

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

BC/ 43029

IB/ 81577_

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

Expressão diferencial de proteínas e mRNAs na interação de
Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* com hospedeiro
compatível

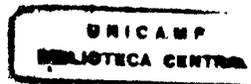
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Sandra Toshico Tahara
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Yoko Bomura Rosato
28/7/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora
em Genética e Biologia Molecular – área de concentração:
Genética de microrganismos

Aluna: Sandra Toshico Tahara
Orientadora: Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

Campinas – SP
2000



| | | |
|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
| UNIDADE | IB/81577 | |
| N.º CHAMADA: | T/UNICAMP | |
| | T132 | |
| V. | Ex. | |
| TOMBO BC/ | 43029 | |
| PROC. | 16-278/00 | |
| C | <input type="checkbox"/> | D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREC. | R\$ 11,00 | |
| DATA | 07/11/00 | |
| N.º CPD | | |

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Tahara, Sandra Toshico

T132 Expressão diferencial de proteínas e mRNAs na interação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com hospedeiro compatível/
Sandra Toshico Tahara. -- Campinas, SP[s.n.], 2000.
114f. ilus.

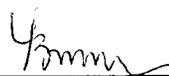
Orientadora: Yoko Bomura Rosato
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Bactérias fitopatogênicas. 2. *Xanthomonas*. 3. Expressão diferencial. I. Rosato, Yoko Bomura. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

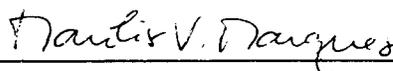
Data da Defesa: 28/07/2000

Banca Examinadora

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato (Orientadora)



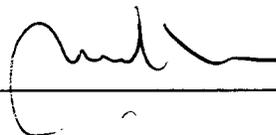
Profa. Dra. Marilis do Valle Marques



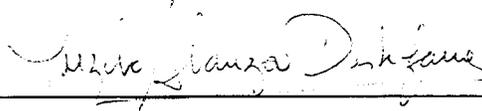
Prof. Dr. Marcos Antonio Machado



Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais



Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destefano



Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 4 |
| 2.1. A bacteriose do maracujazeiro | 4 |
| 2.2. <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> | 5 |
| 2.3. Genes relacionados com a interação planta-patógeno em <i>Xanthomonas</i> | 7 |
| 2.4. Métodos para o estudo de genes relacionados com patogenicidade | 12 |
| 2.4.1. Proteínas em gel de eletroforese 2D | 12 |
| 2.4.2. Análise da expressão de genes através do diferencial display (DD) | 15 |
| Parte 1- Detecção de proteínas diferencialmente expressas na interação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> com extrato de folhas de hospedeiro compatível | 18 |
| Resumo | 19 |
| Abstract | 20 |
| 1. Introdução | 21 |
| 2. Material e Métodos | 23 |
| 2.1. Linhagens bacterianas e meios de cultura | 23 |
| 2.2. Preparação do extrato de plantas | 23 |
| 2.3. SDS-PAGE de proteínas totais | 24 |
| 2.4. Extração de proteínas totais e eletroforese bidimensional (2D) | 24 |
| 2.5. Quantificação de proteínas através do método de Bradford | 25 |
| 2.6. Estimativa do pI das proteínas | 26 |
| 2.7. Coloração das proteínas por impregnação com prata | 26 |
| 2.8. Coloração das proteínas com Coomassie Blue | 26 |
| 2.9. Transferência das proteínas induzidas para membranas de PVDF | 26 |
| 2.10. Sequenciamento da extremidade N-terminal | 27 |
| 3. Resultados e discussão | 28 |
| 3.1. SDS-PAGE de diferentes linhagens de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> | 28 |
| 3.2. Cinética da indução de proteínas (SDS-PAGE) | 32 |
| 3.3. Mapas padrões de proteínas da eletroforese bidimensional de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> | 35 |
| 3.4. Cinética da indução de proteínas (Eletroforese 2D) | 36 |
| 3.5. Sequenciamento N-terminal | 43 |
| 4. Considerações finais | 47 |
| Parte 2- Expressão diferencial de mRNA de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> na interação com extrato de folhas da planta hospedeira | 49 |

| | |
|---|----|
| Resumo | 50 |
| Abstract | 51 |
| 1. Introdução | 52 |
| 2. Material e Métodos | 55 |
| 2.1. Linhagens bacterianas e meios de cultura | 55 |
| 2.2. Preparação do extrato de plantas | 55 |
| 2.3. Extração de RNA | 56 |
| 2.4. Síntese de cDNA | 56 |
| 2.5. RAP-PCR | 57 |
| 2.6. Eluição, reamplificação e isolamento das bandas diferenciais | 58 |
| 2.7. Sequenciamento de DNA | 58 |
| 2.8. Hibridização | 58 |
| 2.9. RT-PCR com primers específicos | 59 |
| 3. Resultados | 60 |
| 3.1. Considerações sobre a escolha da linhagem | 60 |
| 3.2. Isolamento de RNA total | 60 |
| 3.3. Amplificação de cDNA utilizando-se RAP-PCR | 60 |
| 3.4. Confirmação da expressão diferencial | 69 |
| 3.4.1. Hibridização diferencial | 69 |
| 3.4.2. RT-PCR com primers específicos | 71 |
| 4. Discussão | 75 |
| 5. Considerações finais | 82 |
| Conclusões Gerais das Partes I e II | 83 |
| Referências bibliográficas Gerais | 86 |
| Anexo 1 | |
| Anexo 2 | |

Lista de Figuras

- Figura A. Modelo de transporte em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* da proteína AvrBs3 e seu reconhecimento pelo gene de resistência Bs3 em pimentão. 10
- Parte 1- Detecção de proteínas diferencialmente expressas na interação de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* com hospedeiro compatível.**
- Figura 1. Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 29
- Figura 2. Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, cultivadas em meio mínimo MPI e MPI acrescido de extrato de folhas de maracujazeiro. 30
- Figura 3. Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*,

| | |
|--|---------|
| cultivadas em meio mínimo MMI e MMI acrescido de extrato de folhas de maracujazeiro. | 31 |
| Figura 4. Cinética da indução de proteínas (SDS-PAGE) da linhagem <i>X. axonopodis</i> pv <i>passiflorae</i> I11330 em meio MPI acrescido de extrato de folhas de maracujazeiro. | 33 |
| Figura 5. Perfil de proteínas após 45 h de incubação em SDS-PAGE com maiores detalhes de bandas induzidas. | 34 |
| Figura 6. Mapa 2D de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> em meio NYGB e MMI no tempo 0. | 37 |
| Figura 7. Perfil de proteínas da eletroforese 2D de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> após 5 h de incubação em meio MMI e MMP. | 38 |
| Figura 8. Perfil de proteínas da eletroforese 2D de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> após 25 h de incubação em meio MMI e MMP. | 39 |
| Figura 9. Perfil de proteínas da eletroforese 2D de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> após 45 h de incubação em meio MMI e MMP. | 40 |
| Parte 2- Expressão diferencial de mRNA de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> na interação com extratos da planta hospedeira. | |
| Figura 1. mRNA display utilizando-se diferentes <i>primers</i> randômicos. | 62 e 63 |
| Figura 2. Alinhamentos dos diferentes clones com seqüências de proteínas dos bancos de dados. | 66 e 67 |
| Figura 3. Hibridização diferencial dos clones provenientes do display de mRNAs utilizando-se como sondas cDNAs de cada tratamento (MMI, MMP e MMT) sintetizados com os <i>primers</i> OPQ4, OPQ5, OPQ7 E OPR6. | 70 |
| Figura 4. RT-PCR com <i>primers</i> específicos para amplificação do cDNAs dos três tratamentos (MMI, MMP e MMT). | 74 |
| Lista de Tabelas | |
| Parte 1- Detecção de proteínas diferencialmente expressas na interação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> com hospedeiro compatível utilizando-se Mapa das eletrotoreses 2D. | |
| Tabela 1. Altrações no padrão de proteínas da eletroforese 2D de <i>X. axon.podis</i> pv. <i>passiflorae</i> I11330 após diferentes tempos de incubação em meios MMI e MMP. | 42 |
| Tabela 2. Seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal dos <i>spots</i> XP e as respectivas similaridades encontradas no banco de dados. | 44 |
| Parte 2- Expressão diferencial de mRNA de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> na interação com extratos de folhas da planta hospedeira. | |
| Tabela 1. <i>Primers</i> randômicos utilizados para síntese de cDNA. | 57 |
| Tabela 2. Produtos de amplificações diferenciais selecionados com os diferentes <i>primers</i> e similaridade encontrada em bancos de dados. | 64 |
| Tabela 3. Nome e seqüência dos <i>primers</i> utilizados na reação de RT-PCR com <i>primers</i> específicos. | 72 |

Agradecimentos

À profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, que além de ser orientadora, é uma amiga que compreende, aceita minhas limitações e sempre me incentiva;

À Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano pela leitura minuciosa deste manuscrito e valiosas sugestões na correção do trabalho;

À profa. Anete P. de Souza, pela participação na banca do exame de qualificação e leitura deste manuscrito nos oferecendo valiosas contribuições;

Ao prof. Dr. Gonçalo Pereira Amarantes, pela participação na banca do exame de qualificação e leitura deste manuscrito;

Ao Dr. Júlio R. Neto do Instituto Biológico e ao prof. Dr. Ruy Pereira Leite Júnior do Instituto Agrônomo do Paraná, pelo fornecimento das linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho;

À Andréa, Marcos e Anderson do Lab. do prof. Gonçalo, pela grande ajuda no seqüenciamento;

Ao técnico Wilson, pela ajuda prestada para o andamento deste trabalho;

Às secretárias do CBMEG, Sandra, Tânia, Fabiana e Patrícia, pela atenção e ajuda em resolver problemas burocráticos;

Aos vizinhos de laboratório, Rogério, Luciana, Jorge, Edna, Renata, Renato e Ricardo, pela agradável convivência;

Aos amigos Lilão, Nene, July, Mámá, Dani, Lucy, Eliana, simplesmente pela amizade nas horas difíceis (que não foram poucas);

Aos participantes da grande novela do lab, Zédi, Ory, Pät, Ceni e Francine (que é nova mas por razões gastronômicas já foi super bem aceita), por fazerem de nosso ambiente de trabalho um lugar tão agradável;

Ao CNPq e irmãs, pelo apoio financeiro e

Aos meus super pais, irmãos e sobrinhos, por me proporcionarem a realização de mais um sonho.

Expressão diferencial de proteínas e mRNAs na interação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com hospedeiro compatível.

1. Introdução

Dentre as diversas bactérias que se associam à plantas, as bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são na sua quase totalidade patogênicas. O gênero é amplamente disperso no mundo, colonizando centenas de espécies de plantas, entre as quais plantas de importância econômica como arroz, cereais, cítricos, mandioca, hortaliças, ornamentais, etc. Entretanto cada espécie do gênero, atualmente compreendendo 20 (Vauterin *et al.*, 1995), causa sintomas específicos da doença em um número limitado de hospedeiros. Esta restrição de hospedeiros levou à uma nova designação taxonômica, a de patovar (pathogenicity variation), que indica a especialização fitopatológica. Linhagens do mesmo patovar atacam portanto plantas de um determinado gênero ou família relacionada, causando sintomas similares. Diversos sintomas podem ser causados por diferentes espécies de *Xanthomonas* entre os quais podem ser incluídos a queima, podridão, manchas angulares, manchas foliares, cancro dentre outros. Considerando-se apenas essas duas características do gênero, ou seja a restrição de hospedeiros e a variação dos sintomas apresentados, é possível prever que uma diversidade de genes devem atuar no controle e na manifestação das características de patogenicidade das diferentes espécies de *Xanthomonas*. A identificação de genes de patogenicidade assim como aqueles que estão envolvidos com o processo têm-se intensificado nos últimos anos, a partir de 1990, devido às diferentes estratégias e alternativas de análise disponíveis ao nível molecular.

Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* é uma bactéria Gram-negativa causadora da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) ou mancha oleosa (Pereira, 1969). A bacteriose é caracterizada pela formação de pequenas áreas verde-escuras e oleosas que evoluem para áreas circulares e de cor pardacenta. Esta doença é um dos principais problemas de importância econômica que atingem esta cultura (Pereira, 1969; Yamashiro, 1987; Almeida *et al.*, 1992; Teixeira, 1994). Ela tem se tornado um fator limitante para a expansão da cultura em diversas regiões do Brasil devido a forma severa

que ocorre sob condições de clima quente e úmido (Kuroda, 1981; Teixeira, 1994).

A análise de proteínas produzidas por diferentes tipos celulares é o resultado final da expressão de diversos genes funcionalmente ativos. Atualmente a análise mais refinada para identificação de proteínas globais expressas pelo genoma é efetuada por análise de géis das eletroforeses bidimensionais (2D) ou proteoma. O termo proteoma se refere a elaboração de mapas de proteínas totais das eletroforeses bidimensionais onde todas as proteínas observadas nos géis tem a região N-terminal seqüenciada. A eletroforese 2D resulta da combinação do método de focalização isoelétrica e a eletroforese em gel de poliacrilamida (O'Farrell, 1975) onde as proteínas são separadas primeiramente de acordo com seu pI e em seguida, pelo seu peso molecular. Esta combinação proporcionou uma alta capacidade de resolução tornando possível a análise global da expressão gênica. Portanto, a análise subtrativa de dois mapas de proteínas da eletroforese 2D provenientes de tratamentos diferentes pode levar a identificação de proteínas diferencialmente expressas.

O Display diferencial de RNA é uma técnica utilizada para a observação de expressão diferencial de genes em estudos comparativos e foi usado com sucesso na área médica e vegetal (Liang & Pardee, 1992; Goormachtitig *et al.*, 1995). Sua modificação para procariotos, que não apresentam cauda de poliA no mRNA, é conhecida como RAP-PCR (**R**NA **A**rbitrarily **P**rimed **P**olymerase **C**hain **R**eaction) (Wong & McClelland, 1994). Esta técnica permite a análise do perfil de populações de cDNAs provenientes de tratamentos diferentes através de reações de PCR onde é possível observar a diferença no perfil de fragmentos, em decorrência de alguma alteração de populações diferentes de RNAs mensageiros. Os fragmentos expressos diferencialmente podem ser isolados e clonados para a identificação dos genes correspondentes.

Utilizando-se a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* como modelo, este trabalho teve por objetivo analisar proteínas e mRNAs especificamente induzidos na presença de extrato de folhas de planta hospedeira. Para sua execução foram utilizadas as técnicas de gel da eletroforese bidimensional (2D) de proteína e o Display diferencial de mRNA.

Os objetivos gerais deste trabalho foram:

-Identificação de proteínas expressas diferencialmente em *X. axonopodis* pv. *passiflorae* cultivada na presença e ausência de extratos de folhas de *Passiflora edulis*, através de eletroforese 2D;

-Identificação de mRNAs expressos diferencialmente em *X. axonopodis* pv. *passiflorae* cultivada na presença e ausência de extratos de folhas de *Passiflora edulis*, através de RAP-PCR;

2. Revisão de literatura

2.1. A bacteriose do maracujá

Dentre as 530 espécies descritas do gênero *Passiflora* (Piza, 1966), mais de 150 são nativas do Brasil (Hoehne, 1946). Apesar do grande número de espécies pertencentes ao gênero, somente algumas são de importância econômica em função da qualidade dos frutos para o consumo ou ainda por apresentarem propriedades medicinais. As culturas comerciais do maracujá estão baseadas no maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims) e no amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).

O maracujá amarelo também conhecido como maracujá azedo é utilizado industrialmente na fabricação de sucos. Representa, atualmente, 95% dos pomares comerciais do Brasil. O maracujazeiro prefere regiões tropicais e subtropicais, com temperatura média de 20 a 32°C. Não tolera geadas e ventos frios e também não suporta um longo período de temperaturas médias abaixo de 16°C. Todas estas exigências climáticas tornaram o Brasil, um país propício para o desenvolvimento desta cultura e justificam a sua posição como um dos maiores produtores mundiais desta cultura com áreas plantadas principalmente nos estados do Pará, Bahia e São Paulo (Souza & Meletti, 1997).

Várias doenças de etiologia bacteriana foram constatadas na cultura do maracujazeiro. De acordo com Bradbury (1984) estão relatadas como patógenos desta cultura as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. viridiflava* e *P. syringae* pv. *passiflorae*. Dessas bactérias, as mais importantes, pelos prejuízos ocasionados, são *P. syringae* pv. *passiflorae* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

X. axonopodis pv. *passiflorae* é o agente etiológico da doença denominada bacteriose do maracujazeiro ou mancha oleosa do maracujazeiro (Pereira, 1969).

A bacteriose do maracujazeiro foi observada pela primeira vez em 1938 por Reid, na Nova Zelândia, com lesões de formas definidas, grosseiramente circulares e nas folhas, manchas de aspecto oleoso, apresentando inicialmente a cor cinza-claro.

No Brasil, o primeiro relato do patógeno foi registrado na região de Araraquara, Estado de São Paulo por Pereira em 1960 que o identificou como *X. axonopodis*. Atualmente, a ocorrência desta bactéria se estende por todas as regiões de cultivo (Kuroda,

1981; Teixeira, 1994; Peruch *et al.*, 1997).

Plantas infectadas por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* mostram redução no período de exploração comercial, apresentando frutos de baixo valor comercial ou impróprios para a comercialização. Os sintomas caracterizam-se, nas folhas, por lesões necróticas úmidas, de formato irregular, circundadas por tecidos cloróticos. Com a evolução da doença, estas lesões podem coalescer, ocasionando a queda das folhas. A partir das lesões foliares, a infecção pode tornar-se sistêmica, atingindo os ramos, que progressivamente secam, apresentando escurecimento dos feixes vasculares. Os frutos também são afetados pelo patógeno, e os sintomas são caracterizados pela formação de pequenas áreas verde-escuras e oleosas que evoluem para áreas circulares e de cor pardacenta. As sementes também podem ser contaminadas apresentando então um papel importante na disseminação do patógeno (Pereira, 1969; Dias *et al.*, 1990; Malavolta Jr., 1998).

Não são conhecidas medidas de controle ou variedades resistentes. Rotação de culturas, melhoria nos tratamentos culturais ou uso de alguns fungicidas, que podem atenuar a severidade dos sintomas, são apenas medidas paliativas para o problema (Torres & Filho, 1994).

2.2. *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

X. axonopodis pv. *passiflorae* é o agente causador da bacteriose ou mancha oleosa do maracujazeiro. Pertence a um grupo de bactérias Gram-negativas, aeróbicas, quase que exclusivamente fitopatogênicas, responsável por lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecido e hiperplasia em diversas espécies de plantas (Leyns *et al.*, 1984). A maioria das linhagens de *Xanthomonas* apresentam colônias lisas mucóides de coloração amarelada. O pigmento é mono ou dibromo arilpolieno chamado xantomonadina o qual é característico deste gênero. Outra substância típica do gênero é a produção do exopolissacarídeo xantana, o qual é responsável pela aparência mucóide ou viscosa das colônias.

Reunindo dados de homologia DNA-DNA, dados fenotípicos de diferentes grupos da espécie, publicados anteriormente, análise de 95 açúcares (Biolog GN), e características fitopatológicas, Vauterin *et al.* (1995), propuseram uma nova classificação do gênero *Xanthomonas*. Nesta classificação, a espécie mais numerosa, *X. campestris*, foi dividida em

16 espécies: *Xanthomonas campestris*, *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. axonopodis*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. curcubitae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*. A denominação de patovar (pathogenicity variation) que é utilizada com o propósito de distinção de hospedeiros, continua sendo aceita.

O patovar *passiflorae* não foi incluído nessa classificação devido ao pequeno número de amostras disponíveis em coleções internacionais. Este patógeno, descrito originalmente como *X. passiflorae* por Pereira (1969), foi reclassificado como *X. campestris* pv. *passiflorae* (Young *et al.*, 1996). Recentemente, Gonçalves & Rosato (2000), classificaram esta bactéria como pertencente a espécie *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Estes autores utilizaram 54 isolados do patovar *passiflorae* provenientes de diversos estados do Brasil, incluindo das regiões sul, sudeste, nordeste e central. Em análises com *primers* que amplificam regiões repetitivas do genoma de bactérias (REP, ERIC e BOX), RFLP da região intergênica do rDNA 16S-23S e perfil de proteínas em gel de SDS-PAGE estes autores obtiveram dados sobre a variabilidade deste patovar mas não conseguiram identificar a posição taxonômica dos isolados. Somente através da hibridização DNA-DNA, verificaram que os isolados bacterianos do patovar *passiflorae* apresentam homologia de 60,7% com linhagens da espécie *X. axonopodis*, colocando estes isolados dentro desta espécie.

A bibliografia existente sobre o patovar *passiflorae* é bastante escassa. Além deste trabalho de Gonçalves & Rosato (2000), Dias & Takatsu (1987) observaram variações nas características culturais da bactéria, produção de H₂S e virulência, em um número restrito de linhagens. Ainda com relação a variabilidade, Wendland *et al.* (1997), analisaram a diversidade do perfil de DNA plasmidial de 24 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Estes autores observaram uma variação em número de plasmídios de 1 a 3 e no tamanho de 28,5 a 180 kb. Em um trabalho que visava a identificação e diagnóstico da bacteriose, Beriam *et al.* (1998), utilizando técnicas de sorologia, observaram que antígenos na forma de SB (suspensão bacteriana) e CPM (Complexo protéico das membranas da bactéria) foram os mais indicados para detectar a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, sem a necessidade prévia de isolamento do patógeno.

2.3. Genes relacionados com a interação planta-patógeno em *Xanthomonas*

Muitos patógenos produzem enzimas, polissacarídeos e toxinas para superar mecanismos químicos ou estruturas de defesa da planta. Os compostos produzidos, são considerados fatores envolvidos na patogenicidade, onde os mais estudados são as enzimas extracelulares que degradam a parede celular ou outras estruturas, facilitando a entrada do patógeno ou dispersão no hospedeiro e toxinas que lesam ou matam células vegetais, permitindo que o patógeno colonize esta planta. Como exemplo podem ser citadas algumas enzimas degradativas (pectinases, celulasas, proteases), exopolissacarídeos, e toxinas (Beattie & Lindow, 1994; Collmer & Bauer, 1994; Dow & Daniels, 1994) que freqüentemente influenciam na severidade dos sintomas, agindo sinergisticamente para causar doença.

A regulação destes fatores de patogenicidade foi verificada em *X. campestris* pv. *campestris*. Os últimos estágios da doença (podridão negra) em crucíferas são usualmente caracterizados por necrose extensiva dos tecidos da planta, provavelmente causados por enzimas bacterianas, incluindo proteases, pectato liases, endoglucanases, lipases, etc. A síntese destas enzimas e de exopolissacarídeos (EPS) é regulada de uma maneira complexa por vários genes independentes organizados no *cluster rpf* (*regulation pathogenicity factor*). Estes genes foram localizados numa região do cromossomo compreendendo 21.9 kb. Utilizando a mutagênese por transposon, Tang *et al.* (1991) verificaram a existência de pelo menos 8 genes (*rpfA-H*) os quais levaram a redução dos níveis de todas as enzimas extracelulares e EPS. Alguns destes genes tem sido caracterizados, como o *rpfA* que codifica para aconitase e está envolvida na homeostase de ferro (Wilson *et al.*, 1998), o *rpfB* e *rpfF* que estão envolvidos na síntese de pequenas moléculas sinais difusíveis (Barber *et al.*, 1997; Slater, 1999), o *rpfG*, C e H que codificam elementos de 2 componentes do sistema de transdução sensorial (Tang *et al.*, 1991; Slater, 1999). Adjacente ao *rpfG* estão dois genes com ampla função reguladora; *rpfB* codifica para peptídeos de liberação do fator 2 e *lysU* codifica para lisil-RNA sintetase. Recentemente Dow *et al.* (2000) descreveram os genes *rpfD*, *rpfE*, *recJ*, *greA* e mais 4 ORFs. Estes autores verificaram que a *orf4* está envolvida com a regulação da síntese de enzimas extracelulares e EPS juntamente com as *orfs* 1, 2, e 3. Dois genes foram identificados como *recJ* e *greA* os quais estão envolvidos na

transcrição e alongação, respectivamente. A *orf1*, *orf2*, *orf3*, *orf4*, *rpfD* e *rpfE* mostraram similaridade com proteínas hipotéticas preditas de microrganismos que tiveram seus genomas sequenciados como de *Caulobacter crescentus*, de *Bordetella pertussis* e de *Klebsiella pneumoniae*.

Como genes de patogenicidade, podem ser citados os genes *avr* (*avirulence*), de avirulência que envolvem o controle de especificidade raça cultivar (Bonas & van Den Ackerveken, 1999), e os genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), envolvidos com hipersensibilidade e patogenicidade (Gabriel *et al.*, 1996; Bonas & Van den Ackerveken, 1997). Existem ainda os genes *dsp* (*disease specific*), específicos de doença (Boucher *et al.*, 1987; Seal *et al.*, 1990) e os genes *hsv* (*host-specific virulence*), de especificidade de hospedeiros (Mellano & Cooksey, 1988; Waney *et al.*, 1991; Gonçalves, 1996).

De maneira geral, os genes *avr* determinam a incapacidade da bactéria em infectar um planta que possua um gene R correspondente, restringindo assim, o número de hospedeiros do patógeno. A interação planta-patógeno no caso desse grupo parece ser “gene-a-gene”, onde para um gene *avr* específico, há um gene de resistência (R) específico. Dessa interação, resulta a incompatibilidade, levando ao desenvolvimento da reação de hipersensibilidade (HR), que consiste em uma rápida morte celular localizada e restrita ao local da infecção. Eles são cromossomais ou plasmidiais e codificam proteínas solúveis e hidrofílicas que não contém o clássico peptídeo sinal.

Vários modelos tem sido propostos para explicar geneticamente o reconhecimento específico entre genes de avirulência (*avr*) de patógenos e genes de resistência de plantas (R) em interações gene-a-gene (Gabriel & Rolfe, 1990). No modelo elicitor/receptor, os genes *avr* codificam enzimas que produzem moléculas sinais de baixo peso molecular as quais são percebidas por receptores codificados por genes R correspondentes resultando em resposta de defesa da planta. Em suporte a este modelo, foi verificado que o gene *avrD* de *Pseudomonas syringae* codifica uma enzima envolvida na síntese de um elicitor glicolipídico de baixo peso molecular (Midland *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1993). Um modelo alternativo é a hipótese de dímeros a qual o produto proteico de genes *avr* estão diretamente ligados ao produto do gene R ou ao próprio gene R (Ellingboe, 1982). Em suporte a este modelo, os peptídeos codificados por *avr4* e *avr9* de *Clasdosporium fulvum*

foram mostrados induzir diretamente respostas de defesa em plantas (Joosten *et al.*, 1994; van Kan *et al.*, 1991). A Fig. A mostra um esquema de como possivelmente ocorre a interação entre genes *avr* da bactéria e os genes de resistência (R) da planta e a participação dos genes *hrp* (citado adiante).

Um dos mais caracterizados genes *avr* é o *avrBs3* e seus homólogos. Este gene foi isolado de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, patógeno de pimentão e tomate, e codifica uma proteína de 122 kDa, caracterizada em sua região interna, pela presença de uma região de 102 pb contendo repetições em *tandem*, ricas em leucina, as quais são requeridas para três fenótipos, cancro hiperplásico, mancha bacteriana e resposta de hipersensibilidade (HRs). Estas repetições, ricas em leucinas, parecem servir como sítio de ligação entre proteínas mediando a interação direta entre proteínas Avr/Pth e de Resistência (Yang & Gabriel, 1995). Genes homólogos ao *avrBs3* estão presentes em diferentes *Xanthomonas* e possuem 95% de identidade, com maior variabilidade residindo na região de repetição. Alguns membros da família *avrBs3* tem função dupla. Por exemplo, o gene *pthA* de *X. citri* é requerido para patogenicidade (sintomas do cancro) em citros e como gene de avirulência em feijão. Pelo menos 26 membros desta família foram clonados a partir de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *malvacearum*, *X. oryzae* e *X. citri* (Gabriel, *et al.*, 1996).

Transporte de proteínas para o núcleo é um processo ativo e requer que estas proteínas contenham sinais de localização nuclear (NLS) apropriados. Yang & Gabriel (1995) descreveram o papel de seqüências sinais de localização nuclear (NLS) em pelo menos três fenótipos de sintomas determinadas pela família de genes *avr/pth* de *Xanthomonas*. Análise da seqüência de DNA revelou que 3 NLSs são conservadas em pelo menos 10 membros da família (*avrBs3*, *avrBs3-2*, *avrXa10*, *avrb6*, *pthA*, *pthB*, *pthC*, *pthN*, *pthN2* e *avrB4*). Mutações sítio dirigidas afetando o centro do NLS aboliram a habilidade de *pthA* elicitar o desenvolvimento do cancro em citros e *avrb6* elicitar a HR gene-a-gene em algodão mas não teve efeito em elicitar HR em não hospedeiro. Não há seqüência NLS consenso mas a maioria consiste em motivos K-R/K-X-R/K (usualmente adjacentes a prolina) ou consistindo de dois aminoácidos básicos, uma região espaçadora de 4 a 10 aminoácidos e um *cluster* de 3 a 5 aminoácidos básicos. Após a entrada no núcleo dirigido pelos NLSs, as proteínas Avr/Pth ou complexo proteicos podem agir em fatores de transcrição nuclear, levando a diferenças fisiológicas como hiperplasia (divisão celular) em

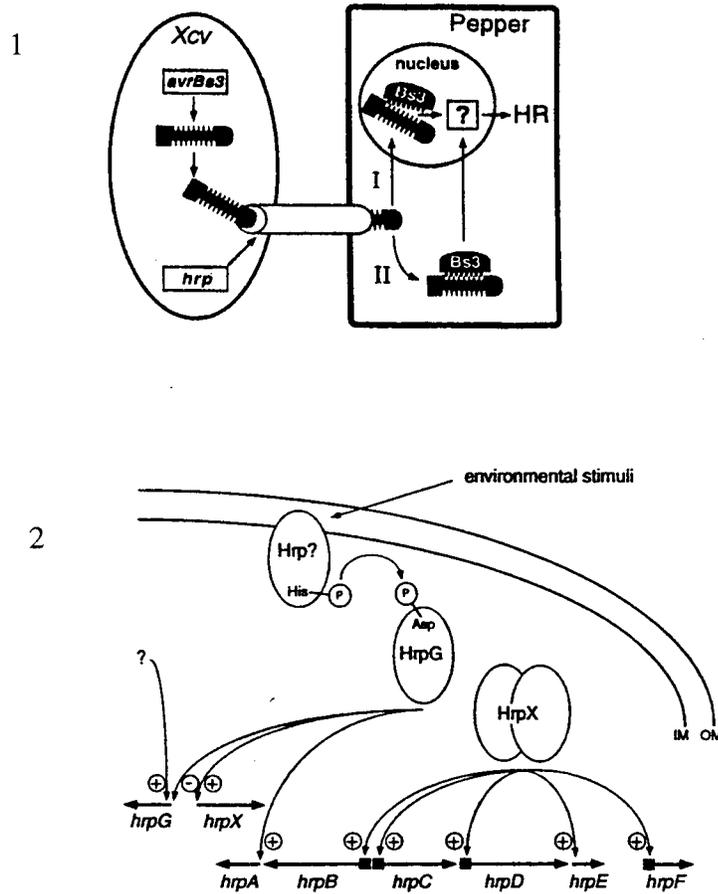


Figura A:1- Modelo de transporte em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* da proteína AvrBs3 e seu reconhecimento pelo gene de resistência específico Bs3 em pimentão (Segundo Van den Ackerveken *et al.*, 1996). 2- Modelo da regulação de genes *hrp* em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. As setas retas indicam *cluster* e genes *hrp* e as setas curvas representam proteínas regulando *hrp*. Wengelnik *et al.* (1996), propuseram que a proteína Hrp possivelmente localizada na membrana interna, funciona como um sensor induzida por estímulos ambientais e fosforila HrpG no aspartato. HrpG ativado poderia então regular o gene *hrpX* e o locus *hrpA*. O HrpX parece ativar o loci *hrpB* a *hrpF*. PIP-Boxes no promotor de *hrpB*, C, D, e *hrpF* estão indicados por um bloco quadrado. IM: membrana interna; OM: membrana externa; +:ativação da transcrição; -: repressão da transcrição.

citros, mancha úmida em algodão ou HR (morte celular localizada).

