

**DISRUPÇÃO DAS ORFS XF-810, XF-818, XF-1940, XF-2359
E XF-2708 DE *Xylella fastidiosa*-CVC POSSIVELMENTE
RELACIONADAS À PATOGENICIDADE DA BACTÉRIA**

SIMONE GUIDETTI GONZALEZ
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profa. Dra. **HELAINÉ CARRER**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Junho – 2004

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

Guidetti Gonzalez, Simone
Disrupção das ORFs Xf-810, Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 de *Xylella fastidiosa* -
CVC possivelmente relacionadas à patogenicidade da bactéria / Simone Guidetti
Gonzalez. – Piracicaba, 2004.
113 p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas – Patogenicidade 2. Clorose variegada dos citros 3. Enzima
microbiana 4. Transformação genética I. Título

CDD 589.9

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

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê:	Leia-se:
xvi	11	... <i>primer</i> “reverse” que é complementar à porção 3’ do gene	... <i>primer</i> “reverse” que é complementar à porção 3’ de uma seqüência de DNA
xix	7	Variegated Chlorose of the citros...	Citrus Variegated Chlorosis...
4	24	...gram-negativas...	...Gram-negativas...
7	12	...Lopes et al. (1999) em São Paulo...	...Lopes et al. (1999) nas análises realizadas com amostras do estado de São Paulo...
8	12	...encurtamento dos internódios...	...encurtamento dos entrenós...
8	21	...Este bloqueio dos vasos pelas células bacterianas é associado com alterações fisiológicas...	...Sugeriu-se que este bloqueio dos vasos pelas células bacterianas pode estar associado com alterações fisiológicas...
9	15	...para detectar raça de <i>X. fastidiosa</i>para detectar linhagem de <i>X. fastidiosa</i> ...
12	10	...ela é incapaz de crescer mais rápido...	...apresenta baixa velocidade de replicação celular...
12	13	...mas nutricionalmente diluído...	...mas nutricionalmente mais pobre...
15	17	...Na planta, a adesão na parede do xilema...	...Acredita-se que na planta a adesão na parede do xilema...
16	9	...100 raças de bactérias...	...100 linhagens de bactérias...
19	13	... <i>Actinobacillus</i> <i>Actinobacillus</i> sp...
19	23	...um pedaço desses genes...	...fragmentos desses genes...
20	10	... FimA ⁻ e FimF ⁻ , estes mutantes...	... FimA ⁻ e FimF ⁻ analisado “in vitro”. Estes mutantes...
21	14	...que apesar de ideal é inapropriada, está no fato de que o desenvolvimento dos sintomas...	...está no fato de que o desenvolvimento dos sintomas...
24	12	...é restrito às membranas...	...é restrito às membranas de pontuação...
28	3	...exoplissacarídeos...	...exopolissacarídeos...
28	27	...MsrA de raças...	...MsrA de linhagens...
36	19	A transformação dos produtos de ligação...	Os produtos de ligação foram transformados...
47	1	...Parafilme...	...filme PVC...
59	18	...11.845 pb...	...8.454 pb...
60	10 (Fig.9)	...11845 pb...	...8.454 pb...
71	22	...Estes resultados demonstram que estas bactérias apresentam as ORFs alvo interrompidas pelo gene <i>yfp</i> , conforme seus respectivos plasmídeos transformantes...	...Estes resultados demonstram que estas bactérias foram transformadas com os plasmídeos contendo as ORFs alvo interrompidas pelo gene <i>yfp</i> ...
76	27	...que se mostrou importante no processo de manutenção da adesão...	...que hipoteticamente é importante no processo de manutenção da adesão...
82	21	...o <i>Kam^R</i>resistência a canamicina...
83	19	...ou até mesmo em plantas de citros...	...ou em plantas de citros...

Ao meu avô Alfredo Guidetti (*in memoriam*), pela sabedoria e exemplo de vida;

Aos meus pais Marcos e Odete, pela minha formação moral e intelectual que permitiram meu desenvolvimento pessoal e profissional,

OFEREÇO

Tantas vezes pensamos ter chegado

Tantas vezes é preciso ir além

(Fernando Pessoa)

Aos meus dois grandes amores:

Meu marido Gustavo por ser meu porto seguro e pelo incentivo, paciência e amor,

E meu filho Gabriel:

por ser meu anjo,
por ser a luz que ilumina a minha vida,
por me fazer perceber que tudo valeu a pena,
e que existem coisas mais importantes,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A força maior, que ilumina o meu caminho.

A ESALQ por me fornecer uma excelente formação acadêmica na graduação e no Mestrado.

A Profa. Helaine Carrer por me abrir às portas da biotecnologia e pela orientação.

Aos meus pais, por todo auxílio e por me ajudarem a cuidar do meu filho desde o início.

A minha sogra Angélica por seu cuidado com meu filho nos intermináveis finais de semana dos últimos meses do Mestrado, nos quais estive ausente.

A toda minha amada família: minha vó Dulce, vó Cacilda, meu irmão Cleyton, meus cunhados e cunhadas, meus primos, tios e meus queridos sobrinhos, pelas alegrias proporcionadas.

A Sílvia Cuco e o Mateus do Depto. de Genética ESALQ/USP, pelo auxílio no uso do microscópio de fluorescência.

A Fundecitrus pelo isolado de *Xylella fastidiosa* concedido. A Elaine Cristina Martins, técnica da Fundecitrus, pelo seu auxílio no ensino do manuseio da bactéria.

A Renata por iniciar as construções com a ORF Xf-1940.

A todos os estagiários, pós-graduandos e funcionários do CEBTEC, pelo convívio e lições aprendidas, especialmente: Valesca, Henrique, Keine, Carlos, Irving, Solizéte, Amaral, a Fátima pelas construções pVF2 e pVF4 e pelo auxílio constante, e a Danila e o Adriano, companheiros de trabalho nesta jornada.

A todos os mestrandos do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, em especial a todas as estudantes que se tornaram mães e que sabem o quanto é difícil e prazeroso ser mãe e pós-graduanda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pela bolsa concedida.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

Ao meu marido e meu filho por compreenderem os momentos em que estive ausente.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Citros e CVC.....	3
2.2 <i>Xylella fastidiosa</i>	4
2.2.1 Transmissão e vetores	5
2.2.2 Plantas hospedeiras.....	6
2.2.3 Sintomas da CVC.....	7
2.2.4 Diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i>	9
2.2.5 Controle da CVC.....	9
2.2.6 Algumas características do genoma da <i>Xylella fastidiosa</i>	10
2.3 A utilização de mutações para o estudo funcional de genes.....	16
2.4 Transformação da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> e obtenção de mutantes.....	18
2.5 Hospedeiros alternativos para o estudo da patogênese de <i>Xylella fastidiosa</i>	21
2.6 Parede celular vegetal.....	22
2.7 Fatores relacionados a patogenicidade e enzimas degradadoras da parede celular vegetal.....	23
2.7.1 Celulases.....	25

2.7.2 Pectato liase.....	26
2.8 Adesão celular e MsrA	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 ORFs de <i>Xylella fastidiosa</i> selecionadas.....	30
3.2 Extração de DNA cosmidial e plasmidial.....	31
3.3 Obtenção das ORFs alvo por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
3.4 Clonagem dos fragmentos amplificados por PCR.....	35
3.5 Transformação de <i>E. coli</i> com os produtos de ligação.....	36
3.6 Construção dos vetores para disrupção de <i>Xylella fastidiosa</i>	37
3.6.1 Estratégia de disrupção por substituição da ORF pelo gene <i>yfp</i>	37
3.6.2 Estratégia de disrupção por inserção do cassete <i>lacZ-Km^R</i>	40
3.7 Confirmação da identidade dos plasmídeos de disrupção de <i>X. fastidiosa</i>	43
3.8 Análise da expressão dos genes <i>yfp</i> e <i>lacZ-Km^R</i> das construções finais em <i>E. coli</i>	44
3.9 Cultivo da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	45
3.10 Preparo de células competentes e transformação de <i>Xylella fastidiosa</i>	46
3.11 Extração de DNA de <i>X. fastidiosa</i>	47
3.12 Confirmação do isolado de <i>X. fastidiosa</i>	48
3.13 Confirmação da obtenção de <i>X. fastidiosa</i> transformada.....	48
4 RESULTADOS.....	51
4.1 ORFs alvo selecionadas e as estratégias de disrupção destas ORFs em <i>X. fastidiosa</i>	51
4.2 Construção dos vetores para disrupção das ORFs por substituição pelo gene <i>yfp</i>	52
4.2.1 PCR e clonagem dos fragmentos 3' e 5'.....	52
4.2.2 Clonagem dos fragmentos 3' em vetor pEYFP-SK.....	55
4.2.3 Clonagem dos fragmentos 5' nos vetores pSG3, pSG13, pSG23 e pVF4.....	57
4.3 Construção dos vetores para disrupção das ORFs Xf-810 e Xf-1940 utilizando o cassete <i>lacZ-Km^R</i>	59

4.4 Clonagem da origem de replicação (<i>OriC</i>) de <i>Xylella fastidiosa</i>	62
4.5 Confirmação das construções finais por seqüenciamento.....	62
4.6 Análise da expressão dos genes <i>yfp</i> e <i>lacZ-Km^R</i> das construções finais em <i>E. coli</i>	68
4.7 Confirmação do isolado de <i>X. fastidiosa</i> e da obtenção de bactérias mutantes.	70
5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÕES.....	85
ANEXOS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Esquema para a construção dos plasmídeos vetores para a disrupção das ORFs de *Xylella* por substituição pelo gene *yfp*. **A.** Amplificação dos fragmentos 5' e 3' das ORFs de interesse do genoma de *X. fastidiosa* por PCR. **B.** clonagem dos fragmentos 5' e 3' flanqueando a região codificadora do gene *yfp* no plasmídeo pEYFP-SK e introdução da *OriC* de 366 pb do vetor p16Kori. **C.** Representação do plasmídeo final que foi utilizado na transformação da bactéria *X. fastidiosa*..... 39
- 2 Esquema para a construção dos plasmídeos vetores para a disrupção das ORFs Xf-810 e Xf-1940, utilizando o cassete *lacZ-Km^R*. **A.** Representação do plasmídeo pKOK6, progenitor do cassete *lacZ-Km^R*. **B.** Representação dos plasmídeos vetores contendo as ORFs de interesse, demonstrando o sítio interno específico das enzimas de restrição, *Bgl*III ou *Pst*I, local de inserção do cassete *lacZ-Km^R*. **C.** Demonstração da inserção da *OriC* de 366 pb ou de 1,9 kb no sítio da *Bam*HI externo à ORF. **D.** Representação do plasmídeo final para transformação de *X. fastidiosa*..... 42
- 3 Obtenção dos fragmentos 3' e 5' das ORFs de interesse amplificados através de PCR e separados em gel de agarose 1 %. Foram empregados os iniciadores descritos na Tabela 2. Linhas de 1 a 4: apresentam os fragmentos 3' das ORFs Xf-818 (537 pb), Xf-2708 (606 pb), 1940 (603 pb) e Xf-2359 (424 pb). Linhas de 5 a 8: apresentam os fragmentos 5' das ORFs Xf-818 (563 pb), Xf-2708 (540 pb), Xf-1940 (504 pb) e Xf-2359 (819 pb). M – Marcador de massa molecular 1 kb plus DNA

	respectivamente, nos plasmídios pSG4, pSG14, pSG25 e pSG57.....	58
9	Confirmação das construções para disrupção utilizando <i>lacZ-Km^R</i> . A. Linha 1 pNAW22 digerido com <i>NdeI</i> e <i>HindIII</i> , linha 2 pNAW22 digerido com <i>BglII</i> , linha 3 pSG30 digerido com <i>PstI</i> confirmando a clonagem do <i>lacZ-Km^R</i> (4,7 kb e 3.612 pb do restante do vetor), linha 4 pSG30 digerido com <i>BamHI</i> (11845 pb). B. Linha 1 fragmento de 1152 pb contendo a ORF Xf-1940 amplificada via PCR. C. Linha 1 pSG50 digerido com <i>BamHI</i> confirmando a presença do inserto de 1.152 pb e do vetor de 2.686 pb, linha 2 pSG51 digerido com <i>EcoRV</i> confirmando que a ORF e o <i>LacZ</i> estão na mesma orientação (7.343 pb e 1.228 pb)....	60
10	Esquemas representando os plasmídeos pSG30 e pSG51. A. Disrupção da ORF Xf-810 pelo cassette <i>lacZ-Km^R</i> (pSG30). B. Disrupção da ORF Xf-1940 pelo cassette <i>lacZ-Km^R</i> (pSG51)	61
11	Digestão parcial do pSG51. Linha 1 – 2 µL do pSG51 não digerido. Linha 2 – pSG 51 digerido totalmente com <i>BamHI</i> . Linha 3 – pS51 linearizado com <i>SaII</i> . Linhas 4 a 9 digestão parcial do pSG51 com <i>BamHI</i> a 37 °C por 1, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos respectivamente. M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL).....	63
12	Confirmação das clonagens da <i>OriC</i> . Linhas 1 a 7: digestão dos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26, pSG31, pSG52, pSG53 e pSG59 com <i>BamHI</i> confirmando a clonagem da <i>OriC</i> de 366 pb (pSG5, pSG15, pSG26, pSG31, pSG52 e pSG59) ou 1,9 kb (pSG53). M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL).....	64
13	Esquemas representando as plasmídeos finais pSG5, pSG15, pSG26 e pSG57 para a disrupção ORFs Xf-818, Xf-2359, Xf-2708 e Xf-1940 com o gene <i>yfp</i>	65
14	Esquemas representando as plasmídeos finais pSG31, pSG52 e pSG53 para a disrupção ORFs Xf-810 e Xf-1940 com o cassette <i>lacZ-Km^R</i>	66

- 15 Sequência do quadro aberto de leitura dos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59. O ATG (códon de iniciação da tradução) das ORFs estão no mesmo quadro aberto de leitura com relação ao ATG do gene *yfp*, nos plasmídeos vetores de disrupção de *X. fastidiosa*. O primeiro **ATG** refere-se a ORF alvo; a sequência AGATCC refere-se aos sítios *BglIII/BamHI* onde as ORFs foram fusionadas; o segundo **ATG** refere-se ao gene *yfp*..... 67
- 16 Expressão do gene *yfp* em microscópio de fluorescência. Bactérias contendo os plasmídeos pSG5 (A) e pSG59(B) fluorescendo (aumento de 1000x)..... 69
- 17 Expressão do cassete *lacZ-Km^R*. Bactérias *E. coli* contendo os plasmídeos pSG31 (A) e pSG53 (B) que cresceram em meio LB contendo canamicina e produziram um precipitado de cor azul..... 69
- 18 DNA genômico e produto da amplificação do DNA de *X. fastidiosa* com *primers* CVC1 e CVC272int. Linhas 1 a 6: 2 µL de DNA total de seis culturas de *Xylella fastidiosa* J1a12. Linhas 7 a 12: fragmentos de 500pb confirmando as culturas de *X. fastidiosa*. M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)..... 70
- 19 Confirmação da presença das ORFs interrompidas pelo gene *yfp* por PCR. Linhas 1, 3, 5 e 8: DNA de *X. fastidiosa* não transformada utilizando os mesmos *primers* que para as transformações com os plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59, respectivamente (controles negativos). Linha 2: *X. fastidiosa* transformada com pSG5 (681 pb). Linha 4: *X. fastidiosa* transformada com pSG15 (933 pb). Linha 6: *X. fastidiosa* transformada com pSG26 (654 pb). Linha 7: *X. fastidiosa* transformada com pSG59 (637 pb)..... 73
- 20 Confirmação da disrupção das ORFs de *X. fastidiosa*. Linhas 1, 4, 5, 7, 9 e 11: PCR com DNA de *X. fastidiosa* não transformadas utilizando os

mesmos *primers* que para as transformações com os plasmídeos pSG5, pSG15, pSG31, pSG52, pSG53 e pSG59, respectivamente (controles negativos). Linha 2: *X. fastidiosa* transformada com pSG5 (900 pb). Linha 3: *X. fastidiosa* transformada com pSG15 (1.050 pb). Linha 6: *X. fastidiosa* transformada com pSG31 (700 pb). Linha 8: *X. fastidiosa* transformada com pSG52 (600 pb). Linha 10: *X. fastidiosa* transformada com pSG53 (600 pb). Linha 12: *X. fastidiosa* transformada com pSG59 (655 pb)..... 74

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Genes de <i>X. fastidiosa</i> (ORFs) selecionados	31
2 <i>Primers*</i> preparados para amplificação de fragmentos de DNA das ORFs selecionadas	33
3 <i>Primers</i> utilizados para a confirmação da disrupção das ORFs de interesse.....	50
4 Conjunto de <i>primers</i> utilizados para a confirmação da transformação de <i>X. fastidiosa</i> e os tamanhos de fragmentos esperados.....	72

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	microlitro
μm	micrometro
CaCl_2	cloreto de cálcio
CTAB	brometo de hexadiltrimetilamônio
DMF	dimetil formamida
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatados
$\text{D.O.}_{600\text{nm}}$	densidade óptica para um comprimento de onda de 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	gramas
IPTG	isopropiltio- β -D-galactoside
kb	kilo bases (= 1000 pb)
KAc	acetato de potássio
KCl	cloreto de potássio
<i>lacZ</i> -Kam ^R	cassete que codifica para produção de β -galactosidase (gene <i>lacZ</i>) e resistência a canamicina, um antibiótico aminoglicosídeo que interfere na síntese protéica bacteriana
mg	miligrama
mL	mililitro
MilliQ	água destilada deionizada e estéril

MnCl	cloreto de manganês
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propaneusulfônico
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
ORF	quadro aberto de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>Primer</i>	oligonucleotídeo iniciador
<i>Primer (F)</i>	<i>primer</i> “forward” que se anela no sentido da transcrição
<i>Primer (R)</i>	<i>primer</i> “reverse” que é complementar à porção 3’ do gene
rpm	rotações por minuto
RbCl	cloreto de rubídio
SDS	duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio (Sodium Duodecyl Sulfate)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultra-violeta
v:v	volume:volume
xg	múltiplos de força gravitacional terrestre (rcf)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside
YFP	proteína amarela fluorescente

**DISRUPÇÃO DAS ORFS XF-810, XF-818, XF-1940, XF-2359 E XF-2708 DE
Xylella fastidiosa-CVC POSSIVELMENTE RELACIONADAS À
PATOGENICIDADE DA BACTÉRIA**

Autora: SIMONE GUIDETTI GONZALEZ

Orientadora: Profª. Dra. HELAINE CARRER

RESUMO

Clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como amarelinho, é uma das doenças de citros mais severas da citricultura brasileira. A CVC é causada pela bactéria limitada ao xilema *Xylella fastidiosa*. Esta bactéria afeta principalmente as variedades de laranja doce e foi relatada pela primeira vez em 1987 nos estados de São Paulo e Minas Gerais. O genoma de *X. fastidiosa* linhagem 9a5c foi completamente seqüenciado e revelou muitos genes provavelmente envolvidos na patogenicidade desta bactéria. Entre estes genes estão as endoglicanases, que são enzimas degradadoras de componentes da parede celular vegetal do hospedeiro e as adesinas, que são proteínas envolvidas na adesão das células bacterianas no xilema, como também auxiliam na formação de agregados bacterianos que causam a obstrução dos vasos do xilema, interferindo no transporte de água e sais minerais para todas as partes da planta, levando ao aparecimento dos sintomas relacionados a CVC. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de mutantes de *X. fastidiosa* linhagem J1a12, pela disrupção das ORFs Xf-810, Xf-818 e Xf-2708, que apresentam função putativa de endoglicanases, da ORF Xf-2359

possivelmente relacionada à uma pectate liase e da ORF Xf-1940, que apresenta similaridade de seqüência à metionina sulfoxido redutase, proteína identificada com a função de possuir adesão funcional na superfície da célula bacteriana. Neste trabalho, duas estratégias foram utilizadas para a construção dos vetores de interrupção das ORFs selecionadas no genoma de *X. fastidiosa*: (1) substituição das ORFs pelo gene *yfp*, que codifica a proteína fluorescente amarela e, (2) inserção do cassete *lacZ-Kam^R* interrompendo a região codificadora das ORFs. Estes vetores foram usados para transformar *X. fastidiosa* linhagem J1a12 por eletroporação e confirmou-se a obtenção das bactérias mutantes por reações em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos.

