago MA, Zatz M, Meidanis J and Setubal JC: **The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa***. *Nature* 2000, **406**:151–157.
22. Groisman, EA: 2001. **The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ**. *J Bacteriol* 2001, **183**:1835–1842.
23. Davis, MJ, French, WJ, Schaad, NW: **Axenic cultura of the bacteria associated with phony disease of peach and plum scald**. *Curr Microbiol* 1981, **5**:311-316.
24. Marques LLR, Ceri H, Manfio GP, Reid DM, and Olson ME: **Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro**. *Plant Disease* 2002, **86**: 633-638.
25. Damerval C, Vienne D, Zivy M, Thiellement H: Electrophoresis. 1986, **7**, 53-54.
26. Bradford, M M: **A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry* 1976, **72**: 248-254.
27. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG: **Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis**. *Electrophoresis* 2004, **25**: 1327-1333.

Considerações finais

Apesar da CVC estar presente no Brasil há mais de 20 anos, ainda ocorrem perdas econômicas e de produção causados pelos altos custos no manejo da doença. Após o seqüenciamento do seu genoma, observou-se uma maneira diferenciada de crescimento e de mecanismo de patogenicidade. A ausência de genes *avr* e de genes relacionados ao sistema de secreção tipo III, a abundância de genes que codificam para adesinas e o bloqueio dos vasos do xilema em função do seu crescimento, levaram à hipótese de que o principal mecanismo de patogenicidade da bactéria é a formação de biofilme, sendo que, esse crescimento como fator de patogenicidade não havia sido reportado anteriormente para nenhum outro fitopatógeno.

Esse mecanismo de patogenicidade passou a ser o foco de muitos trabalhos com *X. fastidiosa*. Para a estirpe Temecula de *X. fastidiosa*, da doença de Pierce em videiras, muito já se sabe sobre a formação de biofilme, principalmente pela fácil manipulação e obtenção de mutantes dessa estirpe quando comparada as de citros. Já para estirpe de *X. fastidiosa* causadora da CVC, as informações sobre obtenção de mutantes e funções das adesinas ou de até outros genes na formação do biofilme são ainda mais escassas.

O maior interesse deste trabalho foi descobrir a importância do crescimento em biofilme para *X. fastidiosa*, já que a não formação dessa estrutura impede a aderência da bactéria no interior do hospedeiro, acarretando insucesso na colonização. Sabe-se que proteínas com função de adesão têm um papel importante no processo de adesão da bactéria à superfície e à agregação celular, garantindo seu crescimento em biofilme.

O presente trabalho mostrou a importância de algumas adesinas na formação do biofilme e na movimentação das células de *X. fastidiosa* e também com análise de expressão diferencial de proteínas no biofilme. Foi observado que as adesinas fimbriais são mais necessárias nas fases

iniciais do biofilme, onde ocorre a adesão da bactéria à superfície, e também, adesão entre as células, através das análises do mutante e do crescimento em biofilme estruturado (ou maduro) da linhagem selvagem pelo proteoma. Em condição de biofilme maduro, o estudo do proteoma mostrou proteínas relacionadas ao movimento e conseqüentemente à colonização do hospedeiro, o qual leva o desenvolvimento dos sintomas característicos da doença.

Este é o primeiro trabalho com técnicas de mutagênese e proteoma para o estudo das adesinas no biofilme da linhagem de citrus de *X. fastidiosa*. A atuação dessas adesinas no desenvolvimento do biofilme demonstra sua importância na adesão das bactérias tanto no substrato quanto no canal alimentar do inseto vetor, ambos locais sujeitos a forte turbulência e pressão.

Considerando-se que a formação do biofilme é a única condição em que a bactéria é capaz de colonizar com sucesso o hospedeiro e, por conseqüência causar a CVC, as adesinas podem ser consideradas fatores importantes de patogenicidade e alvos importantes para o estudo de um maior controle desta bactéria.