Recentemente Duan *et al.* (1999) demonstraram que a expressão do gene *pthA* em tecido da planta, foi suficiente para o desenvolvimento dos sintomas causados pelo patógeno. Nenhum estudo anterior reportou que genes de patogenicidade microbianos, possam elicitar sintomas de patogenicidade quando expressos em células da planta. Entretanto, vários genes *avr* podem provocar HR quando expressos em células de planta que possuem genes de resistência (R) (de Feyter *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1998). Os genes *avrB* e *avrRpt2* causam morte celular e necrose em plantas que evidentemente perderam os genes R específicos, sugerindo então um possível papel de genes *avr* na patogenicidade (Gopalan *et al.*, 1996; McNellis *et al.*, 1998).

Para cada fenótipo de patogenicidade ou avirulência provocados pela maioria dos patógenos de planta, é necessário um sistema funcional de secreção do tipo III codificado por genes *hrp*. Os genes *hrp*, assim como os *avr* têm sido muito estudados em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Bonas *et al.*, 1991). Os genes *hrp* são divididos em três grupos de acordo com sua função: (i) regulação gênica; (ii) produção de elicitor; (iii) sistema de secreção tipo III. Eles estão organizados num *cluster* de 25 kb contendo 6 loci, de *hrpA* à *hrpF*. A análise de seqüência dessa região indica a expressão de 21 genes, dos quais 10 parecem estar associados com a membrana celular da bactéria. A expressão dos genes *hrp* está sob controle das condições ambientais podendo ser induzidos pela planta ou em meios de cultura (Schulte & Bonas, 1992). Dois genes regulatórios foram clonados: o *hrpX* e *hrpG*, localizados próximos do “*cluster*” *hrp* (Wengelnik & Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996) (Fig. A). Os *hrpX* e *hrpG* estão localizados próximos um do outro, fora do *cluster* *hrp*, e são transcritos divergentemente. *hrpG* regula os genes do topo da cascata. A expressão de *hrpG* é baixa em meio complexo e rapidamente aumentada em meio XVM2 (Wengelnik *et al.*, 1996). *hrpX* codifica para um regulador do tipo Ara-C (Wengelnik & Bonas 1996). A expressão de *hrpX* é induzida em XVM2 e necessária para a indução de 5 loci: *hrpB* ao *hrpF*. A proteína HrpX está relacionada com HrpB de *Burkholderia solanacearum* as quais regulam a expressão de várias unidades de transcrição, entre os quais estão o *cluster* *hrp* e o gene *popA* (gene estrutural para a proteína elicitora PopA1 à qual é secretada via maquinaria Hrp e está relacionada com indução de HR) (Genin *et al.*, 1992). A análise do promotor revelou a presença de motivos em seqüências

conservadas chamadas de PIP-box (*Plant inducible promoter*), 44 pb *upstream* ao início de transcrição do *hrp*, bem como nos promotores dos genes *hrpC*, *hrpD* e *hrpF*. Estes dados sugerem que PIP-box pode ter um papel importante no controle transcricional dos genes *hrp*.

2.4. Métodos para o estudo de genes relacionados com patogenicidade

Um dos procedimentos comumente utilizados no estudo da interação patógeno-planta, em nível molecular, tem sido a obtenção de linhagens mutantes que tenham sofrido alteração na expressão de alguma função ligada à patogenicidade e, a posterior complementação do mesmo com banco genômico da linhagem selvagem. (Daniels *et al.*, 1987). Para a obtenção destes mutantes podem ser utilizados métodos de mutagênese química com NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) por exemplo (Daniels *et al.*, 1984; Bonas *et al.*, 1991; Hwang *et al.*, 1992); fago Mu (Mc Cammon *et al.*, 1985), transposons (Tn5 por exemplo) (Shaw *et al.*, 1988; Arlat *et al.*, 1991; Waney *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992); e mutagênese sítio dirigida por *marker exchange* (Ried & Collmer, 1988; Schell *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1991).

Uma outra estratégia para se estudar os genes envolvidos na interação planta-patógeno, é a identificação de genes induzidos pela planta, seguida da investigação de seus papéis no desenvolvimento de sintomas de doença (Osborn *et al.*, 1987; Beaulieu & Van Gijsegem, 1990; Kamoun & Kado, 1990).

2.4.1. Proteínas da eletroforese bidimensional (2D)

A análise de proteínas produzidas por diferentes tipos celulares é o resultado final da expressão de diversos genes funcionalmente ativos, tendo se tornado um complemento importante para o estudo de DNA. O estudo de proteínas em gel da eletroforese bidimensional foi utilizado de forma restrita durante um certo período devido às dificuldades na análise e à reprodutibilidade das matrizes obtidas. Entretanto com a corrida dos projeto de seqüenciamento de genomas de diferentes tipos de organismos os problemas de análise e reprodutibilidade têm sido contornados de forma extremamente rápida, levando ao desenvolvimento das pesquisas do tipo Proteoma (Jungblut & Wittmann-Liebold, 1995;

Wilkins *et al.*, 1996 e Wheeler *et al.*, 1996). Esse método explora a alta capacidade de resolução da eletroforese bidimensional (2D) para a análise celular global da expressão gênica. O sistema 2D resulta da combinação do método de focalização isoeletrica e a eletroforese em gel de poliacrilamida (O'Farrell, 1975). Centenas de proteínas podem ser resolvidas no gel final permitindo obter um mapa protéico global e a composição de uma base de dados para um determinado tipo celular. A eletroforese 2D tem sido utilizada para estabelecer mapas padrões para um organismo inteiro, diferentes tipos de tecidos e modelos de desenvolvimento. Permite também, por outro lado, a comparação dos produtos protéicos produzidos de um grupo celular exposto à diferentes condições biológicas. As comparações entre os mapas gerados produz o que é designado de proteínas de expressão diferencial que são induzidas ou suprimidas sob diferentes condições. O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e rápidas para o seqüenciamento do N-terminal bem como o de membranas de transferência e imobilização estáveis do tipo PVDF (polivinildifluoreto), tem permitido o seqüenciamento com quantidades mínimas de proteínas, na faixa de picomoles (Matsudaira, 1987). Mais recentemente Guerreiro *et al.* (1997) seqüenciaram o N-terminal de diferentes proteínas a partir de 100-200 fmoles. As seqüências de 10 ou mais resíduos são comparadas com um banco de dados como o SWISS-PROT. Essa metodologia foi aplicada em *E. coli* onde foi possível identificar 30 proteínas, das quais, três eram desconhecidas e 20 foram corretamente identificadas. Outras proteínas não foram identificadas e necessitam de complementação com outros métodos de análise (Wilkins *et al.*, 1996).

A análise de proteínas diferencialmente expressas tem sido utilizada *em E. coli*, *Bacillus subtilis*, e *Listeria*, para identificação de proteínas induzidas por respostas adaptativas devido a variações das condições ambientais, principalmente temperatura e estresse salino (Yura *et al.*, 1993; Jones & Inouye, 1994; Volker *et al.*, 1994). Os resultados obtidos têm ampliado as perspectivas de estudos das já conhecidas proteínas de choque de temperatura (HSP, *heat shock proteins* e CSP, *cold shock proteins*) e as proteínas de estresse (GSP, *general stress proteins*). Possivelmente uma das mais bem caracterizadas respostas adaptativas ao aumento de temperatura seja aquela descrita para *E. coli*, quando a temperatura é aumentada de 28 para 42°C (ver Yura *et al.*, 1993). Nessas condições ocorre uma indução temporária de várias HSP. Alguns genes de *E. coli*, responsáveis por esta resposta como por exemplo, *dnaK*, *groEL*, *htpG*, já foram caracterizados e apresentaram-se

homólogos com aqueles de eucariotos (ver Jones & Inouye, 1994). A análise dos dados obtidos com as proteínas de *E. coli* indicam que uma das funções das HSPs é a proteção das cadeias polipeptídicas formadas impedindo que ocorra um dobramento errado ou a agregação dessas. Tais proteínas são as chaperonas moleculares. O decréscimo de temperatura também leva à formação de um conjunto de proteínas diferenciais (CSP). As mais conhecidas em *E. coli* são as proteínas NusA (envolvida na terminação e antiterminação da transcrição), fator I2 (fator de iniciação que intermedia a ligação do tRNA-fmet à subunidade 30S para iniciar a tradução) e a polinucleotidil fosforilase, envolvida na degradação do mRNA. Outras proteínas, que apresentam papéis duplos são também mencionados na revisão de Jones & Inoue (1994). As proteínas geradas por condições de estresse (GSPs) têm sido analisadas em *B. subtilis*, em resposta a choques de alta temperatura, estresse salino e limitação de glicose e oxigênio (Hecker & Volker, 1990; Hecker *et al.*, 1988). Muitas dessas proteínas induzidas em *B. subtilis* apresentam semelhanças com as proteínas induzidas por *heat shock* de *E. coli* como o DnaK e GroEL. Apesar das proteínas especificamente induzidas por diferentes condições de estresse salino, oxidativo e nutricional terem sido detectadas, elas não foram identificadas (Jenkins *et al.*, 1991; Meury & Kohiyama, 1991).

Até o presente momento, foram relatados poucos trabalhos análogos com bactérias de importância para a agricultura ou que interagem com plantas. Em *Azospirillum*, a análise de proteínas da eletroforese 2D foi utilizada para caracterização de duas espécies (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) bem como de mutantes, entretanto as proteínas diferenciais não foram identificadas. Uma das poucas exceções, é apresentada por Guerreiro *et al.* (1997) que detectou através de 2D cerca de 1.700 proteínas constitutivas, que representam cerca de 30% do genoma de *Rhizobium leguminosarum*. A indução com flavonóides apresentou quatro proteínas diferenciais. Foram analisadas 20 proteínas constitutivas e as quatro induzidas, para, tentativamente, se construir marcadores internos para estabelecimento de uma base de dados de proteínas da eletroforese 2D. Este trabalho mostra de forma bastante elucidativa o progresso ocorrido em termos de resolução, para trabalhos desse tipo. Quantidades mínimas de proteínas, de 100-200 fmoles, foram utilizadas para seqüenciamento N-terminal.

A análise de proteínas da eletroforese 2D não tem sido descrita em bactérias

fitopatogênicas. Em *Xanthomonas*, a maior parte dos estudos de proteínas, principalmente perfil de proteínas SDS-PAGE, está direcionada para trabalhos de detecção de biodiversidade e taxonomia. É uma técnica rápida, facilmente padronizada, e bastante discriminativa para propósitos taxonômicos, possibilitando a análise de grande número de amostras. Diversas bandas diferenciais, existentes em comparações de diferentes categorias taxonômicas têm sido detectadas, entretanto, elas raramente têm sido identificadas. Somente Wengelnik *et al.* (1996) utilizaram a separação de proteínas em géis de SDS-PAGE para observar a expressão do gene *hrpA1* induzido por fatores existentes no filtrado de culturas de plantas definido em trabalho anterior (Schulte & Bonas, 1992).

2.4.2. Análise da expressão de genes através do display diferencial (DD)

A determinação de seqüências genômicas de diversos microrganismos como por exemplo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilis influenzae*, *Mycoplasma genitalim*, *Methanococcus jannaschii* e outras tem gerado uma quantidade muito grande de informações depositadas em bancos de dados. Contudo, esta análise representa somente um nível da complexidade genética. A expressão ordenada e temporal destas informações representam outro nível de maior complexidade igualmente importante para a biologia do organismo (Liang & Pardee, 1992).

Os métodos para distinguir mRNAs (produtos de expressão gênica) em estudos comparativos, utilizavam técnicas como a hibridização subtrativa. Esta técnica, apesar de ter sido muito utilizada, é as vezes de baixa reprodutibilidade e requer uma quantidade elevada de RNA (Liang & Pardee, 1992).

O Display diferencial de RNA é uma técnica utilizada para a observação de expressão diferencial de genes em estudos comparativos. A técnica foi originalmente desenvolvida para o estudo de expressão de genes em eucariotos onde continua a ser mais aplicada. A essência do DD, está na utilização de *primers* ancoradores oligo dT para a transcrição reversa. O *primer* oligo dT consiste de 11 ou 12 T's mais duas bases adicionais as quais promovem especificidade permitindo o início da transcrição reversa de somente uma subpopulação de cDNAs. Há reconhecimento de somente 1/12 do total da população de mRNA, pelas combinações das duas últimas bases em sua extremidade 3'. São usados

juntamente com *primers* aleatórios, em geral decâmeros de oligonucleotídeos com seqüências arbitrárias na amplificação subsequente. Os fragmentos de cDNAs amplificados são então separados em gel de poliacrilamida e a detecção feita em filme de auto radiografia onde é possível observar a diferença no perfil de fragmentos, em decorrência de alguma alteração de populações diferentes de RNAs mensageiros. Os fragmentos expressos diferencialmente podem ser isolados e clonados para a identificação dos genes correspondentes.

Desde a sua publicação original o método sofreu algumas adaptações (Welsh *et al.*, 1992; Bauer *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1993; Bertioli *et al.*, 1995) e tem sido utilizado para células animais em caso de tumores de mama (Liang *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1993; Bertioli *et al.*, 1995); células musculares de bovinos (Nishio *et al.*, 1994) e em embriões (Zimmermann & Schultz, 1994). Em plantas, a técnica começou a ser utilizada para análise de genes especificamente induzidos em leguminosa após infecção por diazotrófica (Goemachtig *et al.*, 1995).

Os procariotos não possuem mRNA com cauda poli (A) o que demandou a necessidade de algumas adaptações. Wong & McClelland (1994) utilizaram apenas um *primer* de seqüência randômica, em cada síntese de cDNA, reamplificando posteriormente com os mesmos *primers*. Esta técnica foi chamada de RAP-PCR (RNA Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) cujo princípio, portanto, está em elaborar *fingerprinting* de RNAs por RAP. Os referidos autores utilizaram a técnica pela primeira vez em *Salmonella typhimurium*, uma bactéria Gram-negativa, e detectaram um produto de 435 pb cujo mRNA correspondente era induzido especificamente por peróxido de hidrogênio.

Outros trabalhos foram realizados com procariotos. Em *E. coli.*, Fislage *et al.*, (1997) desenvolveram *primers* cuja seqüência foi determinada de regiões que não apresentavam homologia com rRNA ou com outros RNAs pequenos e abundantes, extraídas de banco de dados (EMBL database). *Primers* com 11 mer foram selecionados por localizarem a extremidade 3' do RNA e as de 10 mer por se ligarem preferencialmente na extremidade 5'. De um total de 10 fragmentos, 4 mostraram similaridade com genes conhecidos: *xylA* (xilose isomerase); *trkA* (componente de superfícies), *albB* (aldeído desidrogenase) e *rimI* (catalizador de acetilação). Fleming *et al.* (1998) otimizaram a técnica do display diferencial para utilização de culturas puras provenientes do solo de

Pseudomonas putida. Estes autores utilizaram o tolueno como modelo para indução do gene *todC1*. Eles detectaram sua indução após 3 h, em 0,015 ng de RNA total ou aproximadamente 10^3 transcritos. Verificaram também, em outro modelo, a indução de naftaleno deoxigenase por salicilato. Shepard & Gilmore (1999) trabalhando com *Enterococcus faecalis*, melhoraram a reprodutibilidade do DD alterando a concentração de RNA para a síntese de cDNA, a temperatura de anelamento e extensão na reação de PCR. Com estas modificações, os autores conseguiram um total de 9 produtos de expressão diferencial de genes que foram submetidos a dois tratamentos, aerobiose e anaerobiose. A análise das seqüências mostrou que três produtos induzidos aerobicamente apresentaram similaridade significativa com catalase e dois com o gene que codifica para oxido-redutase de *Bacillus subtilis*. Os genes anaerobicamente induzidos mostraram similaridade com o sistema de transporte do tipo ABC, com o gene que codifica para seril-tRNA sintetase de *Bacillus subtilis* e dois produtos que codificam para NADH desidrogenase de mamíferos. Os outros dois produtos não demonstraram similaridade significativa em bancos de dados.

Parte 1

Detecção de proteínas diferencialmente expressas na interação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com extrato de folhas do hospedeiro compatível

Detecção de proteínas diferencialmente expressas na interação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com extrato de folhas do hospedeiro compatível.

Resumo

A eletroforese bidimensional (2D) foi utilizada pela primeira vez em bactérias fitopatogênicas para verificar a expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* na presença de extrato de folhas da planta hospedeira (maracujazeiro). A capacidade de indução do extrato de folhas foi preliminarmente testada pela alteração do perfil de proteínas solúveis em SDS-PAGE. Foi verificada a repressão de algumas bandas específicas em meio contendo extrato de folhas de maracujazeiro mas não foram observadas indução de novas proteínas possivelmente devido ao baixo nível de expressão das mesmas. Amostras de culturas da bactéria, cultivadas em diferentes tempos de incubação, em meio mínimo basal (MMI) (Schulte & Bonas, 1992), em meio de indução contendo extrato de folhas de maracujazeiro (MMP) e em meio contendo extrato de folhas de tomateiro, planta incompatível (MMT), foram utilizadas para extração de proteínas e construção dos mapas 2D. Por comparação dos mapas foram detectadas, no total, indução de 8 novas proteínas, aumento no nível de expressão de 9 e repressão de 3. Todas essas proteínas foram caracterizadas quanto ao peso molecular e pI. Quatro proteínas (XP1 à XP4) foram sequenciadas na região aminoterminal: uma das proteínas estava bloqueada e as outras três (XP2-XP4) tiveram determinadas seqüências de 11 aminoácidos. As seqüências obtidas não apresentaram similaridade quanto à região aminoterminal com proteínas conhecidas na base de dados, devido possivelmente ao pequeno número de genes envolvidos com fitopatogenicidade conhecidos. Os resultados obtidos indicam que essas proteínas devem corresponder a novos genes envolvidos na interação planta-bactéria. Espera-se que com o seqüenciamento do genoma da bactéria *X. axonopodis* pv. *citri*, ora em andamento, os genes envolvidos com a expressão dessas proteínas possam ser identificados.

Abstract

Two dimensional gel electrophoresis (2D) was used for the first time to determine a differential protein expression in phytopathogenic bacteria. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* II1330 was grown in a defined minimal medium (MMI), in an induction medium (MMP) containing leaf extract of the compatible host (passion fruit plant) and in an medium containing extract of incompatible host (MMT). Preliminary experiments were carried out using SDS-PAGE of whole-cell proteins to determine the ability of the leaf extracts alter the basic pattern of proteins. Upregulation of some bands were observed however induction of novel bands were lacking possibly due to low level of expression of induced-proteins. The bacterium was grown in the three media and samples were taken after 5, 25 and 45 h and prepared for 2D electrophoresis. The subtraction of the maps revealed a total of 8 new induced-proteins, 9 upregulated and 3 downregulated proteins. The molecular weight and pI of these proteins were determined and 4 (XP1-XP4) were N-terminal sequenced. XP1 was N-terminal blocked and the others had sequences of 11 amino acids determined. Comparison of these sequences to databases using Blast, Fasta and TagIdent programs showed no similarities in the aminoterminal region to any known protein. The lack of similarity in the aminoterminal region of the three proteins indicates that they correspond to a new genes involved in the plant-bacteria interaction. The genomic sequence of *X. axonopodis* pv. *citri*, which is underway, will help to elucidate the genes involved specifically in the interaction of *X. axonopodis* pv. *passiflorae* with passion fruit plants.

1. Introdução

A bacteriose do maracujazeiro (*Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*), causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, é um dos principais problemas de importância econômica que atingem esta cultura (Pereira, 1969; Yamashiro, 1987; Almeida *et al.*, 1992; Teixeira, 1994). A infecção ocorre através das aberturas naturais da planta ou pequenas lesões resultando na invasão sistêmica da planta que pode levar à morte prematura. Nas folhas os sintomas são visíveis pela necrose ou por uma típica mancha de aspecto oleoso circundado por clorose (Malavota JR, 1998). Essa doença tem se tornado um fator limitante para a expansão da cultura em diversas regiões do Brasil devido a forma severa que ocorre sob condições de clima quente e úmido (Kuroda, 1981; Teixeira, 1994). Com o aumento da área cultivada requerida pelas indústrias de sucos e de produtos naturais para extração da maracujina, tem ocorrido concomitantemente a dispersão do patógeno.

Apesar de serem conhecidos os sintomas induzidos pela bactéria na planta, os mecanismos pelos quais são desencadeados os sinais para a indução de sintomas não são conhecidos. Contudo nos últimos anos, vários genes envolvidos com patogenicidade foram analisados e progressos consistentes têm sido obtidos com várias espécies de *Xanthomonas*. Dentre os genes analisados podem ser citados os genes *avr*, de avirulência, que envolvem o controle de especificidade raça cultivar, e os genes *hrp*, envolvidos com hipersensibilidade e patogenicidade (Gabriel *et al.*, 1996; Bonas & Van den Ackerveken, 1997). Existem ainda os genes *dsp*, específicos de doença (Boucher *et al.*, 1987; Seal *et al.*, 1990) e os genes *hsv*, de especificidade de hospedeiros (Mellano & Cooksey, 1988; Waney *et al.*, 1991 e Gonçalves, 1996).

Alguns estudos têm sido realizados com genes que codificam produtos que afetam o metabolismo ou estruturas das células da planta. Como exemplo podem ser citadas algumas enzimas degradativas (pectinases, celulasas, proteases), exopolissacarídeos, e toxinas (Beattie & Lindow, 1994; Collmer & Bauer, 1994; Dow & Daniels, 1994) que freqüentemente influenciam na severidade dos sintomas, agindo sinergisticamente para causar doença.

Em *X. campestris* pv. *passiflorae* não foi descrito até o momento nenhum gene relacionado com patogenicidade, possivelmente devido à importância econômica restrita do

cultivo do maracujazeiro aos países produtores do fruto. Apesar da constatação de genes de patogenicidade do tipo *hrp* e *avr* não terem sido constatados nessa bactéria, é razoável a suposição de que eles existam dado a sua ampla dispersão no gênero *Xanthomonas* (Leite *et al.*, 1994). Diversos genes envolvidos com patogenicidade já foram descritos assim como as respectivas proteínas preditas pela seqüência de DNA, entretanto, a detecção de proteínas envolvidas com patogenicidade em *Xanthomonas* não tem sido reportadas. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo elaborar mapas de proteínas em géis das eletroforeses bidimensionais de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* com a finalidade de obter um panorama geral de proteínas, com alto grau de resolução, e se possível discriminar aquelas especificamente induzidas na presença de extrato de folhas de planta hospedeira.

2. Material e Métodos

2.1. Linhagens bacterianas e meios de cultura

Foram utilizadas inicialmente as linhagens 11043, 11324, 11329, 11330, e 11341 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* isoladas de *Passiflora edulis* no Estado de São Paulo provenientes da Coleção do IBSBF (Instituto Biológico, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, SP) e as linhagens 120, 444, 777, 941, 960, 997, 1151 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* isoladas de *Passiflora edulis* no Estado do Paraná provenientes do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR).

As linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram, de forma geral, mantidas em meio NYGB (Daniels *et al.*, 1984), contendo (por L): peptona 5 g; extrato de levedura 3,0 g e glicerol 20 ml, à 30°C. Adição de 2% ágar foi efetuada para meio sólido (NYGA).

Foram também utilizados os seguintes meios mínimos:

- MPI (Sow & Demain, 1979) que continha (por L): Sacarose 20,0 g; KH₂PO₄ 5,0 g; MgSO₄ 0,2 g; NH₄SO₄ 2,0 g; ácido cítrico 2,0 g; H₃BO₃ 6 mg; ZnCl₂ 6 mg; FeCl₃. 6H₂O 2 mg; CaCO₃ 20 mg ; pH 7,0.

- MMI (Schulte & Bonas, 1992): NaCl 1,2 g; NH₄SO₄ 1,3 g; MgSO₄ 1,2 g; CaCl₂ 0,11 g; KH₂PO₄ 0,2 g; K₂HPO₄ 0,06 g; Sacarose 3,4 g e Extrato de levedura 1g, pH 7,0.

2.2. Preparação do extrato de plantas

Foram utilizados extratos de diferentes plantas incorporados ao meio de cultura para verificar a indução de proteínas específicas. Como planta compatível foram utilizadas folhas do hospedeiro natural (*P. edulis*) e como planta incompatível, folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Petomech VF 162 (Petoseed Co).

O extrato de plantas foi preparado a partir de folhas sem a nervura central. As folhas foram picadas e misturadas com meio de cultura MMI (proporção de 1g : 100 mL de meio), mantidas em gelo e levadas ao triturador (Politron - Superohm) durante 5 minutos. O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm/20 minutos, recuperado o

sobrenadante e novamente centrifugado a 11.000 rpm/10 minutos. O sobrenadante foi filtrado consecutivamente através de membranas Millipore de 0,45 e 0,22 μm . O extrato assim obtido foi congelado a -70°C ou utilizado imediatamente na concentração de 10% nos meios mínimos, o que resultou na concentração final de 1 μg de extrato/ mL de meio. Para o controle da indução foi utilizado o meio basal MPI ou MMI sem adição de extratos.

2.3. SDS-PAGE de proteínas totais

Diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram cultivadas em diferentes meios de cultura (NYGB, MPI ou MMI) com adição de extrato de folhas de maracujazeiro nos meios MPI e MMI. Proteínas dessas culturas foram extraídas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) à concentração de 10% (Laemmli, 1970). Esses experimentos tiveram a finalidade de avaliar a capacidade de indução dos extratos de plantas e verificar o perfil geral de proteínas em diferentes linhagens para proceder à seleção final da linhagem a ser utilizada. Foi também efetuada uma cinética do perfil de proteínas por SDS-PAGE, utilizando-se amostras extraídas em intervalos de 5 h de um total de 50 h de incubação da bactéria com o extrato de plantas.

2.4. Extração de proteínas totais e eletroforese bidimensional (2D).

A extração de proteínas totais e a eletroforese bidimensional (2D) foram efetuadas segundo De Mot & Vanderleyden, (1989) com algumas alterações. *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi cultivada por 16 horas em diferentes meios de cultura e foram utilizadas alíquotas de 1-2 mL. A suspensão bacteriana foi centrifugada e o sedimento celular foi lavado em tampão fosfato (K_2HPO_4 1,24 g/L; KH_2PO_4 0,39 g/L; NaCl 8,8 g/L; pH 7.2). O precipitado foi suspenso em 0,75 mL de tampão de extração (sacarose 0,7 M; Tris 0,5 M; EDTA 50 mM; KCl 0,1 M; DTT 40 mM; pH 8.0) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir foi efetuada a extração com igual volume de fenol saturado com Tris-HCl pH 8.0. Após agitação em vortex (Gene II – Scientific Industries) por 15 minutos e centrifugação por 3 minutos à 8.000 rpm, a fase fenólica foi recuperada. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. As proteínas foram precipitadas da fase fenólica pela adição de 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol. O sedimento celular foi lavado uma vez com acetona 80% gelado. O precipitado foi solubilizado em 75 μL de

tampão de lise: uréia 9,8 M; nonidet P-40 2% (v/v); DTT 100 mM, 2% (v/v) de anfólitos pH 5-8 e pH 3-10 na proporção de 5:1. As amostras foram estocadas à -70°C .

O gel da primeira dimensão foi constituído de 3,6% de acrilamida; 0,21% de bis-acrilamida; 7,2% de anfólito pH 5-8 e 3-10 na proporção de 5:1 (v/v); 2% de nonidet P-40 e 55% de uréia. Foram aplicados no gel aproximadamente 300 μg de proteína total após uma pré corrida. A corrida foi efetuada a 400 V por 18 horas, utilizando-se NaOH 20 mM no reservatório superior e H_3PO_4 10 mM no inferior.

O gel de SDS-PAGE da segunda dimensão foi constituído por um gel de empacotamento (4%) e um gel de resolução (10%). Cada gel cilíndrico da primeira dimensão foi colocado sobre o gel de empacotamento do gel SDS-PAGE da segunda dimensão. A corrida da eletroforese foi efetuada à 70V até o tampão de amostra atingir o gel de resolução e, a seguir, a 140V até o final do gel, a temperatura ambiente. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-glicina (Tris-base 25mM, glicina 0,192 mM e SDS 0,1%, pH 8.3). Como marcador de peso molecular foi utilizado o “ladder 10 kDa” (Gibco-BRL).

2.5. Quantificação de proteínas através do método de Bradford

O método de Bradford se baseia na quantificação da ligação de um corante (Comassie Brilliant Blue) a proteínas de concentração desconhecida e comparação desta ligação com a ligação de proteínas padrões (usualmente BSA- Soro albumina bovina) em diferentes quantidades. Deste modo, quantidades crescentes de BSA, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 μg de proteína foram colocados em diferentes tubos de microcentrífuga além de 200 μL do corante (Reagente de Bradford, Bio-Rad) e H_2O milliQ totalizando 1 mL. Para os tubos com proteínas de concentração desconhecidas, foram adicionados 1 μL de amostra. A reação do branco foi feita em um tubo contendo apenas o tampão de lise, utilizado na extração da proteína, o corante e a H_2O . Estas misturas foram agitadas e incubadas por 15 min., à temperatura ambiente. A curva padrão foi determinada pela absorbância (A_{595}) versus concentração da proteína BSA em espectrofotômetro (Microplate Reader – BioRad). A concentração das proteínas foram então calculadas utilizando as absorbâncias das amostras e a curva padrão.