**DISRUPTION OF THE ORFS XF-810, XF-818, XF-1940, XF-2359 E XF-2708 OF
Xylella fastidiosa-CVC PROBABLY RELATED TO PATHOGENICITY
OF THE BACTERIA**

Author: SIMONE GUIDETTI GONZALEZ

Adviser: Profª. Dra. HELAINE CARRER

SUMMARY

Variegated Chlorose of the citrus (CVC), also known as “amarelinho”, is one of the more severe diseases of citrus of the Brazilian Citrus plantation. CVC is caused by *Xylella fastidiosa*, a limited bacteria to the xylem. This bacterium affects mainly sweet orange varieties and it was reported for the first time in 1987 in the states of São Paulo and Minas Gerais. The genoma of *X. fastidiosa* strain 9a5c was completely sequenced and it revealed many genes probably involved in the patogenicity of the bacteria. Among the genes, are the endoglucanases, that are degradative enzymes of the host cell wall components and the adesins, that are proteins involved in the adhesion of the bacterial cells in the xylem, as well as they aid in the formation of bacterial aggregation that cause the obstruction of the xylem vessels interfering in the transport of water and mineral salts for all the parts of the plant, providing the emergence of the symptoms related to CVC. The objective of this work was to produce mutants of *X. fastidiosa* strain J1a12, by disruption of the ORFs Xf-810, Xf-818 and Xf-2708, that present putative function of endoglucanases, Xf-2359 possibly related to a pectate liase and of Xf-1940, that presents

sequence similarity to the methionine sulfoxide reductase, identified protein with the functional function of adhesion in the surface of the bacterial cell. In this work, two strategies were used for the construction of the disruption vectors of the selected ORFs in the *X. fastidiosa* genome: (1) substitution of the ORFs for the *yfp* gene, that codifies for the yellow fluorescent protein and, (2) insertion of the *lacZ*-Kam^R cassette into the coding region of the ORFs. These vectors were used to transform *X. fastidiosa* strain J1a12 by electroporation and the mutants produced were confirmed by polymerase chain reactions (PCR) with specific oligonucleotids.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de frutas cítricas do mundo, dominando a maioria do mercado internacional, comercializando suco de laranja concentrado. Mais de 80% da produção do país concentra-se no estado de São Paulo, onde a indústria de citros e atividades associadas geram 3,4 milhões de empregos e mais de 1,5 bilhões de dólares por ano (Araújo et al., 2002). Acredita-se que, globalmente, um quinto do potencial rendimento de colheita é perdido por ano devido a doenças (Dow & Daniels, 2000). E entre as muitas doenças que afetam esta cultura está a clorose variegada dos citros (CVC), a qual foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1987 (Rossetti et al., 1990) e se disseminou para pelo menos 90% dos pomares do estado de São Paulo (Lambais et al., 2000).

A rápida disseminação da CVC entre os pomares brasileiros e o alto nível de dano causado por esta doença resultou em grandes perdas econômicas para os citricultores e para a indústria de suco de laranja (Della Coletta-Filho & Machado, 2002).

A bactéria *Xylella fastidiosa* causadora da CVC foi o primeiro patógeno de plantas a ter o seu genoma completamente seqüenciado e esta escolha ocorreu devido a sua importância econômica e biológica (Simpson et al., 2000).

Uma característica que parece ser importante na patogenicidade de *X. fastidiosa* é a presença de genes que codificam para enzimas como, celulasas, pectato liase e proteases, que degradam a parede celular vegetal, e auxiliam a movimentação da bactéria através dos vasos do xilema durante a colonização do hospedeiro.

Proteínas como adesinas, responsáveis pela adesão da bactéria ao xilema e no

sistema digestivo dos insetos vetores parece também ser importante para patógenos como *X. fastidiosa*.

Muitos genes associados a fimbrias bacterianas, proteínas de adesão e exoenzimas conhecidas em outros patógenos bacterianos como relacionados a patogenicidade, foram identificados no genoma de *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000, Dow & Daniels, 2000; Van Sluys et al., 2002), podendo ser alvos importantes para estudos de patogenicidade da bactéria.

Após identificação de supostas funções de genes por similaridade de seqüência com outros genes conhecidos em outros organismos, é necessário comprovar a função desses genes no organismo de interesse. Uma metodologia de estudo para elucidar a função dos supostos genes na patogenicidade de microorganismos é através de interrupção gênica por transformação genética. E utilizando os conhecimentos gerados sobre as complexas interações entre planta, patógeno e inseto vetor, espera-se contribuir com o desenvolvimento de tecnologias que permitam um controle mais efetivo da doença da CVC.

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram: (a) o desenvolvimento de vetores para a interrupção das ORFs Xf-810, Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 e (b) a transformação de *X. fastidiosa* por interrupção destas ORFs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citros e CVC

As plantas cítricas ocupam o primeiro lugar na produção mundial de frutas, desempenhando um papel de acentuada importância sócio-econômica mundial. Esta posição de destaque deve-se à grande aceitação dos citros na alimentação humana, na forma de fruta fresca e suco. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de laranja, e a estimativa da safra 2004 é de aproximadamente 17 milhões de toneladas em uma área plantada de aproximadamente 811 mil hectares (IBGE, 2004).

Entre os vários problemas que afetam a citricultura a ocorrência de doenças é o fator que mais contribui para baixar a produtividade. Entre elas, a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, tem sido detectada nas várias regiões citrícolas do país, causando sérios prejuízos econômicos. Todas as cultivares comerciais de laranja doce são afetadas pela CVC, independente do porta-enxerto utilizado (Carvalho et al., 1995). Entretanto, plantas da cultivar pêra expressaram reações de resistência à colonização por *X. fastidiosa*, pelo acúmulo de cristais no lúmen dos vasos do xilema e pela deposição de substância semelhante a goma e de possivelmente compostos fenólicos nos espaços intercelulares das folhas (Alves, 2003).

Em 2003, 10,38 % das plantas de laranja das variedades Pêra Rio, Valência, Natal e Hamlin do estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro apresentaram sintomas de CVC de nível 1 (plantas com sintomas restritos às folhas) e 33,18 % apresentaram sintomas de nível 2 (plantas com sintomas foliares e frutos miúdos; a

distribuição desses frutos de tamanho reduzido pode ocorrer em uma área da planta assim como na planta toda), ou seja, pelo menos 43,56 % das plantas estavam infectadas pela *X. fastidiosa*, sem considerar as plantas contaminadas que ainda não apresentaram sintomas (Fundecitrus, 2004).

Segundo dados da Fundecitrus (<http://www.fundecitrus.com.br>) observa-se a tendência no aumento da incidência da CVC ano a ano (de 1996 a 2003), o que revela a importância de se estudar o patógeno para se poder estabelecer estratégias eficientes de controle.

2.2 *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram-negativa, sendo a única espécie do gênero e consiste de muitos patovares que causam doenças em culturas economicamente importantes como alfafa, amendoeira, uva, pêsego e ameixeira (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Esta bactéria pode ser diferenciada em subespécies ou patovares dependendo de critérios como especificidade da planta hospedeira e patogenicidade (Hopkins, 1989; Chen et al., 1995; Pooler & Hartung, 1995a; Banks et al., 1999).

Todas as estirpes da bactéria formam uma única espécie por tratar-se de um grupo de organismos com grande homologia genética (75 – 100%) (Wells et al., 1987), especialmente na região 16S do rDNA (Chen et al., 2000). E linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de citros e café no Brasil podem incitar sintomas de doença, após inoculação mecânica, em sete variedades comerciais de videira (*Vitis vinifera*) crescendo no Brasil e Califórnia (Li et al., 2002).

As bactérias agrupadas nesta espécie possuem formato de bastonetes com cerca de 0,3-0,5 x 1,0-3,5 μm , são atríquias, com parede celular enrugada formada por três camadas, aeróbicas estritas, gram-negativas limitadas ao xilema, fastidiosas e são adaptadas a concentrações diluídas de nutrientes (Chagas et al., 1992).

A palavra fastidiosa é aplicada aos microorganismos que requerem meio de cultura complexo para o seu adequado crescimento *in vitro* e mesmo neste meio de cultura apresentam crescimento muito lento (Lemos et al., 2003).

Na década de 50 acreditava-se que a doença causada por *X. fastidiosa* em videira tinha natureza viral e utilizando plantas de alfafa e videira como plantas indicadoras foi demonstrado que mais de 100 espécies de plantas eram hospedeiras (Purcell & Hopkins, 1996), e em 1973 dois trabalhos descreveram a associação da doença a organismos do tipo Rickettsia (Hopkins & Mollenhaver, 1973; Goheen et al., 1973) mais tarde apropriadamente referidos como Bactérias Limitadas ao Xilema (XLB) (Chen et al., 1992). Somente em 1987 foi criado o gênero *Xylella* incluindo somente uma espécie, *Xylella fastidiosa*, como sendo uma bactéria relacionada ao gênero *Xanthomonas* spp. (Wells et al., 1987).

Xylella fastidiosa infecta uma ampla gama de plantas de diferentes grupos taxonômicos e causa doenças economicamente importantes, incluindo clorose variegada dos citros (CVC). Quando CVC foi descrita pela primeira vez (Rossetti et al., 1990) no Estado de São Paulo, ela já tinha se disseminado para as regiões de citricultura do Brasil e da Argentina (Brlansky et al., 1991).

Os postulados de Koch para a CVC foram primeiramente completados por Chang et al. (1993) e Hartung et al. (1994) e assim confirmou-se que a *X. fastidiosa* é o agente causal da CVC.

2.2.1 Transmissão e vetores

Em contraste com a maioria das bactérias fitopatogênicas, que tem o vento e a água como importantes agentes de disseminação, *X. fastidiosa* depende, exclusivamente, de insetos vetores para sua disseminação natural e penetração em tecido hospedeiro. Além da transmissão no campo de planta para planta através de cigarrinhas vetoras,

pode ocorrer infecção também em viveiro não protegido e também durante a enxertia utilizando material vegetal contaminado (Carlos et al., 1997).

Os vetores de *X. fastidiosa* são cigarrinhas da família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae e Cercopidae, que se alimentam da seiva bruta das plantas (Purcell & Hopkins, 1996). Em plantas de citros, as espécies predominantes e comprovadamente transmissoras da bactéria são: *Acrogonia terminalis*, *Oncometopia facialis*, *Dilobopterus costalimai*, apesar de muitas outras espécies terem este potencial (Yamamoto, 2000).

As células bacterianas encontram-se na parte anterior do tubo digestivo das cigarrinhas (estomadéu), aderidas ao forro cuticular do pré-cibário, cibário e da porção anterior do esôfago, ou nas peças bucais (Purcell & Hopkins, 1996). E estas células ganham acesso ao xilema quando o inseto se alimenta da seiva bruta (Lambais et al., 2000).

Não existe um período latente entre a aquisição e a inoculação pelo vetor. As cigarrinhas adultas, uma vez infectadas, podem transmitir *X. fastidiosa*, ao longo de suas vidas, devido à capacidade desta bactéria se multiplicar nos vetores (Hill & Purcell, 1995). Ninfas também podem transmitir *X. fastidiosa*, mas perdem a capacidade de transmissão após as ecdises, quando ocorre mudança de instar ou passagem para o estágio adulto (Purcell, 1979). Suspeita-se que a aderência de *X. fastidiosa* ao estomadéu das cigarrinhas seja possível devido à presença de fimbrias (filamentos extra celulares a célula bacteriana) e a ocorrência de uma matriz extracelular na qual as bactérias estão embebidas (Purcell & Hopkins, 1996).

2.2.2 Plantas hospedeiras

Xylella fastidiosa apresenta uma ampla gama de hospedeiros que compreende pelo menos 30 famílias de plantas (Sherald & Kostka, 1992). Além de CVC *X. fastidiosa* causa outras doenças de importância econômica como doença de Pierce na videira (Davis et al., 1978) que limita a produção comercial de cachos de uva (*Vitis vinifera*) na Flórida e nas regiões do sudeste dos Estados Unidos (Hopkins, 1989), nanismo do

pessegueiro (Wells et al., 1983), nanismo da alfafa (Goheen et al., 1973), requeima da cafeeiro (Lima et al., 1998), requeima da ameixeira (Raju et al., 1982), requeima da pereira (Leu & Su, 1993), requeima da amoreira (Kostka et al., 1986), requeima da maçã (Sherald et al., 1987), escaldadura da folha da cerejeira (Wells et al., 1980) e da amendoeira (Mircetich et al., 1976), entre outras.

Esta bactéria também apresenta hospedeiros alternativos. No Brasil, Leite et al. (1997), investigaram a presença de *X. fastidiosa* em plantas invasoras ocorrendo naturalmente em pomares de ameixeira, encontrando 11 espécies hospedeiras, muitas delas comuns em todo o território nacional como, capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*), capim-colchão (*Digitaria* sp.), capim-quicuío (*Pennisetum clandestinum*), capim-estrada (*Paspalum urvillei*), poia branca (*Richardia* sp.) e assa-peixe (*Vernonia* sp.). Lopes et al. (1999) em São Paulo encontraram outros hospedeiros alternativos da bactéria, como: apaga-fogo (*Alternanthera tenella*), braquiária (*Brachiaria decumbens*), capim-carrapicho (*Cenchrus echinatus*), capim amargoso (*Digitaria insularis*), erva de Santa Luzia (*Euphorbia hirta*), erva-quente (*Spermacoce latifolia*), maria preta (*Solanum americanum*), picão (*Bidens pilosa*) e trapoeraba (*Commelina benghalensis*). Como pôde ser observado a gama de hospedeiros de *Xylella fastidiosa* é muito extensa e diversificada.

2.2.3 Sintomas da CVC

Clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença causada pela bactéria gram-negativa *Xylella fastidiosa* (Chang et al., 1993; Hartung et al., 1994). O patógeno tem sido observado no xilema de plantas infectadas e em cigarrinhas vetoras (Brlansky et al., 1983).

Os sintomas de CVC são bastante evidentes nas folhas, ramos e frutos. A clorose foliar, um dos sintomas desta doença, se apresenta inicialmente nas regiões mediana e superior da copa, podendo ocorrer desfolha dos ramos ponteiros. Os sintomas foliares

podem se restringir a alguns setores nas plantas afetadas ou evoluir, de modo disperso, atingindo toda a copa (Rossetti & De Negri, 1990).

Nas folhas, surgem manchas cloróticas, de bordos irregulares e que contrastam com o verde do limbo, assemelhando-se a uma variegação (De Negri & Garcia Junior, 1993). Mais de um tipo de clorose podem ser observados nas folhas maduras, como a clorose internerval brilhante típica de deficiência de zinco, afetando uniformemente todo o limbo foliar (Beretta et al., 1997) e a clorose variegada ou pontual de distribuição ao acaso no limbo foliar, com ou sem formação de tecido corticoso de aspecto ligeiramente saliente na face inferior, congruente às manchas cloróticas. As manchas pontuais podem coalescer formando áreas necrosadas estendendo-se até a borda do limbo foliar. Nas folhas também se observa redução da expansão foliar, afilamento e encurvamento para cima, e nos ramos ocorre encurtamento dos internódios (Machado et al., 1992).

Os sintomas nos frutos surgem após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas em ramos afetados ocorrendo pegamento excessivo e anormal de frutos em ramos floríferos, formando penca de frutos com acentuada redução de tamanho, amadurecimento precoce, consistência enrijecida e com suscetibilidade a queimaduras de sol (Lee et al, 1991).