2.6. Estimativa do pI das proteínas

O pI das proteínas foi estimado através da aferição do pH das diferentes regiões gel da primeira dimensão. O gel da primeira dimensão foi cortado em onze pedaços de 1 cm, e colocados separadamente em tubos contendo 1 mL de H₂O milliQ. Os tubos foram deixados à 10°C por 16 horas e após este período, o pH da solução foi medido em pHmetro.

2.7. Coloração das proteínas por impregnação com prata.

A coloração das proteínas foi efetuada segundo Blum *et al.* (1987), modificado. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e utilizadas sequencialmente, conforme descrito a seguir. Fixador (etanol 50%, ácido acético 12%, 50 µL de formaldeído 37%), 1 h; Etanol 50%, 3 x 20 min; Solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2%), 1 min; Lavagem com água destilada, 3 X 20 s; Solução de impregnação (nitrito de prata, 0,2%; 0,75mL de formaldeído 37%), 20 min; Lavagem com água destilada, 3 x 20 s; Solução reveladora (carbonato de sódio 6%; tiosulfato de sódio 0,4 %; 0,5 mL de formaldeído 37%) até o aparecimento das bandas; Solução de bloqueio (etanol 50%, ácido acético 12 %).

2.8. Coloração das proteínas com Coomassie Blue

Na coloração de proteínas com Coomassie Blue, os géis foram mergulhados numa solução contendo 54% (v/v) de metanol, 13,5% (v/v) de ácido acético e 0,27% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue por 20 minutos com agitação lenta. Após este tempo, esta solução foi substituída por uma solução de descorante contendo 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial. Esta solução foi substituída vezes até a visualização das bandas no gel.

2.9. Transferência das proteínas induzidas para membranas de PVDF (polivinildifluoreto) (Matsudaira, 1987).

Após a eletroforese, o gel foi incubado por 30 min em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM v/v, pH 8,3; metanol 20%). Após a repetição desta etapa, o gel foi transferido para uma unidade de transferência (TE 50X - Hoefer) e colocado sobre a

membrana de PVDF (BioRad) previamente umedecida com metanol e tampão de transferência. A membrana e o gel foram colocados entre folhas de papel de filtro umedecidos com tampão de transferência. A transferência foi efetuada a $0,8 \text{ mA cm}^2$ por um período de 2 horas. Após a transferência as membranas foram lavadas por 3 vezes durante 5 min. em água destilada. A seguir, as membranas foram coradas com Comassie Blue. As bandas de interesse foram cortadas das membranas, colocadas em tubo *de* microcentrífuga e enviadas para seqüenciamento.

2.10. Seqüenciamento da extremidade N-terminal

O seqüenciamento da extremidade N-Terminal foi realizado no sequenciador automático Perkin Elmer ABI 476A na NAPS Unit, Sequencing Services Laboratories, da Universidade Brititish Columbia, Canadá. A reação consistiu em clivagem e conversão dos aminoácidos N-terminais em aminoácidos PTH (PTH-AA) os quais foram injetados no sistema de HPLC PE ABI 120A. A identificação do resíduo de aminoácido foi determinada por comparação com o tempo de retenção conhecido de padrões PTH-AA. Em cada ciclo sucessivo (um ciclo é requerido para cada resíduo de aminoácido solicitado) a seqüência pode ser determinada ou “chamada”.

3. Resultados e Discussão

3.1. SDS-PAGE de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

Com a finalidade de verificar o grau de diferenças existentes no padrão de proteínas das diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e avaliar os diferentes meios de cultura, foi efetuado, em fase preliminar, um estudo do perfil de proteínas totais exibido por 10 diferentes isolados, coletados principalmente nos estados de SP e PR. As linhagens foram cultivadas em meio complexo NYGB durante 16-18 h e as proteínas solúveis foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE (Fig. 1). Os resultados obtidos demonstraram que todas as linhagens apresentaram um perfil de 27 bandas idênticas, com peso molecular variando de <20 a 110 kDa. A ausência de variações no padrão de bandas entre as diferentes linhagens permitiu a seleção de um único isolado para os estudos posteriores. No presente caso, foi selecionada a linhagem I11330.

Os meios de cultura mínimos MPI e MMI, de composição química definida, foram também utilizados para verificar se esses meios eram capazes de alterar o padrão obtido com o meio complexo. As seis linhagens utilizadas (I11329, I11330, I11341, 941, 120 e 1151) nesses experimentos foram também cultivadas em condições de indução, adicionando-se extrato de folhas de maracujazeiro na concentração de 1 µg/mL de meio de cultura. A Fig. 2 mostra o perfil de bandas de diferentes linhagens cultivadas em MPI com e sem extrato de folhas de maracujazeiro. Devido à maior concentração de proteínas utilizadas no gel, o perfil de bandas das amostras é mais nítido, entretanto é possível observar que o padrão geral permanece equivalente ao obtido com o meio NYGB. É contudo, bastante visível que o meio com extrato de folhas de maracujazeiro reprime algumas bandas, como por exemplo, uma banda de cerca de 29 kDa, assinalada na Fig. 2. O meio MMI (Fig. 3) também apresentou um perfil semelhante ao obtido no meio MPI, com repressão da mesma banda de 29 kDa. Os experimentos dessa fase permitiram também verificar que os diferentes meios de cultura (MMI e MPI) induziram o mesmo padrão de proteínas nas diferentes linhagens e que qualquer meio de cultura em princípio, poderia ser utilizado como meio basal. Nessa etapa, escolheu-se a manutenção dos meios de cultura de composição química definida o que automaticamente excluiu o meio complexo N. Os dois meios mínimos (MPI e MMI) foram portanto selecionados para os experimentos de cinética

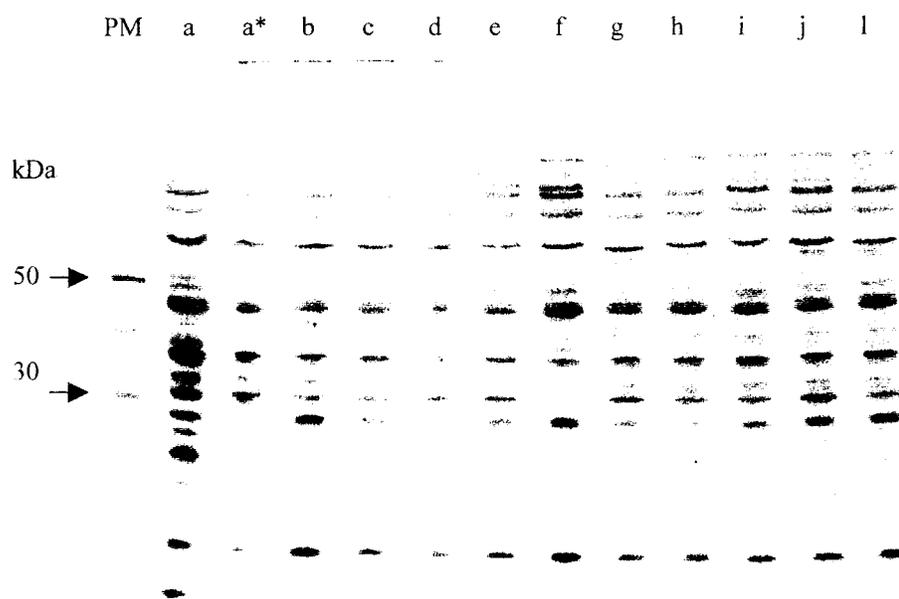


Figura 1. Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* coradas com prata. **a** e **a***, linhagem **I11330** cultivada em meio MPI e N, respectivamente. **b-l**: linhagens **I11329**, **I11043**, **I11341**, **1151**, **941**, **960**, **997**, **777**, **444**, **120**, respectivamente, cultivadas em meio complexo, NYGB. PM: marcador de peso molecular de 10 kDa (Gibco-BRL).

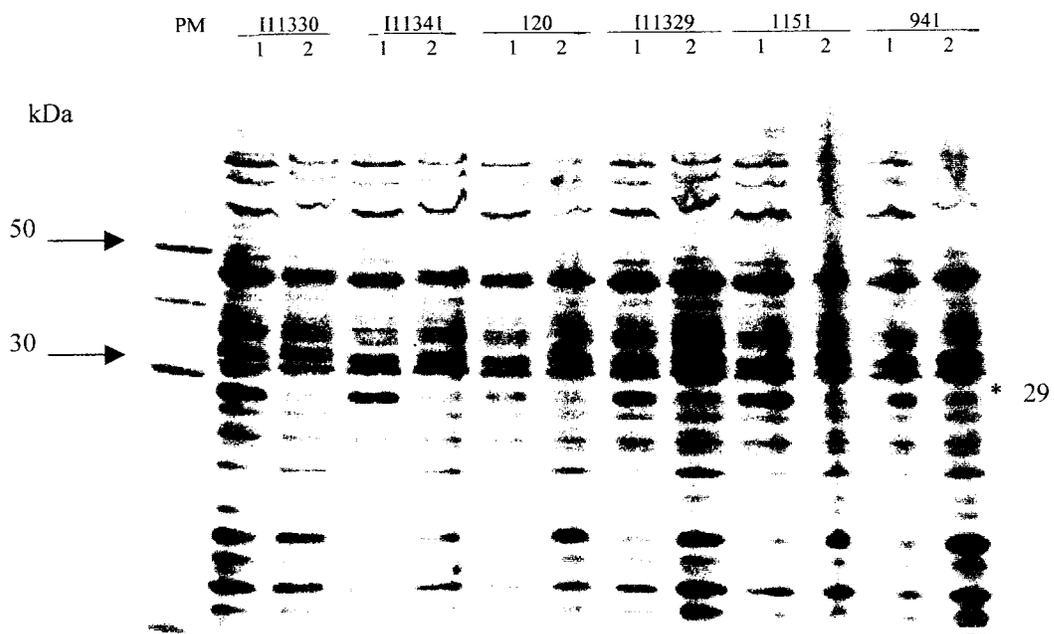


Figura 2. Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, cultivadas em meio mínimo MPI (1) e MPI acrescido de extrato de folhas de maracujazeiro (2) coradas com prata. Linhagens I11330, I11341, 120, I11329, 1151 e 941, respectivamente. PM: peso molecular de 10 kDa (Gibco-BRL). O asterisco indica proteína de 29 kDa reprimida.

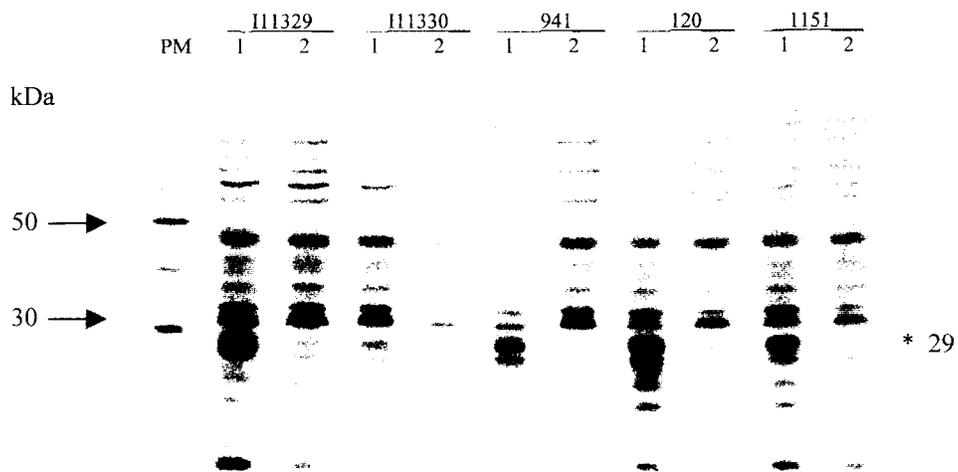


Figura 3. Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE) de diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, cultivadas em meio complexo MMI (1) e MMI acrescido de extrato folhas de maracujazeiro (2) coradas com prata. Linhagens I11329, I11330, I11341, 941, 120 e 1151, respectivamente. PM: peso molecular de 10 kDa (Gibco-BRL). O asterisco indica proteína de 29 kDa reprimida.

de indução com o extrato de plantas.

3.2. Cinética da indução de proteínas (SDS-PAGE)

Selecionada a linhagem I11330, foram efetuados experimentos de cinética para comprovar a capacidade de indução do extrato de folhas de maracujazeiro na expressão de proteínas diferenciais e para verificar o tempo de indução mais adequado. A linhagem I11330 foi primeiramente adaptada aos meios basais MPI ou MMI (100 mL) crescendo nesses meios até atingir $A_{600} = 0.5$, o que ocorreu aproximadamente após 4 dias. Esta cultura foi centrifugada e o sedimento celular foi suspenso em 300 μL de meio. Esta suspensão foi dividida em alíquotas de 100 μL e inoculadas em 30 mL dos seguintes meios de cultura: basal (MPI ou MMI), basal contendo extrato de folha de maracujazeiro (MMP) e meio basal contendo extrato de folhas de tomateiro (MMT) na concentração de 1mg/mL (p/v). Amostras de 1,5 mL foram retiradas em diferentes tempos de incubação (intervalos de 5 h com um total de 50 h) e utilizadas para preparar a extração de proteínas totais para SDS-PAGE.

O perfil de proteínas obtido com o meio MPI (Fig. 4A), apesar de não nítido com relação a várias bandas, mostra a ocorrência de alterações no perfil nos diferentes tempos de incubação. Três bandas, de 50, 52 e 14 kDa aproximadamente, mostram que pode ocorrer tanto repressão como indução de proteínas com o extrato de folhas de maracujazeiro. A banda de 52 kDa, diminuiu de intensidade a partir de 35 h enquanto as bandas de 50 e 14 kDa aumentaram de intensidade a partir de 25 e 35 h, respectivamente. A Fig. 4B, à direita, apresenta com maior clareza a repressão da banda de 29 kDa e outras duas bandas de 18 e 16 kDa, com o extrato de folhas de maracujazeiro.

A Fig. 5 mostra a cinética de proteínas no tempo de 45 h utilizando-se os meios de cultura MMI, MMT (MMI+extrato de folhas de tomateiro) e MMP (MMI+extrato de folhas de maracujazeiro). Os meios de cultura MMI e MMT apresentaram perfis de proteínas idênticos. Entretanto com o extrato de folhas de maracujazeiro, diversas bandas foram induzidas e outras reprimidas. As bandas dos seguintes pesos moleculares foram consideradas como induzidas especificamente pelo extrato: 86, 75, 44 e 23 kDa; as bandas de 32, 29 e 24 kDa foram reprimidas. Devido ao maior número de alterações causadas pelo

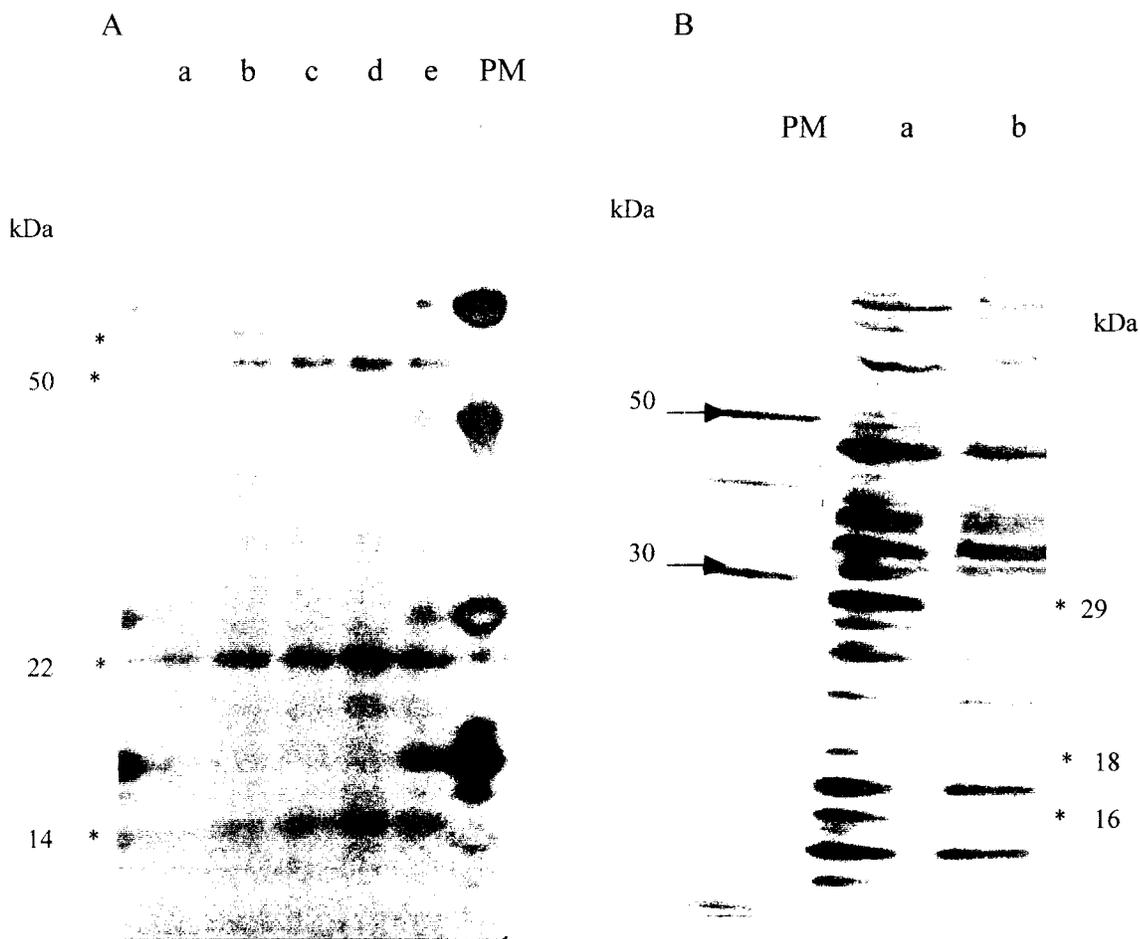


Figura 4. **A.** Cinética da indução de proteínas (SDS-PAGE) da linhagem *X. axonopodis* pv. *passiflorae* II1330 em meio MPI acrescido de extrato de folhas de maracujazeiro. **a-e:** amostras retiradas nos tempos 15, 25, 35, 45 e 50 h, respectivamente. **B.** Perfil de proteínas após 96 h de incubação nos meios de cultura MPI (**a**) e 48 h em MPI+extrato de maracujazeiro (**b**). **PM:** peso molecular de 10 kDa (Gibco-BRL). Os asteriscos indicam proteínas induzidas e reprimidas. Todos os géis apresentados foram corados com prata.

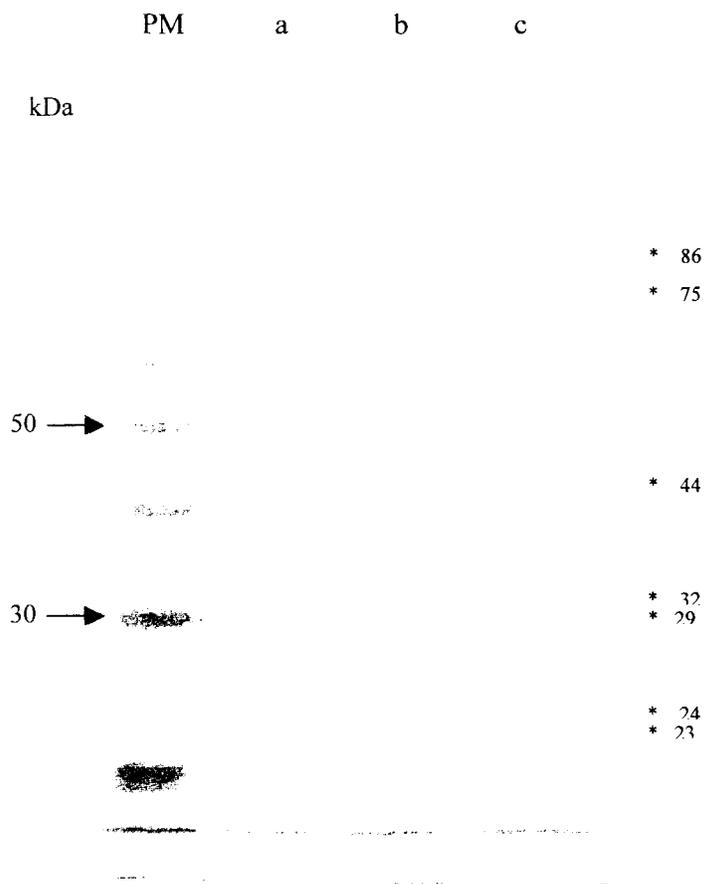


Figura 5. Perfil de proteínas após 45 h de incubação em SDS-PAGE coradas com prata mostrando maiores detalhes de bandas induzidas. **a)** MMI; **b)**MMI acrescido de extrato de folhas de maracujazeiro e **c)**MMI acrescido de extrato de folhas de tomateiro. **PM**: peso molecular de 10 kDa (Gibco-BRL). Os asteriscos indicam proteínas com intensidade alteradas (induzidas ou reprimidas).

extrato de folhas de maracujazeiro utilizando-se o meio MMI, optou-se pelo uso deste meio nos experimentos subseqüentes.

3.3. Mapas padrões de proteínas da eletroforese bidimensional de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

Com a finalidade de elaborar mapas padrões de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram selecionados dois meios de cultura distintos. Um deles, o meio complexo NYGB, foi descrito em 1984 por Daniels *et al.*, no desenvolvimento do primeiro trabalho com genética em *Xanthomonas*. O segundo meio, MMI, é um meio mínimo, portanto de composição química definida, e apesar de ser um meio de utilização mais restrita, têm sido o único analisado em *Xanthomonas* para indução de genes do tipo *hrp*, envolvidos com patogenicidade. Apesar da utilização desses dois meios de cultura atenderem propósitos distintos, eles não tem sido analisados comparativamente para verificar os efeitos correspondentes na expressão gênica. Dessa forma, a linhagem II1330 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi cultivada nesses dois meios e elaborado os respectivos mapas. O tempo de cultivo empregado para cada meio foi distinto uma vez que a taxa de crescimento é mais lenta em MMI, entretanto a padronização foi efetuada por medida de absorbância ($A_{600}=0.8$), que corresponde aproximadamente à 48 h de crescimento em meio NYGB e 96 h em MMI.

A análise geral dos perfis obtidos mostra que o peso molecular das proteínas variou de 22 a 120 kDa e a maioria delas se situou na faixa direita do gel, compreendendo os valores aproximados de pH 4.5 à 7.0. Alguns *spots* apareceram consistentemente em todos os géis e apresentaram a mesma intensidade em diferentes repetições. Alguns destes *spots*, 7 no total (de 1-7), foram considerados como marcadores internos de referência geográfica para localização e para avaliação da concentração dos demais *spots*. O mapa foi dividido em quadrantes (I a IV, Fig. 6) e os *spots* foram assinalados com os números correspondentes. Em alguns casos os números correspondem a mais de um *spot*, mas que aparecem em concentrações semelhantes nos demais tratamentos. Outros *spots*, também consistentes em todos os tratamentos, não foram assinalados. O peso molecular dos *spots* foi estimado pelo marcador de peso molecular (Gibco BRL) em cada corrida e o pI (ponto isoelétrico) foi estimado pela medida do pH em diferentes pontos dos respectivos géis.

O perfil de proteínas extraídas de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* cultivada em meio NYGB apresentou uma certa variação na intensidade dos *spots* observados, porém os marcadores internos de referência geográfica estão nitidamente presentes (Fig. 6). Um total aproximado de 250 a 350 *spots* foi visualizado em diferentes géis, o que deve corresponder de 5 a 7% do genoma de *Xanthomonas*. O genoma de *Xanthomonas* foi estimado por Reinach *et al.*, (<http://www.scisoc.org/meetings/2000/>) como apresentando de 5.2 à 5.3 x 10⁶ pb, o que corresponderia a 4700 à 4800 ORFs, assumindo que cada gene tenha aproximadamente 1100 pb. No gel da eletroforese 2D, obtido à partir da cultura da bactéria cultivada em meio complexo NYGB, pode-se observar uma maior intensidade geral das bandas, que se acentua numa área de proteínas com pI de 5 à 6 e peso molecular acima de 50 kDa em comparação ao gel MMI. Alguns destes *spots* foram assinalados na Fig. 6. Apesar da menor intensidade dos *spots* no gel MMI, diversas bandas presentes neste gel estão ausentes naquela com meio NYGB. Sete *spots* de intensidade moderada a alta estão assinaladas no gel MMI e completamente ausentes ou em baixa intensidade no gel NYGB, indicando a repressão de proteínas neste meio.

3.4. Cinética da indução de proteínas (Eletroforese 2D)

Tendo sido estabelecida a capacidade de indução do extrato de plantas pelos experimentos com eletroforese SDS-PAGE e os mapas de referência obtido com a bactéria cultivada em meio NYGB, procedeu-se a caracterização das proteínas diferenciais em géis das eletroforeses 2D, utilizando-se o meio MMI. A linhagem bacteriana I11330 foi cultivada nas mesmas condições descritas para SDS-PAGE e amostras de 1.5 mL foram retiradas em intervalos de 5 h, totalizando 50 h. Cerca de 300 µg de proteínas, quantificadas pelo método de Bradford, foram utilizadas para os géis das eletroforeses 2D. As Figs. 7-9 mostram os perfis obtidos para os tempos de 5, 25 e 45 h de incubação, que foram considerados representativos dos diferentes tempos utilizados.

Não foram detectadas alterações nos meios MMI e MMT nos diferentes tempos de incubação e ambos os mapas se apresentaram bastante similares, se não idênticos. Deste modo, todas as comparações foram feitas somente com MMI e MMP.

O tempo zero foi considerado idêntico para todos os tratamentos equivalendo ao tratamento MMI (Fig. 6). Foram efetuadas 2-3 repetições dos principais tratamentos de 5,

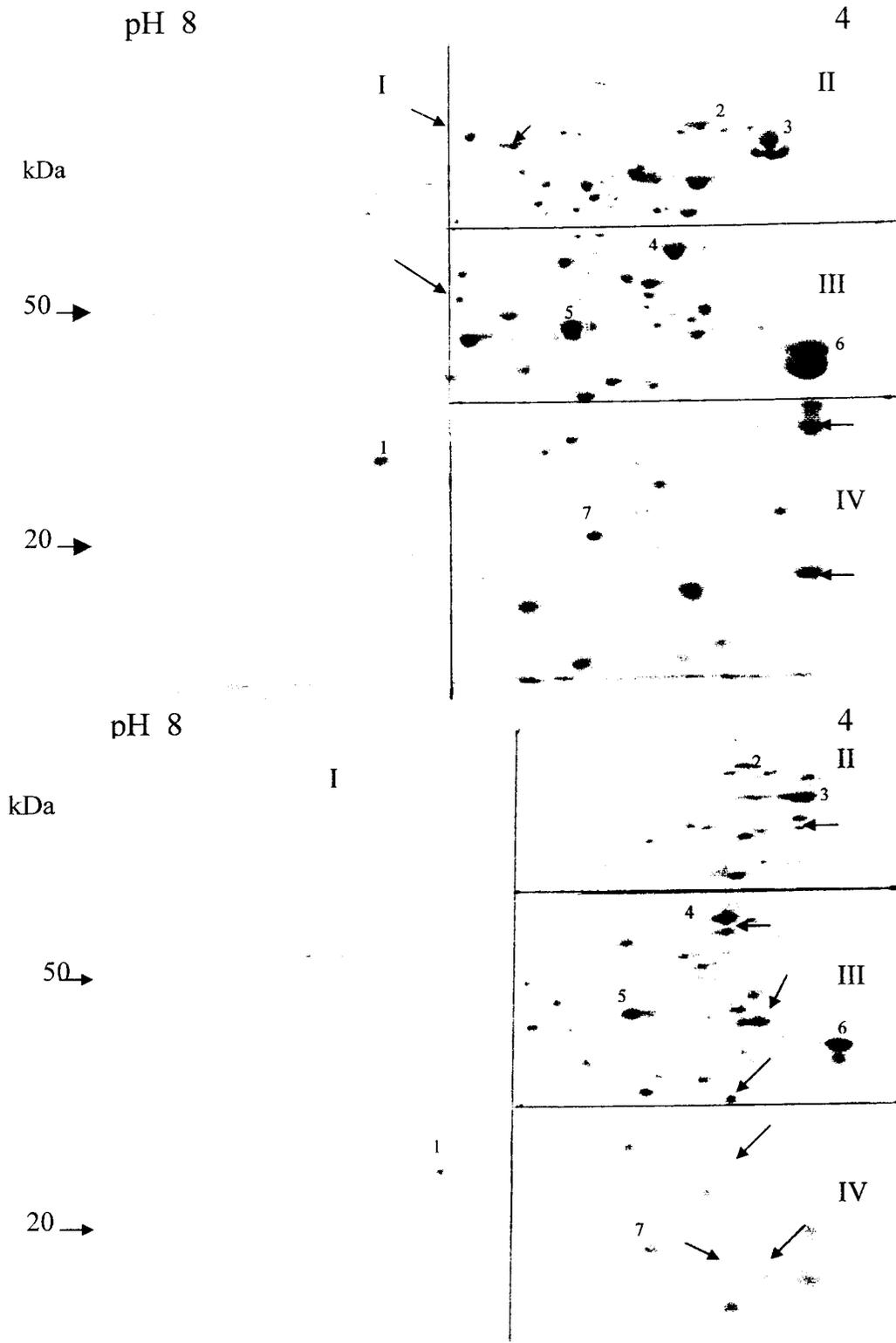


Figura 6. Mapa da eletroforese 2D de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em meio NYGB (acima) corado com Comassie Blue e MMI (abaixo) no tempo 0 corado com prata. Os números se referem aos spots de maior intensidade e que serviram de marcadores moleculares internos. As setas indicam proteínas com intensidades alteradas (indução ou repressão)

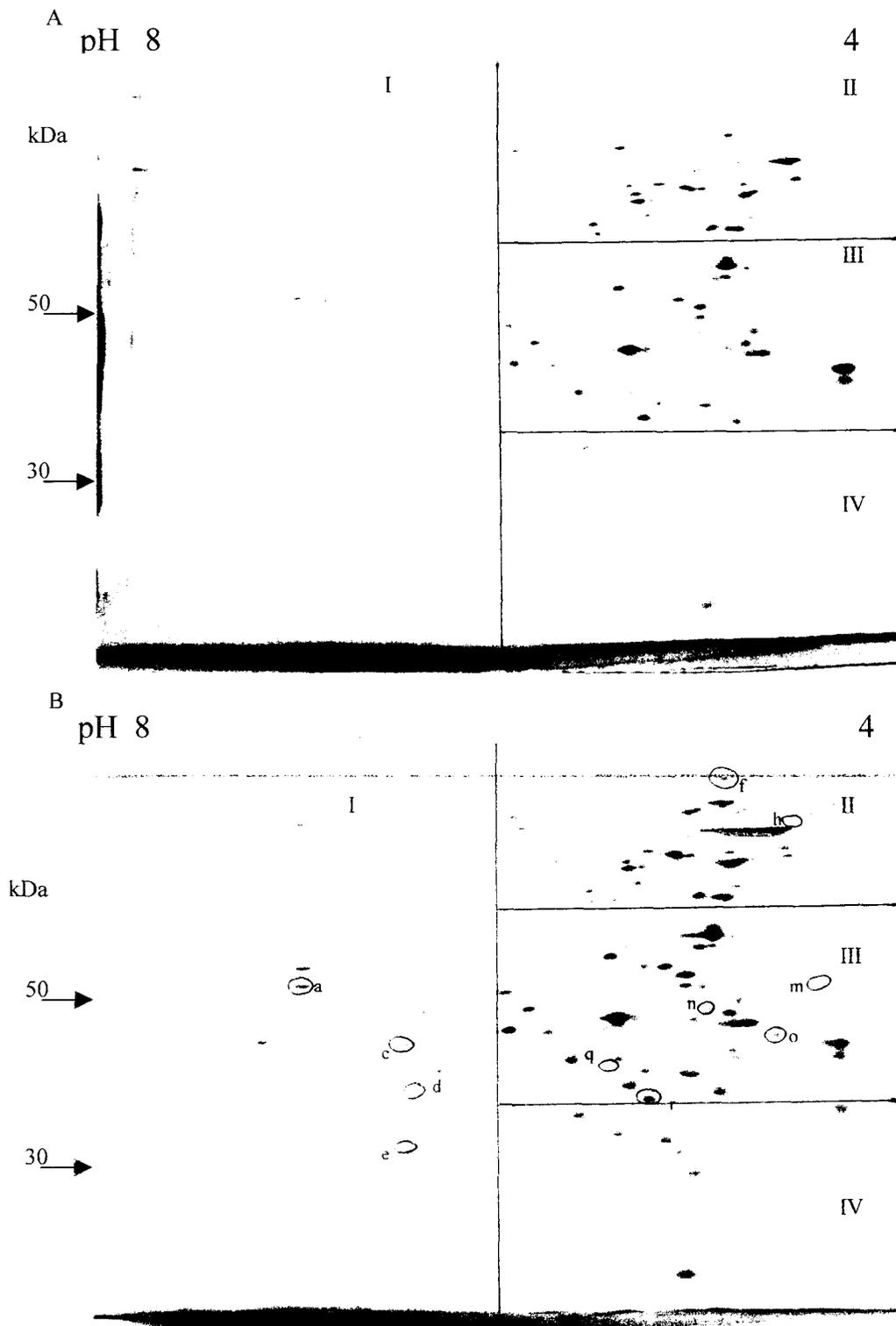


Figura 7. Perfil de proteínas da eletroforese 2D de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* após 5 h de incubação em meio MMI (A) e MMP (B) corados com prata. a – r : spots com alteração na intensidade (indução ou repressão).

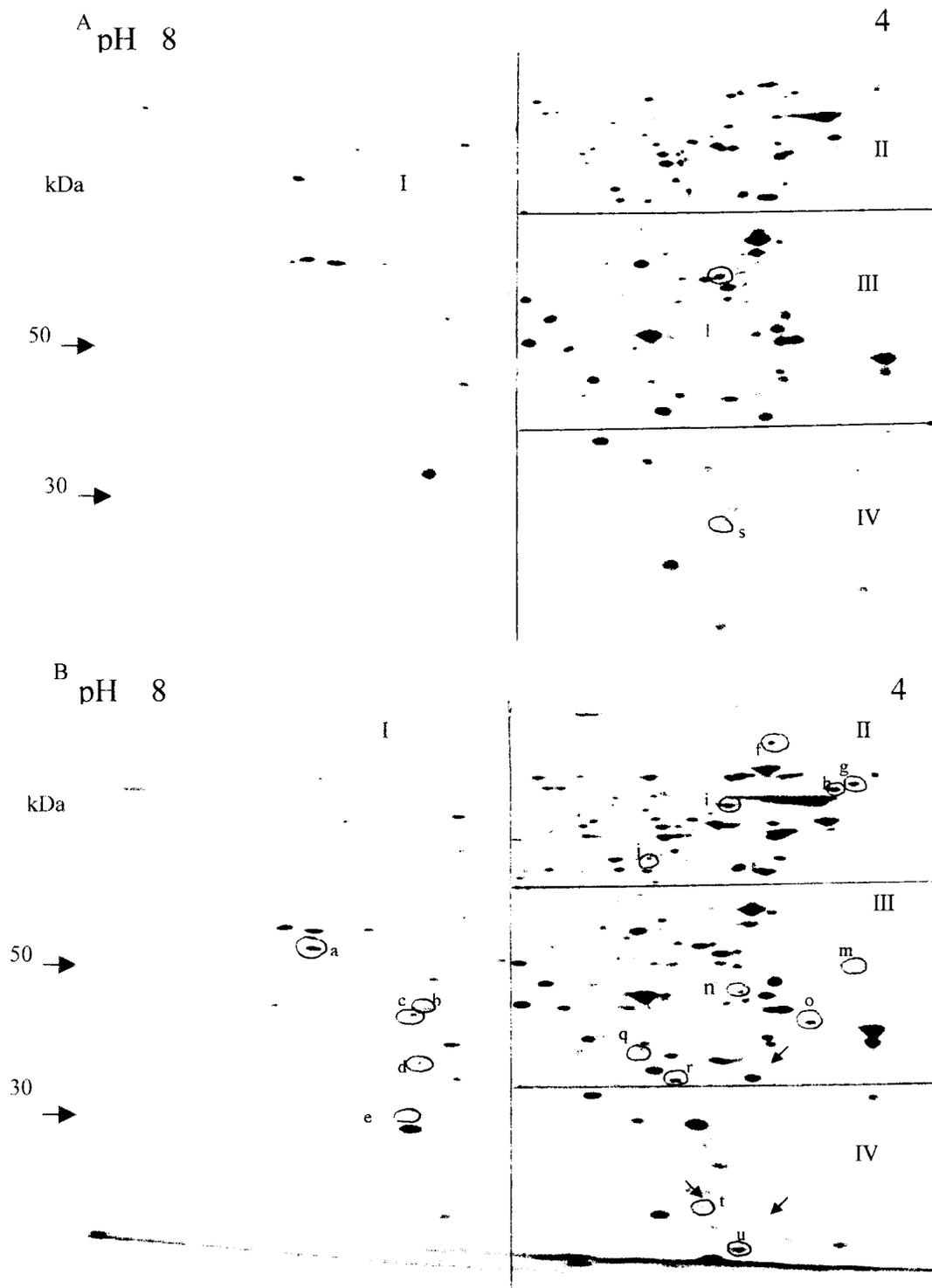


Figura 8. Perfil de proteínas da eletroforese 2D de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* após 25 h de incubação em meio MMI (A) e MMP (B) coradas com prata. As setas dentro do gel B indicam as proteínas que foram sequenciadas na extremidade N-terminal. a – u: spots com alterações nas intensidades decorrentes do tratamento MMP.

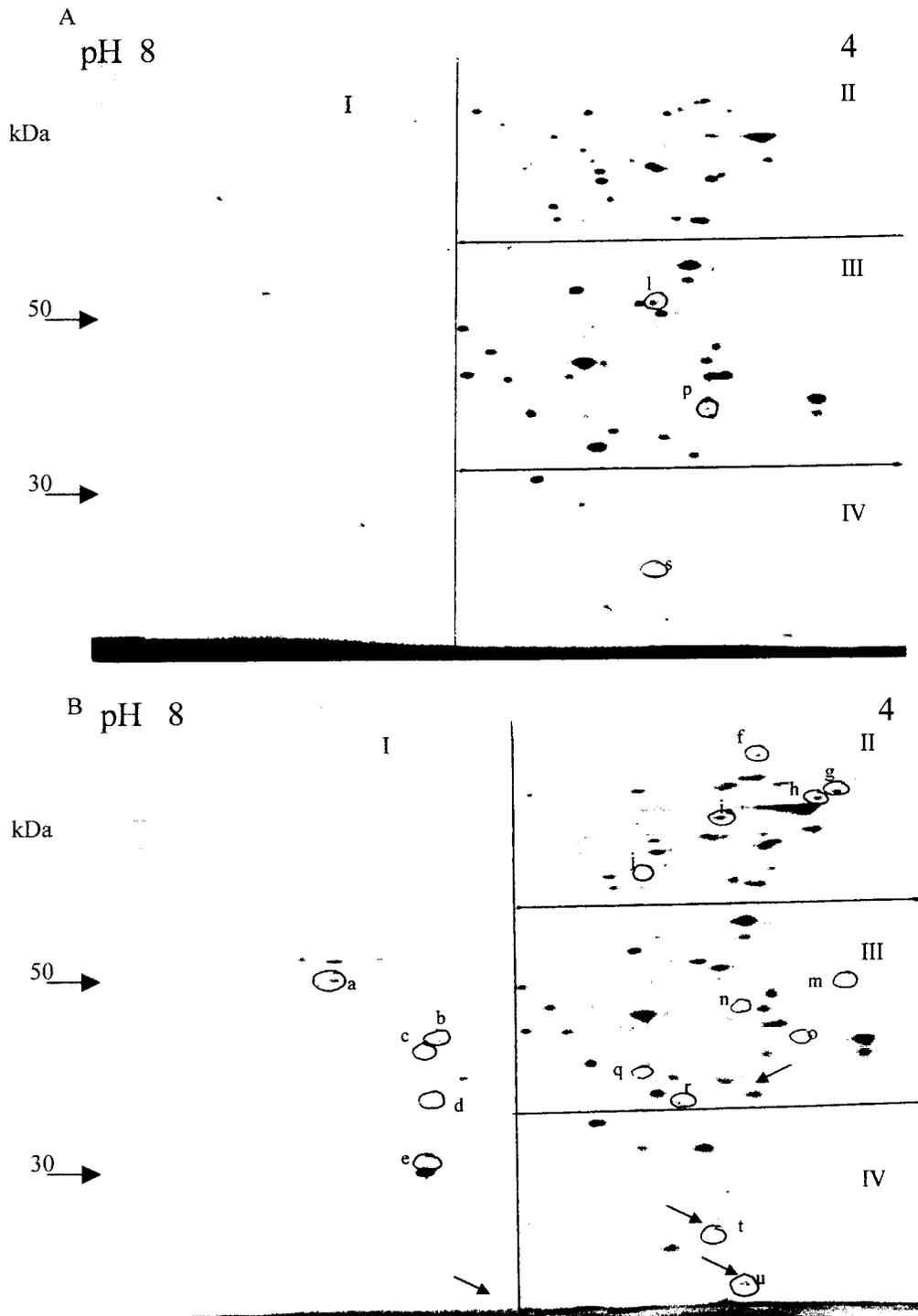


Figura 9. Perfil de proteínas da eletroforese 2D de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* após 45 h de incubação em meio MMI (A) e MMP (B) coradas com prata. As setas dentro do gel indicam proteínas que foram sequenciadas na extremidade N-terminal. a – u: spots com intensidades alteradas (indução e repressão) decorrentes do tratamento MMP.

25 e 45 h e observou-se uma grande repetibilidade dos *spots* apresentados. O maior problema foi apresentado na concentração de proteínas, o que dificultou em alguns casos a confirmação da alteração e/ou indução de novas proteínas.

Na comparação dos tratamentos (MMI e MMP) foram observadas alterações discretas de intensidade dos *spots* nos diferentes tempos. Foi detectado, um aumento das alterações dos *spots* que acompanharam o aumento do tempo de incubação (Figs. 7, 8 e 9).

No tempo de 5 horas foram observados 5 *spots* com alteração de intensidade (*a, c, d, n* e *r*) e 6 novos *spots* (*e, f, h, m, o, e q*) no tratamento MMP em comparação ao MMI. Três destas novas proteínas (*h, m e o*) apresentaram pI de 4.5 com os pesos de 108, 52 e 43 kDa, respectivamente. As outras duas, denominadas *f* e *q*, apresentaram pI =5,0 e de 120 kDa e pI=5.5 e 37 kDa, respectivamente. Nas Figs. 7, 8, e 9 pode-se verificar que estes novos *spots* também estão presentes no MMP nos outros tempos sem alterações significativas na intensidade, com exceção do *spot h* que parece aumentar nos tempos de 25 e 45 horas. Os *spots a, c, d, n, e r* apresentaram aumento em suas intensidades. Estas proteínas também estão presentes no tratamento MMP dos tempos 25 e 45 horas (Figs. 7, 8 e 9).

Após 25 h de incubação (Fig. 8) as diferenças entre os tratamentos se tornaram mais acentuadas. As mesmas proteínas detectadas no tempo 5 h foram observadas no meio MMP neste tempo, além de outras 6 proteínas (*spot b, g, i, l, s, t*) com alterações na intensidade e observadas somente neste tratamento. Destas seis proteínas, 2 apresentaram diminuição (*l e s*) e as outras 4 (*b, g, i, e t*) apresentaram aumento da intensidade no meio MMP em comparação ao MMI.

Ainda neste tempo foram observadas o aparecimento de 2 novas proteínas (*j e u*) presentes somente no MMP.

A incubação de 45 horas (Fig. 9) foi o tempo em que todas as alterações ocorridas nos tempos de 5 e 25h puderam ser observadas concomitantemente. Além das proteínas visualizadas nos tempos anteriores, foi observado outra proteína com intensidade diminuída somente a partir deste tempo (*spot p*) indicando repressão desta proteína em presença do extrato de folhas de maracujazeiro.

As alterações observadas nos diferentes tempos de tratamento e assinaladas nas Figs. 6-9, são apresentadas na Tab. 1.

O tempo de 45 h representou a somatória das alterações ocorridas em decorrência dos

Tabela 1: Alterações no padrão de proteínas 2D de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* I11330 após diferentes tempos de incubação nos meios MMI e MMP.

| Quadrante | 5 horas | | | | 25 horas | | | | 45 horas | | | | | | | | |
|-----------|-------------------|------|-----|-----|-------------------|------|-----|-----|-------------------|------|-----|-----|-------------------|------|-----|-----|-----|
| | Tipo de alteração | spot | PM | pI | Tipo de alteração | spot | PM | pI | Tipo de alteração | spot | PM | pI | Tipo de alteração | spot | PM | pI | |
| I | + | a | 50 | 7.0 | |
| | + | c | 43 | 6.5 | + | b | 44 | 6.5 | + | b | 44 | 6.5 | + | b | 44 | 6.5 | |
| | + | d | 35 | 6.5 | + | c | 43 | 6.5 | + | c | 43 | 6.5 | + | c | 43 | 6.5 | |
| | * | e | 30 | 6.5 | * | d | 35 | 6.5 | + | d | 35 | 6.5 | + | d | 35 | 6.5 | |
| | * | f | 120 | 5.0 | * | e | 30 | 6.5 | + | e | 30 | 6.5 | * | e | 30 | 6.5 | |
| II | * | g | 112 | 4.5 | + | f | 120 | 5.0 | * | f | 120 | 5.0 | * | f | 120 | 5.0 | |
| | * | h | 108 | 4.5 | * | g | 112 | 4.5 | + | g | 112 | 4.5 | + | g | 112 | 4.5 | |
| | * | i | 105 | 5.5 | + | h | 108 | 4.5 | + | h | 108 | 4.5 | + | h | 108 | 4.5 | |
| | * | j | 74 | 5.5 | * | i | 105 | 5.5 | + | i | 105 | 5.5 | + | i | 105 | 5.5 | |
| | * | k | 56 | 5.5 | * | j | 74 | 5.5 | + | j | 74 | 5.5 | * | j | 74 | 5.5 | |
| III | * | m | 52 | 4.5 | - | k | 56 | 5.5 | - | k | 56 | 5.5 | - | l | 56 | 5.5 | |
| | + | n | 48 | 5.0 | * | l | 52 | 4.5 | * | l | 52 | 4.5 | * | m | 52 | 4.5 | |
| | * | o | 43 | 4.5 | + | m | 48 | 5.0 | + | m | 48 | 5.0 | + | n | 48 | 5.0 | |
| | * | q | 37 | 5.5 | * | n | 43 | 4.5 | + | n | 43 | 4.5 | * | o | 43 | 4.5 | |
| | + | r | 35 | 5.0 | * | o | 43 | 4.5 | + | o | 43 | 4.5 | - | p | 40 | 5.0 | |
| IV | * | q | 37 | 5.5 | |
| | + | r | 35 | 5.0 | |
| | - | s | 28 | 5.0 | - | s | 28 | 5.0 | 5.0 | - | s | 28 | 5.0 | - | s | 28 | 5.0 |
| | + | t | 26 | 5.0 | + | t | 26 | 5.0 | 5.0 | + | t | 26 | 5.0 | + | t | 26 | 5.0 |
| | * | u | 22 | 5.0 | * | u | 22 | 5.0 | 5.0 | * | u | 22 | 5.0 | * | u | 22 | 5.0 |

+ : aumento na intensidade do spot
 - : diminuição na intensidade do spot
 * : novo spot

diferentes tratamentos e dessa forma, esse tempo de tratamento foi escolhido para proceder a seleção das proteínas para o seqüenciamento N-terminal. Foram retiradas amostras de 45 h para dois géis preparativos e posterior transferência para membranas de PVDF. O seqüenciamento N-terminal foi realizado na NAPS Unit, Sequencing Services Laboratories, da Universidade Brititish Columbia, Canadá. Durante o processo de transferência ocorreram perdas na concentração do material e portanto foram selecionados apenas *spots* de concentrações maiores. Foram selecionados aqueles especificamente induzidos e que se apresentaram em concentrações julgadas razoáveis para se proceder ao microsseqüenciamento N-terminal. Uma forma prática sugerida pelo laboratório NAPS para confirmar se a concentração de proteína seria suficiente, foi produzir uma cópia xerox da membrana PVDF, corada com Coomassie Blue, e caso houvesse nitidez do *spot* na cópia, a concentração seria julgada adequada. Foram selecionados 4 *spots* (XP1 a XP4), com diferentes pesos moleculares e pIs (Tab. 2). XP2 e XP3 foram também denominados de *spot t* e *u*. Todos os *spots*, com exceção do XP4, parecem ser induzidos em meio contendo extrato de folhas de maracujazeiro. O XP4 parece ser uma proteína expressa constitutivamente.

3.5. Seqüenciamento N-terminal

Dos 4 *spots*, XP1, XP2, XP3 e XP4 (Figs. 8 e 9), submetidos ao seqüenciamento N-terminal (anexo 1), apenas três tiveram seqüências determinadas uma vez que uma delas (XP1) apresentou bloqueio da extremidade N-terminal.

Foram definidos 11 resíduos de aminoácidos dos três *spots* seqüenciados (Tab. 2). Estas seqüências foram analisadas em banco de dados através dos programas BlastP (Altschul *et al.*, 1990) e Fasta3 (Pearson & Lipman, 1988) e foram obtidas seqüências similares a diversas proteínas de diferentes organismos (procariotos e eucariotos). Entretanto, não foram detectadas proteínas com similaridade suficientemente consistente na região N-terminal. Algumas seqüências foram identificadas próximas da região amino-terminal de diferentes proteínas e as seqüências que apresentaram os maiores índices de similaridades em regiões próximas à região N-terminal são apresentadas na Tab. 2, à título de ilustração. Uma vez que as similaridades não são consistentes com relação à seqüência

Tabela 2. Seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal dos *spots* XP e as respectivas similaridades encontradas no banco de dados.

| <i>spot</i> | kDa | pI | Seqüência N-terminal | Características das proteínas com maior similaridade | Similaridade | No de acesso |
|-------------|-----|-----|--|---|----------------------|--------------------------------|
| XP1 | 20 | 6,0 | Bloqueada | Bloqueada | | ND |
| XP2 | 22 | 5,0 | GLEVTSGKNL 12 GLKNVTSGANP 10 GLELLTSG 01 GIELITS | Choque térmico (<i>Staphylococcus</i>) A 1,2-fucosil-transferase (Humano) Classe II Beta1 de MHC | 8/10 8/8 7/7 | 034818 O75029 09XRJ9 |
| XP3 | 26 | 5,0 | D/G GSTAVGANTQ 05 DAATAAGASAQ 14 DGKTAVGGDGQ 35 LGSTAIGVGTK | Choque térmico (<i>Raphanus sativus</i>) Choque térmico (<i>Aquifex aeolicus</i>) Subunidade α , proteosoma (<i>A. thaliana</i>) | 8/11 8/11 8/10 | 9ZNW5 O67587 P52427 |
| XP4 | 35 | 5,0 | Q/A/S/GIEQLAETAQA 05 SVEDLAETS 04 IEQLNESVQ 01 GVDQLAET | Zinc finger (Humano) Glicoproteína de envelope (Retrovirus) Proteína Nore (<i>A. faecalis</i>) | 8/9 7/9 8/10 | Q9UC18 AF188685 BAA90779 |

Os números à frente da seqüência de aminoácidos indicam a posição do 1° resíduo na respectiva seqüência.

N-terminal e cada *spot* pode corresponder à proteínas de diferentes categorias funcionais, essas similaridades não serão discutidas. Adicionalmente, o peso molecular deduzido não corresponde àqueles obtidos para as proteínas XP. Foram também utilizadas apenas as informações de peso molecular e pI em pesquisa em banco de dados, entretanto, devido ao grande número de proteínas (na ordem de centenas) com características similares, foi praticamente impossível a dedução. Uma pesquisa foi realizada também no banco de dados PROSITE (Bairoch, 1993) na procura por domínios e foi detectado um sítio de fosforilação, (SG)-X-(KN), da proteína quinase C em XP2. Como este sítio é usualmente encontrado na extremidade C-terminal e esta proteína ainda não foi descrita em bactéria esta função não deve estar presente em XP2. Com a proteína XP3 foi verificada a possibilidade de uma modificação pela adição de miristato (um ácido saturado C14) em sua via N-terminal na ligação amida. O modelo consenso para o sítio de N-miristilação, G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAAGCN]-{P}, onde G é o sítio de miristilação, foi detectado na posição 2-7 na seqüência de XP3 (GGCTAV). A seqüência de XP4 não revelou nenhuma similaridade significativa para a região amino-terminal e/ou peso molecular com outras proteínas.

Aliando-se as três características simultaneamente, seqüência N-terminal, peso molecular e pI, foi utilizado também o programa TagIdent (Wilkins *et al.*, 1998) para procura das proteínas correspondentes. Entretanto não foi possível identificar as proteínas, devido principalmente à falta de identidade na seqüência N-terminal.

Os resultados obtidos com o mapa das eletroforeses 2D indicam que a detecção de proteínas diferenciais pode ser observada com relativa facilidade. Cerca de oito novas proteínas foram induzidas e mantidas nos diferentes tempos de tratamentos utilizados no presente trabalho. Esse número é superior aos quatro *spots* induzidos por ácido benzóico observados por Guerreiro *et al.* (1997) em *Rhizobium leguminosarum*, entretanto inferior às 18 proteínas dependentes de pH detectadas em *E. coli* (Blankenhorn *et al.*, 1999). O método permite também que outras proteínas reprimidas ou que apresentem alterações no nível de expressão possam ser detectadas. Entretanto existem problemas na identificação dessas proteínas. Mesmo considerando-se organismos com o genoma já conhecido, a identificação total das proteínas ainda é parcial. Em *E. coli* por exemplo, dentre as 18 proteínas mencionadas anteriormente apenas 9 foram identificadas por seqüenciamento N-terminal. Resultados como esses indicam que a técnica do proteoma pode revelar genes que de outra

forma não poderiam ser analisados. As limitações na identificação de proteínas através de eletroforese 2D com o genoma podem ser atribuídas a fatores diversos entre os quais a própria falta de homologia de ORFs putativas de genes seqüenciados com bancos de dados. Em *E. coli* por exemplo, de 4289 genes capazes de codificar proteínas, 1724 não foram enquadrados em grupos ortólogos ou são de função desconhecida (www.ncbi.nlm.nih/). Em outras bactérias com genomas seqüenciados, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus subtilis*, aproximadamente 16% das funções são desconhecidas ou apenas preditas de forma geral.

Apesar de alguns genes envolvidos com patogenicidade já serem conhecidos em bactérias fitopatogênicas, o mapa de eletroforeses 2D obtido no presente trabalho exclui a observação de proteínas relacionadas. O emprego de um meio de cultura basal que induz a expressão dos genes *hrp*, que são os mais conhecidos no gênero, impede a detecção dessas proteínas. Os genes de avirulência (*avr*), constituem uma segunda classe de genes envolvidos com patogenicidade e dentre os 30 genes *avr* conhecidos em diferentes bactérias fitopatogênicas (para uma revisão, ver Leach & White, 1996), apenas o produto do gene *avrD* foi identificado. Os genes *avr* estão entretanto na dependência de genes *hrp* funcionais e portanto também não devem ser detectados nos mapas obtidos. Dessa forma, os resultados obtidos são indicativos que novas proteínas envolvidas na interação bactéria-planta foram detectadas. Espera-se que com a publicação dos dados de seqüenciamento do genoma de *X. axonopodis* pv. *citri*, os genes correspondentes possam ser identificados e um papel funcional possa ser atribuído a essas proteínas. A aplicação dessa técnica será portanto mais útil quando todo o genoma do organismo for conhecido, com as limitações já mencionadas anteriormente.

4. Considerações finais

Alguns pontos relacionados com a caracterização de proteínas utilizando-se mapas de eletroforeses 2D também podem ser mencionados. O primeiro deles é que o mapa obtido no presente trabalho revelou apenas uma pequena porcentagem do proteoma total. Foram visualizados no máximo 350 *spots*, o que representa apenas 7% da capacidade de expressão global estimada. A capacidade de visualizar proteínas globais é limitada pela resolução da própria técnica e procedimentos de coloração, pela presença de proteínas em baixa concentração e a pequena variação de peso molecular e pI para a detecção de todas as proteínas presentes no lisado celular. Alguns desses problemas poderiam ser resolvidos por análise de *contigs*, onde diferentes géis são agrupados para cobrir uma amplitude maior de peso molecular e pI (Cordwell *et al.* 1997). O problema da baixa concentração de proteínas teria como solução mais direta o aumento da concentração de proteína total a ser carregada no gel. Entretanto esse procedimento leva à obtenção de um mapa com *spots* extremamente intensos para as proteínas que são produzidas em alta concentração impossibilitando a individualização de proteínas. Com relação à capacidade de visualização de proteínas é também preciso ser mencionado que o método de extração utilizado não é apropriado para extração de proteínas hidrofóbicas, como por exemplo, as proteínas de membrana, que podem portanto ser excluídas do mapa. Um segundo ponto é que apesar dos mapas de eletroforeses 2D serem altamente discriminativos quanto às proteínas, pode ocorrer a comigração de duas bandas durante a eletroforese. Nesse caso, o seqüenciamento N-terminal pode revelar uma seqüência dúbia e portanto incompatível com a base de dados. O terceiro ponto foi a ausência de metionina como aminoácido inicial nas três proteínas. Além de metionina como aminoácido inicial na maioria das proteínas, serina e alanina também têm sido detectados em procariotos. Em *Clostridium pasteurianum* foi estimado que 1/3 das proteínas são processadas na região N-terminal (Flengsrud & Skjeldal, 1998). Finalmente, uma última consideração a ser feita é com relação à semelhança entre os perfis obtidos com o MMI e MMT, ou seja, aparentemente o extrato de folhas de tomateiro não foi capaz de induzir alterações visíveis no mapa de eletroforeses 2D apesar dele ter sido utilizado na mesma concentração do extrato de folhas de maracujazeiro. Entretanto, não é possível afirmar que essa mesma semelhança seria detectada com extratos de outras plantas

incompatíveis, desde que a composição dos extratos pode variar consideravelmente. Mais ainda, a formulação do meio MMI foi determinada como sendo um meio artificial substitutivo ao meio com extrato de folhas de tomateiro (Schulte & Bonas, 1992), o que explica a semelhança entre os padrões obtidos nos dois meios.

Parte 2

**Expressão diferencial de mRNAs de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* na
interação com extratos de folhas da planta hospedeira**

Expressão diferencial de mRNAs de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* na interação com extratos de folhas da planta hospedeira

Resumo

O display diferencial (DD) foi utilizado em *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, patógeno de maracujazeiro, com a finalidade de detectar mRNAs diferencialmente expressos. Amostras de culturas da linhagem I11330, incubadas até 45 horas, em meio mínimo basal (Schulte & Bonas, 1992), em meio de indução contendo extrato de folhas de maracujazeiro (MMP) e em meio contendo extrato de folhas de planta incompatível (tomate) (MMT) foram utilizadas para extração de RNA total e síntese de cDNA com 6 diferentes *primers* randômicos. Os cDNAs foram amplificados com os *primers* correspondentes (RAP), marcados com ^{32}P , e diferenças decorrentes dos diferentes tratamentos foram visualizadas após eletroforese em gel de poliacrilamida. Onze bandas diferenciais, 9 induzidas com extrato de folhas de maracujazeiro e 2 reprimidas, foram analisadas quanto à similaridade em banco de dados. Três clones (P21, Q42 e R65) não apresentaram similaridade consistente com nenhuma categoria funcional e os demais revelaram similaridades com diferentes proteínas. Q51 e Q52 apresentaram similaridade com uma das proteínas de mobilização plasmidial e a proteína quinase/ou mucina, respectivamente. Três clones (Q75, R63 e R64) foram relacionados com hidrolases de atividade carboxi-terminal e três clones (P13, Q43 e Q723) estão envolvidos com proteínas de membrana. Todos os clones, exceto Q42 e R63, foram confirmados como sendo expressos diferencialmente através de hibridização diferencial e/ou RT-PCR com *primers* específicos. Os resultados obtidos mostraram que o display diferencial utilizando o RAP-PCR mostrou-se eficiente na detecção de novos genes induzidos por extrato de planta. Os maiores problemas encontrados foram relacionados com a determinação da função das seqüências devido aos poucos genes relacionados com fitopatogenicidade depositados em banco de dados.

Abstract

The differential display technique was used in the phytopathogenic *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* to detect mRNAs specifically-induced in a medium containing leaf extracts of the compatible host (passion fruit plant). The bacterium was grown in a basal minimum media (MMI), in a medium containing extract of the compatible and incompatible (tomato) host (MMP and MMT, respectively). RNA were prepared from the treatments and six randomic *primers* were used individually to synthesize cDNAs. Eleven differential fragments, 9 induced by the compatible extract and 2 repressed, were cloned and sequenced. Similarity search in the database, using the deduced amino acid sequence, showed that most of the cloned fragments shared similarities with different classes of proteins. Three clones (P21, Q42, R65) showed no consistent similarities in the database and the others were related to different classes of proteins. Two clones, Q51 and Q52, shared similarities with the bacterial Rep protein and with a human protein kinase/mucin, respectively. Three clones (Q725, R63 e R64) were related to carboxipeptidases and three others (P13, Q43, Q723) shared similarities with membrane proteins. All clones, except Q42 and R63, were confirmed as differentially-expressed by hybridization and/or RT-PCR. The results obtained show that the differential display using RAP-PCR is able to reveal novel genes induced by plant extracts. Major problems were related with the precise functional assignment of the sequences due to the few phytopathogenicity-related genes sequences deposited in the database.