Kostka et al. (1986) atribuíram a disfunção do xilema em doenças causadas por *X. fastidiosa* devido ao acúmulo de polissacarídeos bacterianos, a produção de géis, gomas e tiloses pelo hospedeiro em resposta a infecção, e/ou acúmulo de células bacterianas que fisicamente obstrui os vasos do xilema. Este bloqueio dos vasos pelas células bacterianas é associado com alterações fisiológicas, como a acumulação de toxinas (Hopkins, 1989), seqüestro de nutrientes importantes (Leite et al., 2002) e deficiência hormonal (Simpson et al, 2000) que são freqüentemente presentes na explicação da evolução da doença.

McElrone et al. (2001) confirmou que o estresse de água acentua a severidade dos sintomas em plantas de *Parthenocissus quinquefolia* infectadas com *X. fastidiosa*. Os resultados de análises físicas da interação entre estresse de água e a infecção de *X. fastidiosa* mostraram que esses fatores atuam conjuntamente em plantas de videira (McElrone et al., 2003).

Alves (2003) observou que número de vasos do xilema colonizados por *X. fastidiosa* apresenta uma relação direta com o aparecimento de sintomas necróticos em folhas de ameixeira e cafeeiro, mas não com os sintomas em folhas de laranjeira caipira.

2.2.4 Diagnóstico de *X. fastidiosa*

O uso de métodos de diagnósticos para identificar a presença de *X. fastidiosa* em plantas é um passo importante na implementação de medidas de restrição da disseminação da doença no campo e em áreas não infectadas (Ferreira et al., 1999).

Tradicionalmente, *X. fastidiosa* tem sido isolada de tecidos sintomáticos e identificada pelo seu crescimento lento e pelas pequenas colônias opalescente em meios de cultura especialmente enriquecidos. Patovares podem ser identificados por testes de patogenicidade. Entretanto, testes de patogenicidade requerem tempo e trabalho intensivo (Hopkins, 1988). Muitas técnicas baseadas no DNA tem sido aplicadas para diferenciar patovares de *Xylella* (Albibi et al., 1998; Chen et al., 1992; Chen et al., 1995; Pooler & Hartung, 1995a; Pooler & Hartung, 1995b; Pooler et al., 1997) e “primers” específicos para PCR foram desenvolvidos para detectar raça de *X. fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros (Pooler & Hartung, 1995b) e causadora da doença de Pierce (Banks et al., 1999).

2.2.5 Controle da CVC

A utilização de mudas livres do patógeno, o monitoramento da população de cigarrinhas com a aplicação de inseticidas e a poda de ramos doentes são as medidas principais empregadas para o controle da CVC (Donadio & Moreira, 1997). E a Fundecitrus também recomenda a erradicação de plantas com menos de 2 anos que apresentam sintomas.

2.2.6 Algumas características do genoma da *Xylella fastidiosa*

O genoma de *X. fastidiosa*, linhagem 9a5c, é composto por um cromossomo circular de 2.679.305 pb, e dois plasmídeos o pXF51 e pXF1.3 com respectivamente 51.158 pb e 1.285 pb, e apresenta 52,7% de G+C (Simpson et al., 2000).

Das 2.904 ORFs (quadro aberto de leitura – “open reading frames”) 47% apresentam similaridade de seqüência com proteínas conhecidas permitindo inferir funções putativas. Supostos genes de patogenicidade, virulência e adaptação foram atribuídos a 147 ORFs (Simpson et al., 2000). Com a caracterização de novos genes em outros organismos e o aperfeiçoamento dos programas de computador, Bhattacharyya et al. (2002) alisaram novamente o genoma de *X. fastidiosa* e observaram a existência de 2.985 ORFs, dos quais 58% apresentam função putativa.

O genoma da linhagem Temecula de *X. fastidiosa* isolada de videiras naturalmente infectadas e com sintomas de doença de Pierce (PD) também foi seqüenciado (Van Sluys et al. 2003) e apresenta um cromossomo circular com 2.519.802 pb e apenas um pequeno plasmídeo de 1.345 pb, e das 2.066 ORFs 65,9 % apresentam função putativa. Comparando-se com o genoma de *X. fastidiosa* causadora da CVC, 9a5c (Simpson et al., 2000) observou-se que 98 % das ORFs presentes em Temecula também são encontradas na linhagem 9a5c, e a média de identidade de aminoácidos nas ORFs é de 95,7 %. *X. fastidiosa* PD apresenta 41 genes específicos, enquanto a 9a5c apresenta 152 genes específicos da linhagem. Os autores concluíram que estes dois organismos apresentam funções metabólicas idênticas e parece que usam um conjunto de genes em comum na colonização da planta e na patogenicidade, sendo assim o estudo de genoma funcional dos dois organismos poderia compartilhar mecanismos comuns para as duas linhagens, e a integração dos conhecimentos adquiridos individualmente poderia acelerar os avanços no combate a PD e CVC.

Ambas as linhagens de *X. fastidiosa* (PD e CVC) apresentam conjuntos de caminhos biossintéticos que permitem a síntese de todos os aminoácidos, purinas, pirimidinas, e nucleotídeos, e sistemas de transporte incluindo aqueles para carboidratos,

ions, aminoácidos e peptídeos e também para a expulsão de drogas e toxinas (Simpson et al., 2000; Van Sluys et al. 2003). Entre os genes com funções determinadas por similaridade de seqüência que exibem alto nível de divergência entre as duas linhagens estão, por exemplo, os que podem estar envolvidos na interação *X. fastidiosa*-planta hospedeira, incluindo aqueles responsáveis pela adesão e agregação celular, resistência a drogas e enzimas de modificação e restrição de DNA (Van Sluys et al. 2003).

A presença de um gene precursor de poligalacturonase intacto na linhagem PD, que é um gene essencial para a síntese de enzimas de degradação da parede celular facilitando a migração entre os vasos, poderia ser responsável pela maior agressividade desta linhagem em relação à linhagem CVC (Almeida et al., 2001).

Analisado o genoma de algumas linhagens diferentes de *X. fastidiosa*, utilizando microarray, Nunes et al. (2003) observaram que a similaridade entre esses genomas é muito grande, apresentando mais de 90 % de ORFs conservadas entre a linhagem 9a5c de citros e as linhagens que causam doença em ameixa, erva de Santiago, uva, amora, olmo e amendoeira. A conservação das ORFs aumenta para aproximadamente 97 % quando a linhagem 9a5c é comparada com a linhagem de café e para aproximadamente 99 % quando comparada com outros isolados de citros. Essencialmente, todos os genes envolvidos nos principais caminhos bioquímicos e funções celulares estão presentes em todas as linhagens de *X. fastidiosa* analisadas, sugerindo que a adaptação para viver no xilema de plantas é dependente de genes altamente conservados, responsáveis pelas principais características fisiológicas que envolvem um mecanismo para gerar energia utilizando carboidratos, incluindo enzimas para degradação de celulose (Nunes et al., 2003). E as diferenças na patogenicidade e gama de hospedeiros ocorrem devido às relativas pequenas diferenças genéticas entre os diferentes isolados de *X. fastidiosa*.

A análise da seqüência do genoma de *X. fastidiosa* revelou um grande número de genes cujas seqüências de aminoácidos apresentam alta similaridade com genes de *Xanthomonas* spp., particularmente *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Simpson et al., 2000) e muitos desses genes estão envolvidos na patogenicidade ou virulência (Dow & Daniels, 2000; Lambais et al., 2000). Esta similaridade na seqüência

de aminoácidos entre *Xanthomonas* e *X. fastidiosa* não é surpreendente, já que estas duas espécies estão intimamente relacionadas (Wells et al., 1987). As diferenças entre os tamanhos dos genomas de *X. fastidiosa* (~2,7 Mb) e Xcc (~5,5 Mb), provavelmente refletem as diferenças nas estratégias para causar a infecção e na capacidade de crescimento dos dois organismos. *Xylella fastidiosa* depende de cigarrinhas para sua transmissão e é limitada ao xilema das plantas, enquanto Xcc pode infectar plantas intactas e é capaz de crescer e sobreviver na superfície de folhas de plantas e também no solo (Dow & Daniels, 2000).

Quando *X. fastidiosa* é colocada para crescer em meio de cultura nutricionalmente rico, ela é incapaz de crescer mais rápido, e há evidências de que o pequeno tamanho relativo do genoma dessa bactéria, faltando capacidade metabólica de obter vantagens de nutrientes adicionais, faz com que ela seja adaptada para sobreviver em ambiente constante, mas nutricionalmente diluído (Van Sluys et al., 2002). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* e *Agrobacterium tumefaciens* apresentam genomas maiores do que *X. fastidiosa*, contendo genes para um extenso arsenal de caminhos metabólicos, e isso reflete na adaptação a diferentes condições ambientais. Além de colonizar o interior da planta hospedeira *Xanthomonas* é capaz de viver de forma epífeta, enquanto *Ralstonia solanacearum* e *Agrobacterium tumefaciens* vivem livremente no solo (Van Sluys et al., 2002).

Sistemas de secreção possuem importância fundamental para a correta translocação de proteínas e outras moléculas da bactéria patogênica para a célula hospedeira. Existem cinco diferentes formas de sistemas de secreção denominados como tipos I, II, III, IV e V (Lee & Schneewind, 2001). O tipo I está envolvido na secreção de toxinas e o tipo IV está envolvido na exportação de macromoléculas, como proteínas de transferência conjugal, responsáveis pela mobilização de plasmídeo entre bactérias (Cao & Saier, 2001; Van Sluys et al., 2002), e genes que codificam para estes dois sistemas de secreção estão presentes no genoma de *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000). Esta bactéria também apresenta genes que codificam para adesinas associadas a superfície, que são

auto-transportadas pelo sistema de secreção do tipo V (Simpson et al., 2000; Van Sluys et al., 2002).

Muitas bactérias fitopatogênicas utilizam o sistema de secreção do tipo III (SSTIII) para causar doença em seus hospedeiros (He & Jin, 2003). Proteínas bacterianas são liberadas dentro da célula do hospedeiro pelo SSTIII, onde funcionam como fatores de virulência modulando a maquinaria genética do hospedeiro suscetível para o seu próprio benefício (Chang et al., 2004). Muitos desses fatores de virulência podem atuar na supressão da resposta de defesa da planta e conseqüentemente promove a doença, enquanto outros podem atuar promovendo a liberação de nutrientes da célula vegetal (Dow & Daniels, 2000). Plantas resistentes apresentam genes que codificam proteínas R, que reconhecem proteínas bacterianas liberadas pelo SSTIII, resultando na indução de resposta de defesa da planta, incluindo a resposta de hipersensibilidade (RH), tornando o patógeno avirulento (Dangl & Jones, 2001). As proteínas bacterianas identificadas por sua habilidade de engatilhar esta resposta de defesa da planta são considerados como determinantes de avirulência (Avr) (Dow & Daniels, 2000; Chang et al., 2004).

Uma das diferenças entre *X. fastidiosa* e *Xanthomonas* spp. é a ausência na primeira do sistema de secreção do tipo III. E a análise do genoma de *X. fastidiosa* não identificou nenhum gene com seqüência de aminoácidos apresentando similaridade com produtos de genes de avirulência (genes *avr*) conhecidos (Simpson et al., 2000). A transmissão mediada por inseto, a restrição vascular e o lento crescimento da bactéria, podem ser conseqüências da falta da dependência da patogênese de *X. fastidiosa* com o sistema de secreção do tipo III (Dow & Daniels, 2000).

As enzimas capazes de degradar a parede celular vegetal são secretadas pelo sistema de secreção do tipo II. Este sistema é requerido para a virulência de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae* (Dow et al., 1987; Ray et al., 2000). Em *X. c.* pv. *campestris* foram identificados um agrupamento de 11 genes denominados *xpsEFGHIJKLMND*, que possuem função nesta secreção de proteínas e patogenicidade (Dums et al., 1991). A mesma organização gênica encontrada em *X.c.* pv. *campestris*

ocorre em *X. fastidiosa*, e a maioria dos produtos dos genes possui alta similaridade na sequência de aminoácidos (Dow & Daniels, 2000).

Em *X. fastidiosa* o sistema de secreção do tipo II está provavelmente envolvido na exportação de enzimas que degradam a parede celular, incluindo celulases e proteases. Possíveis funções para estas enzimas na patogênese da bactéria é na degradação da membrana de pontuação, permitindo a bactéria se mover para vasos não previamente colonizados e também na mobilização da parede celular para propósitos nutricionais ou para inibir a defesa da planta (Dow & Daniels, 2000).

A produção de enzimas e polissacarídeos extracelulares por *X. c. pv. campestris* é estritamente regulada durante o crescimento em meio líquido e durante a doença. Foram identificados um grupo de genes que atuam na regulação da síntese desses fatores de virulência (Dow & Daniels, 2000). Este grupo de genes, que é chamado de *rpf* (fatores de regulação da patogenicidade) compreende nove genes (*rpfA-I*), sendo localizado dentro de uma região de 21,9 kb do cromossomo de *X. c. pv. campestris* (Barber et al., 1997; Tang et al., 1991; Dow et al., 2000). Enquanto em *X. c. pv. campestris* estes genes estão organizados em cluster, em *X. fastidiosa* genes com similaridade de sequência aos *rpf* estão parcialmente localizados em cluster e não foram encontrados genes com similaridade a *rpfD* e *rpfI* (Dow & Daniels, 2000).

O gene *rpfA* codifica a principal aconitase de *X. c. pv. campestris*, a qual está envolvida na homeostase de ferro e também atua na regulação da expressão gênica de algumas enzimas extracelulares e de exopolissacarídeo (Wilson et al., 1998). Os genes *rpfB* e *rpfF* estão envolvidos na regulação da síntese de moléculas sinal difusível de baixo peso molecular (DSF), a qual pode estar envolvida na comunicação entre as bactérias (Barber et al., 1997). RpfG, RpfH e RpfC podem estar envolvidos no sistema de transdução de sinal na percepção de sinais ambientais, e de DSF, na ativação da expressão de genes de patogenicidade e na regulação da síntese de DSF (Slater et al., 2000).

A sinalização célula a célula mediada por DSF apresenta um importante papel na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo virulência para plantas e animais, nos distantes gêneros de bactérias (Kaiser & Losick, 1993). Sinais de célula a célula permite a bactéria conduzir-se em um padrão de grupo, coordenando mudanças na expressão dos genes em resposta a mudanças ambientais e na população de células em crescimento, um fenômeno chamado de “quorum sensing” (Dow & Daniels, 2000).

Xylella fastidiosa possui genes que apresentam alta similaridade a nove dos doze genes *gum* presentes em *X. c. pv. campestris*, que são responsáveis pela biossíntese de goma xantana. Sugerindo que a goma fastidiosa produzida por *X. fastidiosa* seja menos viscosa que a goma xantana produzido por *X. c. pv. campestris* (Simpson et al., 2000; Silva et al., 2001). Mudanças no último estágio da biossíntese da goma xantana levam a uma redução na virulência de *X. c. pv. campestris* (Katzen et al., 1998).

Embora o exato mecanismo de patogenicidade não seja conhecido, a adesão e a secreção de proteínas podem ser considerados elementos importantes. Uma importante característica de *X. fastidiosa* é a necessidade de se aderir na planta hospedeira e no inseto vetor. Para colonizar o inseto vetor, *X. fastidiosa* precisa se aderir no tecido do inseto e então resistir ao alto fluxo de seiva do xilema que o inseto suga. Na planta, a adesão na parede do xilema deve possibilitar condições apropriadas para o crescimento bacteriano e formação do biofilme (Smolka et al., 2003). Um importante aspecto da patogênese bacteriana é a agregação celular (interação bactéria-bactéria), que leva a obstrução vascular do xilema, causando estresse de água e nutrientes na planta (Purcell & Hopkins, 1996; Hopkins, 1989). Além disso, proteínas secretadas como proteases, celulasas e lipases podem estar envolvidas no processo de infecção por degradarem o tecido da planta e permitindo, assim, a disseminação da bactéria através do sistema vascular (Hopkins, 1989). Proteínas tóxicas também podem ser secretadas e podem estar envolvidas no desenvolvimento da doença (Smolka et al., 2003).

2.3 A utilização de mutações para o estudo funcional de genes

A relação entre fenótipos e os correspondentes genótipos é frequentemente obtido por análises do fenótipo de mutantes e a subsequente caracterização do gene. Alternativamente, uma análise genética reversa consiste na construção de mutações em genes específicos e a investigação do fenótipo nos mutantes gerados. Mutações aleatórias podem ser criadas por produtos químicos ou por mutagênese utilizando transposon, enquanto mutações específicas são normalmente geradas por recombinação homóloga no cromossomo de bactérias (Philippe et al., 2004).

O genoma de mais de 100 raças de bactérias está completamente sequenciado. As ORFs (open reading frames) representam 90 % do cromossomo bacteriano, mas a função de 40 a 60 % dos genes não é conhecida (Philippe et al., 2004). A construção de mutantes é uma estratégia que pode ser utilizada para se decifrar a função desses genes.

Alguns métodos são utilizados para a obtenção de mutantes como: mutagênese por inserção-deleção, troca alélica e mutagênese utilizando transposon. Este último método não é utilizado para a disrupção de genes específicos, o que pode ser feito com a recombinação homóloga (mutagênese por inserção-deleção e troca alélica).

A troca alélica resulta na troca do gene selvagem por uma cópia interrompida por um marcador de seleção. Esta estratégia envolve a recombinação homóloga com duas permutas. A grande vantagem da troca alélica é o fato dessa estratégia gerar mutantes mais estáveis do que a mutagênese por inserção-deleção (Souza, 2002). Este método já foi utilizado em bactérias como *Escherichia coli* (Philippe et al., 2004), *Mycobacterium tuberculosis* (Malhotra et al., 2004) e *Xylella fastidiosa* (Gaurivaud et al., 2002). A disrupção gênica por troca alélica pode ser feita utilizando cassetes que confirmam resistência a antibiótico e expressão da enzima β -galactosidase e também genes repórteres, como *yfp* (proteína amarela fluorescente). A introdução de gene repórter no lugar do gene em estudo é muito interessante, pois assim torna-se possível à monitoração da expressão do gene.

A mutagênese por inserção-deleção envolve a recombinação homóloga com uma permuta entre o gene selvagem no cromossomo bacteriano e uma cópia truncada desse

gene, resultando na inserção do vetor plasmidial inteiro entre duas cópias do gene alvo que sofreu uma duplicação (Morrison et al., 1984). Este método de mutagênese tem sido usado para *Streptococcus pneumoniae* por mais de vinte anos (Lee et al., 1998) e também já foi utilizado em vários outros organismos como *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton et al., 2001), *Mycobacterium smegmatis* (Baulard et al., 1996) e *Xylella fastidiosa* (Monteiro et al., 2001b; Silva Neto et al., 2002; Gaurivaud et al., 2002).

Genes repórteres são amplamente utilizados para estudos de funções de genes. A proteína verde fluorescente (GFP) é codificada por um gene repórter, e é caracterizada pela habilidade de emitir fluorescência verde quando excitada por luz UV ou azul (Cody et al., 1993), sendo uma ferramenta poderosa para análises na célula através da emissão de fluorescência de suas proteínas, permitindo análises em tempo real de eventos moleculares que ocorrem na célula (Kain, 1999).

A GFP é uma proteína pequena encontrada na água viva *Aequorea Victoria*, é um excelente marcador para estudos de interações entre planta e patógeno (Xi et al., 1999), já que para a análise no microscópio de fluorescência é necessário apenas preparações simples e a integridade da estrutura da planta e da bactéria permanecem bem preservadas (Ramos et al., 2002).

Existem os variantes de GFP que apresentam as propriedades espectrais alteradas nos comprimentos de onda de excitação e emissão máximas, apresentando um aumento na intensidade da cor da fluorescência, por exemplo, azul (EBFP) (Kain, 1999), verde (EGFP) e amarelo (EYFP) (Stuurman et al., 2000). Uma característica dos variantes de *gfp* é a habilidade de emitirem também fluorescência verde (Kain, 1999).

A expressão do gene *yfp* tem sido utilizada para estudos com microorganismos (Griesbeck et al., 2001, Miller et al., 2000, Stuurman et al. 2000), células de plantas (Nowak et al., 2004, Tse et al., 2004, Bolte et al., 2004), de animais (Narayan & Greif, 2004), e em células de humanos (Kretzschmar et al., 2004, Sorkina et al., 2003).

2.4 Transformação da bactéria *Xylella fastidiosa* e obtenção de mutantes

Muitos genes supostamente relacionados com a patogenicidade estão presentes no genoma de *X. fastidiosa*, mas pouco se sabe experimentalmente sobre os mecanismos de patogenicidade comparados com outras bactérias gram-negativas. Para o estudo desses genes é necessária a utilização de métodos de interrupção, para se poder inferir a importância desses genes na interação planta-patógeno.

Em 2001 iniciou-se o desenvolvimento da tecnologia de transformação dessa bactéria através da publicação de três trabalhos desenvolvidos separadamente (Guilhabert et al., 2001; Monteiro et al., 2001b; Qin & Hartung 2001).

Transformação de *X. fastidiosa* relatado por Qin & Hartung (2001) mostrou ser instável, assim o plasmídeo vetor utilizado pode ser útil para a complementação de estudos *in vitro* de mutantes de *X. fastidiosa*, mas não em estudos *in planta*.

O primeiro relato de transformação estável de *X. fastidiosa* foi feita por Monteiro et al. (2001b) através do desenvolvimento de vetores contendo uma parte da origem de replicação da bactéria (*OriC*) de 366 pb (que compreende a região intergênia entre os genes *dnaA* e *dnaN*) ou a *OriC* inteira de aproximadamente 1,9 kb (contendo gene *dnaA* e as regiões que o flanqueiam) e o gene que confere resistência a canamicina sob a ação do promotor do gene que codifica o RNA ribossômico 16S, também de *X. fastidiosa*. Os autores testaram a transformação em cinco isolados de *X. fastidiosa* causadora de CVC e dois isolados de café, mas somente conseguiram sucesso na transformação de apenas dois isolados de CVC (J1a12 e B111) e após alguns repiques ocorreu a integração dos plasmídeos vetores na região promotora do gene do RNA ribossômico 16S por recombinação homóloga. Os autores mostraram que a mutação de um gene específico é possível nessa bactéria.

Guilhabert et al. (2001) obtiveram *X. fastidiosa* de uva transformada através de transposição utilizando transpososomas. O transpososomo é a associação de uma transposase hiperativa com um fragmento de DNA linear contendo as seqüências de

reconhecimento da enzima transposase e um gene marcador. Após seqüenciamento de dez mutantes os autores observaram que em dois deles a inserção do gene de resistência ao antibiótico canamicina ocorreu em regiões intergênicas e em oito ocorreram em ORFs conhecidas ou hipotéticas. Assim os autores obtiveram mutantes resistentes a canamicina e os transpososomas se mostraram eficientes para a transformação de *X. fastidiosa*.

Os primeiros relatos de interrupção gênica em *X. fastidiosa*-CVC foram publicados por Silva Neto et al. (2002) e Gaurivaud et al. (2002). Silva Neto et al. (2002) construíram um vetor de transformação de *X. fastidiosa* ligando o plasmídeo nativo de *X. fastidiosa* pXF1.3 no plasmídeo comercial pBluescript, e adicionando também o gene que confere resistência a canamicina sob a ação do promotor do gene do RNA ribossômico 16S. Como o pXF1.3 apresenta uma ORF com alta similaridade com uma proteína de replicação de *Actinobacillus*, foi possível a obtenção de mutantes após a clonagem de parte do gene *xpsD*. Os autores obtiveram uma porcentagem de 10 % de mutantes apresentando o gene *xpsD* interrompido devido a integração de todo o plasmídeo no meio do gene, por recombinação homóloga com uma permuta. Os autores escolheram esse gene para a interrupção devido ao fato de que a proteína codificada por ele faz parte do sistema de secreção do tipo II e em fitopatógenos proteínas secretadas através deste sistema são principalmente enzimas hidrolíticas, que apresentam um importante papel na patogênese de microorganismos.

Já Gaurivaud et al. (2002) utilizaram a origem de replicação cromossômica de *X. fastidiosa* nos vetores construídos para a interrupção por inserção-deleção dos genes *bga* e *cvaB*, e um pedaço desses genes. O gene *bga* codifica a enzima β -galactosidase que apresenta fenótipo de fácil visualização (coloração azul da colônia) foi utilizado como um modelo para a interrupção e o gene *cvaB* apresenta homologia com um componente do sistema ABC de transporte de colicina V, possivelmente envolvido na patogenidade dessa bactéria (Simpson et al., 2000). Os autores também obtiveram a interrupção do gene *bga* através de troca alélica, interrompendo o gene por inserção do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina.

A adesão de *Xylella fastidiosa* ao vaso de xilema e ao inseto vetor pode ser requerida para a virulência e transmissão da bactéria, com esta observação Feil et al (2003) fizeram a disrupção dos genes *fimA* e *fimF* que codificam a principal proteína que apresenta fimbria FimA e homólogo da fimbria adesina MrkD, para determinar suas funções no processo de adesão. Fímbricas são filamentos que se estendem da superfície bacteriana (Soto & Hultgren, 1999) e podem servir como uma âncora ao substrato e também na agregação entre as células. Estes autores obtiveram mutantes de linhagem de *X. fastidiosa* que causa doença em videira, através de troca alélica, utilizando o plasmídeo pUC18 com a sua origem de replicação e fizeram a disrupção dos genes pela inserção do gene de resistência ao antibiótico canamicina. Foi observado, com o auxílio de microscópio eletrônico, que o tamanho e número das fímbricas, agregação celular e número de células diminuíram para os mutantes FimA⁻ e FimF⁻, estes mutantes permaneceram patogênicos a videira, porém apresentaram uma população de células reduzida quando comparada com os tipos selvagens.

Guilhabert & Kirkpatrick (2003) construíram vetor para transformação de *X. fastidiosa* causadora de doença em videira, que se replica de forma autônoma na bactéria, se mantendo estável geneticamente, mas após inoculação das linhagens transformadas em plantas de videira, a bactéria perde o plasmídeo. Assim este vetor só poderia ser utilizado para estudos *in vitro*.

Koide et al. (2004) obtiveram *X. fastidiosa*-CVC resistentes a canamicina utilizando mutagênese através de transposons. Este sistema permitiu inserções aleatórias e a geração de um grande número de mutantes de uma só vez. Os autores obtiveram mutantes apresentando a disrupção de diferentes genes e mostraram que este sistema de transformação não tem preferência por inserção em seqüências específicas.

Através de disrupção do gene *rpfF* de *X. fastidiosa* que causa doença em uva, Newman et al. (2004) observaram que este gene é importante na comunicação entre as células devido a produção de uma molécula sinal difusível de baixo peso molecular (DSF). Os mutantes apresentaram baixa transmissão pelas cigarrinhas vetoras, e as cigarrinhas que se alimentaram de plantas infectadas com os mutantes eram capazes de

se “limparem” dos mutantes, isso se deve ao fato desses mutantes não formarem o biofilme para se fixarem no interior do inseto, pois DSF regula a produção de exopolissacarídeos para a formação do biofilme. Os autores observaram que na planta a formação do biofilme não é afetada nos mutantes, esta diferença pode ser devido ao tipo de ambiente a ser colonizado pela bactéria no inseto e na planta e tal diferença na arquitetura do biofilme está sob o controle da bactéria e do ambiente.

Transformação genética de *Xylella fastidiosa* pode permitir a análise das funções dos genes com a geração de mutantes defectivos em diversos processos, permitindo assim um melhor entendimento dos mecanismos moleculares da patogenicidade de *X. fastidiosa* e, talvez, possibilitando o surgimento de tratamentos eficientes para o controle de doenças causadas por esta bactéria.

2.5 Hospedeiros alternativos para o estudo da patogênese de *Xylella fastidiosa*

Uma das dificuldades para o estudo de potenciais genes de patogenicidade de *X. fastidiosa* em plantas de citros, que apesar de ideal é inapropriada, está no fato de que o desenvolvimento dos sintomas em plantas inoculadas ocorre somente após seis meses a um ano (Hartung et al., 1994). Para solucionar este problema é necessária a utilização de hospedeiros alternativos que apresentem resposta rápida para os testes de patogenicidade.

Inoculando *X. fastidiosa* em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cultivar RP1) Lopes et al. (2000) observaram os primeiros sintomas em poucas plantas depois de seis semanas após a segunda inoculação, e em todas as plantas após oito semanas. Os sintomas se caracterizaram por lesões pequenas de cor laranja-escuro, que apareceram inicialmente na margem de folhas mais velhas. Já Alves et al. (2003) estudando três diferentes cultivares de *Nicotiana tabacum* (TNN, Havana e RP1) observaram que os sintomas foliares nas cultivares RP1 e Havana eram similares aos descritos por Lopes et al. (2000) e o sintoma na cultivar TNN se caracterizava principalmente pela clorose

internerval. Mas os sintomas em Havana eram mais pronunciados e as folhas com sintomas permaneciam na planta por um período de tempo maior do que nas outras duas cultivares, demonstrando assim que a cultivar Havana é mais apropriada para ser um hospedeiro experimental de *X. fastidiosa* do que as outras duas cultivares estudadas.

Plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) também podem ser hospedeiras sintomáticas da linhagem de *X. fastidiosa* causadora da CVC, como demonstrado por Monteiro et al. (2001a). Estes autores observaram os primeiros sintomas nas plantas inoculadas com a bactéria após dois meses, e após quatro meses todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas. Os sintomas observados inicialmente foram deformação das folhas jovens e redução no porte das plantas, ocorreu também o aparecimento de manchas cloróticas marginais e ao longo das nervuras das folhas mais velhas, estas folhas sofriam abscisão mais cedo e em casos extremos as plantas retinham apenas as folhas apicais. Os autores também confirmaram que *Xylella fastidiosa* reduz sua virulência com o cultivo continuado em laboratório, mas não perde a patogenicidade devido aos repiques, pois os sintomas se manifestaram primeiro em maior porcentagem nas plantas inoculadas com a bactéria que foi menos repicada.

2.6 Parede celular vegetal

Nas paredes celulares vegetais estão presentes a parede celular primária, a lamela média e pode estar presente a parede celular secundária. A lamela média compreende os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes, sendo constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose. A parede secundária, que pode ou não estar presente, fornece um suporte estrutural à célula, apresentando também lignina (Prade et al., 1999). As paredes primárias, de um modo geral, não são uniformes na espessura e áreas mais finas, denominadas de campos primários de pontuação, estão presentes (Raven et al., 2001). Nas células condutoras e de sustentação a parede secundária estabelece-se somente sobre uma parte da parede primária não cobrindo

também os campos primários da parede primária, do que decorrem essas características pontuações (Raven et al., 2001).

Polissacarídeos da parede celular vegetal são os mais abundantes compostos orgânicos encontrados na natureza. Eles representam 90 % da parede celular vegetal e podem ser divididos em três grupos: celulose, hemicelulose e pectina (McNeill et al., 1984).

Celulose consiste de cadeias lineares de β - D-glicopiranosil ligadas por pontes glicosídicas $\beta - 1 \rightarrow 4$, que são condensadas por pontes de hidrogênio na estrutura cristalina, chamada de microfibrilas (Kolpak & Blackwell, 1976). Estas microfibrilas consistem de cadeias com mais de 250 glicoses e são ligadas pelas hemiceluloses (Carpita & Gibeaut, 1993). Em adição a estrutura cristalina, a celulose contém regiões não cristalinas dentro das microfibrilas (regiões amorfas) (Vries & Visser, 2001).

Hemiceluloses são polissacarídeos mais heterogêneos e depois da celulose são os polissacarídeos mais abundantes na parede celular vegetal. Pectina forma outro grupo de heteropolissacarídeos e consiste de cadeia linear de unidades de ácido D-galacturônico (Vries & Visser, 2001).

Hemicelulose e polissacarídeos de pectina, e também lignina, interagem com as fibras de celulose, criando uma estrutura rígida fortalecendo a parede celular vegetal (Vries & Visser, 2001).

2.7 Fatores relacionados a patogenicidade e enzimas degradadoras da parede celular vegetal

Os principais grupos de substâncias secretadas por bactérias, que parecem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças, tanto direta como indiretamente, são enzimas, toxinas, reguladores de crescimento e polissacarídeos (Long & Staskawics, 1993). Foi demonstrado em alguns patógenos a produção de compostos que atuam como supressores da resposta de defesa das plantas hospedeiras e enquanto outros que

produzem substâncias que fazem com que a bactéria se adere a planta para assim crescer e colonizá-la (Leite et al., 2001).

Observações de cortes longitudinais de pecíolos de folhas de videira com doença de Pierce, revelaram nos elementos traqueais do xilema a presença de *X. fastidiosa* formando agregados bacterianos (Tyson et al., 1985), que podem funcionar como uma rede atraindo nutrientes para a colônia, causando deficiências nutricionais em plantas afetadas (Leite et al., 2002). Os agregados bacterianos, juntamente com goma do hospedeiro, obstruem os vasos do xilema resultando em estresse de água (Beretta et al., 1997).

Análises através de microscopia de tecidos vasculares de diferentes plantas colonizadas por *X. fastidiosa* mostram que o movimento da bactéria de célula para célula é restrito às membranas do xilema. O movimento da bactéria de um vaso para outro vaso do xilema sugere a produção de enzimas que degradam a membrana e a parede celular vegetal (Hill & Purcell, 1995, Alves, 2003). Os sintomas parecem estar dependentes com a taxa e extensão da colonização (Hill & Purcell, 1995).

Muitos fitopatógenos são capazes de produzir enzimas degradadoras da parede celular vegetal como celulasas, xilanases, pectinases e proteases, que podem ser importantes fatores de patogenicidade (Norman-Setterblad et al., 2000). Genes que codificam precursor de poligalacturonase, celulasas e muitas proteases, como também a completa maquinaria necessária para a secreção das enzimas degradadoras da parede celular vegetal, foram identificados no genoma de *Xylella fastidiosa* (Simpson et al., 2000).

Em *X. fastidiosa*, enzimas secretadas que degradam a parede celular vegetal podem desempenhar um papel importante na migração entre os vasos, através da degradação da parede celular primária das pontuações dos vasos do xilema (Alves, 2003). Alternativamente, a degradação localizada da parede celular vegetal pode liberar carboidratos necessários para o crescimento bacteriano no xilema (Lambais et al., 2000).

2.7.1 Celulases

As celulases apresentam importante papel na patogenicidade de muitos microorganismos fitopatogênicos, auxiliando na dispersão dos mesmos no interior da planta e assim, favorecendo a colonização. Estas enzimas também podem ser utilizadas para explorar a energia e o carbono disponível na celulose, por organismos como fungos e bactérias que produzem uma mistura de celulases que atuam em conjunto (Teeri, 1997).

Quatro classes de enzimas estão envolvidas na biodegradação da celulose. Endoglicanases (EC 3.2.1.4) catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose. Celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) libera celobiose a partir de celulose cristalina. β -Glicosidases (EC 3.2.1.21) degrada oligossacarídeo a glicose. Exoglicanases libera glicose a partir das extremidades da cadeia de celulose (Vries & Visser, 2001).

A patogenicidade do patógeno de milho *Cochliobolus carbonum* mutante para a celulase CEL1 não foi alterada, comparando-se com o tipo selvagem, indicando que esta enzima, por si só, não é um determinante para a doença (Sposato et al., 1995). Para *Erwinia chrysanthemi* as celulases *celZ* e *celY* não são essenciais para o desenvolvimentos dos sintomas em folhas de *Saintpaulia ionantha*, embora com os mutantes *celY* os sintomas demorem mais para aparecerem (Boccara et al., 1994).

Já em *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* nos mutantes para celulase CelV1 ocorreu redução na virulência, sugerindo que este gene possa aumentar a habilidade da bactéria em macerar o tecido (Mae et al., 1995).

Em *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a transformação do mutante *celA*⁻ com este gene restabeleceu a atividade desta celulase (endoglicanase) e o fenótipo patogênico, sugerindo que esta endoglicanase desempenha um importante papel na patogenicidade deste microorganismo (Jahr et al., 2000).