1. Introdução

Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* é uma bactéria Gram-negativa causadora da bacteriose ou mancha oleosa (Pereira, 1969). Essa doença tem se tornado um fator limitante para a expansão da cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*) em diversas regiões do Brasil devido a forma severa que ocorre sob condições de clima quente e úmido (Kuroda, 1981; Teixeira, 1994). A infecção ocorre através de estômatos ou pequenas lesões na planta (Pereira, 1969).

Até o momento, nenhum gene relacionado com patogenicidade foi estudado nesta bactéria. Os mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno são complexos e ainda pouco entendidos. Contudo, nos últimos anos, vários genes envolvidos com patogenicidade foram analisados de várias espécies de *Xanthomonas*. A resposta da planta ao patógeno é manifestada através de duas reações básicas: a de patogenicidade ou de hipersensibilidade. Na reação de patogenicidade a bactéria, após a invasão, se multiplica rapidamente nos tecidos da planta compatível levando à manifestações dos sintomas da doença após 5-7 dias. Numa planta resistente ou incompatível, o patógeno permanece limitado ao ponto de inoculação ou de entrada e desenvolve uma resposta rápida de hipersensibilidade num período de 12 a 24 horas. Há uma necrose rápida numa área restrita, e que não desencadeia o desenvolvimento dos sintomas na planta. Essas duas reações são controladas pelos genes *hrp* (Hipersensibilidade e Resposta de Patogenicidade) caracterizados em várias espécies de bactérias fitopatogênicas Gram-negativas (para uma revisão, ver Lindgren, 1997). Esses genes tem sido detectados em diversas bactérias fitopatogênicas incluindo algumas espécies do gênero *Xanthomonas*. Em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, um dos representantes do gênero mais estudados, foi identificado um cluster de cerca de 23 kb, correspondendo a seis genes, de *hrpA* a *hrpF* (Bonas *et al.*, 1991). Dois elementos regulatórios localizados fora do cluster, *hrpX* e *hrpG*, foram também descritos (Wengelnik & Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996). Tem sido proposto que os genes *hrp* codificam proteínas do sistema de secreção envolvidas com fatores de patogenicidade e elicitores (Van den Ackerveken *et al.*, 1996). Os genes *hrp* ativos são necessários para a expressão de um segundo grupo de determinantes de patogenicidade, as proteínas Avr, codificadas pelos genes *avr* (Dangl,

1994; Leach & White, 1996). Vários genes *avr* já foram identificados em *Xanthomonas* (Bonas *et al.*, 1989, Kearney & Staskawicz, 1990; Minsavage *et al.*, 1990) e esses genes exercem um papel importante restringindo os hospedeiros (Dangl, 1994), em alguns casos na virulência (Swarup *et al.*, 1991, 1992) ou na adaptação do patógeno ao hospedeiro (Kearney & Staskawicz, 1990). A análise funcional desses genes está sob investigação intensiva e recentemente novos genes regulatórios (*hrpH*, J, K, V, X e Y) foram descritos (He, 1998).

Além dos genes *hrp* e *avr*, outros fatores como produção de exopolissacarídeos e enzimas extracelulares são relacionados com a patogenicidade de *X. campestris*. Esses fatores são regulados por um *cluster*, de cerca de 22 Kb, designado *rpf* (Tang *et al.*, 1991). Alguns desses genes foram caracterizados e apresentaram similaridades com diferentes produtos, como por exemplo, aconitase (Wilson *et al.*, 1998), síntese de pequenas moléculas difusíveis (Barber *et al.*, 1997) ou elementos de um sistema de transdução de sinal (Slater, 1999), entre outros. Recentemente, outros genes envolvidos com recombinação, fatores de alongação de transcrição e ORFs foram identificadas também no *cluster rpf* (Dow *et al.*, 2000). Apesar de alguns desses fatores serem reconhecidamente importantes para o desenvolvimento de sintomas na planta, muitos deles permanecem ainda sem um papel definido no mecanismo de patogenicidade. Desconhecem-se também as alterações especificamente induzidas na interação com o hospedeiro e as respostas do patógeno no microambiente da planta, exceto por alguns genes *hrp* que são especificamente induzidos nessa interação.

Devido ao pouco conhecimento sobre a interação de bactérias fitopatogênicas com o seu hospedeiro, o presente trabalho utilizou como modelo a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* com o objetivo geral de identificar genes especificamente induzidos na presença de extrato de folhas de planta hospedeira. Para sua execução foi utilizado a técnica de *differential display* através do uso de RAP-PCR (RNA Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction). O *differential display* foi usado com sucesso na área médica e vegetal (Liang & Pardee, 1992; Goormachtig *et al.*, 1995) e a sua modificação para procariotos, que não apresentam cauda de poliA no mRNA, é conhecida como RAP-PCR (Wong & McClelland, 1994).

Deste modo, as seguintes etapas foram investigadas no presente trabalho:

- Avaliação do extrato de folhas como agente indutor de genes especificamente envolvidos na interação de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* com a planta hospedeira;
- Identificação de mRNAs expressos diferencialmente em *X. axonopodis* pv. *passiflorae* cultivada na presença e ausência de extratos de folhas de *Passiflora edulis*, através de RAP-PCR;
- Clonagem e seqüenciamento das bandas isoladas por RAP-PCR;
- Confirmação da expressão diferencial por RT-PCR (Reverse Transcription - PCR).

2. Material e Métodos

2.1. Linhagens bacterianas e meios de cultivo

Foi utilizada a linhagem *X. axonopodis* pv. *passiflorae* I11330 isolada de *Passiflora edulis* proveniente da Coleção do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR), previamente caracterizada por Gonçalves & Rosato (2000).

A linhagem de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi rotineiramente cultivada e mantida em meio NYGB (Daniels *et al.*, 1984) com ou sem adição de ágar, à 30°C.

Foram utilizados os seguintes meios mínimos nos experimentos de indução:

- MPI (Sow & Demain, 1979), contendo (por L): KH₂PO₄ 5,0 g; MgSO₄ 0,2 g; NH₄SO₄; H₃BO₃ 6 mg; ZnCl₂ 6 mg; FeCl₃ 2 mg; Sacarose 20,0 g; pH 7,0
- MMI (Schulte & Bonas, 1992) contendo (por L): NaCl 1,2 g; NH₄SO₄ 1,3 g; MgSO₄ 1,2 g; CaCl₂ 0,11 g; KH₂PO₄ 0,2 g; K₂HPO₄ 0,06 g; Sacarose 3,4 g e Extrato de levedura 1 g, pH 7,0.

Foram também utilizadas linhagens de *E. coli* (DH5 α , Stratagene) para transformação e os plasmídios pKS+ (Stratagene) e pGEM (Promega) para clonagem e seqüenciamento. A linhagem *E. coli* foi cultivada em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989), à 37°C.

2.2. Preparação do extrato de plantas

Foram utilizados extratos de diferentes plantas incorporados ao meio de cultura para verificar a indução de produtos específicos. Como planta compatível foram utilizadas folhas do hospedeiro natural (*P. edulis*) e como planta incompatível, folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Petomech VF 162, procedente da Petoseed Co.

O extrato de plantas foi preparado a partir de folhas sem a nervura central. As folhas foram picadas e misturadas com meio de cultura MMI (proporção de 1g : 100 mL de meio), mantidas em gelo e levadas ao triturador (Politron, Superohm) durante 5 minutos. O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm/20 minutos, recuperado o sobrenadante e novamente centrifugado a 11.000 rpm/10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de membrana Millipore 0,22 μ m. O extrato assim obtido foi congelado a -70°C ou utilizado imediatamente na concentração de 10% nos meios basais, o que resultou

na concentração final de 1 mg de extrato/ mL de meio. Para o controle da indução foi utilizado o meio basal MPI ou MMI.

2.3. Extração de RNA (Winderickx, & Castro 1994)

A linhagem de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* selecionada foi cultivada em meios de cultura adequados e 1,5 mL desta cultura foi centrifugada. O sedimento celular foi lavado 3 vezes com H₂O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) para a retirada de resíduos do meio de cultura. As células, a partir deste momento mantidas em gelo, foram suspensas em 750 µL de tampão de extração (1 mM EDTA; 0,1 M Tris; 0,1 M LiCl; 10 mM iodo acetato de sódio). A esta suspensão foi adicionado 750 µL de fenol (equilibrado com H₂O)/clorofórmio/álcool isoamílico numa proporção de 25:24:1 contendo 1% de SDS. A mistura foi fortemente agitada duas vezes por 1 minuto com um pequeno intervalo entre as agitações e colocadas em gelo. Após centrifugação por 3 minutos à 3000 rpm, a fase aquosa foi recuperada. Esta extração com fenol foi repetida até o desaparecimento completo de resíduos na interface. A esta fase aquosa foi acrescentado 1/20 volume de acetato de potássio 40% e 2 volumes de etanol absoluto para a precipitação do RNA. Após duas horas a -20 °C e centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos o sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em 100 µL de H₂O tratada com DEPC. A qualidade e quantificação da preparação foi verificada em gel de agarose 1% desnaturante contendo 6% formaldeído e 1 X de tampão MOPS. A corrida eletroforetica foi efetuada em 1 X de tampão MOPS.

2.4. Síntese de cDNA (Ausubel, 1994)

O RNA extraído, conforme protocolo acima descrito, foi tratado com DNase, para eliminar o DNA genômico. 80 µL de RNA da extração foi misturado com 24 ul de tampão da DNase (10mM Tris-HCl, pH 7.5; 55 mM de KCl; 5 mM de MgCl₂); 5 U de inibidor de RNase (Gibco-BRL) e 200 U de DNase (Gibco-BRL) e incubados por 1 h à 37°C. Após este tempo, adicionou-se 100 µL de água DEPC e efetuou-se uma extração com fenol clorofórmio (3:1). O RNA tratado foi precipitado com 1/10 V de Kac (3M) e 2V de etanol absoluto e sedimento de RNA foi lavado com etanol 70% seco e suspenso em 20 µL de água DEPC. Para síntese da fita complementar, à cada 100 ng de RNA tratado, foi adicionado 1 µM de *primer* randômico para um volume final de 10 µL e incubados por 15

minutos à 68 °C e acrescentado tampão da enzima; 0,1 M DTT; 10 mM dNTPs e 5 U de transcriptase reversa (Gibco-BRL). A mistura foi incubada por 50 minutos à 37 °C e estocada em -20 °C. Os *primers* randômicos (Operon Technologies, Inc.) utilizados estão apresentados na Tab. 1

Tabela 1: *Primers* randômicos utilizados para síntese de cDNA

| <i>Primer</i> | Seqüência |
|---------------|---------------------|
| OPQ4 | 5' AGT GCG CTG A 3' |
| OPQ5 | 5' CCG CGT CTT G 3' |
| OPQ7 | 5' CCC CGA TGG T 3' |
| OPR6 | 5' GTC TAC GGC A 3' |
| OPR7 | 5' ACT GGC CTG A 3' |
| OPP1 | 5' GTA GCA CTC C 3' |

2.5. RAP-PCR (Wong & McClelland, 1994).

Para a reação de PCR foram utilizados 2 µL do cDNA e 4 µL do *primer* (1 µM) utilizado para a síntese de cDNA. Foram adicionados 14 µL de uma mistura contendo 8,8 µL de H₂O; 2 µL de tampão da Taq DNA Polimerase 10X; 0,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL de dNTP 20 µM (cada um); 0,5 µL de dCTP ³³P e 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL). A amplificação do DNA foi efetuada de acordo com os seguintes parâmetros: 1X (94 °C/4 min); 30X (94 °C/30s; 40 °C/2 min; 72 °C 30s). Uma amostra de 7 µL do produto de amplificação foi misturada com um tampão de carga contendo formamida deionizada (44%), EDTA 0,5 M e 0,1% de xileno cianol e 0,1% azul de bromofenol. Foi efetuada uma incubação por 4 min. a 80°C e transferência para o gelo antes das amostras serem submetidas a eletroforese em gel de seqüenciamento a 1.280 V, 25 mA e 27 W. O gel foi seco sobre uma folha de papel Whatman 3M e exposto ao filme de Raio-X para a

visualização dos produtos de RAP-PCR.

2.6. Eluição, reamplificação e isolamento das bandas diferenciais

Para a clonagem dos produtos diferenciais, o gel foi alinhado com a autoradiografia e as bandas características foram excisadas e eluídas da acrilamida com 120 μL de H_2O milli-Q em banho maria por 15 min. Uma amostra de 4 μl do DNA foi reamplificados por PCR com o mesmo *primer* utilizado para a amplificação. O produto do PCR foi clonado e sequenciado.

2.7. Seqüenciamento de DNA

A reação para seqüenciamento DNA foi efetuada através de PCR com o kit BigDye (Perkin Elmer) utilizando-se os *primers* M13 direto e reverso do vetor pUC19. As condições para o PCR foram os seguintes: 1X (96°C/1 min e 30 seg); 25X (96°C/12seg; 50°C/6seg; 60°C/4min). Esta reação foi purificada através de precipitação com álcool isopropílico 75% seguida de lavagens com etanol 70%, segundo fabricante do kit. Após as amostras de DNA serem secas e suspendidas em tampão apropriado, estas foram submetidas a corrida no seqüenciador automático da Perkin Elmer, modelo ABI PrismTM Model 377 (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética e Instituto de Biologia-Depto de Genética e Evolução, Unicamp).

2.8. Hibridização

100 ng de DNA plasmidial de cada clone foram transferidos em duplicata para 3 membranas de nailon através do método de *dot blot* de acordo com o protocolo do fabricante da membrana (Amersham Pharmacia). Cada membrana foi hibridizada com uma mistura cDNAs provenientes de cada tratamento, marcados com digoxigenina de acordo com instruções do fabricante (Boehringer-Mannheim FRG). Foi feita uma pré hibridização por 2 h. seguida da hibridização por 16 h ambas à 42°C em 50% de formamida. Após a hibridização, as membranas foram lavadas por 1 minuto com SSC 2X (NaCl 0,3M; citrato trissódico 0,03M e 0,5% SDS); seguindo-se duas lavagens de 15 min. com SSC 2X e 0,1% SDS; duas lavagens de 20 min. com SSC 0,1X e 0,1%SDS à 60°C e uma lavagem momentânea com SSC 1X. A revelação da hibridização foi feita por detecção imunológica utilizando-se anticorpo conjugado (anti-digoxigenina) e CSPD (Boehringer-Mannheim,

FRG) detectados em filmes de raio-X.

2.9. RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) com *primers* específicos

A reação de RT-PCR foi efetuada de acordo com Shepard & Gilmore (1999). Cada produto do RAP-PCR expresso diferencialmente foi sequenciado e a partir das extremidades terminais foram desenhados e sintetizados *primers* específicos (Gibco-BRL) para cada clone. A reação de PCR específica foi realizada utilizando-se cDNAs sintetizados com o *primer* randômico correspondente a cada clone (ver em Resultados).

Para a reação de PCR específica, 2,5 μ L de cDNA foram misturados a 22,5 μ L de uma mistura de PCR para um volume final de 25 μ L. Esta mistura continha 10mM Tri-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ 125 μ M de cada dNPT, 25 pmol de *primer* direto e reverso de cada clone, e 5 U de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia). Após 1 ciclo de 5 min de desnaturação a 95°C, a amplificação foi realizada durante 30 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por 30 sec.; 60°C por 2 min. e 72°C por 30 sec.

3. Resultados

3.1. Considerações sobre a escolha da linhagem

Em resultados prévios foi verificado que 8 diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, cultivadas em diferentes condições, apresentaram perfis idênticos de proteínas solúveis em gel de SDS-PAGE, tendo-se selecionado a linhagem I11330 para a construção de um mapa de proteínas em gel bidimensional (2D). Esta linhagem foi testada para patogenicidade utilizando-se folhas destacadas de maracujazeiro e sintomas típicos da mancha oleosa foram observados 3-5 dias após a inoculação com suspensão bacteriana ($A_{600}=0,2$). Dessa forma essa mesma linhagem foi utilizada para os estudos de display diferencial.

3.2. Isolamento de RNA total

A linhagem *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 11330 foi previamente adaptada ao meio mínimo basal (MMI) e preparada para ser utilizada nos diferentes meios de cultura. A suspensão bacteriana foi cultivada até atingir $A_{600}=0,5$ e a massa celular foi inoculada em três meios de cultura: MMI (meio de cultura basal), MMP (meio de cultura basal contendo extrato de folhas de maracujazeiro na concentração de 1mg/mL) e (MMT) (meio de cultura basal contendo extrato de folhas de tomateiro na concentração de 1mg/mL).

O isolamento de RNA total foi efetuado a partir de 1,5 mL de amostras da cultura bacteriana, cultivada em diferentes meios até atingir $A_{600} = 0.5$, obtendo-se um rendimento total de cerca de 10 µg de RNA total, avaliado por eletroforese em gel de agarose desnaturante, tomando-se como referência a concentração de rRNA. O gel de agarose, além de permitir uma estimativa da concentração de rRNA permitiu também avaliar a integridade da preparação, ou seja, a ocorrência de degradação do RNA.

3.3. Amplificação de cDNA utilizando-se RAP-PCR

Para verificar o efeito da concentração de RNA foram utilizadas diferentes concentrações de RNA (100 e 200 ng) nas reações de síntese da primeira fita não tendo sido observadas diferenças no perfil de bandas nestas duas concentrações. Em experimentos

preliminares foram também utilizados extratos de outras plantas incompatíveis (mandioca e soja) além de tomateiro. Como os resultados de RAP-PCR foram aparentemente idênticos para os três hospedeiros, manteve-se apenas o tratamento com extrato de folhas de tomateiro como hospedeiro incompatível.

O padrão de bandas obtidos para cada *primer* testado (OPP1, OPR6, OPR7, OPQ4, OPQ5 e OPQ7) (Fig. 1) se mostrou similar nas duas repetições e em média foram observadas 60 bandas por *primer*. A exceção foi verificada com o *primer* OPP1, onde alguns padrões de bandas não mostraram repetibilidade. Algumas bandas diferenciais induzidas ou reprimidas especificamente pelo extrato de folhas de maracujazeiro (MMP) estão assinaladas na Fig. 1 e somente aquelas presentes nas duas repetições foram consideradas.

As bandas diferenciais foram eluídas do gel de acrilamida, reamplificadas e clonadas em pGEM ou pKS+. A Tab. 2 mostra um resumo das bandas diferenciais detectadas com os diferentes *primers* utilizados, incluindo fragmentos que estavam presentes ou ausentes e os resultados de seqüenciamento e homologia observados (resultados no item abaixo). Foram selecionadas 18 bandas diferenciais para clonagem e sequenciamento. Deste total, somente 15 bandas foram clonadas, 12 induzidas e 3 reprimidas no tratamento com extrato de maracujazeiro.

No processo de clonagem foram isoladas cerca de 5 colônias putativas por banda selecionada. Esse número de colônias por clonagem foi utilizado para certificar-se o fragmento de interesse estaria presente. Em geral, muitos dos fragmentos clonados correspondem aos genes ribossomais que estão presentes em alta frequência na população de RNA e são portanto preferencialmente selecionados. Para os 15 fragmentos selecionados foram, portanto, isolados no total 75 clones putativos. Esses clones foram sequenciados utilizando-se os *primers* direto e reverso, correspondendo à cerca de 150 reações de seqüenciamento.

Após o seqüenciamento, dos 15 fragmentos selecionados, 4 (P12, P23, Q71 e R73) foram identificados como ribossomais, apresentando homologia com o gene 16S ou 23S, sendo portanto, excluídos. As seqüências dos demais clones (apresentadas no Anexo 2) foram utilizadas para procura de similaridade na bases de dados (GenBank e SwissProt) utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). As características de cada

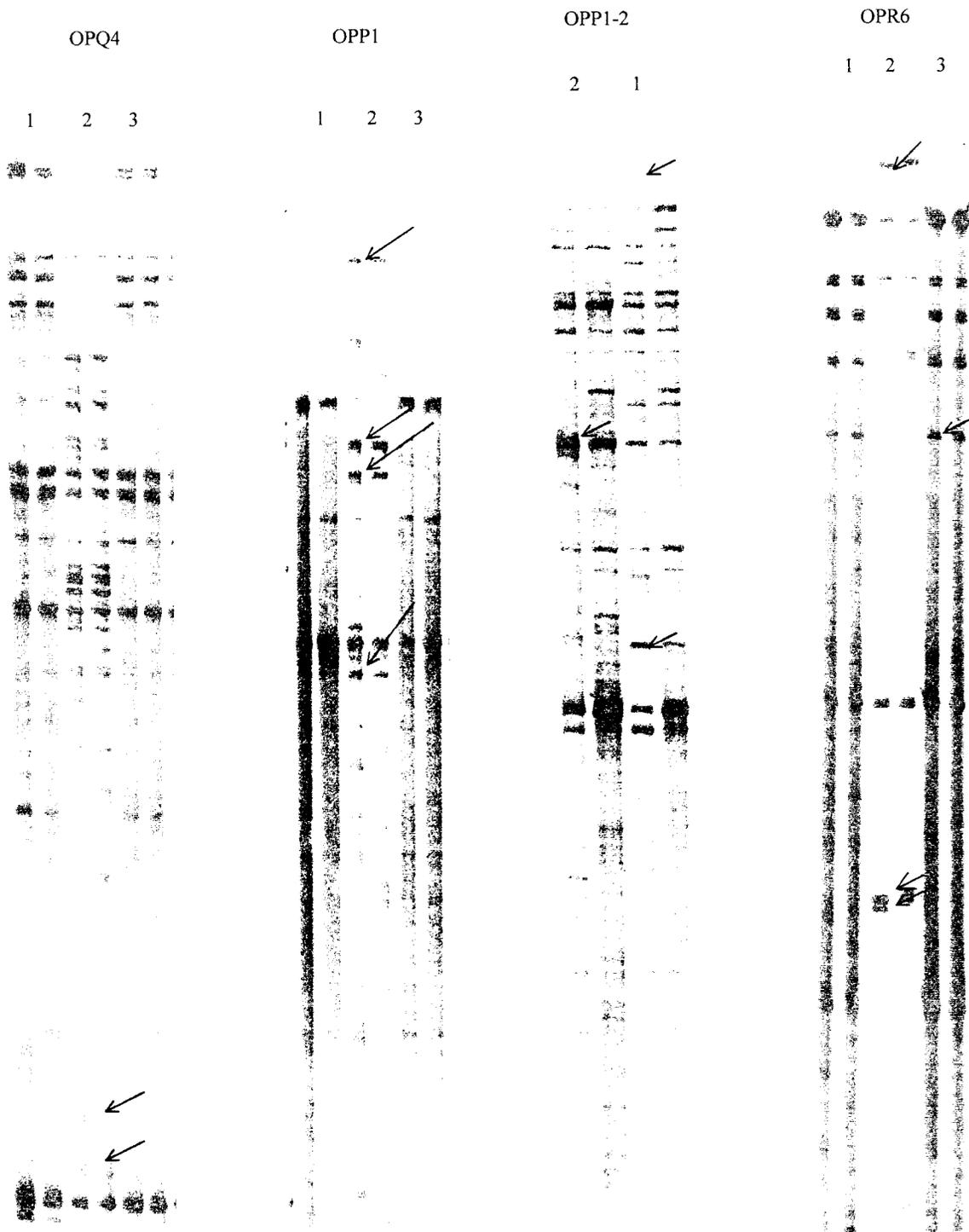
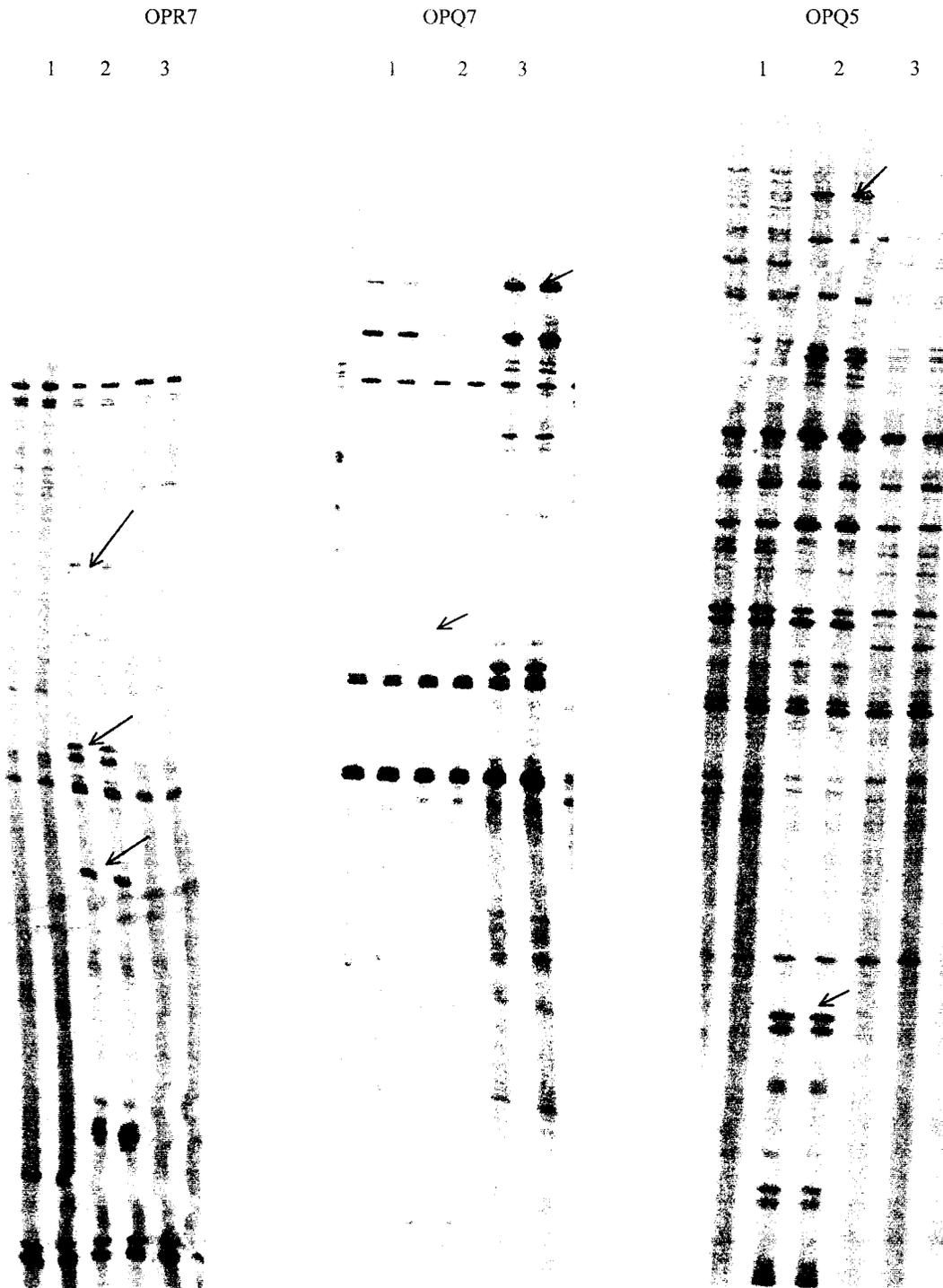


Figura 1. mRNA display utilizando-se diferentes *primers* randômicos. 1, 2 e 3: tratamentos com os meios MMI, MMP e MMT, respectivamente, com duas amostras repetidas em cada coluna. O resultado com o *primer* OPP1 é apresentado duas vezes. As setas indicam algumas bandas diferenciais.



Continuação da Figura 1. mRNA display utilizando-se diferentes *primers* randômicos. 1, 2 e 3: tratamentos com os meios MMI, MMP e MMT, respectivamente, com duas amostras repetidas em cada coluna. As setas indicam algumas bandas diferenciais.

Tabela 2. Produtos de ampliações diferenciais selecionados com os diferentes *primers* e similaridade encontrada em bancos de dados.

| <i>Primer</i> | Clone | Nº de Pares de Bases | I ou R | Homologia | Similaridade | Número de acesso |
|---------------|-------|----------------------|--------|---|--------------|------------------|
| OPP1 | P13 | 384 | R | Proteína de membrana (<i>Campylobacter jejuni</i>) | 44/94 | CAB75223.1 |
| | P21 | 260 | I | Fator de transcrição de hepatócito (<i>G. gallus</i>) | 28/47 | Q90867 |
| OPQ4 | Q42 | 186 | I | Produto gênico (<i>Drosophila</i>) | 12/22 | AE003675 |
| | Q43 | 225 | I | Permease (<i>Borrelia burgdorferi</i>) | 39/61 | AE001168 |
| OPQ5 | Q51 | 481 | I | Proteína de mobilização (<i>T. ferrooxidans</i>) | 78/153 | P20085 |
| | Q52 | 413 | I | Tirosina quinase (Humano) | 32/75 | A368773 |
| OPQ7 | Q723 | 539 | I | Proteína de membrana (<i>Campylobacter jejuni</i>) | 39/60 | AL139077 |
| | Q725 | 460 | I | Protease carboxi terminal (<i>H. pylori</i>) | 34/57 | AAD83941.1 |
| OPR6 | R63 | 581 | R | Lys-carboxipeptidase (Humano) | 18/40 | AAA51921.1 |
| | R64 | 300 | I | Glu-carboxipeptidase (Humano) | 26/44 | AAC05579.1 |
| | R65 | 288 | I | Proteína putativa (<i>Plasmodium</i>) | 25/44 | CAB39024.2 |

I: indução e R: repressão.

fragmento resultante bem como a similaridade detectada na base de dados encontra-se na Tab. 2. A busca de similaridade foi efetuada utilizando-se as seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos diferentes quadros de leitura.

A similaridade na base de dados foi obtida para todos os clones sequenciados, entretanto, os valores encontrados, de forma geral, são para pequenas regiões das proteínas deduzidas (Fig. 2a, b, c, d e e). Em alguns casos, especificamente nos clones Q42 e R65, não foi possível deduzir a função pois a similaridade foi detectada com proteínas putativas, de função desconhecida. Também no caso do clone P21, a similaridade detectada de 47 aminoácidos com o fator de transcrição nuclear de hepatócitos de *Gallus gallus* não permitiu nenhuma correlação consistente. Dessa forma esses clones devem corresponder a novos genes existentes no genoma de *X. axonopodis*, ainda não descritos na literatura, e que são induzidos especificamente com extrato da planta compatível.

O clone P13, contendo 384 bases, apresentou similaridade na seqüência de aminoácidos deduzida (frame +1) com uma proteína de membrana putativa de *Campylobacter jejuni* (Fig 2d).