Muller et al. (1997) observaram que a celulase CEL1 de *Claviceps purpurea* é induzida durante os primeiros dias da infecção de centeio. Esta enzima pode estar

envolvida na penetração e degradação da parede celular do hospedeiro, desempenhando papel no processo de infecção.

Com o seqüenciamento do genoma de *Xylella fastidiosa* foram identificados genes apresentando homologia com endoglicanases de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ORFs Xf-810 e Xf-818) e de *Ralstonia solanacearum* (ORF Xf-2708) (Wulff, 2002), que possivelmente atuam na patogenicidade da bactéria.

2.7.2 Pectato liase

Pectinas são heteropolissacarídeos complexos que contem duas diferentes regiões definidas (Perez et al., 2000). A região “lisa” consiste de esqueleto de ácido D-galacturônico e a região que apresenta ramificações com diferentes açúcares (Vries & Visser, 2001).

A diferença estrutural entre a principal cadeia das regiões ramificadas e não ramificadas da pectina tem implicações nas enzimas envolvidas na degradação destas regiões. O esqueleto da região não ramificada pode ser hidrolisado por pectina liases (EC 4.2.2.10), pectato liases (EC 4.2.2.2) e poligalacturonases (EC 3.2.1.15 e EC 3.2.1.67) (Vries & Visser, 2001).

Pectina liase prefere substratos com alto grau de metil-esterificação, enquanto que pectato liases preferem substratos com baixo grau de esterificação. Uma diferença entre estes dois tipos de enzimas é a necessidade de íons Ca^{2+} para a catálise por pectato liase e o não requerimento pela pectina liase. Seis genes de pectina liase foram identificados no genoma de *Aspergillus niger* e apenas uma pectato liase (Vries & Visser, 2001).

Pectinases são conhecidas por causarem maceração do tecido, como no caso da maioria de *Erwinia* spp. (Hendawy et al., 1997). Entre as enzimas que degradam a pectina a pectato liase é a principal delas e apresenta papel importante no desenvolvimento de doenças de podridão mole da raiz. Em *Erwinia chrysanthemi*, nove pectato liases extracelulares foram identificadas (Bekri et al., 1999). Enquanto em todas

as linhagens de *Pseudomonas viridiflava* estudadas por Liao (1989) uma única enzima pectíca é necessária para a maceração do tecido vegetal, sendo esta uma pectato liase.

Nectria hematococca, um fungo patógeno de ervilha, apresenta dois genes que codificam para pectato liases *pelA* e *pelD*, sendo *pelA* induzido por pectina enquanto *pelD* é induzido somente *in planta*. A disrupção tanto de *pelA* ou *pelD* sozinhos não acarreta na diminuição da virulência, mas a disrupção de ambos os genes causa uma redução drástica na virulência do patógeno, demonstrando que pectato liase é um fator de virulência para este fungo (Rogers et al., 2000).

Um gene com grau de similaridade de $1e^{-10}$ com pectato liase de *Pseudomonas viridiflava* (Liao et al., 1988) foi verificado no genoma de *X. fastidiosa*, mas os 236 aminoácidos da proteína de *X. fastidiosa* é similar somente a porção C terminal da proteína de 896 aminoácidos de *P. viridiflava*.

2.8 Adesão celular e MsrA

O contato célula a célula é um processo essencial para o estabelecimento da interação planta-patógeno e desenvolvimento da doença. Durante o processo de infecção e desenvolvimento da CVC, *X. fastidiosa* interage com o seu inseto vetor e células da planta hospedeira, e também com outras células da bactéria em microcolônias. Polissacarídeos extracelulares e adesinas que apresentam ou não fimbrias, desempenham papéis importantes como mediadores desse contato célula a célula de *X. fastidiosa* (Lambais et al., 2000).

Fimbrias do Tipo IV são estruturas polares filamentosas observadas em muitos patógenos bacterianos (Fernandez & Berenguer, 2000). Genes codificando proteínas responsáveis pela biogênese das fimbrias do tipo IV foram identificadas no genoma da *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000). Estas fimbrias podem ser necessárias para a ligação polar de *X. fastidiosa* à parede do intestino do inseto vetor, contribuindo para a colonização do vetor e sobrevivências das células bacterianas, e também na aderência de *X. fastidiosa* à parede celular do xilema, bem como para a formação de microcolônias

nos vasos do xilema e/ou movimentação da bactéria no sistema vascular da planta (Lambais et al., 2000).

Além de exopolissacarídeos e fimbrias do tipo IV foram identificados três genes no genoma de *X. fastidiosa* que codificam supostas adesinas, homólogos a adesinas de *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catharrhalis* (Simpson et al., 2000). Em patógenos de animais e humanos adesinas estão envolvidas na aderência ao tecido epitelial (Kerr, 1999). Em fitopatógenos, adesinas são importantes na aderência ao tecido do vetor e do hospedeiro.

Uma das adesinas encontradas no genoma de *X. fastidiosa* é a enzima denominada metionina sulfoxido redutase (MsrA; EC 1.8.4.6) que é uma enzima de manutenção da adesão, que auxilia na preservação da aderência de alguns patógenos bacterianos de humanos (Leite et al., 2002).

Leite et al. (2002) utilizando microanálise de raio X demonstraram a presença de enxofre elementar em células de *X. fastidiosa* crescendo *in vitro* e em células encontradas dentro de vasos do xilema. Picos de cálcio e magnésio foram detectados em associação com enxofre em vasos obstruídos. Os autores propuseram que radicais tióis (SH), mantidos pela enzima MsrA, podem ser ativados na superfície da bactéria e parece promover a agregação célula a célula, através da ligação dissulfeto com grupos tióis da superfície de células adjacentes ou por ligação de grupos de enxofre através de íons divalentes (S-Ca-S, S-Mg-S). Ocorreriam interações entre as células de *X. fastidiosa* e os vasos do xilema nas porções hidrofóbicas de ambos os lados e adicionalmente ocorreriam interações entre o enxofre da superfície de *X. fastidiosa* e cargas localizadas no xilema diretamente ou por pontes através de cálcio e magnésio. Após adesão inicial, a bactéria iniciaria a produção de goma fastidiosa, que estaria envolvida na arquitetura do biofilme formado pela *X. fastidiosa* no interior dos vasos do xilema, causando a obstrução.

A falta de capacidade de produzir MsrA de raças de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Escherichia coli* acarretou na redução da habilidade de adesão quando comparado com suas respectivas raças selvagens (Wizemann et al., 1996). Dhandayuthapani et al. (2001) através de disrupção do gene *msrA*, também observaram

redução da aderência do patógeno de humano *Mycoplasma genitalium* a eritrócitos de carneiro e redução da virulência.

Uma característica importante de MsrA é que ela é também uma enzima de reparo antioxidante, catalisando a redução de resíduos de metionina sulfoxido de proteínas em metionina (Dhandayuthapani et al., 2001).

Oxigênio reativo pode causar dano a muitos componentes celulares e é correlacionado com muitas doenças. As células desenvolveram uma variedade de mecanismos que destroem estas moléculas reativas ou reparam o dano quando ele ocorre. Em proteína um dos aminoácidos mais facilmente oxidado é a metionina, que é convertida a metionina sulfoxido. Sendo a enzima MsrA um importante antioxidante, e há evidências que esta enzima desempenha papel importante na proteção das células contra danos oxidativos (Weissbach et al., 2002).

Hassouni et al. (1999) observaram que o patógeno de planta *Erwinia chrysanthemi* mutante para MsrA eram mais sensíveis ao estresse oxidativo, eram menos móveis em superfície sólida, os mutantes apresentaram a virulência reduzida em folhas de chicória e nenhuma invasão sistêmica foi observada quando estes mutantes eram inoculados em plantas de *Saintpaulia ionantha*. Sugerindo que as plantas respondem a patógenos virulentos produzindo espécies ativas de oxigênio, e a enzima MsrA, reparando danos oxidativos, permite a sobrevivência do patógeno no ambiente interno do hospedeiro, suportando a teoria de que espécies ativas de oxigênio desempenham um papel importante na defesa da planta (Hassouni et al., 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORFs de *Xylella fastidiosa* selecionadas

O banco de dados de *Xylella fastidiosa*, isolado 9a5c, (<http://watson.fapesp.br/onsa/genoma3.htm>) (Simpson et al., 2000) foi utilizado para a obtenção da seqüência das ORFs (Open Reading Frames – Quadro aberto de leitura) deste trabalho.

Foram selecionadas as ORFs Xf-810, Xf-818 e Xf-2708 que apresentam atividade celulásica comprovada, mais especificamente de endoglicanases (Wulff, 2002), a ORF Xf-1940 que apresenta similaridade com genes que são essenciais para a produção e manutenção de adesinas funcionais na superfície da célula e a ORF Xf-2359, que foi classificada como uma proteína hipotética no genoma de *X. fastidiosa*, mas que apresenta similaridade ($1e^{-10}$) com pectato liase de *Pseudomonas viridiflava* (Liao et al., 1988).

Na Tabela 1 estão listadas as ORFs alvo selecionadas, o nome do cosmídeo usado para amplificar a sequência de nucleotídeos de cada ORF, a função putativa, o número de pares de bases (pb) e o valor de similaridade destas ORFs com relação a proteínas de outros organismos.

Tabela 1. Genes de *X. fastidiosa* (ORFs) selecionados

ORFs e coordenada cromossomal ¹	Cosmídeo	Função putativa	Tamanho (pb)	e-value ²
Xf - 810 (761 713-763 410 U)	XF-07H04	endoglicanase	1698	3e ⁻⁵⁰
Xf - 818 (769 640-771 418 C)	XF-07H04	endoglicanase	1779	1e ⁻¹⁴⁵
XF-1940 (1842787-1843437 C)	XF-03H12	adesina	651	2e ⁻⁶⁷
Xf - 2708 (2 588 067-2 589 137 U)	XF-07B07	endoglicanase	1071	2e ⁻⁸⁵
Xf-2359 (2.235.666 – 2.234.956 C)	XF-07A02	pectato liase	711	1e ⁻¹⁰

¹ A coordenada cromossomal refere-se a posição do gene no genoma de *X. fastidiosa* 9a5c (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>).

² Wulff et al. (2003), exceto e-value de Xf-1940 (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>).

3.2 Extração de DNA cosmidial e plasmidial

Para extração de DNA cosmidial e plasmidial as bactérias *E. coli* foram crescidas em meio LB (Anexo A) e alíquotas de 1,5 mL foram transferidas para microtubos de centrifuga, que foram centrifugados à 19.000xg por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido com 100 µL de solução 1 (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0) gelada, em seguida foi adicionado 200 µL da solução 2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%) e homogeneizado por inversão dos tubos. Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos, e então foi adicionado 150 µL da solução 3 (acetato de potássio 5M, 11,5 mL ácido acético glacial, 28,5 mL água deionizada), misturando-se por

inversão. Os tubos foram mantidos novamente no gelo por 10 minutos e, após este período, foram centrifugados a 19.000xg por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 1,5 µL de RNase (10 mg/mL). Os tubos foram incubados a 37 °C por 20 minutos. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado. Centrifugou-se a 19000xg por 15 minutos à 4°C, e o precipitado foi lavado com 750 µL de etanol 70% centrifugando à 19000xg por 15 minutos. O DNA precipitado foi seco a 37 °C e ressuspendido em 30 µL de água MilliQ esterilizada.

A extração de DNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1 % com tampão TAE 1X (Tris 40 mM pH 7,6, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) acrescido de 1 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) para cada 100 mL de TAE 1X. O gel foi fotografado, depois da corrida, com fotodocumentador Kodak Digital Science 1D, sob luz ultra-violeta (UV).

3.3 Obtenção das ORFs alvo por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para obtenção das seqüências de DNA das ORFs selecionadas, foram preparados *primers* tomando-se por base a seqüência original das ORFs. O grau de auto-complementariedade dos pares de *primers* foi avaliado através do programa Vector NTI[®] Suíte (InforMax, Inc.). Nos *primers* foram inseridos seqüências de reconhecimento de enzimas de restrição, para facilitar a clonagem dos fragmentos de DNA nos plasmídeos vetores. A síntese foi feita em escala de 50 nmoles pela Life Technologies do Brasil Ltda (São Paulo, SP). A seqüência dos *primers* utilizados para amplificar cada ORF é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers** preparados para amplificação de fragmentos de DNA das ORFs selecionadas

ORF	Nome do <i>primer</i> e seqüência (5' → 3')	Sítios de restrição inseridos	Tamanho (pb)
XF-810	F588LNd (F) caaca CATATGAGGTATGAGATGCG	<i>NdeI</i>	1991
	R588LHd (R) gtcgc AAGCTTATTCGGAAAACTGGAC	<i>HindIII</i>	
XF-818	4941B (F) g GAGCTCGGATCCTAGACGCTTGCCATCGGCCTG	<i>SstI/BamHI</i>	563
	818P2BgIII (R) g AGATCTGAAGTGTTTGAAAAACGACATTA	<i>BgIII</i>	(fragmento 5')
	818 2678 (F) t GGATCCGAATAAGACGCTTGATCCGAA	<i>BamHI</i>	537
	818P4 (R) c CTCGAGGCCGAGCGTAGGAGGTAGCGGCGTC	<i>XhoI</i>	(fragmento 3')
XF-1940	MrsaSstIBamHI (F) g GAGCTCGGATCCTGCTCAACTGTTTGATCATTGGA	<i>SstI/BamHI</i>	504
	Mrsa-BgIII (R) g AGATCTGGCTTCGATTGTCAGTACCATGA	<i>BgIII</i>	(fragmento 5')
	Mrsa-BamHI (F) c GGATCCAAGCTTCAGGTTTGAGTGGCGATAGAGA	<i>BamHI/HindIII</i>	603
	Mrsa-XhoI (R) c CTCGAGAATTCTGTCCGTACAGGCCATGA	<i>XhoI</i>	(fragmento 3')
	Mrsa2778 (F) – gt TCTAGACAGTAAGATTGATGGAA	<i>XbaI</i>	1152
	Mrsa1243 (R) – g GGATCCTATCCATTTGCTCTCTTC	<i>BamHI</i>	

Tabela 2. *Primers** preparados para amplificação de fragmentos de DNA das ORFs selecionadas

ORF	Nome do <i>primer</i> e seqüência (5' → 3')	Sítios de restrição inseridos	Tamanho (pb)	
XF-2708	2708P1SstBamHI (F) g GAGCTCGGATCCC ACTGTACGAGGTGGGTCGT	<i>SstI/BamHI</i>	540 (fragmento 5')	
	2708P2BglII (R) g AGATCTGC ATAGAAAGGAAATAGGCATAG	<i>BglII</i>		
	2708P3 (F) c GGATCCAAGCTT GATTATCCATTTAACCTG	<i>BamHI/HindIII</i>	606 (fragmento 3')	
	2708P4 (R) c CTCGAGGGT GAGCTGTA CTG GAGCTG	<i>XhoI</i>		
	XF-2359	PectatoP1SstBamHI (F) g GAGCTCGGATCCC AATAAACTCAATCTGCGGTA	<i>SstI/BamHI</i>	819 (fragmento 5')
		PectatoP2BglII (R) g AGATCTGT GATGTGGAGATTCGGTCATCG	<i>BglII</i>	
Pectato2473 (F) c GGATCC ACGAAGCCATCAAAGACCTGC		<i>BamHI</i>	424 (fragmento 3')	
Pectato2876 (R) g CTCGAGGT GCGTTGTTT GATTT TATGT		<i>XhoI</i>		

* Na seqüência de nucleotídeos dos *primers* as letras minúsculas representam os nucleotídeos adicionados para facilitar a amplificação do gene de interesse e a digestão do fragmento amplificado pelas enzimas de restrição, letras em negrito denotam sítios de restrição inseridos no *primer*. (F) – *Primer* “forward” se anela no sentido da transcrição. (R) – *Primer* “reverse” que é complementar à porção 3’ do gene.

Os *primers* foram diluídos em água para obter a concentração de 10 $\mu\text{moles}/\mu\text{L}$ e foram mantidos a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. As reações de amplificação foram preparadas seguindo o padrão abaixo:

DNA	1 μL (~50 ng)
Tampão PCR 1X (Gibco-BRL)	3 μL
MgCl ₂ (25 mM).....	1 μL
dNTPs (Gibco-BRL) (200 μM de cada)...	1 μL
<i>Primer</i> “forward”	1 μL
<i>Primer</i> “reverse”	1 μL
Taq DNA polimerase (Gibco-BRL)	1,5 U

Cada reação foi completada com água para se obter um volume final 30 μL .

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research) e foram iniciadas com desnaturação a $94\text{ }^\circ\text{C}$ por 3 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a $94\text{ }^\circ\text{C}$ por 45 segundos, pareamento a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 segundos e extensão a $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 90 segundos. A extensão final foi realizada a $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (TAE 1X) e purificados utilizando-se diferentes Kits como, GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (cat. 27-9602-01, Amersham Biosciences), Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (cat. A9282, Promega) ou Concert[™] Gel Extraction Systems (cat. 11456, Life Technologies) de acordo com as especificações dos fabricantes.

3.4 Clonagem dos fragmentos amplificados por PCR

Os fragmentos de DNA de *X. fastidiosa*, amplificados via PCR, foram clonados em vetores pGEM-T (kit pGEM[®]-T Vector System – Promega) ou pCR[®]4-TOPO (TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing – Invitrogen) ou ainda, em vetor pUC18 utilizando-se o kit “SureClone[™] Ligation kit” (Amersham Pharmacia Biotech), sem

serem digeridos com as respectivas enzimas de restrição presentes nos *primers* produzidos.

Os vetores pGEM-T e pCR®4-TOPO foram utilizados principalmente para a clonagem de produtos de PCR pois estes apresentam extremidades coesivas terminadas em adeninas (A) e os vetores apresentam no seu sítio de clonagem tiaminas (T).

A clonagem em pUC18 utilizando o kit “SureClone™ Ligation kit” foi feita, basicamente, através das seguintes etapas: reparo das extremidades dos fragmentos com as enzimas Klenow e T4 Polinucleotídeo quinase, purificação do inserto utilizando a coluna micro spin, e ligação no vetor pUC18 linearizado no sítio de clonagem da enzima *SmaI*, presentes no kit.

Para cada etapa de clonagem e subclonagem a reação de ligação entre vetor e inserto foi realizada utilizando a proporção molar de 1:4 entre vetor e inserto, respectivamente, 1 U da enzima T4 DNA ligase (Gibco-BRL) e 2 µL do tampão de ligação T4 5X, em um volume final de 15 µL, as reações de ligação eram submetidas à temperatura de 16 °C por 14 – 16 horas. O produto da ligação era utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli*, visando à amplificação clonal do novo plasmídeo.

3.5 Transformação de *E. coli* com os produtos de ligação

A transformação dos produtos de ligação em células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Hanahan et al., 1983) foi realizada adicionando-se 10 µL da reação de ligação em tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 200 µL de células competentes preparadas de acordo com o Anexo B. Essa mistura permaneceu no gelo por 20 minutos, e logo em seguida sofreu um choque térmico a 42 °C por 90 segundos, e os tubos foram transferidos imediatamente para o gelo permanecendo por 3 minutos. Em ambiente asséptico foi adicionado 1 mL de meio LB. A mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora, sob agitação de 220 rpm. Em seguida foi centrifugada por 1 minuto a 2.600xg. Cerca de 500 µL do sobrenadante foram descartados e as células foram ressuspensas no volume

restante, com auxílio de pipeta. Aproximadamente 50 µL dessa suspensão foram espalhadas em placas de petri plásticas contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina (100 mg/L) e 50 µL da solução de X-Gal/IPTG (Anexo C), para avaliação da atividade de β-galactosidase (gene *lacZ*) nos transformantes e seleção destes após incubação a 37 °C por 14 – 16 horas.

3.6 Construção dos vetores para disrupção de *Xylella fastidiosa*

Duas estratégias foram usadas para a construção dos vetores para disrupção dos genes alvo de *X. fastidiosa*:

- (1) Disrupção pela substituição da ORF pelo gene *yfp* (proteína amarela fluorescente), obtido a partir de vetor pEYFP-SK (cedido pelo Dr. Eric Lam, Rutgers University, USA), para a disrupção das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708;
- (2) Disrupção pela inserção do cassete *lacZ*-Km^R (gene da *lacZ* fusionado a região codificadora do gene de resistência ao antibiótico canamicina) clonado a partir do plasmídeo pKOK6 (Kokotek & Lotz, 1989). Esta estratégia foi utilizada para a disrupção das ORFs Xf-810 e Xf-1940.

Após a construção dos plasmídeos vetores de disrupção de *X. fastidiosa*, foi introduzido a origem de replicação cromossomal de *X. fastidiosa* (*OriC*) de 366 pb ou de 1,9 kb, obtidos respectivamente dos plasmídeos p16Kori e p16KdAori (Monteiro et al., 2001b), para permitir a transformação da bactéria.

3.6.1 Estratégia de disrupção por substituição da ORF pelo gene *yfp*

A metodologia utilizada para a construção dos plasmídeos vetores utilizando a estratégia de substituição da ORF de *X. fastidiosa* pelo gene *yfp* está representada esquematicamente na Figura 1.

Inicialmente, foram feitas amplificações de segmentos de nucleotídeos por PCR denominada de fragmentos 5' utilizando *primers* para amplificar um fragmento contendo 21 nucleotídeos da região 5' codificadora da ORF mais uma seqüência montante (*upstream*) à ORF. Para as ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 foram amplificados fragmentos 5' de 563, 504, 819 e 540 pb, respectivamente.

Da mesma forma, foram obtidos os segmentos denominados de fragmentos 3'. Os *primers* utilizados amplificam um fragmento contendo alguns nucleotídeos da região 3' da ORF e mais um segmento ajusante (*downstream*) à ORF. Para as ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 foram amplificados fragmentos 3' de 537, 603, 424 e 606 pb, apresentando 58, 9, 29 e 102 nucleotídeos da região 3' codificadora das ORFs e o restante são nucleotídeos ajusante (*downstream*) à ORF, respectivamente. Os cosmídeos utilizados para amplificação de cada ORF estão descritos na Tabela 1 e a seqüência dos *primers* estão na Tabela 2.

Após eletroforese em gel de agarose 1 %, os fragmentos foram purificados e ligados nos plasmídeos vetores. Os fragmentos 5' foram ligados em vetores pGEM-T e os fragmentos 3' foram ligados em vetores pCR[®]4-TOPO, exceto o fragmento 3' da ORF Xf-1940 que foi ligado em vetor pUC18.

Os plasmídeos contendo os fragmentos 3' foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I e esses fragmentos foram clonados em vetores pEYFP-SK digeridos com *Bg*III e *Xho*I. As enzimas *Bam*HI e *Bg*III produzem segmentos que permitem a ligação das pontas coesivas, mas não recupera nenhum destes sítios de restrição após a ligação. Os plasmídeos resultantes foram digeridos com *Sst*I e *Bam*HI, onde foram clonados os fragmentos 5', liberados dos seus vetores pela digestão com as enzimas *Sst*I e *Bg*III. Após a clonagem, cada plasmídeo produzido apresenta o gene *yfp* flanqueado pelos fragmentos 5' e 3' das ORFs de *X. fastidiosa*.

O plasmídeo p16Kori foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI liberando a seqüência da *OriC* de 366 pb, a qual foi clonada no sítio de restrição da *Bam*HI de cada um dos plasmídeos descritos acima, produzindo os plasmídeos finais usados para transformar *Xylella fastidiosa*.

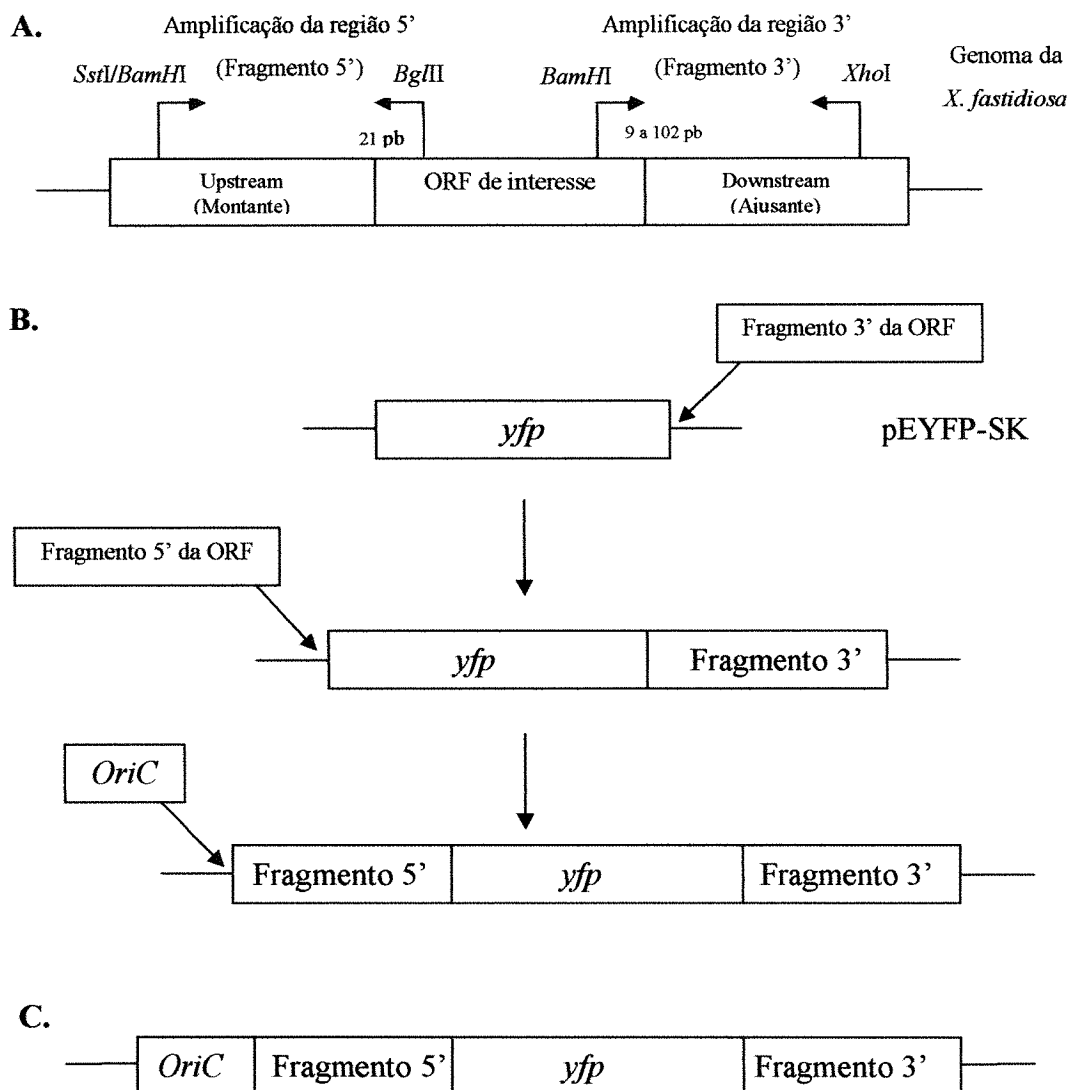


Figura 1 – Esquema para a construção dos plasmídeos vetores para a disrupção das ORFs de *Xylella* por substituição pelo gene *yfp*. **A.** Amplificação dos fragmentos 5' e 3' das ORFs de interesse do genoma de *X. fastidiosa* por PCR. **B.** clonagem dos fragmentos 5' e 3' flanqueando a região codificadora do gene *yfp* no plasmídeo pEYFP-SK e introdução da *OriC* de 366 pb do vetor p16Kori. **C.** Representação do plasmídeo final que foi utilizado na transformação da bactéria *X. fastidiosa*

3.6.2 Estratégia de interrupção por inserção do cassete *lacZ-Km^R*

A metodologia utilizada para a construção dos plasmídeos vetores para a interrupção da ORF de *X. fastidiosa* utilizando a estratégia da inserção do cassete *lacZ-Km^R* está representada esquematicamente na Figura 2.

Foram feitas, inicialmente, ampliações de fragmentos de 1767 e 1152 pb das ORFs Xf-810 e Xf-1940, respectivamente, utilizando os *primers* F588LNd e R588LHd para a ORF Xf-810 e os *primers* Mrsa1243 e Mrsa2778 para a ORF Xf-1940 (Tabela 2). O fragmento da ORF Xf-810 contém 69 nucleotídeos da região adjacente à ORF, enquanto o fragmento da ORF Xf-1940 contém 180 nucleotídeos da região montante e 321 nucleotídeos da região adjacente à ORF. Cada fragmento das ORFs foram clonados no sítio de restrição *SmaI* do vetor pUC18 (“SureCloneTM Ligation kit”-Amersham Pharmacia Biotech), conforme descrito no item 3.4. O fragmento contendo a ORF Xf-810 resultou no plasmídeo pNAW22 preparado por Nelson Wulff (Wulff, 2002) e o fragmento da ORF Xf-1940 resultou no plasmídeo pSG50.

Como a ORF Xf-810 apresenta no seu interior dois sítios de restrição para a enzima *BglIII*, pNAW22 foi digerido com esta enzima para inserir o cassete *lacZ-Km^R* isolado do plasmídeo pKOK6 (Kokotek & Lotz, 1989), pela digestão com *BamHI* para liberar o cassete com 4,7 kb, que foi ligado no sítio *BglIII* da ORF Xf-810, e produziu o plasmídeo pSG30. Este plasmídeo apresenta o cassete *lacZ-Km^R* interrompendo a ORF Xf-810, dividindo o fragmento em duas regiões, a região 5' com 322 nucleotídeos e a região 3' com 384 nucleotídeos.

Para finalizar a construção do plasmídeo vetor de interrupção da ORF Xf-810 foi inserida a sequência da *OriC* para permitir a transformação de *X. fastidiosa*. A *OriC* de 366 pb foi digerida do plasmídeo p16Kori com a enzima *BamHI* e foi inserida no mesmo sítio de restrição presente no plasmídeo pSG30, resultando no plasmídeo final pSG31.

Já o plasmídeo pSG50, apresenta dois sítios para a enzima *PstI*, sendo um sítio localizado no interior da ORF Xf-1940 e outro localizado no vetor adjacente a região 5' dessa ORF. Este plasmídeo foi parcialmente digerido com a enzima *PstI*, inserindo no sítio interno da ORF o cassete *lacZ-Km^R*, digerido do plasmídeo pKOK6 com a mesma

enzima, *Pst*I, resultando no plasmídeo pSG51. Este plasmídeo apresenta o cassete *lacZ*-*Km*^R interrompendo a ORF e dividindo o fragmento em duas regiões a região 5' com 633 nucleotídeos e a região 3' com 519 nucleotídeos.

A partir do plasmídeo pSG51 foram construídos dois plasmídeos para interrupção da ORF Xf-1940 em *X. fastidiosa*. Primeiramente pSG51 foi parcialmente digerido com *Bam*HI, pois apresenta dois sítios de restrição para esta enzima localizados nas extremidades dos fragmentos 5' e 3'. Em um dos sítios foi clonada separadamente a *OriC* de 366 pb e outra de 1,9 kb, digeridas também com *Bam*HI dos plasmídeos p16Kori e p16KdAori, respectivamente. As construções finais resultantes foram os plasmídeos pSG52 (com *OriC* de 366 pb) e pSG53 (com *OriC* de 1,9 kb).

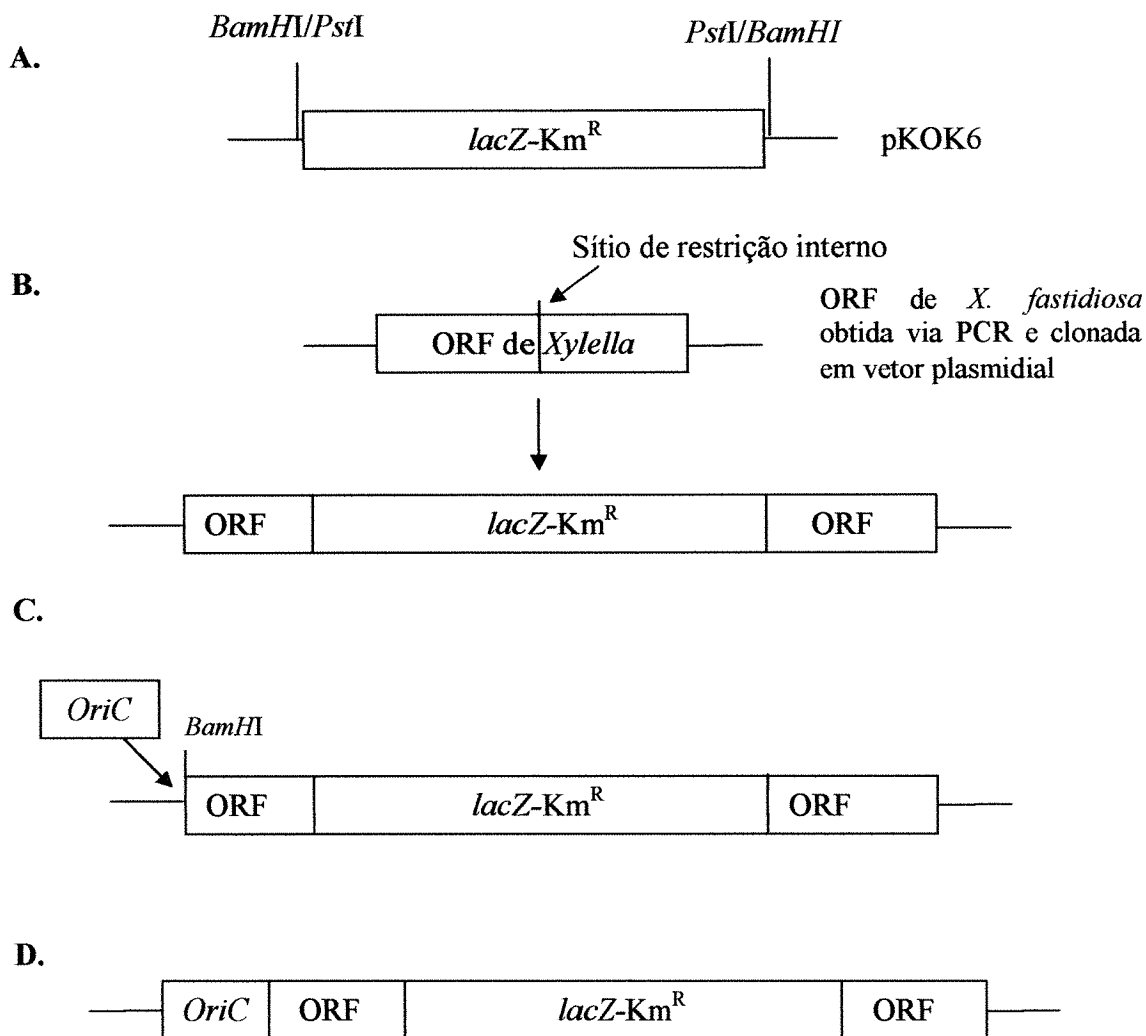


Figura 2 - Esquema para a construção dos plasmídeos vetores para a disrupção das ORFs Xf-810 e Xf-1940, utilizando o cassete *lacZ-Km^R*. **A.** Representação do plasmídeo pKOK6, progenitor do cassete *lacZ-Km^R*. **B.** Representação dos plasmídeos vetores contendo as ORFs de interesse, demonstrando o sítio interno específico das enzimas de restrição, *Bgl*III ou *Pst*I, local de inserção do cassete *lacZ-Km^R*. **C.** Demonstração da inserção da *OriC* de 366 pb ou de 1,9 kb no sítio da *Bam*HI externo à ORF. **D.** Representação do plasmídeo final para transformação de *X. fastidiosa*

3.7 Confirmação da identidade dos plasmídeos de interrupção de *X. fastidiosa*

Após cada etapa de clonagem os plasmídeos produzidos foram digeridos com enzimas específicas para a verificação da presença do inserto, e aqueles que apresentaram o fragmento de tamanho esperado foram seqüenciados para confirmar novamente a identidade dos clones e se as seqüências estavam de acordo com o quadro aberto de leitura, para expressão da proteína codificada pelo gene inserido.