O fragmento Q43 apresentou uma seqüência de 225 pares de bases que codifica uma proteína similar à permeases de diversas bactérias do sistema de transporte ABC como por exemplo, de *Pyrococcus horikoshi* (59%), de *Borrelia burgdorferi* (63%), de *Thermotoga maritima* (65%) e de *Bacillus subtilis* (59%), com identidades de 36,5%; 33,3%; 35% e 31,7%, respectivamente (Fig. 2d). Em *Pyrococcus horikoshi* esta proteína recebe nome de PH1712, em *Borrelia burgdorferi* e *Thermotoga maritima* de *rbsC-1* e em *Bacillus subtilis* é parte de um *operon* designado *yufP*.

Do fragmento Q51 foram sequenciados 481 pares de bases e o frame -2 pode codificar uma proteína correspondente à proteína MobL do plasmídio pTF1 de *Thiobacillus ferrooxidans* (50%), com a enzima TraA de *Lactococcus lactis* (49%) e com RepB e MobA de *Escherichia coli* (52%) com identidades de 31,5%; 27,5% e 33% respectivamente (Fig. 2b). Todos estes genes fazem parte do sistema de mobilização de plasmídios destas bactérias. Eles estão envolvidos na duplicação e na transferência intra e interespecífica de plasmídios (Day, 1987).

Foram sequenciadas 413 bases referentes ao clone Q52 que apresentou similaridade com uma proteína quinase (EC 2.7.1.112) humana (25 e 42% de identidade e similaridade,

| | | |
|------------------|--|----|
| <i>G. gallus</i> | HLQSGPRLTPSPAVSSSS-LVLYQSSDSTN-SHSQLLPSTHVIETF | 45 |
| P21 | HLFRAPRLSPTPESSNXWLATHCSASKTNSRARTSPSLISVMICY | 47 |
| | ** .***:*. ** . * . : *...** *::: ** .*: : | |

Figura 2a: Alinhamento do clone P21 com fator de transcrição nuclear de *G. gallus*. O símbolo “*” indica resíduo de aminoácido idêntico ou conservado em todas as seqüências alinhadas; “:” indica substituições conservadas e “.” indica substituições semi-conservadas.

| | | |
|------------------------|---|-----|
| <i>L. lactis</i> | MAIFHMNFSNISAGKGRSAVASASYRSGEKLYSEMENKTYFYNRSVMPESFILLPENAPE | 60 |
| <i>T. ferrooxidans</i> | MAIYHLSAKPISRSAGRSATGAAAYRAGVEITDERTGLVHDYTRK--GGVLHSELILPGG | 58 |
| Q51 | MPIYHVSINRSX--KGXSSVXRLLIVQGSICGXQLX-SGAKYKDRALSHNKCLLPMSPR | 57 |
| | *.*:*. . * *: | |
| <i>L. lactis</i> | WAKDRQKLWNEVEAVDRKVNRYAKEFNVALPIELSEDEQKELLTEYVQKIFVDKGMVAD | 120 |
| <i>T. ferrooxidans</i> | GTADRAEFWNGVEAHHKRGDAVLVREIEISLPTELTAEQRKALAVGYARALADRYGVAAD | 118 |
| Q51 | WCFDVRSEFWDINEHQEXRANARVAREVEVSLPNSLDALQRKALALDLGQLLVDRYQAAVL | 117 |
| | * . *: : . :. :*...** .* ::: * : : | |
| <i>L. lactis</i> | VAIHRD-----HDENPHAHVMLTNRPFNADGSWGQKAKKE | 155 |
| <i>T. ferrooxidans</i> | VALHAPRTVTDRELEKHPDQYHETDPKTGRRHNGNWHAHILLSACHVQPDGTLGKKA--- | 175 |
| Q51 | VAVHSPGR-----RGDQRNHHVHLLMSARKVDAGK-LGERACAE | 155 |
| | **:* . * * *::: : | |

| | | |
|----------------|--|-----|
| Q51 | FWDINEHQEXRANARVAREVEVSLPNSLDALQRKALALDLGQLLVDRYQAAVLVAVHSPG | 60 |
| <i>E. coli</i> | YWDAADLYE-RANGRLFKEVEFALPVELTLDQQKALASEFAQHLTGAERLPYTLAIHAGG | 59 |
| | ::* : * **.*: :***:*. * * *:::*. * . : . :*: : | |
| Q51 | RRGDQRNHHVHLLMSARKVDAGKLGGERACAEFDARQG-----AGAXEMKALR | 107 |
| <i>E. coli</i> | GE----NPHCHLMTSERINDG---IERPAAQWFKRYNGKTPEKGGAQKTEALK | 105 |
| | . * * **::* * * . * * . *::: * . . ** : : * : | |

Figura 2b: Alinhamento do clone Q51 com proteínas de mobilização (Mob/Rep) de *T. ferrooxidans* e *L. lacticus* e de *E. coli*. O símbolo “*” indica resíduo de aminoácido idêntico ou conservado em todas as seqüências alinhadas; “:” indica substituições conservadas e “.” indica substituições semi-conservadas.

| | | |
|-------------------|---|----|
| Q52 | ACKRVKFPYPVMHCNARRLPSILPAPCRSVSSCCAGGCSLTWSKRRPAQSSCASTHVQCQSRCQRAGG | 69 |
| <i>H. sapiens</i> | ACNTSRCPAPVRCPEGARRIPTYQEGACCPVQNCSTWVCSINGTLYQPG--AVVSSSLCETRCCELPGG | 69 |
| | ** : * * .***:*. ** . * . : *...** *::: ** .*: : | |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Q52 | NARRLPSILPAPCRSVSSCCAGGCSLTWSKRRPAQSSCASTHVQCQSRCQRAGGRVVLSSMPAGSRATEMKALRG | 75 |
| Tyr quinase | NIRRKPVLAEASASQASCFSDDGYPLSWTWKCKSDKSFNCTEEITEGVWNRKANRKFVQWVSSSTLNMSEAIG | 75 |
| | * * * * .:*. . * :** :. * * *::: :.* . * . :. * * * . . : * . : * : * : | |

Figura 2c: Alinhamento do clone Q52 com a proteína mucina e a enzima tirosina quinase humana. Resíduos de aminoácidos importantes para a estrutura terciária da proteína foram identificados nos clones em negrito. O símbolo “*” indica resíduo de aminoácido idêntico ou conservado em todas as seqüências alinhadas; “:” indica substituições conservadas e “.” indica substituições semi-conservadas.

respectivamente, numa seqüência de 75 aminoácidos). A enzima faz parte de uma família do tipo II de tirosina quinase e funciona possivelmente como receptor de fatores de crescimento de células do tecido hematopoiético (Small *et al.*, 1994). Uma outra similaridade (identidade de 21/70 e similaridade de 34/70) foi detectada com mucina de humanos (Meezaman *et al.*, 1994), que é uma glicoproteína encontrada em diversas espécies de mamíferos (Fig 2c).

No seqüenciamento do clone Q725, foi verificado que este fragmento possui 460 pares de bases e a análise de sua seqüência em banco de dados mostrou que o frame +2 codifica uma seqüência de 70 aminoácidos, similar à uma família de proteases de diferentes espécies como *Helicobacter pylori* (59%), *Bacillus subtilis* (57%), *Borrelia burgdorferi* (59 %) e *Campylobacter jejuni* (53%), com identidades de 35,1%; 31,8%; e 33,3% respectivamente (Fig 2e). Esta família de proteases teria a função de processamento da extremidade carboxi-terminal. Em *B. subtilis*, este gene denominado de OrfRM1 mostrou similaridades com o gene *prc* de *E. coli* e *ctpA* de *Synechocystis* sp. A proteína Prc que é codificada pelo gene *prc* possui sensibilidade ao choque térmico e osmótico e susceptibilidade múltipla a drogas, está envolvido na clivagem do peptídeo C-terminal da forma precursora da proteína 3 que se liga a penicilina (PBP 3) (Marasco *et al.*, 1996).

O fragmento Q723, apresentou uma seqüência de 539 pares de bases e a análise da proteína deduzida (frame -3) mostrou similaridade de cerca de 65%, com proteínas de membrana, função deduzida do genoma de *Campylobacter jejuni*. A proteína de membrana de *C. jejuni* possui 1081 aminoácidos com 3 regiões conservadas com diferentes domínios. A primeira região abrange os aminoácidos de 1 a 90 e possui 3 domínios membranares hidrofóbicos (MSDs); a segunda região compreende os aminoácidos de 90 a 780 sem domínios MSDs e finalmente, a terceira região (781 ao 1081) contém 10 possíveis MSDs. A Fig. 2d apresenta uma região de 8 aminoácidos contíguos e conservados em vários organismos comparados além de outros aminoácidos com alta similaridade. De acordo com estes dados, o clone Q723 parece corresponder a uma proteína de membrana considerando-se a similaridade com o terceiro domínio de proteínas de membrana desta classe. A proteína Q723 também apresentou similaridade com a proteína Nrfl envolvida com a maturação do citocromo c de *Wolinella succinogenes* (Simon *et al.*, 2000) e de *H. pylori*.

A proteína deduzida da seqüência de bases do clone R63, apresentou similaridade

com a lisina-carboxipeptidase (EC 3.3.17.3) humana numa seqüência de apenas 49 aminoácidos, com identidade de 35% (Fig.2e).

Finalmente o clone R64, com 300 bases sequenciadas, codifica para uma proteína que apresenta similaridade com a gama-glutamil-carboxipeptidase (EC 3.4.19.9) humana numa seqüência de 44 aminoácidos (identidade de 34%) (fig. 2e).

3.4. Confirmação da expressão diferencial

A confirmação da expressão diferencial dos clones caracterizados foi efetuada utilizando se a hibridização e/ou RT-PCR.

3.4.1. Hibridização diferencial

Os onze clones parcialmente caracterizados e sequenciados (R65, R64 e R63, Q42, Q43, Q51, Q52, Q723, Q725, P21 e P13), excluindo-se os ribossomais, foram submetidos a hibridização diferencial para confirmação da expressão induzida. Para a hibridização diferencial, 100 ng do DNA plasmidial de cada clone (total de 11 clones, em duplicata) foram imobilizados em 3 membranas de náilon. Cada membrana foi hibridizada com as diferentes populações de cDNA marcadas com digoxigenina. Cada população de cDNA foi sintetizada a partir dos diferentes tratamentos (MMI, MMP ou MMT) utilizando se individualmente cada *primer* (OPP1, OPR6, OPQ4, OPQ5 e OPQ7) para síntese do cDNA e posterior reamplificação. O *primer* OPR7 foi excluído por não ter apresentado bandas diferenciais. Os cDNAs sintetizados com os diferentes *primers* foram então misturados em proporções equivalentes (cerca de 2 µL de cada síntese) e marcados com digoxigenina. A população total de cDNAs, preparada para cada um dos três tratamentos, foi utilizado como sonda para cada membrana. Como controles da reação de hibridização foram utilizados o DNA total da linhagem original (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*), o vetor de clonagem (pUC19) e um clone contendo rDNA. Os resultados obtidos evidenciaram que todos os clones, exceto P13, apresentaram hibridização mais intensa com a população de cDNA proveniente das células tratadas com extrato de folhas de maracujazeiro (Fig. 3A). Dentre os clones positivos, pQ43, pR64 e pR65 apresentaram hibridização mais intensa com o extrato compatível, devido possivelmente a um nível de expressão maior desses genes.

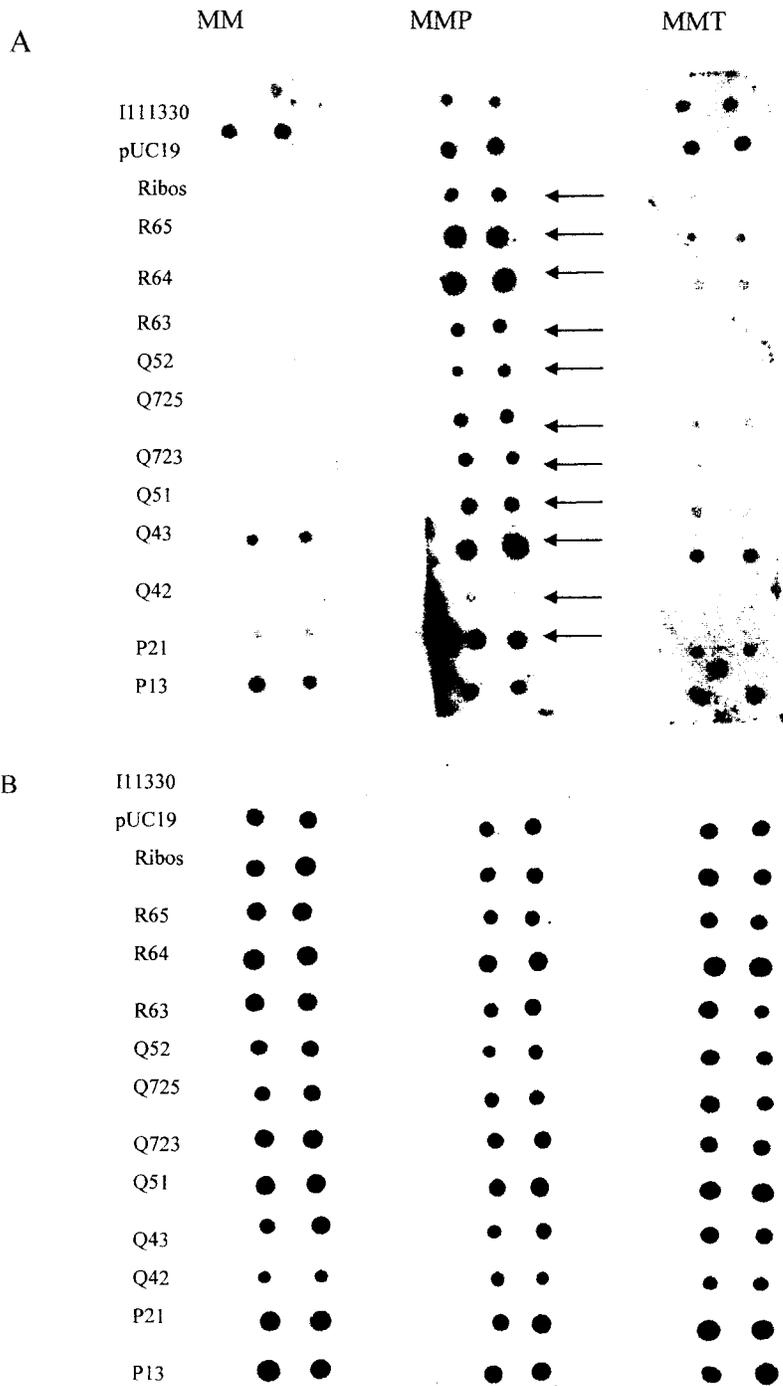


Figura 3: Hibridização diferencial dos clones provenientes do display de mRNAs utilizando-se como sondas cDNAs de cada tratamento (MMI, MMP e MMT) sintetizados com os *primers* OPQ4, OPQ5, OPQ7 e OPR6. **A-** MMI: hibridização com cDNA do tratamento em MMI; MMP: hibridização com cDNA do tratamento em MMP; MMT: hibridização com cDNA do tratamento em MMT. **B:** Hibridização das mesmas membranas de A com DNA do vetor pUC19. As setas indicam as bandas de expressão diferencial.

Os clones R63 e P13, reprimidos com extrato de folhas de maracujazeiro (Tab. 2), apresentaram resultados contraditórios na hibridização diferencial. Era esperado que esses clones apresentassem hibridização mais intensa com a sonda dos cDNAs proveniente do meio basal (MMI) ou do tratamento com extrato de tomateiro (MMT). No entanto, neste experimento foi verificado que o clone pR63 hibridizou mais intensamente com os cDNAs provenientes do tratamento com extrato de folhas de maracujazeiro e o clone pP13 hibridizou na mesma intensidade com as três sondas.

Com o DNA genômico e o vetor de clonagem, o sinal de hibridização foi equivalente nas três membranas indicando que as concentrações de DNA de cada clone colocados em cada membrana foram aproximadamente iguais. Apenas o controle contendo o gene 16S do rDNA apresentou hibridização mais intensa quando o cDNA utilizado foi preparado a partir de extrato de folhas de maracujazeiro. Uma explicação plausível para esse resultado pode ser atribuído à maior taxa de multiplicação celular que ocorre nas células bacterianas quando o extrato de planta compatível é adicionado ao meio de cultura. A maior taxa de crescimento demanda uma maior síntese de proteínas que por sua vez requer uma síntese mais acelerada de rRNAs.

Um outro experimento controle foi realizado onde as membranas foram hibridizadas com o vetor pUC19 (Fig. 3B). Neste experimento foi verificado que a intensidade de hibridização para cada clone nas três membranas foi muito semelhante. Este resultado indica que a diferença de intensidade detectada no experimento anterior, utilizando os cDNAs dos diferentes tratamentos como sonda, foi devido a expressão diferencial e não por diferenças nas quantidades de DNA aderidas nas membranas.

3.4.2. RT-PCR com *primers* específicos

Primers desenhados a partir das extremidades 5' e 3' dos clones P13, R64, Q723, Q725, Q51 e Q43 (Tab. 3) foram sintetizados para confirmar a expressão diferencial detectada na hibridização. Esta confirmação foi realizada através da reação de RT-PCR. Após a síntese do cDNA dos mRNA dos três tratamentos com os *primers* randômicos correspondentes, foram utilizados 2 µL destes cDNAs para uma reação de PCR com os *primers* específicos.

Tabela 3: Nome e seqüência dos *primers* utilizados na reação de RT-PCR com *primers* específicos.

| Clone | Primer | Seqüência | Fragmento (pb) |
|-------|--------|--|-----------------|
| Q43 | Q43D | 5' AGT GCG CTG AGA TAA ATA G 3' | 225 |
| | Q43R | 5' AGT GCG CTG ACC GTT CCT GG 3' | |
| Q51 | Q51D | 5' TGA TCA CTG ATG CAA TGG 3' | 420 |
| | Q51R | 5' GCG TTG TCT CAC AAC AAA TG 3' | |
| Q725 | Q725D | 5' CCG ATG GCC ACA GCT ATC AC 3' | 456 |
| | Q725R | 5' CCG ATG GTG TTG ACC TGC TTT C 3' | |
| Q723 | Q723D | 5' TTC CCG ATC CTA AGC 3' | 408 |
| | Q723R | 5' ATG CGC TGG ATG TTC 3' | |
| P13 | P13D | 5' GTA GCA CTC CAA GAG TAC G 3' | 384 |
| | P13R | 5' GTA GCA CTC CAT GGT AAT AAG 3' | |
| R64 | R64D | 5'GTC TAC GGC AAA ATA TTA TTT AAT C 3' | 300 |
| | R64R | 5'CTG CAG GAA TTG CAT TCT AC 3' | |

Na Fig. 4 pode-se observar que os fragmentos P13, Q43, Q725 e Q64 estão sendo amplificados diferencialmente quando os três tratamentos são comparados. As reações de RT-PCR com os *primers* dos clones Q43, Q725 e R64 amplificaram a banda esperada somente a partir de cDNAs provenientes do tratamento com extrato de folhas de maracujazeiro confirmando portanto a expressão diferencial (Fig. 4). Os *primers* sintetizados a partir das extremidades dos clones Q723 e Q51 parecem estar incorretos uma vez que não foi detectada amplificação dos fragmentos dos clones originários. Finalmente o clone pP13, reprimido na presença do extrato de folhas de maracujazeiro (ver Tab. 2), não havia sido confirmado na hibridização diferencial, porém no experimento de RT-PCR, os resultados obtidos confirmam a amplificação do fragmento de ~400 pb apenas em cDNAs provenientes dos tratamentos com MMI e MMT.

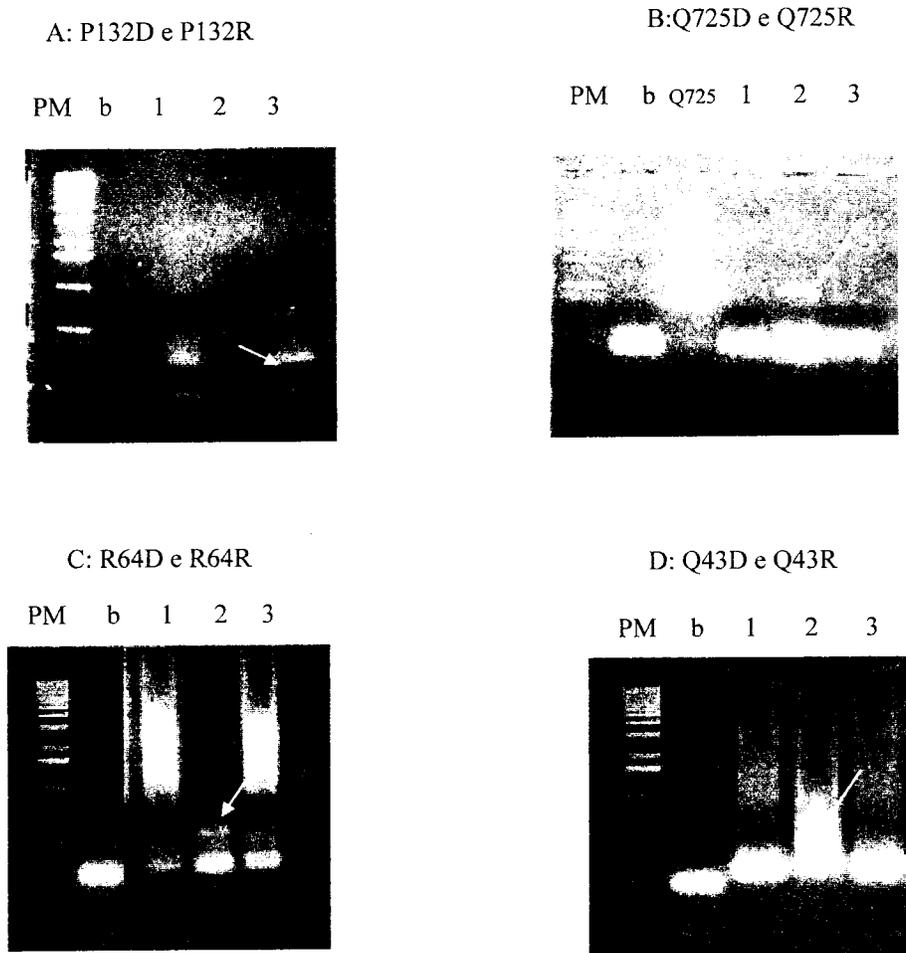


Figura 4: RT-PCR com *primers* específicos para amplificação do cDNAs dos três tratamentos (MMI, MMP e MMT). A amplificação dos cDNAs foi efetuada com os *primers* randômicos correspondentes e reamplificados com os *primers* indicados (A-D). **b**: reação sem cDNA; **1**:MMI; **2**:MMP; **3**:MMT; Q725: amplificação do DNA do clone Q725; **PM**: peso molecular 1 Kb (Gibco-BRL).

4. Discussão

O método desenvolvido por Liang & Pardee (1992), denominado “mRNA differential display”, através do qual mRNAs de diferentes tratamentos são comparados após a síntese de cDNA por PCR, foi inicialmente utilizado em eucariotos. A síntese de cDNAs gera uma população que deve ser representativa dos tipos de mRNAs presentes em cada extrato. Os *primers* utilizados na reação de PCR são planejados de forma a se obter uma população de cDNAs correspondente a uma fração dos mRNAs. Dessa forma é utilizada uma variedade de combinações de *primers* para assegurar essa representatividade. A comparação dos padrões obtidos para cada tratamento é realizada após eletroforese dos produtos de PCR. Os produtos diferenciais podem então ser purificados, reamplificados e clonados ou utilizados como sondas para a procura dos genes correspondentes. Em procariotos, esta técnica foi denominada de RAP-PCR (Wong & McClelland, 1994) e foi utilizada neste trabalho com o objetivo de identificar perfis de produtos de PCR que indicam polimorfismos entre populações de mRNAs causados pela expressão diferencial de genes em resposta à diferentes tratamentos. No presente caso, o método do display diferencial foi utilizado para identificação de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* que estejam se expressando diferencialmente na interação com extratos da planta hospedeira. Este método se mostrou eficiente na detecção de diferenças no perfil de mRNAs, amplificados com *primers* randômicos, em função dos diferentes tratamentos. A utilização de seis *primers* randômicos possibilitou o isolamento de 18 clones diferenciais e possivelmente um maior número poderia ser identificado com o uso de um número mais elevado de *primers*. Algumas desvantagens são entretanto apresentadas pelo método utilizado. Dentre os 18 clones identificados, 3 não foram clonados e 4 foram relacionados com genes ribossomais (16S e 23S). A não clonagem dos fragmentos pode ser atribuída a pequena quantidade de DNA que foi eluída do gel do display diferencial nestas amostras, juntamente com a ineficiência da reação de *blunt-ending* com as enzimas Klenow e DNA polimerase. Possivelmente, com um maior tempo de incubação, utilização de maior concentração dessas enzimas ou mesmo a utilização de kits de clonagem de produtos de PCR seria possível contornar o problema da não clonagem do fragmento. A identificação

de genes ribossomais em 22% dos clones pode ser minimizada selecionando-se *primers* aleatórios que apresentem seqüências não complementares às seqüências correspondentes aos ribossomais, à semelhança de Fislage *et al.*, (1997). Estes autores desenvolveram *primers* cuja seqüência foi determinada de regiões que não apresentavam homologia com rRNA ou com outros RNAs pequenos e abundantes, extraídas de banco de dados.

Os fragmentos clonados variaram de 200 a 1.000 pb, considerados como sendo de tamanho razoável para se proceder uma busca de similaridade na base de dados do GenBank ou EMBL. Entretanto, a base de dados é escassa com relação aos genes de fitopatógenos e, portanto, a procura pode se tornar limitada. Mesmo em bactérias com genomas completamente sequenciados há um grande número de genes não identificados funcionalmente. Em *E. coli* e *H. influenza*, por exemplo, 38 e 42% dos genes respectivamente, codificam para proteínas desconhecidas (Shepard & Gilmore, 1999). Por outro lado, o grande repertório de seqüências de nucleotídeos depositado, resultantes do sequenciamento de genomas, leva freqüentemente à atribuição de funções desconhecidas ou duvidosas. O primeiro caso está representado pelos clones Q42 e R65 que não apresentaram similaridades com proteínas depositadas nos bancos de dados. A função duvidosa pode ser exemplificada pela seqüência de aminoácidos deduzida do clone P21, que apresentou similaridade com o fator de transcrição nuclear de hepatócito de *Gallus* (Fig. 2a). Dessa forma a função desse gene permanece ainda indeterminada. Faz-se portanto necessário um estudo complementar para a identificação completa do gene em questão e de outros de função ainda desconhecida.

Alguns genes induzidos, detectados no presente trabalho, apresentaram similaridades interessantes e nenhuma das possíveis funções foi ainda descrita como envolvidas com fitopatogenicidade. A similaridade da proteína deduzida da seqüência do clone Q51 com a proteína Mob de *T. ferrooxidans* e também com a proteína Rep do plasmídio RSF1010 de *E. coli* (Derbyshire *et al.*, 1987) (Fig. 2b) indica que o gene correspondente de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* está sendo induzido na presença de extrato de folhas de maracujazeiro. A proteína Mob ou o equivalente RepB em enterobactérias, representa uma das principais proteínas envolvidas com duplicação e mobilização plasmidial. A detecção de proteínas Rep em *Xanthomonas* foi apenas descrita para plasmídios de pequeno peso molecular, que se duplicam pelo sistema de *rolling-circle* (Baldini *et al.*, 1999) e que não

corresponde ao apresentado pelo clone Q51, devendo se tratar portanto de um plasmídio distinto. A existência de plasmídios maiores, de 28,5 a 180 kb, em *X. axonopodis* pv. *passiflorae* já foi descrita por Wendland *et al.* (1997). Apesar de diversos plasmídios poderem estar presentes na bactéria analisada, a razão da indução desse gene não é clara. Duas alternativas podem ser mencionadas. Uma delas é que o extrato de plantas (de maracujazeiro e tomateiro) induz uma taxa de crescimento mais rápida (dados não mostrados) e como os plasmídios contendo *repB* apresentam uma sincronia na duplicação com o DNA cromossômico, há possivelmente uma maior síntese das proteínas envolvidas com a duplicação plasmidial. Essa possibilidade, entretanto, pode ser excluída uma vez que o extrato incompatível não apresentou indução do gene *repB*. Uma hipótese alternativa, seria a indução de um sistema de amplificação plasmidial, devido à existência de outros genes inseridos no plasmídio e que teriam importância para manutenção do fitopatógeno frente a um novo ambiente. É conhecido que os plasmídios de *X. campestris* possuem genes envolvidos com resistência a antibióticos (Minsavage *et al.*, 1990), ao cobre (Cooksey, 1993) e podem também apresentar genes de avirulência (Swanson *et al.*, 1988, Bonas *et al.*, 1989). Portanto, a identificação completa do plasmídio correspondente ao clone Q51 poderá esclarecer se alguma outra função diferenciada, além da manutenção do próprio plasmídio, seria importante na interação planta-bactéria.

O clone Q52 apresentou uma seqüência de aminoácidos similar à tirosina quinase humana (Fig.2c). Apesar de proteínas do tipo quinase não terem sido ainda registradas como importantes na patogenicidade de *Xanthomonas*, em *Bradyrizobim japonicum* tem importante papel no sistema de transdução de sinal, ativando o sensor por fosforilação (Loh *et al.*, 1996). Uma outra similaridade foi também detectada com mucinas (Fig. 2c). Estas proteínas apresentam uma alta quantidade de resíduos de cisteína conservadas na região carboxi-terminal, que devem ser importantes para a estrutura terciária da proteína. Na seqüência deduzida de Q52 foram observados, de forma similar, 7 resíduos de cisteína numa seqüência de 75 aminoácidos. Como a proteína deduzida do clone Q52 apresentou similaridade equivalente com a proteína quinase e mucina, há necessidade de isolar o gene completo e desenvolver outros estudos complementares para se certificar dos domínios existentes e confirmar a atribuição funcional.

Três clones (P13, Q43 e Q723) estão relacionados com proteínas de membrana (Fig.

2d), sendo duas delas similares à seqüências deduzidas do genoma de *C. jejuni* e uma delas com uma permease de *B. burgdorferi* (Q43). A permease de *B. burgdorferi* corresponde à proteína envolvida com o transporte de açúcares (ribose/galactose) do tipo ABC. Esse sistema é bastante conhecido em *E. coli* (Hueck, 1998), entretanto, as similaridades encontradas com Q43 incluem espécies distintas como *Pyrococcus horikoshi*, *P. abyssi*, *Thermotoga maritima*, *Bacillus subtilis*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, dentre outras.