As reações de PCR de seqüenciamento foram feitas em placa de seqüenciamento (MicroAmp® Optical 96 – Well Reaction Plate, Applied Biosystems) utilizando 10 pmoles/ μ L do *primer* M13/pUC – *Reverse* (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') ou M13/pUC-*Forward* (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'), ou ainda *primers* específicos utilizados nas ampliações por PCR dos fragmentos, dependendo do plasmídeo sendo analisado, 2 μ L de tampão de seqüenciamento, 100 ng de DNA plasmidial e 2 μ L do reagente de seqüenciamento (kit Big Dye™ Terminator – Perkin Elmer Biosystems). O volume final foi de 10 μ L completado com água MilliQ. Utilizou-se para as reações termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems) iniciando com desnaturação à 96 °C por 2 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação à 96 °C por 45 segundos, pareamento à 50 °C por 30 segundos e extensão à 60 °C por 4 minutos. A extensão final foi realizada a 60 °C por 2 minutos.

Para retirar os sais do tampão, bem como os nucleotídeos fluorescentes não incorporados, fez-se a purificação da amostra adicionando-se 60 μ L de isopropanol 75% (preparado no momento de utilização) ao volume de 10 μ L da reação de PCR e agitou-se vigorosamente 20 vezes. A placa de seqüenciamento foi mantida 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Centrifugou-se por 45 minutos a 2.250xg e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 150 μ L de etanol 70% (a temperatura ambiente) e centrifugado 10 minutos a 2.250xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco no escuro a temperatura ambiente por 2 horas e armazenado em refrigerador (4 °C), até o momento do seqüenciamento.

Imediatamente antes do seqüenciamento adicionou-se 10 µL de formamida a cada reação de seqüenciamento purificada e a placa foi agitada durante 30 segundos, o DNA foi desnaturado por 5 minutos a 95 °C e as reações foram colocadas no gelo. O seqüenciamento foi feito em seqüenciador capilar automático ABI-3100 (Applied Biosystems/Hitachi) de acordo com instruções do fabricante.

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências do banco de dados da *X. fastidiosa* (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>), para confirmar a identidade da seqüência de DNA.

Para analisar se o códon de iniciação (ATG) do gene *yfp* estava na mesma seqüência de tradução das ORFs, foram feitos seqüenciamentos (como descrito anteriormente) utilizando separadamente os *primers* “forward” dos fragmentos 5’ e o *primer* “reverse” P1EY(G)FP (Tabela 3), que se parecia na região interna do gene *yfp*. Essas seqüências foram analisadas no programa Vector NTI Suite v .6.0 (InforMax, Inc. USA).

Todas as culturas de *E. coli* contendo os plasmídeos construídos corretamente foram misturadas em igual proporção com uma solução de glicerol 100% esterilizada por autoclavagem, e armazenadas em ultracongelador a – 80°C, para fazer parte do estoque de clones produzidos pelo laboratório para que possam ser utilizadas em pesquisas no futuro.

3.8 Análise da expressão dos genes *yfp* e *lacZ-Km^R* das construções finais em *E. coli*

A expressão do gene *yfp*, nos plasmídeos finais contendo este gene foi observada após inoculação das bactérias em lâmina de microscópio e observação da expressão da proteína YFP feita em microscópio Fluorescent Microscope Axioplan 2 (Zeiss), Depto. de Genética ESALQ/USP, utilizando o mesmo filtro que é utilizado para expressão do gene *gfp* (proteína verde fluorescente), luz UV.

Para os testes de resistência ao antibiótico canamicina e expressão do gene *lacZ*, as bactérias *E. coli* transformadas com as construções contendo o cassete *lacZ-Km^R*

foram inoculadas em meio LB sólido suplementado com o antibiótico canamicina (50 mg/L) e 50 µL da solução X-Gal/IPTG espalhado nas placas, 30 minutos antes da inoculação das bactérias. A confirmação ocorreu devido a resistência ao antibiótico canamicina e a visível coloração azul das colônias de bactérias *E. coli*.

3.9 Cultivo da bactéria *Xylella fastidiosa*

A linhagem de *Xylella fastidiosa* utilizada foi a J1a12 (Monteiro et al., 2001b). Esta linhagem foi isolada de plantas de citros, sintomáticas para a CVC, coletadas na região de Jales, estado de São Paulo.

O meio de cultura utilizado para *X. fastidiosa* foi o PW (Davis et al., 1978) que contém os ingredientes abaixo, em cada litro de meio preparado:

Peptona	4 g
Triptona	1 g
K ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g
Hemina clorada (0,1%)	10 mL
Vermelho de fenol (0,2%) ...	10 mL
Água destilada	850 mL
Ágar	10 g

Após autoclavagem (20 minutos), com o meio resfriado por volta de 60 °C, adicionou-se, sob condições assépticas, 80 mL de L-Glutamina (4 %), 30 mL de albumina de soro bovino fração V (BSA) (10 %) e 20 mL de solução de glicose 50 %. Estas soluções foram previamente esterilizadas por filtração (filtro de 0,2 µm).

O cultivo de *X. fastidiosa* ocorreu a 28 °C sob agitação constante de 100 rpm. A subcultura da bactéria para meio fresco foi realizada em uma diluição de 1/10, a cada sete dias.

3.10 Preparo de células competentes e transformação de *Xylella fastidiosa*

Para o preparo de células competentes, uma colônia de *X. fastidiosa* crescendo em meio sólido PW foi inoculada em 0,5 mL de PW líquido. Após sete dias de cultivo a 28°C e 100 rpm adicionou-se 2 mL de meio PW, após 7 dias novamente adicionou-se 25 mL de meio PW e 7 dias depois adicionou-se mais 250 mL de meio PW, após mais 7 dias esta cultura foi utilizada para preparo de células competentes.

No preparo de células competentes todas as etapas eram feitas de maneira a deixar as células em temperaturas baixas (gelo) para aumentar a eficiência das células competentes. A cultura de 250 mL foi transferida para tubo de polipropileno gelado e centrifugada a 2.600xg por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuscitado, com auxílio de pipeta, em 200 mL de água MilliQ gelada e centrifugado a 2.600xg por 15 minutos a 4 °C. As bactérias precipitadas foram ressuscitadas em 200 mL de solução de glicerol (10%) gelada e foram novamente centrifugadas como descrito. O precipitado final foi ressuscitado em 1,0 mL de glicerol 10 % e alíquotas de 100 µL foram transferidas para microtubos de centrifuga, previamente gelados que foram congelados em nitrogênio líquido e estocados em ultracongelador (- 80 °C).

Para a transformação 100 µL de células competentes foram mantidas no gelo durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 µg de DNA plasmidial e a mistura de células competentes de *X. fastidiosa* e DNA foi transferida para cubeta de eletroporador de 0,2 cm (Bio-Rad, cat. nº 165-2086), estéril e gelada. As células foram transformadas em eletroporador GenePulser (Bio-Rad), utilizando 2,5 kV de potência, 200 Ω de resistência, e um campo de 25 µF. Imediatamente após a aplicação da corrente elétrica as células foram ressuscitadas em 1 mL de meio PW, transferidas para tubos de 15 mL e incubadas a 28°C e 100 rpm por 24 horas. Para a seleção dos transformantes 150 µL das culturas transformadas foram plaqueadas em duas placas com meio PW sólido contendo ou não o antibiótico canamicina (5 mg/L), quando utilizado o vetor para disrupção do gene com *lacZ-Km^R*. Quando utilizado o vetor para disrupção com o gene *yfp* não foi utilizado antibiótico no meio de seleção. As placas foram envolvidas em

Parafilme e incubadas a 28°C até o surgimento das colônias. O restante das culturas transformadas foram cultivadas em meio PW líquido e subcultivadas a cada sete dias, para posterior extração de DNA genômico e análises da eficiência do método de transformação.

3.11 Extração de DNA de *X. fastidiosa*

A extração de DNA de *Xylella fastidiosa* foi realizada utilizando 30 mL de cultura de células crescidas por uma semana que foi centrifugada por 15 minutos a 9.700xg e seu sobrenadante descartado. O precipitado de células formado foi ressuspenso em 567 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8) e em seguida adicionou-se a 30 µL de SDS 10 %, 6 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 5 µL de RNase (10 mg/mL). Após agitação, a mistura foi incubada a 37 °C durante 1 hora. Foram então adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10 % (Anexo D) e incubou-se novamente por 10 minutos à 65 °C. Em seguida adicionou-se 700 µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v). A solução foi homogeneizada por agitação manual e centrifugada a 19.000xg por 10 minutos. A fase superior foi transferida para novo tubo e foi adicionado 700 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v), em seguida a solução foi homogeneizada por agitação e centrifugada a 19.000xg por 10 minutos. A fase superior foi novamente transferida para novo tubo e o DNA foi então precipitado, adicionando-se 500 µL de isopropanol, homogeneizando-se por inversões do tubo e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. O tubo foi então centrifugado por 15 minutos a 4 °C e 19.000xg, e o DNA precipitado foi a seguir lavado com 1,5 mL de etanol 70%. O DNA foi seco e ressuspenso em 50 µL de água MilliQ estéril.

3.12 Confirmação do isolado de *X. fastidiosa*

Para a confirmação do isolado de *Xylella fastidiosa* uma alíquota do DNA obtido (~50 ng) foi utilizada para amplificação por PCR de uma região específica do genoma de *X. fastidiosa*. Para isso foram utilizados os *primers* CVC1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAAA-3') e CVC272-2int. (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT-3'), que foram delineados a partir de uma inserção de 28 nucleotídeos, presente apenas nos isolados de *X. fastidiosa* que causam CVC (Pooler & Hartung, 1995b).

As condições utilizadas para a amplificação foram: 1 µL de tampão PCR 1X (Gibco-BRL), 1 µL de MgCl₂ (25 mM), 200 µM de cada dNTPs (Gibco-BRL), 1 µL de cada *primer* (10 pmoles/µL) e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL), em um volume final de 30 µL. A amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research) e foi iniciada com desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (TAE 1X).

3.13 Confirmação da obtenção de *X. fastidiosa* transformada

Para a confirmação da transformação de *X. fastidiosa* foi isolado DNA genômico a partir de uma cultura de 25 mL crescida por uma semana após a transformação, conforme item 3.10. Em seguida 1 µL (~50 ng) deste DNA foi utilizado para a reação de PCR utilizando a combinação de *primers*: (1) CVC1 e CVC272-2int, para confirmação do isolado de *Xylella fastidiosa*; (2) o *primer* “forward” do fragmento 5' e o *primer* P1EY(G)FP (interno ao gene *yfp*) (Tabela 3) ou (3) o *primer* “reverse” do fragmento 3' e o *primer* “forward” P2EY(G)FP (interno ao gene *yfp*) (Tabela 3), confirmando a

presença do fragmento presente no plasmídeo contendo a ORF interrompida pelo gene *yfp*, na amostra de DNA analisada.

Para se ter certeza da ocorrência da integração do gene *yfp* e do cassete *lacZ-Km^R* no genoma da *X. fastidiosa*, foram utilizados *primers* específicos do genoma da bactéria em conjunto com *primer* P1EY(G)FP, interno ao gene *yfp*, ou *primer* KM Antisense, interno ao cassete *lacZ-Km^R*, usados para a disrupção das ORFs alvo deste trabalho (Tabela 3).

Para a confirmação da disrupção da ORF Xf-1940 com o cassete *lacZ-Km^R* (pSG52 e pSG53) foi utilizado os *primers* Mrsa-XhoI (Tabela 2) e o KM Antisense (Tabela 3).

As bactérias *X. fastidiosa* contendo as ORFs alvo substituídas com o gene *yfp* foram testadas com os *primers*: P1EY(G)FP e um *primer* externo à ORF, não presente no plasmídeo usado na transformação da bactéria. As bactérias *X. fastidiosa* contendo as ORFs alvo interrompidas pelo cassete *lacZ-Km^R* foram analisadas pela amplificação de um fragmento de DNA com os *primers* KM Antisense (interno à *lacZ-Km^R*) e um *primer* externo às ORFs não presente nos plasmídeos de transformação (Tabela 3).

Tabela 3. *Primers* utilizados para a confirmação da disrupção das ORFs de interesse

ORF	Nome do <i>primer</i> e seqüência (5' → 3')
Xf-810	XF810R (<i>reverse</i>) 5' – CGTTAGGCAACTGCGGAGC – 3'
Xf-818	XF818 (<i>forward</i>) 5' – CCCATAGCCGACAAACACCA – 3'
Xf-2708	XF2708 (<i>forward</i>) 5' – GCGGGAGTACCTGCGTTGTAC – 3'
Xf-1940	XF1940 (<i>forward</i>) 5' – GTGCGCCATTGATTTCCAACG - 3'
Xf-2359	XF2359 (<i>forward</i>) 5' – GCCTCACTCAGCGGCTGCAA - 3'
	KM Antisense (<i>forward</i>) 5' – TCACCGAGGCAGTTCCATA – 3'
	P1EY(G)FP (<i>reverse</i>) 5'-GCCCTCGCCGGACACGCTG-3'
	P2EY(G)FP (<i>forward</i>) 5'-CGGGATCACTCTCGGCATG-3'

4 RESULTADOS

4.1 ORFs alvo selecionadas e as estratégias de disrupção destas ORFs em *X. fastidiosa*

A análise do genoma da *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000) identificou as ORFs Xf-810, Xf-818 e Xf-2708 que apresentam similaridade com endoglicanases, a ORF Xf-2359 com similaridade a pectato liase e a ORF Xf-1940 apresentando similaridade com a adesina MsrA e devido a importância comprovada destas enzimas na patogenicidade de alguns microorganismos, foram escolhidas para serem estudadas neste trabalho.

Estas ORFs de *X. fastidiosa* foram clonadas a partir de cosmídeos utilizados no programa de seqüenciamento do genoma da bactéria, efetuado pela rede ONSA (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>).

Duas estratégias foram usadas para a construção de vetores para disrupção das ORFs alvo de *X. fastidiosa* e obtenção de bactérias mutantes. Uma das estratégias utilizadas foi a disrupção das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 pela substituição da ORF pelo gene *yfp*, que codifica a proteína amarela fluorescente. A outra estratégia foi a disrupção das ORFs pela inserção do cassete *lacZ-Km^R*, esta estratégia foi utilizada para a construção dos vetores de disrupção das ORFs Xf-810 e Xf-1940.

4.2 Construção dos vetores para disrupção das ORFs por substituição pelo gene *yfp*

4.2.1 PCR e clonagem dos fragmentos 3' e 5'

Inicialmente foram feitas reações de PCR, com os *primers* descritos na Tabela 2, para amplificação dos fragmentos 3' e 5' das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708, utilizando DNA isolado dos cosmídeos XF-07H04, XF-03H12, XF-07A02 e XF-07B07, respectivamente.

A Figura 3 mostra os fragmentos dos genes de interesse amplificados a partir de DNA cosmidial. Pode-se observar que os fragmentos obtidos possuem os respectivos tamanhos esperados, conforme listado na Tabela 2.

Os fragmentos 3' e 5' das ORFs de interesse obtidos, foram purificados do gel de agarose e inseridos em vetores pUC18 (fragmento 3' da ORF Xf-1940) e pCR[®]4-TOPO (fragmentos 3' das ORFs Xf-818, Xf-2359 e Xf-2708) e em vetor pGEM-T (fragmentos 5'), utilizando as metodologias específicas para cada vetor, e foram transformados em *E. coli*. Após 14 horas de cultivo, colônias brancas e com resistência a ampicilina, que possivelmente continham o DNA recombinante, foram selecionadas e cultivadas para extração do DNA dos plasmídeos.

A confirmação da clonagem dos fragmentos 3' foi feita digerindo-se os plasmídeos com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, enquanto na confirmação da clonagem dos fragmentos 5' foram utilizadas as enzimas *Sst*I e *Bg*III. Estes sítios de restrição foram inseridos nos *primers* empregados para a amplificação dos fragmentos de DNA de *X. fatidiosa*, de forma a permitir as subclonagens posteriores.

Desta forma foram confirmadas as clonagens dos fragmentos 3' e 5' das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 através do perfil de cada restrição, que originava uma banda com tamanho esperado para o fragmento 3' de 537 pb (Xf-818), 603 pb (Xf-1940), 424 pb (Xf-2359) e 606 pb (Xf-2708) e outra banda com os vetores pUC18 de 2.686 pb para o fragmento 3' da ORF Xf-1940 e o pCR[®]4-TOPO de 3.954 pb para os fragmentos 3' das ORFs Xf-818, Xf-2359 e ORF Xf-2708 (Figura 4A).

Com estes resultados, foi então confirmado a construção dos plasmídios pSG1, pVF2, pSG12 e pSG21 que contém, respectivamente, os fragmentos 3' das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708.

Também foi confirmado a construção dos plasmídios pSG2, pSG55, pSG11 e pSG22 contendo, respectivamente, os fragmentos 5' de 563 pb, 504 pb, 819 pb e 540 pb das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708, respectivamente, clonados em vetores pGEM-T de 3000 pb (Figura 4B).