Em *Xanthomonas* foram descritas proteínas de membrana que são codificadas por alguns genes *hrp* (para revisão, ver Hueck, 1998). Estas proteínas fazem parte do sistema de secreção do tipo III. Este sistema parece ser dedicada à translocação de proteínas de patogenicidade do citoplasma da bactéria para o interior das células hospedeiras. Entretanto os clones identificados no presente trabalho não apresentaram homologia com esse sistema, pertencendo ao tipo I. Assim como no sistema tipo III, as proteínas no sistema tipo I, são sec independentes e não sofrem processamento amino-terminal. Estruturalmente, são compostas de no mínimo 3 proteínas: uma proteína ligada a membrana à qual interage com a proteína periplasmática e uma proteína de ligação ao ATP à qual fornece energia ao transporte para a membrana. Sistemas de secreção do tipo I não foram ainda reportados em *Xanthomonas*, contudo, eles foram descritos para o sistema de secreção de protease de *Pseudomonas aeruginosa* e *Erwinia chrysanthemi*. Os sinais de secreção parecem ser específicos para subfamílias do sistema de secreção, ou seja, as proteases por exemplo, são ineficientemente secretadas pelo sistema da hemolisina de *E. coli*. A conformação da proteína (Wandersman, 1996) ou resíduos de aminoácidos específicos devem facilitar o reconhecimento das proteínas a serem transportadas (Chervaux & Holland, 1996).

Um fato interessante foi relatado por Kemner *et al.* (1997). Estes autores relataram que alguns genes de *Agrobacterium tumefaciens* que fazem parte do sistema de transporte do tipo ABC com alta afinidade à açúcar possam possivelmente contribuir para eficiência da formação de tumor na planta. Três destes genes seriam: *gguA* que codifica uma proteína putativa de ligação de ATP, *gguB* que codifica uma permease ligada á membrana e *gguC* que não possui função conhecida. Estes genes estão próximos ao gene *chvE*, que codifica uma proteína periplasmática que também faz parte do sistema ABC de transporte e que participa em quimiotaxia e indução de genes de virulência em resposta a monossacarídeos

os quais ocorrem em fermentos da planta. No caso do clone Q43, a permease parece estar mais relacionada com o transporte de açúcares simples, do tipo galactose. A única fonte de carbono utilizada no meio de cultura de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi sacarose e a indução da permease pode ter sido causada por outros componentes existentes no extrato de folhas de maracujazeiro. A composição específica do maracujazeiro não foi determinada ainda e portanto o indutor específico deverá ser investigado posteriormente.

O clone Q723, além da similaridade com uma proteína de membrana de *C. jejuni*, apresentou também uma alta similaridade com uma proteína de membrana putativa de *Helicobacter pylori* e com a proteína NrfI de *Wolinella succinogenes*, envolvida na maturação do citocromo c de bactérias Gram-positivas, cloroplastos e cianobactérias, cujas seqüências alinhadas estão apresentadas na Fig. 2. As proteínas envolvidas na maturação do citocromo c em bactérias Gram-negativas são um pouco mais conhecidas e em geral organizadas em *clusters* (Thöny-Meyer, 1997) e parecem estar associadas as membranas. O gene *nrfI* codifica uma proteína com 901 aminoácidos. Esta proteína possui similaridade com *ccsA* (39% de identidade) de *Helicobacter pylori*. Proteínas CcsA-like foram também deduzidas do genoma de várias outras bactérias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (*RscC* proteína) ou *Mycobacterium* ssp., de *Synechocystis* sp. 6803 e *Aquifex aeolicus*. Todas estas proteínas contêm motivos ricos em triptofano (seqüência consenso WGxxWxWD) e pelo menos 2 resíduos conservados de histidina; estes parecem ser essenciais para o transporte através da membrana ou para sua apresentação no espaço periplasmático (Simon *et al.*, 2000). Estes motivos conservados ou os resíduos de histidina não foram encontrados na seqüência do clone Q723. No entanto, a região de homologia entre a proteína deduzida de Q723 e NrfI abrange uma região com alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, o que sugere a sua possível localização na membrana.

A correlação de um gene do citocromo e virulência foi verificada em *Shigella flexneri* por Way *et al.* (1999). O gene *bd* corresponde a uma das duas oxidases terminais da cadeia respiratória de bactéria que reduz a molécula de oxigênio para água, utilizando pequenos intermediários através da cadeia de transporte de elétrons. Estes autores verificaram que mutantes no locus *cydc*, que leva a diminuição da expressão de *bd*, diminuem significativamente a sobrevivência intracelular e aumentam em 100 vezes a dose letal comparada a linhagem selvagem. Alterações na biossíntese de riboflavina (*ribc*) ou

ubiquinol-8 (*ubiH*), que leva ao aumento da expressão de *bd*, diminuí em 10 vezes a dose letal comparando com a linhagem selvagem. Estes dados sugerem que a virulência destes mutantes está ligado com alterações na expressão do gene *bd* citocromo.

Os clones Q725, R63 e R64 fazem parte de um grupo de proteases, do tipo carboxi-terminal (Fig. 2e). Sabe-se que muitos patógenos produzem enzimas extracelulares que degradam a parede celular ou outras estruturas da planta, facilitando a entrada de produtos de alto peso molecular para a célula bacteriana. Correlação entre níveis de proteases extracelulares e virulência tem sido observada em *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Bashan *et al.*, 1986) e em *Xanthomonas* (Fujimoto *et al.*, 1991; Rosato *et al.*, 1994) apesar do papel dessas enzimas extracelulares ainda não estar bem estabelecido em *Erwinia chrysanthemi* (Dahler *et al.*, 1990). Mutantes deficientes em protease de um número de patovares do gênero *Xanthomonas* têm mostrado redução na indução sintomas de patogenicidade em seu hospedeiros entretanto parecem não ser essenciais (Dow *et al.*, 1993). As proteases extracelulares analisadas em *Xanthomonas* são em geral serina-proteases ou metaloproteases (Dow *et al.*, 1990) o que as diferencia das proteases aqui observadas que apresentam atividade carboxi-terminal. Muitas proteínas em procariotos bem como em eucariotos são sintetizadas em sua forma precursora. Elas são convertidas para a forma madura depois de processamento proteolítico e remoção de pequenos peptídeos na extremidade N ou C-terminal das proteínas precursoras. A proteína Pcr e CtpA fazem o processamento C-terminal. Fernandes-Gonzalez *et al.* (1993), verificaram que a proteína CtpA possui três motivos conservados : OGYORO, OOODOR E OOG E (onde O significa um resíduo hidrofóbico). Os motivos não foram encontrados nas seqüências dos clones Q725, R63 e R64, no entanto, foram encontrados alguns resíduos de arginina que parece ter papel importante na ligação com a extremidade C-terminal para o processamento.

Uma das proteases, a deduzida do clone R63, é reprimida com o extrato da planta compatível, o que é sugestivo de que proteases de diferentes especificidades são ativadas e inativadas na interação planta-bactéria.

Dentre os onze clones detectados como apresentando hibridização diferencial, dez foram confirmados por hibridização e/ou pela reação de RT-PCR. Utilizando-se hibridização *dot blot* dos clones com cDNAs provenientes dos tratamentos como sondas,

foi possível confirmar 9 dos 11 clones. Procedimentos similares foram adotados por diferentes autores para confirmar a hibridização diferencial em *E. coli* (Richmond *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 1998). A confirmação da expressão diferencial foi também efetuada em alguns clones utilizando-se RT-PCR. Apenas o clone R63 não foi confirmado por nenhum dos métodos. A reação de RT-PCR apresenta uma maior sensibilidade (Shepard & Gilmore, 1999) e adicionalmente é de execução mais rápida e fácil. Deverão ser sintetizados *primers* para este clone não confirmado através desse método, incluindo aqueles que não amplificaram nenhum produto (Q51 e Q723).

5. Considerações finais

Os resultados obtidos mostram que o método do display diferencial de mRNA utilizando-se RAP-PCR é bastante eficiente para identificação de genes que são expressos diferencialmente em razão de diferentes tratamentos. No presente trabalho a utilização de apenas 6 *primers* possibilitou a identificação de 11 genes distintos, ainda não descritos na literatura, como envolvidos na interação planta-bactéria. Dois problemas importantes podem ser mencionados com relação ao trabalho desenvolvido. O primeiro deles é a alta frequência de genes ribossomais que podem ser preferencialmente clonados em detrimento daqueles desejados. Isso leva à necessidade de sequenciamento de um grande número de clones putativos, o que demanda um maior tempo e maiores recursos para a identificação correta dos clones. Um método para subtração do rRNA da população total de RNA seria portanto altamente interessante para aumentar a eficiência do processo. Paliativamente como sugerido em Discussão, poderia se proceder a amplificação com *primers* randômicos selecionados. O segundo grande problema observado foi com relação a comparação dos dados de homologia das seqüências obtidas com aquelas existentes em banco de dados. Devido à escassez de seqüências conhecidas e com funções atribuídas de fitopatógenos bacterianos, há necessidade de dedução sobre estas seqüências. Espera-se que com o sequenciamento do genoma de *X. axonopodis* pv. *citri* a identificação completa do gene possa ser efetuada restando a atribuição funcional dos genes diferenciais no mecanismo de patogenicidade. A confirmação dos clones diferenciais foi efetuada através de hibridização e/ou reação de RT-PCR e apenas dois dos clones (R63 e Q42) ainda não foram confirmados. Dois grandes grupos de proteínas foram consideradas diferenciais: um grupo incluindo as proteínas de membrana e outro proteínas hidrolíticas, além de outras possíveis funções atribuídas aos clones identificados como uma proteína Rep e uma proteína quinase ou mucina. Algumas dessas proteínas, como aquelas envolvidas com o sistema de transporte ABC e maturação do citocromo c, envolvem *clusters* gênicos em outras bactérias, indicando que novos estudos podem ser planejados para confirmar e determinar o papel dessas proteínas e de outras detectadas no presente trabalho.

Conclusões gerais da Parte I e Parte II

Conclusões gerais

No estudo da interação planta-patógeno, uma das estratégias têm sido a identificação de genes induzidos pela planta seguida da investigação de seus papéis na patogenicidade. Portanto, no estudo da interação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e o maracujazeiro, genes desta bactéria foram induzidos pela adição de extrato de folhas da planta ao meio de cultura. A expressão diferencial de genes induzidos pela planta (maracujazeiro) foi detectada em géis de SDS-PAGE.

A identificação de proteínas e mRNAs expressos diferencialmente foram realizadas utilizando-se duas técnicas: análise subtrativa de géis 2D e o display diferencial de RNA.

A análise subtrativa de eletroforeses 2D, foi efetuada através da comparação de mapas de eletroforeses 2D da bactéria crescida em meio MMI (meio basal), MMP (extrato de folhas de maracujazeiro) e MMT (extrato de folhas de tomateiro). Nesta análise, foram detectadas diversas proteínas com alterações em suas intensidades possivelmente causadas pela maior ou menor expressão destes genes em resposta ao tratamento com MMP. No entanto, não foi possível a identificação da função exata das três proteínas seqüenciadas na extremidade N-terminal. Uma proteína não foi seqüenciada pelo bloqueio da extremidade N-terminal

Com a utilização do display diferencial de mRNA foram detectadas diversos genes expressos diferencialmente em função do tratamento com extrato de folhas de maracujazeiro. O problema mais uma vez, foi com relação a identificação correta da função destes genes. Dos onze clones isolados, somente três não apresentaram similaridades com nenhuma seqüência depositada em banco de dados. No entanto, as similaridades encontradas nos outros clones não foram descritas ainda no processo de patogenicidade e o papel desses genes na interação planta-bactéria deve ser ainda determinado futuramente. Para esta etapa, o banco genômico da bactéria, contendo insertos de aproximadamente 3 kb, foi construído e os genes completos estão sendo investigados.

Os resultados indicaram que a detecção de proteínas e mRNAs expressos diferencialmente podem ser observados com relativa facilidade. Dentre os dois métodos utilizados, o display diferencial de mRNA parece ser uma técnica mais sensível, onde pequenas quantidades de transcritos podem ser detectados e isolados para análises. A

confirmação da expressão diferencial foi verificada somente no display diferencial através do RT-PCR utilizando *primers* específicos. Esta técnica, além de confirmar a expressão diferencial com rapidez e facilidade, pode mostrar quantitativamente esta expressão. A situação é diferente com a utilização dos mapas de eletroforeses 2D, onde proteínas produzidas em pequenas quantidades não são detectadas diminuindo assim a sensibilidade deste método.

Nas duas técnicas, houve dificuldades na identificação das funções das proteínas e de mRNAs devido à escassez de informações de genes de fitopatogenicidade, tornando a atribuição funcional de proteínas e de seqüências de DNA bastante duvidosa.

Os resultados obtidos são indicativos que novos genes envolvidas na interação bactéria-planta foram detectados, porém, além da identificação, existe a necessidade de uma melhor caracterização destes genes para a confirmação de suas funções. Espera-se que os dados de seqüenciamento do genoma de *X. axonopodis* pv. *citri*, possam ajudar na identificação desses novos genes e um papel funcional possa ser atribuído a essas proteínas e mRNAs. A aplicação dessas técnicas serão portanto mais úteis quando todo o genoma do organismo for conhecido.

Referências bibliográficas Gerais

- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. & Lipman, D. P. (1990). Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, **215**:403-410.
- Almeida, L. M. G.; Rodrigues Neto, J. & Malavolta Jr., V. A. (1992). Ação de antibióticos “in vitro” contra *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **5ª RAIB-resumos**, Instituto Biológico, São Paulo:6
- Arlat, M.; Gough, C. L.; Barber, C. E.; Boucher, C. & Daniels, M. J. (1991). *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, **4**:593-601.
- Ausubel, F. M. (1994). In: **Current protocols in Molecular Biology**, ppp 4.3.1-4.3.4. Greene & Wiley Interscience, New York.
- Baldini, R. L.; Tahara, S. T. & Rosato, Y. B. (1999). A rolling-circle miniplasmid of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: the nucleotide sequence and its use as a cloning vector. **Plasmid**, **42**:126-133.
- Barber, C. E.; Tang J. L.; Feng, J. X.; Pan, M. Q.; Wilson, T. J. Q.; Slater, H.; Dow, J. M. Williams, P. & Daniels, M. J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, **24**:555-566.
- Basham, Y.; Okan, Y. & Henis, Y. (1987). A possible role for proteases and deaminases in the development of the symptoms of bacterial speck disease in tomato caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, **28**:15-31.
- Bauer, D.; Muller, H.; Reich, J.; Riedel, H.; Ahrenkiel, V.; Warthoe, P. & Strauss, M. (1993). Identification of differentially expressed mRNAs species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Research**, **21**: 4272-4280.
- Beattie, G. A. Lindow, S. E. (1994). Survival, growth, and localization of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* on leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**:3790-3798.
- Beaulieu, C. & Van Gijsegem, F. (1990). Identification of plant-inducible genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Journal of Bacteriology**, **172**: 1569-1575.

- Berian, L. O. S.; Malavolta, V. A.; Rosato, Y. B. & Yano, T. (1998). Serologia aplicada ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp). **Arquivos do Instituto Biológico**, **65**:25-33.
- Bertioli, D. J.; Schlichter, U. H. A.; Adams, M. J.; Burrows, P. R.; Steinbib, H-H & Antoniow, J. F. (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. **Nucleic Acids Research**, **23**:4520-4523.
- Blankenhorn, D.; Philips, J. & Slonczewski, J. L. (1999). Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, **181**:2209-2216.
- Blum, H.; Beier, H. & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-95.
- Bonas, U.; Stall, R. E. & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas*. **Molecular and General Genetics**, **218**: 127-136.
- Bonas, U.; Schultze, R.; Fenselau, S.; Minsavage, G. V.; Staskawicz, B. J. & Stall, R. E. (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**:81-88.
- Bonas, U. & Van den Ackerveken, G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases. **Plant Journal**, **12**:1-7.
- Bonas, U. & Van den Ackerveken, G. (1999). Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. **Current Opinion in Microbiology**, **2**:94-98.
- Boucher, C. A.; Van Gijsegem, F.; Barberis, P. A.; Arlat, M & Zischeck, C. (1987). *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensibility on tobacco are clustered. **Journal of Bacteriology**, **169**:5626-5636.
- Bradbury, J. F. (1984). *Xanthomonas* Dowson (1939). In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol.1 (N. R. Krieg & J. C. Holt, eds.) Baltimore, The Williams & Wilkins Co. pp.199-210.
- Bairoch, A. (1993). The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current

- status. **Nucleic Acids Research**, **21**:3097-3103.
- Chervaux, C. & Kolland, I. B. (1996). Random and directed mutagenesis to elucidate the functional importance of helix II and F-989 in the C-terminal secretion signal of *Eschechia coli* hemolysin. **Journal of Bacteriology**, **178**:1232-1236.
- Collmer, A. & Bauer, D. W. (1994). *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas syringae*: Plant pathogens trafficking in extracellular virulence proteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **192**:43-78.
- Cooksey, D. A.; Azad, H. R.; Cha, J-S. & Lim, C-K. (1990). Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**:431-435.
- Cooksey, D. A. (1993). Copper uptake and resistance in bacteria. **Molecular Microbiology**, **7**:1-5.
- Cordwell, S. J. & Humphery-Smith, I. (1997). Evaluation of algorithms used for cross-species proteome characterisation. **Electrophoresis**, **18**:1410-1417.
- Dahler, G. S.; Barras, F. & Keen, N. T. (1990). Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases of *Erwinia chrysanthemi* EC16. **Journal of Bacteriology**, **172**:5803-5815.
- Dangl, J. L. (1994). The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **192**:99-150.
- Daniels, M. J.; Barber, C. E.; Turner, P. C.; Sawczyc, M. K.; Byrde, R. J. W. & Fielding, A. H. (1984). Cloning of gene involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **EMBO Journal**, **3**:3323-3328.
- Daniels, M. J.; Collinge, D. B.; Dow, J. M.; Osbourn, A. E.; Roberts, I. N. (1987). Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, **25**:353-359.
- De Mot, R. & Vanderleyden, J. (1989). Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, **35**: 960-967.
- De Feyter R.; Mcfadden, H. & Dennis, L. (1998). Five avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* cause genotype-specific cell death when expressed transiently in cotton. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **11**:698-701.

- Derbyshire, K. M.; Hatfull, G. & Willetts, N. (1987). Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: A genetic and DNA sequence analysis of the mobilization region. **Molecular and General Genetics**, **206**:161-168.
- Dias, S. C. & Takatsu, A. (1987). Ocorrência de bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* sp.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, **12**:140.
- Dias, S. C. & Takatsu, A. (1990). Translocação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* nos tecidos do hospedeiro e sua detecção nas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, **15** :131.
- Dow, J. M.; Clarke, B. R.; Milligan, D. E.; Tang, J. L. and Daniels, M. J. (1990). Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**:2994-2998.
- Dow, J. M.; Fan, M. J.; Newman, M.-A. & Daniels, M. J. (1993). Differential expression of conserved protease genes in crucifer-attacking pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**:3996-4003.
- Dow, J. M. & Daniels, M. J. (1994). Pathogenicity determinants and global regulation of pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Current Topics in Microbiology**, **192**:29-41.
- Dow, L. M.; Feng, J.-X.; Barber, C. E.; Tang, J.-L. & Daniels, M. J. (2000). Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, **146**:885-891.
- Duan, Y. P.; Castañeda, A. Zhao, G.; Edrdo, G & Gabriel, D. W. (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **12**:556-560.
- Ellingboe, A. H. (1982). Genetical aspects of active defense. Pages 179-192. In: **Active defense mechanisms of plants**, Proceeding NATO Conference, Cape Sounion, Greece, ed. R. K. S. Wood. Plenum Press, New York.
- Fernandez-Gonzales, F.; Kittredge, K. L.; Rayborn, M. E.; Hollyfield, J. G.; Landers, R. ^a; Saha, M & Grainger, R. M. (1993). **Journal Cell Science**, **105**:7-21.
- Fislag, R.; Berceanu, M.; Humboldt, Y.; Wendt, M. & Oderender, H. (1997). Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. **Nucleic Acids Research**,

25:1830-1835.

- Fleming J. T.; Yao, W-H. & Sayler G. S. (1998). Optimization of differential display of prokariotic mRNA: Application to pure culture and soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**:3698-3707.
- Flengsrud, R. & Skjeldal (1998). Two-dimensional gel electrophoresis separation and N-terminal sequence analysis of proteins from *Clostridium pasteurianum* W5. **Electrophoresis**, **19**:802-806.
- Fujimoto, D. K.; Leach, J. E. & Vidaver, A. K. (1991). Identification of protease genes from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**, **81**:1188.
- Gabriel, D. W. & Rolfe, B. G. (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, **28**:365-391.
- Gabriel, D.W., Yuan, Q.; Yang, Y. & Chakrabarty, P.K.(1996). Role of nuclear localizing signal sequences in three disease phenotypes determined by *Xanthomonas avr/pth* gene family. In **Biology of Plant-Microbe Interactions**, G. Stacey; B. Mullin & P.M.Gresshoff (eds), International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, USA.
- Genin, S.; Gough, C. L.; Zischek, C. & Boucher, C. A. (1992). Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Microbiology**, **6**:3065-3076.
- Gonçalves, E. R. (1996). Caracterização de um clone *hsv* e obtenção de mutantes não patogênicos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Tese de Mestrado. Unicamp. Campinas, S. P. Brasil- 137p.
- Gonçalves, E. R. & Rosato, Y.B. (2000). Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflorae* spp) and their relatedness to other *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, **50**:811-821.
- Guerreiro, N.; Redmond, J;W.; Rolfe, B.G. & Djordjevic, M.A. (1997). *New Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **10**:506-516.
- Gopalan, S.; Gauer, D. W.; Alfano, J. R.; Loniello, A. O.; He.; S. Y. & Collmer, A. (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells

- alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitivity cell death. **Plant Cell**, **8**:1095-1105.
- Goormachtig, S.; Valerio-Lepiniec, M.; Szcajglowski, K.; van Montagu, M.; Holsters, M. & de Bruijn, F.J. (1995). Use of differential display to identify novel *Sesbania rostrata* genes enhanced by *Azorhizobium caulinodans* infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **8**:816-824.
- Hara, H.; Yamamoto, Y.; Higachitami, A.; Suzuki, H. & Nishimura, Y. (1991). Cloning, mapping, and characterization of the *Escherichia coli* *prc* gene, which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3. **Journal of Bacteriology**, **173**:4799-4813.
- He, S. Y. (1998). Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, **36**:363-392.
- Hecker, M.; Heim, C.; Volker, U. & Wolfel, L. (1988). Induction of stress proteins by sodium chloride treatment in *Bacillus subtilis*. **Archive of Microbiology**, **150**:564-566.
- Hecker, M. & Volker, U. (1990). General stress proteins in *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology and Ecology**, **74**:197-214.
- Hoehne, F. C. (1946). **Frutas indígenas**. Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil. 88 pp. Instituto de Botânica, Pub. Série D.
- Hu, N. T.; Hung, M.; Chiou, S.; Tang, F.; Chiang, D.; Huang, H. & Wu, C. (1992). Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Journal of Bacteriology**, **174**: 2679-2687.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**:379-433.
- Hwang, I.; Lim, S M. & Shaw, P. D (1992). Cloning and characterization of pathogenicity genes from *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* **Journal of Bacteriology**, **174**:1923-1931.
- Jenkins, D. E.; Auger, E. A. & Martin, A. (1991). Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. **Journal of Bacteriology**, **173**:1992:1996.

- Jones, P. G; & Inouye, M. (1994). The cold shock response-a hot topic. **Molecular Microbiology**, **11**:811-818.
- Joosten, M. H. A. J. Cozijnsen, T. J. & De Wit, P. J. M. (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. **Nature**, **367**:384-386.
- Jungblut, P. & Wittmann-Liebold, B. (1995). Protein analysis on a genomic scale. **Journal of Biotechnology**, **41**:111-120.
- Kamoun, S. & Kado, C. I. (1990). A Plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an extracellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. **Journal of Bacteriology**, **172**:5165-5172.
- Kearney, B. & Staskawicz, B. J. (1990). Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. **Nature**, **346**:385-386.
- Kemner, J. M.; Liang, X. & Nester, E. W. (1997). The *agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. **Journal of Bacteriology**, **179**:2452-2458.
- Kuroda, N. H. (1981). Avaliação do comportamento quanto à resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a *Xanthomonas passiflorae* Pereira. Dissertação de graduação. FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP., Brazil, 47pp.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-685.
- Leach, J. E. & White, F. F. (1996). Bacterial avirulence genes. **Annual Review of Phytopathology**, **43**:1479-1488.
- Leite Jr, R. P.; Egel, D. S. & Stall, R. E. (1994). Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**:1078-1086.
- Leyns, F.; DeCleene, M.; Swings, J. G. & Deley, J. (1984). The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review**, **50**:308-356.
- Liang, P. Averboukh, L. & Pardee, A. B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. **Nucleic Acids Research.**, **21**:3269-3275.
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by

- means of polymerase chain reaction. **Science**, **257**:967-971.
- Lindgren, P. B. (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Annual Reviews of Phytopathology**, **35**:129-152.
- Loh, J., Garcia, M.; Yuen, J. & Stacey, G. *nod* gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. (1996). In: Biology of plant-microbe interactions ed. Stacey, G.; Mulli, B. & Gresshoff, M. St. Paul, Minnesota, USA, 307-312.
- Malavolta Jr, V. A. (1998). **Doenças bacterianas**. In: Rugiero, C. (Ed) Maracujá do plantio à colheita. Jaboticabal: FUNEP, p.217-229.
- Marasco, R.; Varcamonti, M.; Ricca, E. & Sacco, M. (1996). A new *Bacillus subtilis* gene with homology to *Escherichia coli* *prc*. **Gene**, **183**:149-152.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto PVDF membranes. **Journal Biology Chemistry**, **262**: 10035-10038.
- McCammon, S. L.; Coplin, D. L. & Rowan, R. G (1985). Isolation of avirulent mutants of *Erwinia stewartii* using bacteriophage Mu pf7701. **Journal General Microbiology**, **131**:2993-3000
- McNellis, T. W.; Mudgett, M. B.; Li, K.; Aoyama, T.; Horvath, D.; Chua, N. H. Staskawicz, B. J. (1998). Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. **Plant Journal**, **14**:247-257.
- Meezaman, D.; Charles, P.; Daskal, E.; Polymeropoulos, M. H.; Martin, B. M. & Rose, M. C. (1994). Cloning and analysis of cDNA encoding a major airway glycoprotein, human tracheobronchial mucin (MUC5) **Journal Biology Chemistry**, **269**:12932-12939
- Mellano, V. J. & Cooksey, D. A. (1988). Development of host range mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Applied and Environmental Microbiology**, **54**:884-889
- Meury, J. & Kohiyama, M. (1991). Role of heat shocks protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **173**:4404-4410.
- Midland, S. L.; Keen, N. T.; Sims, J. J.; Midland, M. M.; Staylon, M. M.; Burton, V.; Smith, M. J.; Mazzola, E. P.; Graham, K. L. & Clardy, J. (1993). The structures of syringolides 1 and 2, novel C-glycosidic elicitors from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Journal of Organic chemistry**, **58**:2940-2945.

- Minsavage, G. V.; Canteros, B. I. & Stall, R. E. (1990). Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, **80**:719-723.
- Nishio, Y.; Aiello, L. P. & King, G. L. (1994). Glucose induced genes in bovine aortic smooth muscle cells identified by mRNA differential display. **FASEB Journal**, **8**:103-106.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal Biology Chemistry**, **250**:4007-4021.
- Osbourn, A. E.; Barber, C. E. & Daniels, M. J. (1987). Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* using a promoter-probe plasmid. **EMBO Journal**, **6**:23-28.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. **Proceeding of Natural Academic of Science USA**, **85**:2444-2448.
- Pereira, A. L. G. (1969). Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, **36**:163-174.
- Peruch, L. A. M.; Schroeder, A. L.; Bertolini, E. & Calvette, K. (1997). Ocorrência da mancha oleosa do maracujá no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, **22**:237.
- Piza Jr., C. T. (1966). **Cultura do maracujá. Departamento de Produção Vegetal da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo**, SP, Brasil, p. 102 (Série Boletim Técnico).
- Reid, W. D. (1938). Grease spot of passion fruit. New Zeland . **Journal of Science and Technology**, A XX e, 260-265.
- Richmond, C. S.; Glasner, J. D.; Mau, R.; Jin, H. & Blattner, F. R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* k-12. **Nucleic Acids Research**, **27**:3821-3835.
- Ried, J. L. & Collmer, A. (1988). Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **1**:32-38
- Rosato, Y. B.; Destefano, S. A. L. & Daniels, M. J. (1994). Cloning of a locus involved in pathogenicity and production of extracellular polysaccharide and protease in *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. **FEMS Microbiology Letters**, **117**:41-46.

- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schell, M. A.; Roberts, D. P. & Denny, T. P. (1988). Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonate encode by *pglA* and its involvement in pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, **170**: 4501-4508.
- Schulte, R. & Bonas, U. (1992). Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **Journal of Bacteriology**, **174**:815-823.
- Seal, S. E.; Cooper, R. M. & Clarkson, J. M. (1990). Identification of a pathogenicity locus in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular and General Genetics**, **222**:452-456.
- Shaw, J. L.; Settles, L. G. & Kado, C. I. (1988). Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a nonpathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **1**:39-45.
- Shepard, B. D. & Gilmore, M. S. (1999). Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, **65**:1470-1476.
- Simon, J.; Gross, R.; Einsle, O.; Kroneck, P. M.; Kroger, A. & Klimmek, O. (2000). A NapC/NirT-type cytochrome c (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome c nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. **Molecular Microbiology**, **35**:686-96
- Slater, H. (1999). The regulation of pathogenicity factor production in *Xanthomonas campestris* by a small diffusible molecule. PhD thesis, University of East Anglia In: Dow, L. M.; Feng, J.-X.; Barber, C. E.; Tang, J.-L. & Daniels, M. J. (2000). Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, **146**:885-891.
- Small, D.; Levenstein, M.; Kim, E.; Carow, C.; Amin, S.; Rockwell, P.; Witte, L.; Burrow, C.; Ratajczak, M. Z.; Gewirtz, A. M. & Civin, C. I. (1994). STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. **Proceeding of National**

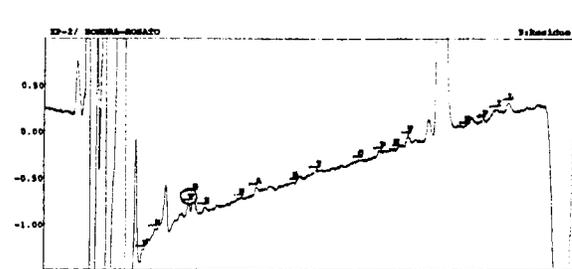
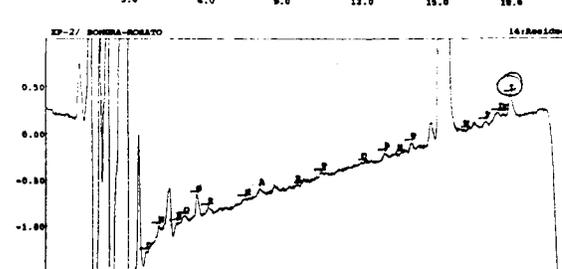
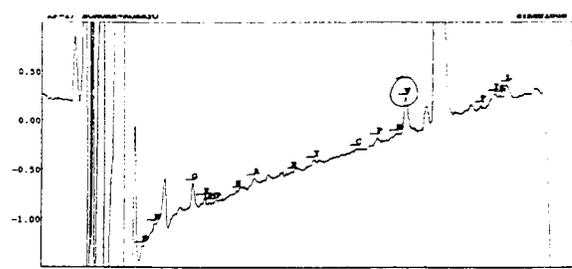
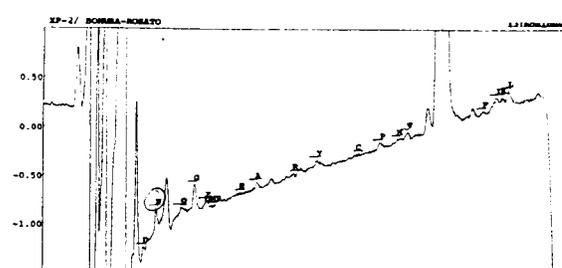
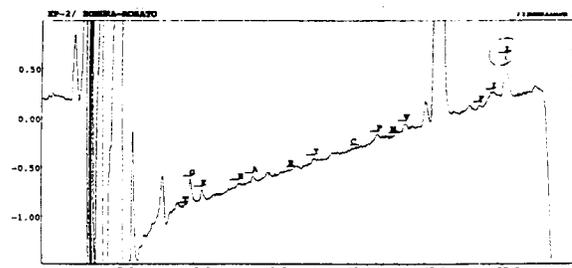
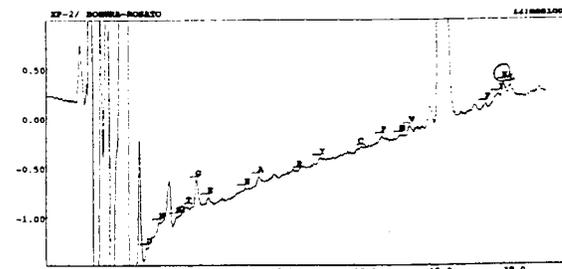
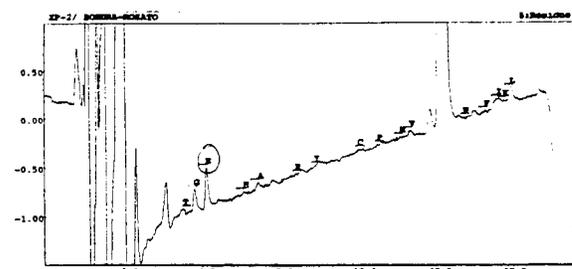
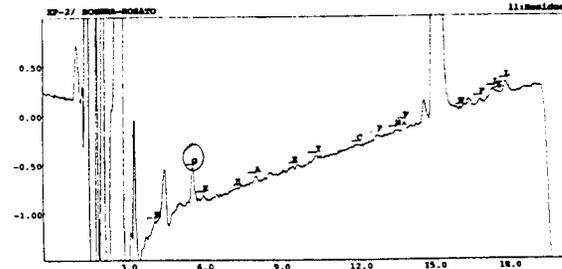
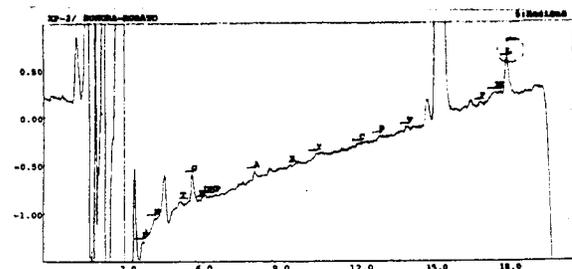
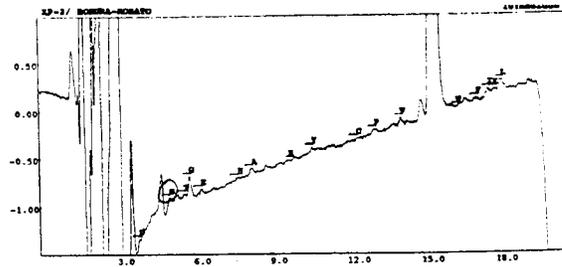
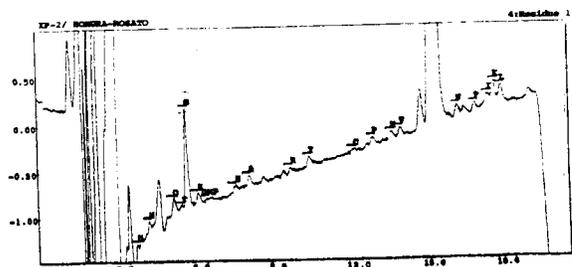
- Academic of Science**. U.S.A. **91**:459-463
- Smith, M. J.; Mazzola, E. P.; Sims, J. J.; Midland, S. L.; Keen, N. T.; Burton, V. & Staylor, M. M. (1993). The syringolides: Bacterial C-glycosyl lipids that trigger plant disease resistance. **Tetrahedron Letter**, **34**:223-226.
- Sow, P. & Demain, A. L. (1979). Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied and Environmental of Microbiology**, **31**:1186-1192.
- Sousa, J. S. I. & Meletti, L. M. M. (1997). In: **Maracujá: espécies, variedades e cultivos**. Ed Sousa, J. S. I. & Meletti, L. M. M., v. 3, Piracicaba: FEALQ 179p.
- Stevens, C.; Bennett, M. A.; Athanassopoulos, E.; Tsiang, G.; Taylor, J. D. & Mansfield, J. W. (1998). Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* leads to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. **Molecular Microbiology**, **29**:165-177.
- Swarup, S., R. De Feyter, R. H. Brlansky, and D. W. Gabriel. (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology**, **81**: 802-809.
- Swarup, S. Yang, Y., Kingsley, M. T. & Gabriel, D. W. (1992). An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-Microbe interactions**, **5**:204-213.
- Swason, J.; Kearney, B.; Dahlbeck, D. & Staskawicz, B. (1988). Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race change mutants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **1**:5-9.
- Taguchi, F.; Yamamoto, Y.; Inagaki, N. & Satoh, K (1993). Recognition signal for the C-terminal processing protease of D1 precursor protein in the photosystem II reaction center. An analysis using synthetic oligopeptides. **FEBS Letter**, **326**:227-231.
- Tang, J. L.; Liu, Y. N.; Barber, C. E.; Dow, J. M.; Wootton, J. C. & Daniels, M. J. (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Molecular and General Genetics**, **226**: 409-417.
- Teixeira, C. G. (1994). Cultura. In: **Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e**

- aspectos econômicos**, p. 1-142. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP., Brasil, Série Frutas Tropicais, 9.
- Thöny-Meyer, L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **61**:337-376.
- Tomb, J-F.; White, O.; Kerlavage, A. R. Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Kerchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. R. Peterson S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; Mckenney, K.; Fitzgerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Hickey, E. K.; Berg, D. e.; Gocayne, J.D.; Utterback, T. R.; Peterson, J. D.; Kelley, J. M.; Cotton, M. D.; Weidman, J. M.; Fujii, C.; Bowman, C.; Watthey, L.; Wallin, E.; Hayes, W. S.; Borodovsky, M.; Karp, P. D.; Smith, H. O.; Fazer, C. M & Veter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, **388**:539-547.
- Torres F^o, J. & Ponte, J. J. (1994). Estudo sobre o controle da Bacteriose ou “Morte Precoce” (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**. **18**:34-38.
- Van den Ackerveken, G.; Marois, E. & Bonas, U. (1996). Reconition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. **Cell**, **87**:1307-1316.
- Van Kan, J. A. L. Van den Ackerveken, G. & Wit, P. J. G. M. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**:52-59.
- Vauterin, L.; Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **45**: 472-489.
- Volker, U.; Engelmann, S.; Maul, B.; Riethdorf, S.; Volker, A.; Schmid, R.; Mach, H. & Hecker, M. (1994). Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, **140**: 741-752.
- Wandersman, C. (1996). **Secretion across the bacterial outer membrane**, p. 955-966. In: F. C. Neidhardt, R. CustrissIII, JL Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, M. Riley, W. S., Resnikoff, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington.

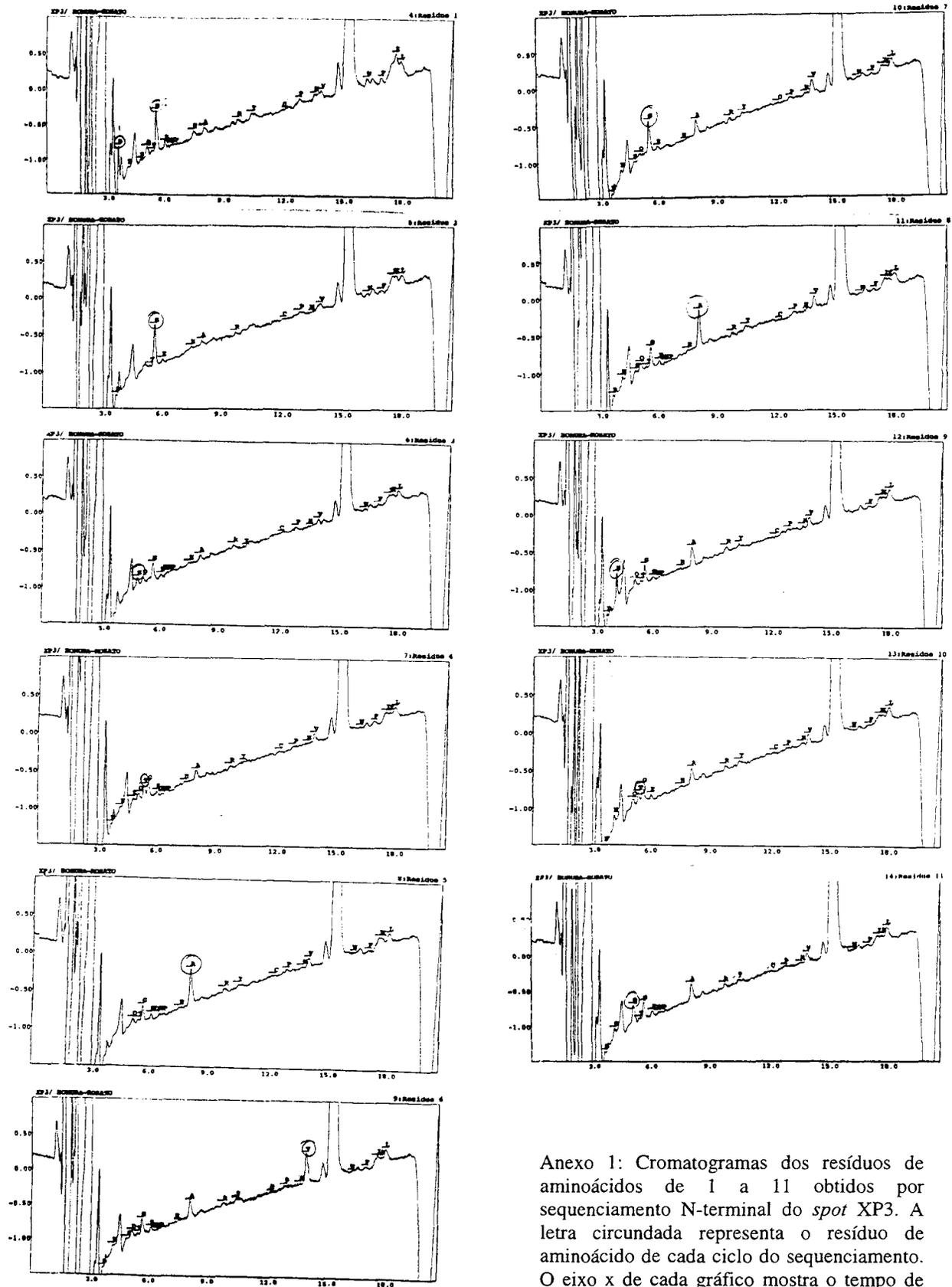
- Waney, V. R.; Kingsley, M. T. & Gabriel, D. W. (1991). *Xanthomonas Campestris* pv. *translucens* genes determining host-specific virulence and general virulence on cereals identified by Tn5-gusA insertion mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**:623-627.
- Way, S. S.; Sallustio, S.; Magliozzo, R. S. & Godberg, M. B. Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome *bd* expression on *Shigella flexneri* virulence. *Journal of Bacteriology*, **181**:1229-1237.
- Welsh, J.; Chada, K.; Dalai, S. S.; Cheng, R.; Ralph, D. & McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, **20**:4965-4970.
- Wendland, A. Leite Jr, R. P. & Ueno, B. (1997). Diversidade do perfil de DNA plasmidial de *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae* que causa bacteriose em maracujazeiro. **Suplemento da Fitopatologia Brasileira**, **22**:239.
- Wengelnik, K. & Bonas, U. (1996). *hrpX*, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, **178**:3462-3469.
- Wengelnik, K.; Van den Ackerveken, G., & Bonas, U. (1996). *hrpG*, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**:704-712.
- Wheeler, C. H.; Berry, S. L.; Wilkins, M. R.; Corbett, J. M.; Ou, K.; Gooley, A. A.; Humphrey-Smith, I.; Williams, K. L. & Duan, M. J. (1996). Characterisation of proteins from two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry and amino acid compositional analysis. **Electrophoresis**, **17**:580-587.
- Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D. Ou, K. & Golaz, O. (1996). From proteins to proteome: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio/Technology**, **14**:61-65.
- Wilkins, M. R.; Gasteiger, E.; Tonella, Ou, K.; Tyler, M.; Sanchez, J.-C.; Gooley, A. A. Wals, B. J. ; Bairoch, A.; Appel, R. D.; Williams, K. L. & Hochstrasser, D. F. (1998). Protein identification with N and C-terminal sequence tags in proteome projects. **Journal of Molecular Biology**, **278**:599-608.
- Winderickx, J. & Castro, I. M. (1994). In: **Practical course in molecular biology of**

- microorganisms**, pp 59-63. Universidade Federal de Ouro Preto, MG.
- Wilson, T. J. G.; Bertrand, N.; Tang, J.-L.; Feng, J.-X.; Pan, M.-Q.; Barber, C. E.; Dow, J. M. & Daniels, M. J. (1998). The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an acetylase. **Molecular Microbiology**, **28**:961-970.
- Wong, K. W. & McClelland, M. (1994). Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. **Proceeding Natural Academic Science USA**, **91**:639-643.
- Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G. & Cairney, J. (1997). Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: Mass cloning and characterization of differentially expressed genes from loblolly pine embryos. **Plant Molecular Biology Reporter**, **15**:377-391.
- Yamashiro, T. (1987). Principais doenças do maracujazeiro amarelo no Brasil. In: **Maracujá**. C. Ruggiero (ed.), pp 146-149. Legis Summa, Ribeirão Preto, SP., Brasil.
- Yang, Y. & Gabriel, D. W. (1995). *Xanthomonas* avirulence pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **8**:627-631.
- Young, J. M.; Saddler, G. S.; Takikawa, Y.; De Boer, S. H.; Vauterin, L.; Gardan, L.; Gvozdyak, R. J. & Stead, D. E. (1996). **Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995**. Review of Plant Pathology, **75**:721-763.
- Yura, T.; Nagai, H. & Mori, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, **47**:321-350.
- Zimmermann, J. W. & Schultz, R. M. (1994). Analysis of gene expression in the pre implantation mouse embryo: use of mRNA differential display. **Proceeding of Natural Academic of Science USA**, **91**:5456-5460.

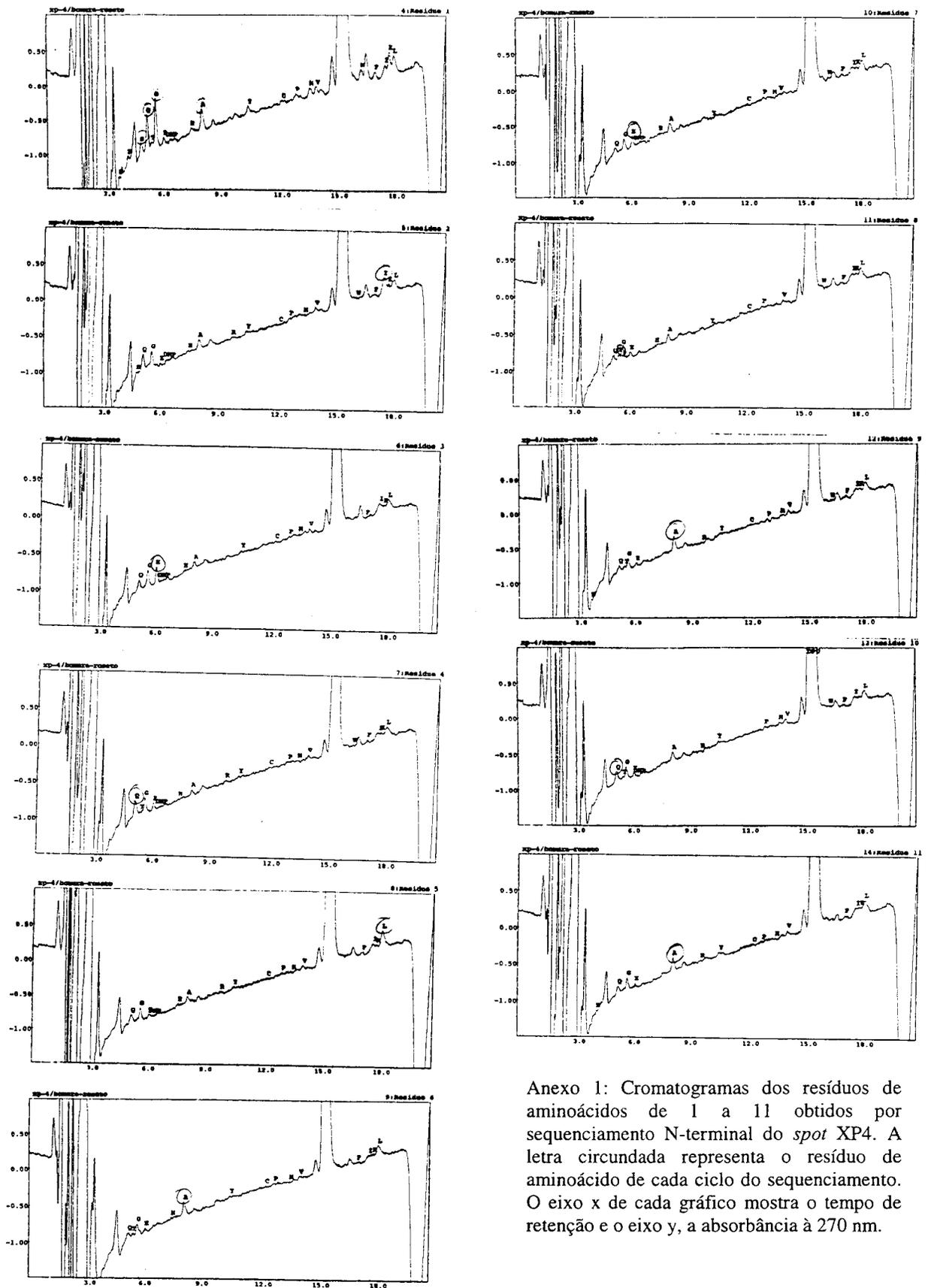
Anexo 1



Anexo 1: Cromatogramas dos resíduos de aminoácidos de 1 a 11 obtidos por sequenciamento N-terminal do spot XP2. A letra circundada representa o resíduo de aminoácido de cada ciclo do sequenciamento. O eixo x de cada gráfico mostra o tempo de retenção e o eixo y, a absorvância à 270 nm.



Anexo 1: Cromatogramas dos resíduos de aminoácidos de 1 a 11 obtidos por sequenciamento N-terminal do *spot* XP3. A letra circundada representa o resíduo de aminoácido de cada ciclo do sequenciamento. O eixo x de cada gráfico mostra o tempo de retenção e o eixo y, a absorbância à 270 nm.



Anexo 1: Cromatogramas dos resíduos de aminoácidos de 1 a 11 obtidos por sequenciamento N-terminal do *spot* XP4. A letra circundada representa o resíduo de aminoácido de cada ciclo do sequenciamento. O eixo x de cada gráfico mostra o tempo de retenção e o eixo y, a absorbância à 270 nm.

Anexo 2

Anexo 2: Sequências de nucleotídeos dos clones isolados do RAP-PCR. A coluna 1 se refere ao primer utilizado para na reação de RAP-PCR. A coluna 2 mostra o clone e o n° de bases que foram sequenciados de cada clone. A coluna 3 mostra a sequencia de nucleotídeos de cada clone. Nesta coluna foram sublinhadas as sequências dos primers que foram utilizados no RT-PCR com primers específicos.

| primer | clone | sequência |
|--------|---------------|--|
| OPR6 | R63 (581n) | GTCTACGGCAAACAACACCGAGGCCAAGACCGATAAAACAACACCTTTAGACAC ACTGTCCCTCGCGAAAGCTGATTTTTACAGAAGAAGGGGAACCTAGGTGGGGAAT ATAGGGTTTCGTGACACTCTTTGTCACGCCGATTACAACATTTAATGGAACACC TTCCCTACCCCGTGCCACACAAGTATGACTTTTCGCGGCTAGCATGACTGCGCT TGGTTTTGCATGGAAAGTTTTGCATGGCTTATTAATGCTCTGCAAAAAACATCA ACTAATGGAAATAAGTTAGTAAGCGCGACTTTGGTGGGCGTCATCATTGCGTGA TGATAACCATGGCTCTGGCAAGGAGTGGTTCANAAGGGTTCAGACTAAGACAT TAGATAATGAGGTCCACTCTATGCATGGCATTTCGCCCTATTATGGCTCTTACC TGCTACCTTCAACGTTTGCCCGGCATTATAGGCAGGTTTCGGCGAAAGCGTTCCG TTTCCAAANGGACACACCGTCTGGAAAAACTTGAACCTATAAGACTTTTTTC GAGTCGGCNCAGGGATACAACACNNGGGTCTCACGGNGG |
| | R64 (300n) | GTCTACGGCAAAATATTATTTAATCTGGTTTCTTGTTTACTTATTCTATTTTCC ATGTGCGTGGTTTTTTATAAAAACTTTTATTGTATTAACAAGAAAAACAATAA CATAAAGAAAATCAATCAGAAAGCAAAAATAAACTAAAAATTTAGAGAAAACAA AATAAACCACTCATTTTTAAAAAATAATATATTTCTTCTTTACAACATCTATT TTTCTCGTACTGGCGCCACTCCGAGCCCAGCGTCTGCTTCCAGTCGGTATTGG CCTTGATGCCGTAGAAATCGAATTCCTGCAC |
| | R65 (288n) | GTCTACGGCATCAAGGNTNATACCCGACTGGAAGCAGACNCTGGGCTCGGAGTG GCGCCAGTACGAGGAAAAATAGATGTTGTAAAGAAGAAATATATTTTTTTTA AAAATGAGTGGTTTTATTTTGTTTTCTCTAAATTTTAGTTTATTTTTGCTTTCT GATTGATTCCTTTATGTTATTGTTTTTCTTGTTTAAATAACAATAAAAGTTTTTA TAAAAAAGACGCACATGGAAAAATAGAATAAGTAAACAAGAAACGAGATTAAT AATATTTTGCCGTAGAC |

| primer | Clone | sequência |
|--------|----------------|--|
| OPP1 | P13 (384 n) | GTAGCACTCCAAGAGTACGTATGTGAACAAAGCGCTTACTTTTTACTTCCTTATA AATTACTTCATTTTTATCCAGCATTGATAGGACTAATGACGTATCANANCTATC CTTATTTTCTCGGAAGATCGTGATATATCAATTAATGGTAGCTGTGGGGTAGAG TTGTTAATTCAGTACGTATACTTGGCCTTTATTATCTAGCTGTGTGTGGCGTTT AAGATTTACATTCGTTTTGTGCCATTGTCGATCTTCCCTTTCACATTCCTCAAGTCG TCGTAGCTTGCTTAGGACCGCGTTTTATTTGCTCCGTTCTATATTTTCGTGGT TACATTTTATTTCTTTTTTCTACCCCTTTTGCTTATTACCTATGGAGTGCTAC |
| | P21 (260n) | GTAGCACTCCATTACCGAAATGAGGCTGGGGCTTGTGCGTGCTCGCGAGTCGTTTC GTCTTACTGGCCGAGCAATGGGTAGCAAGCCAANCGTTTGATGATTCGGTGGCG TAGGCGAAAGCGGGGCGCTCGGAAAAGATGCCCCGCCACGGCAAAGATTA AAATGTAGTGATGAAATTTGGGAGGCAGTCACTAATAAAATGTAGGTTATTAAGAG TAAGTAGTATTATTAATTATAGTGTTTTGGGAGTGCTAC |

Continuação do anexo 2: Sequências de nucleotídeos dos clones isolados do RAP-PCR. A coluna 1 se refere ao primer utilizado para na reação de RAP-PCR. A coluna 2 mostra o clone e o nº de bases que foram sequenciados de cada clone. A coluna 3 mostra a sequência de nucleotídeos de cada clone. Nesta coluna foram sublinhadas as sequências dos primers que foram utilizados no RT-PCR com primers específicos

| primer | Clone | sequência |
|--------|---------------|--|
| OPQ4 | Q42 (186n) | CCCTTTGNNGGGGGCCCNNTAGAGTACAGAAGCCCCTTGGAAANCGCCCCGGGAGC TTTGNCAAAAAGGTCCCCNNGCNGGCGGAGCGCGAANTTTNTAGTGANCGAATTGN NATACGANTTTTTTAGGGCCNGAAACNNGGGGGGAGCCACGGGGGGNACACTAANN GGGGN |
| | Q43 (225n) | AGTGCGCTGAGATAAAATAGAATGAGCACAGCTTGCATAATACTCGCAATTTCTAA CGGAATTTCTGTATTACGCTCCAGCCCCATCGCTCCTGTTTGCAAAGCGGCAAGT AAAAGAGACGTANAAACAATGCCGATCGGATTCGAGTTTGCTAACAGAGCAGNCA TCACTCCAGTCCACGCATATCCAGGAACCGTCAGCGCACT |

| primer | Clone | sequência |
|--------|----------------|--|
| OPQ5 | Q515 (481n) | TTACATCACAGCTGCCATGATGAGATGCGCATTGATCACTGATGCAATGGGGCCA CGCAGGGCTTTCATCTCCGTGCCCTGCTCCCTGCTGGCATCGAACTCAGCACA AGCCCCGCTCCCCAGCCCTTTGGCATCGACTTTTCTGGCAGACATGAGTAGATGC ACATGATGATTGCGCTGGTCTCCTCTTCGACCAGGTGAGTGAACAGCCACCAGCA CAGCAGCTTGATACCGATCGACAAGGAGCTGGCCAAGATCGAGGGCAAGCGCCTT GCGTTGCAGTGCATCTAGACTGTTGGGTAAGGAACTTCGACTTCTCTTGCCACG CGAGCATTTGCTCTCGTCTCTGGTGCTCATTAATATCCCAGAAGCTTCGAACATC GAAACACCATCTCGGGCTCATCGGGAGCAAGCATTTGTTGTGAGACAACGCCCGA TCTTTTCCATATTTGGCGCCGCTTGGAGTTGATCCCGCAGA |
| | Q52 (413n) | GAATNGATCACAGCTGCATGATGAGATGCGCATTGATCACTGATGCAATCTTCCC ACGAGGGCTTTCATCTCCGTGGCCCTGCTCCCTGCTGGCATCGAACTCAGCACA ACCCGTCCCCAGCCCTTTGGCATCGACTTTTCTGGCAGACATGAGTAGATGCAC ATGATGATTGCGCTGGTCTCCTCTTCGACCAGGTGAGTGAACAGCCACCAGCACA GCAGCTTGATACCGATCGACAAGGAGCTGGCAAGATCGAGGGCAAGCGCCTTGGC TTGCAGTGCATCTAGACTGGTGGGTAAGGAACTTCACTCTCTTGACGCGAGCA TTTGCTCTCGTCTCTGTGCTCATTAATATCCANAAGCTCGAACATCGAAACACC ATCTCGGGNTTCATCGGGAGCAAGCATT |

Continuação do anexo 2: Sequências de nucleotídeos dos clones isolados do RAP-PCR. A coluna 1 se refere ao primer utilizado para na reação de RAP-PCR. A coluna 2 mostra o clone e o n° de bases que foram sequenciados de cada clone. A coluna 3 mostra a sequência de nucleotídeos de cada clone. Nesta coluna foram sublinhadas as sequências dos primers que foram utilizados no RT-PCR com primers específicos

| primer | Clone | sequência |
|--------|----------------|--|
| OPQ7 | Q723 (539n) | <u>TTCCCGATGGTAAGCATATATAAACCAACAATCGCCGACATTT</u> CGTTAATGGTCCG TAAGCTGATCGACGAATTTTCCAACATTATTCCTGTTCTTTTCATTGGTAATGCT GAATAAAATAAGCACCAGCAAACCAAGAAATGCGCTCAGCCCCGATAAACCCGTAG CTGGCGGTAATCACGGCACGTGGATAAGCAGCCAATATGATTTCAGCACGGGAAC CAGGTTGGTAATTTCAGGATTCATCCAGTTGAGGTGGNCACAAAAAGAGTGATTC CGGCCATGAATGCGGCAGTACCAATCACCAACGGATATTTACGCCCAAAAATCAA TCCGGCCAGCATGGAAGCCCAGGCCACATAAATCATCGACTCGTACCGTGTTCAG GTTNATGTCCCGAACATCCAGCGCATGATAAGTCTTCGGATGAATCAAAATCCAG ATATGACCCATCAATGGATATTNAAGNATTATTAATCGTTTCTGCTGAAATATTC AACATCCAAAAGAAGCGTNTTCAACACAATAATAGGATCCGTA |
| | Q725 (460n) | <u>CCCCGATGGCCACAGCTATCACATTAATTACCACAGCTGTATCGTTTGGACATTA</u> AACTGCACTCCTATCCCGTCAAAATGCCCCTGAAGCTGTTTCATCGGCGCTTTTTTA ACTCCTTTGGAGAAAGGTAACCTGAATGTGGATCAAGTTTTTGAAGAATATAGGG TATTGCCTCCTCCGTAACCTCCCTGTAGTTAACGGTATCAACATAGTTTGCCTCA ACCTGTGAGAGAATTAGCATAAGTTTTATCCCATCTTCCTGCAGTCAGTTTCAGCT CCTGAGATCTCCTGTAGTCATAATATAAATTTAAACGGAAACTGCTCCCAAAGGA AGACAATTATAAGTATTGGCCATGGATTAGACCTGAATCTTTCAGTTATTTTACT CATAATCCATTGTGTTAATCTATAAAGTTTACAACCTCGATAAAAGCCTTTGAAA <u>GCAGGTCAACACCATCGGGG</u> |