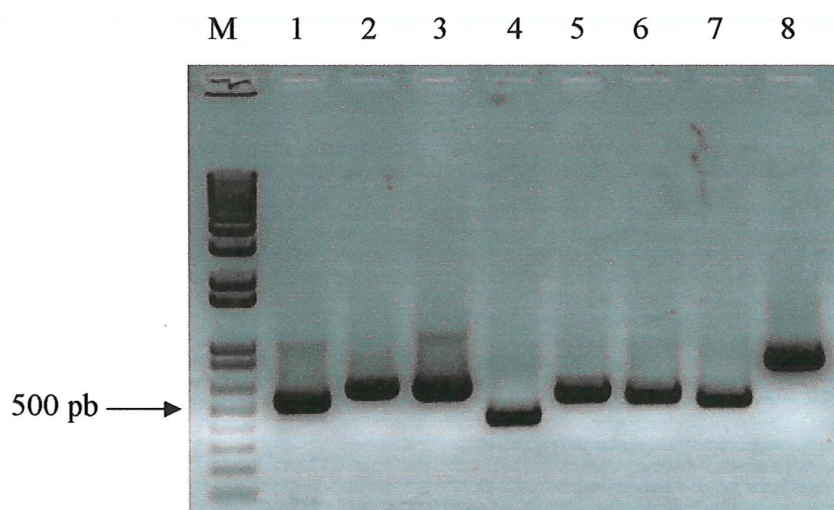


Figura 3 – Obtenção dos fragmentos 3' e 5' das ORFs de interesse amplificados através de PCR e separados em gel de agarose 1 %. Foram empregados os iniciadores descritos na Tabela 2. Linhas de 1 a 4: apresentam os fragmentos 3' das ORFs Xf-818 (537 pb), Xf-2708 (606 pb), 1940 (603 pb) e Xf-2359 (424 pb). Linhas de 5 a 8: apresentam os fragmentos 5' das ORFs Xf-818 (563 pb), Xf-2708 (540 pb), Xf-1940 (504 pb) e Xf-2359 (819 pb). M – Marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)

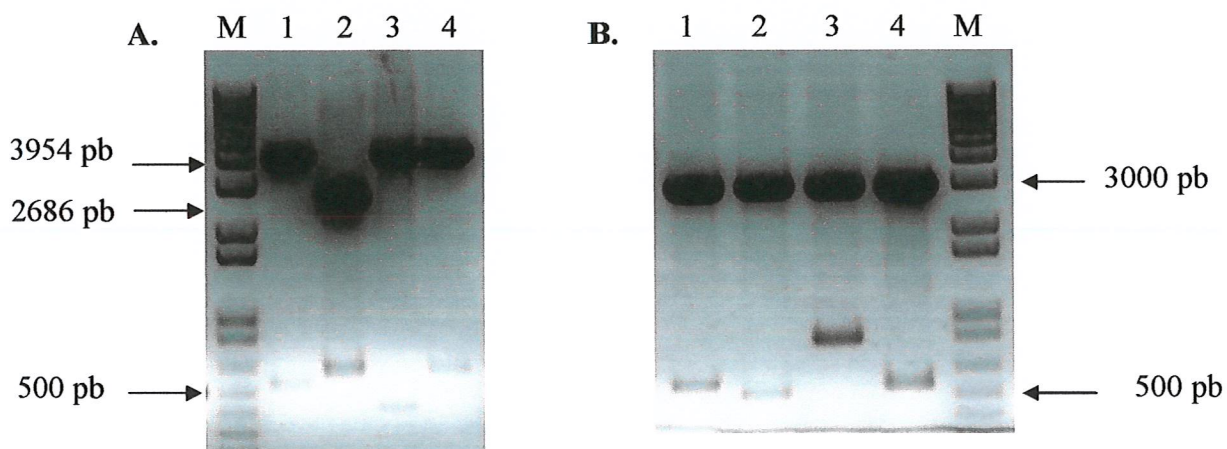


Figura 4 – Perfil de restrição dos plasmídios para confirmação da presença dos fragmentos 3' e 5'. **A.** Linhas 1 a 4: clones positivos para clonagem dos fragmentos 3' das ORFs Xf-818 (pSG1), Xf-1940 (pVF2), Xf-2359 (pSG12) e Xf-2708 (pSG21), respectivamente. **B.** Linhas 1 a 4: clones positivos para clonagem dos fragmentos 5' das ORFs Xf-818 (pSG2), Xf-1940 (pSG55), Xf-2359 (pSG11) e Xf-2708 (pSG22), respectivamente. As bandas de maior tamanho representam os vetores linearizados. M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)

4.2.2 Clonagem dos fragmentos 3' em vetor pEYFP-SK

Os plasmídeos pSG1, pVF2, pSG12 e pSG21 digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I produziram os fragmentos 3' (Figura 4A), que foram purificados do gel de agarose e clonados em vetor pEYFP-SK digerido com as enzimas *Bgl*II e *Xho*I. Os produtos destas ligações foram transformados em *Escherichia coli* e a confirmação das clonagens foram feitas pelas reações de restrição com as enzimas *Sst*I e *Xho*I, para separação de fragmentos cujos tamanhos compreendam os fragmentos 3' fusionados ao gene *yfp* que possui 797 pb (Figuras 5).

Observando-se a Figura 5 confirmaram-se as clonagens, pois foram obtidos os fragmentos de 1.334 pb (Xf-818), 1.221 pb (Xf-2359), 1.403 pb (Xf-2708) e 1.400 pb (Xf-1940), separados do restante do vetor de 3000 pb.

Foi confirmado então as construções pSG3, pSG13, pSG23 e pVF4 contendo respectivamente os fragmentos 3' das ORFs Xf-818, Xf-2359, Xf-2708 e Xf-1940 clonados em vetor pEYFP-SK. A representação destes plasmídeos está na Figura 6.

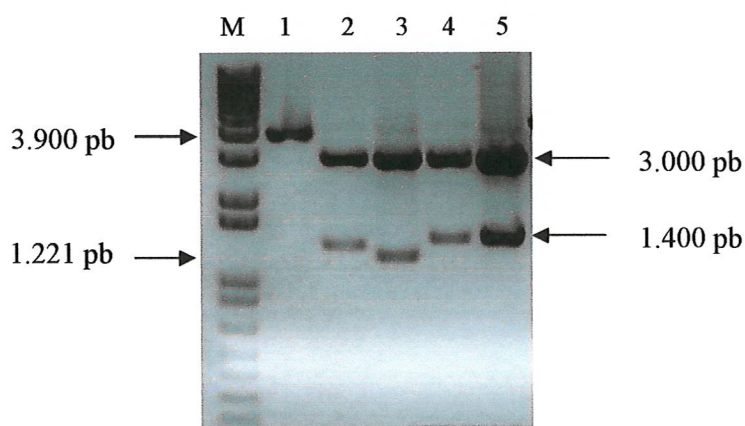


Figura 5 – Perfil de restrição dos plasmídios para a verificação da presença dos insertos. Linha 1: pEYFP linearizado com *Xho*I (3.900 pb). Linhas 2 a 5: plasmídios pSG3, pSG13, pSG23 e pVF4 digeridos com *Sst*I e *Xho*I, confirmando a presença de bandas representando os fragmentos 3' fusionados ao gene *yfp* (1.334 pb, 1.221 pb, 1.403 pb e 1.400 pb, respectivamente) e o restante do vetor (3.000 pb). M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder

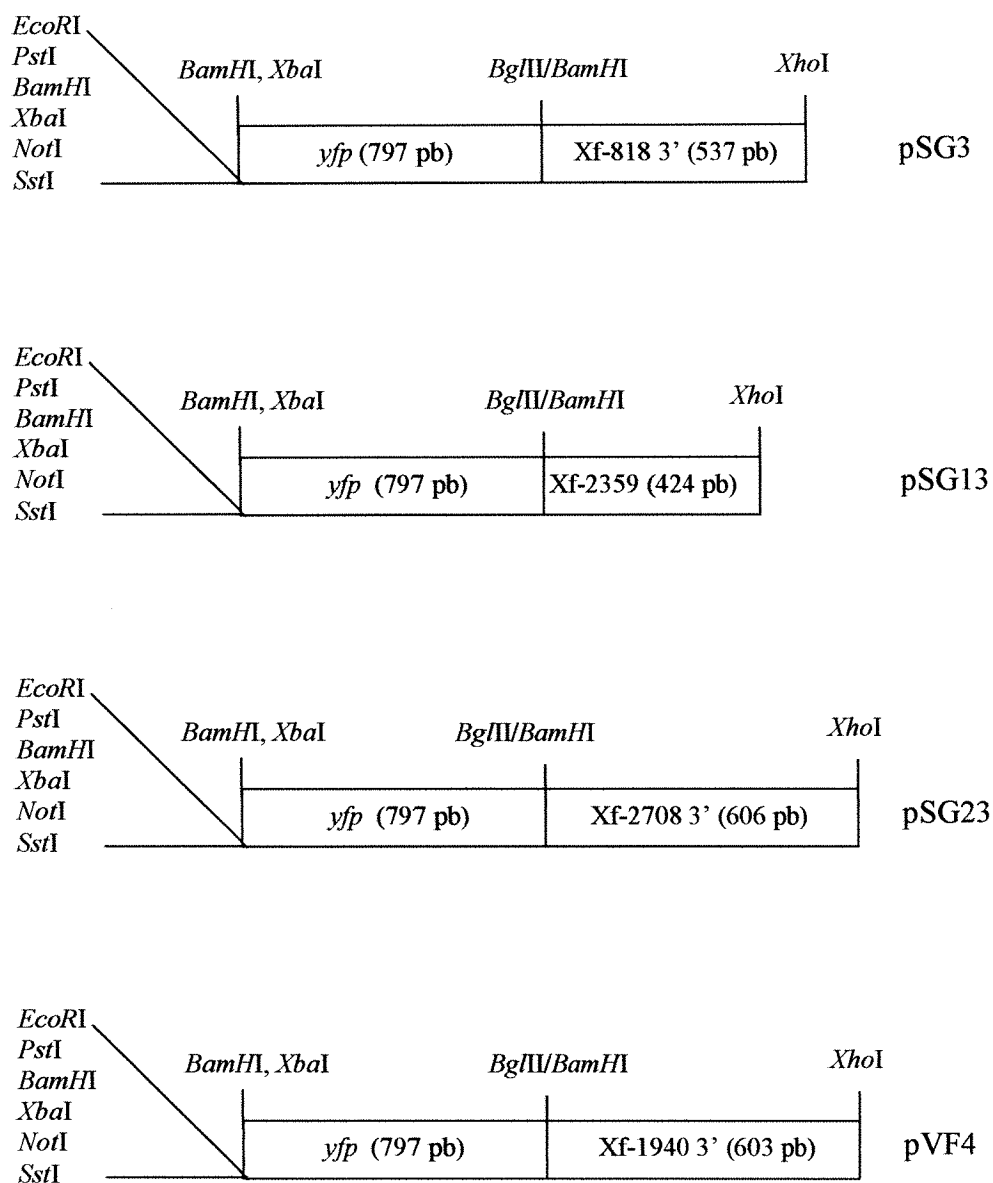


Figura 6 - Esquemas representando os fragmentos 3' das ORFs fusionados ao gene *yfp* em vetor pEYFP resultando nos plasmídios pSG3, pSG13, pSG23 e pVF4

4.2.3 Clonagem dos fragmentos 5' nos vetores pSG3, pSG13, pSG23 e pVF4

Após a construção dos plasmídios pSG3, pSG13, pSG23 e pVF4 fez-se a inserção dos fragmentos 5' nos sítios *Sst*I e *Bam*HI destes plasmídios, a partir dos plasmídeos pSG2, pSG55, pSG11 e pSG22 que foram digeridos com as enzimas *Sst*I e *Bgl*II liberando os fragmentos 5'.

Analisando o perfil de restrição dos plasmídios produzidos por reações de restrição com as enzimas *Sst*I e *Xho*I (Figura 7), para separação de fragmentos cujos tamanhos correspondam ao gene *yfp* flanqueado pelos fragmentos 5' e 3' das ORF, as clonagens foram confirmadas, pois foram obtidas as bandas de 1.894 pb (Xf-818), 2.040 pb (Xf-2359), 1.943 pb (Xf-2708) e 1.904 pb (Xf-1940), separadas do restante do vetor de 3.000 pb.

Confirmaram-se então as construções dos plasmídios pSG4, pSG14, pSG25 e pSG57 contendo o gene *yfp* flanqueado, respectivamente, pelos fragmentos 5' e 3' das ORFs Xf-818, Xf-2359, Xf-2708 e Xf-1940, representados na Figura 8.

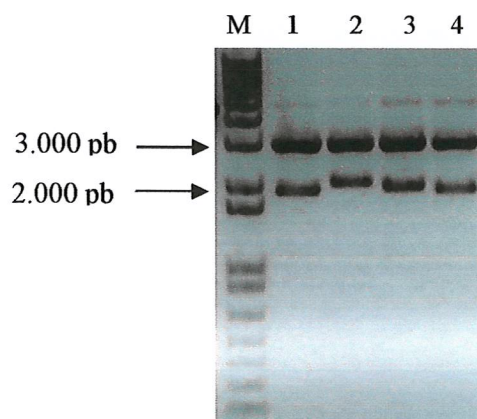


Figura 7 – Perfil de restrição dos plasmídios para a verificação da presença dos insertos.

Linhas 1 a 4: plasmídios pSG4, pSG14, pSG25 e pSG57 digeridos com *Sst*I e *Xho*I, confirmando a presença de bandas representando o gene *yfp* flanqueado pelos fragmentos 5' e 3' das ORFs Xf-818 (1.894 pb), Xf-2359 (2.040 pb), Xf-2708 (1.943 pb) e Xf-1940 (1904 pb) e o restante do vetor (3.000 pb). M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)

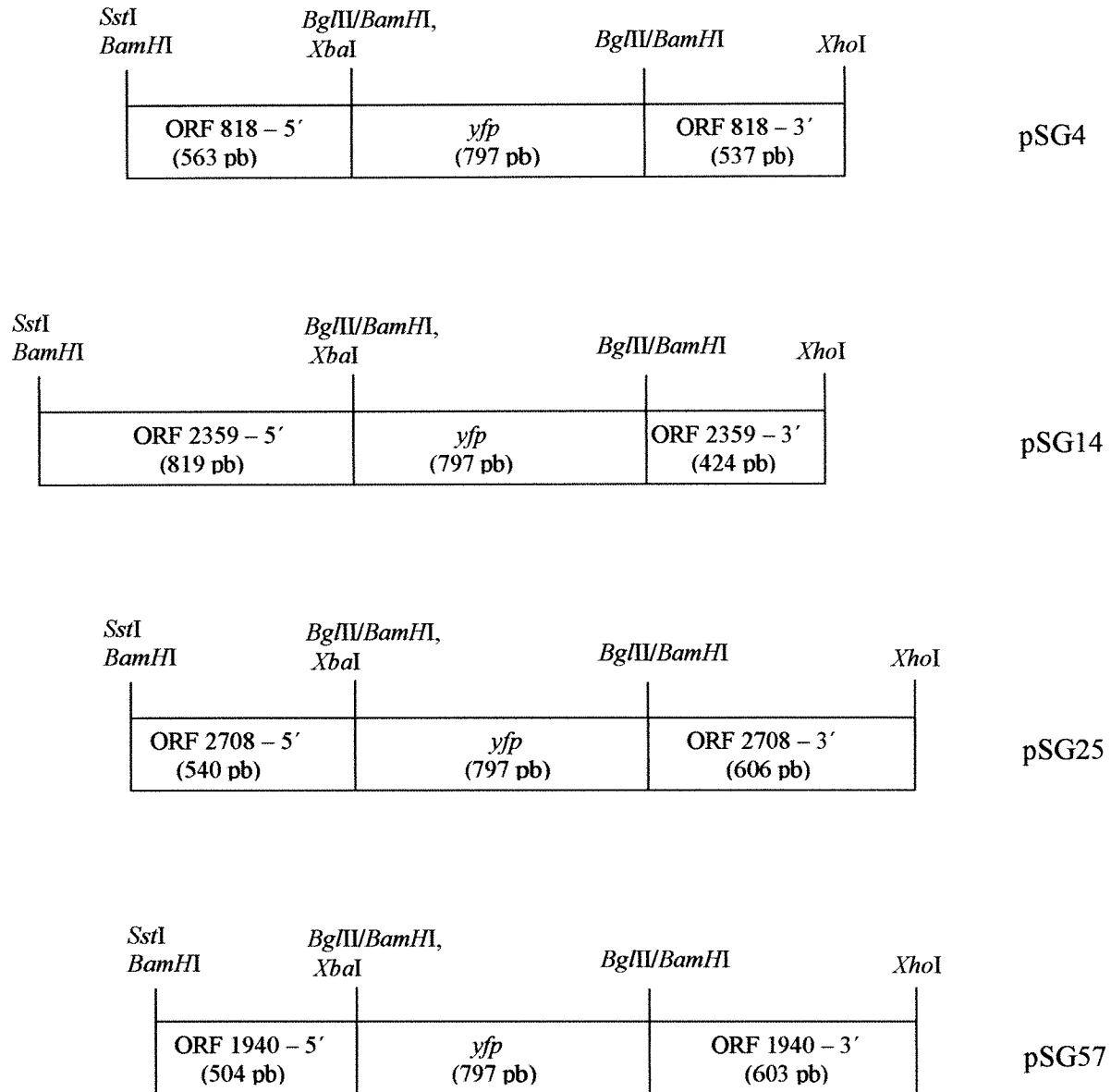


Figura 8 - Esquemas representando o gene *yfp* flanqueado pelos fragmentos 5' e 3' das ORFs Xf-818, Xf-2359, Xf-2708 e Xf-1940 resultando, respectivamente, nos plasmídios pSG4, pSG14, pSG25 e pSG57

4.3 Construção dos vetores para disrupção das ORFs Xf-810 e Xf-1940 utilizando o cassete *lacZ-Km^R*

Para a obtenção de mutagênese das ORFs Xf-810 e Xf-1940 a partir da disrupção das mesmas com *lacZ-Km^R*, inicialmente foram feitos PCRs para a amplificação das ORFs, utilizando os iniciadores descritos na Tabela 2, a partir dos cosmídeos Xf-07H04 e Xf-03H12, respectivamente.

A construção do plasmídeo de disrupção da ORF Xf-810 foi iniciada a partir do plasmídeo pNAW22 (Wulff, 2002) que apresenta um fragmento de 1.767 pb, compreendendo a ORF de 1.698 pb e mais 69 pb da região montante (*upstream*) à ORF, clonado no sítio *SmaI* do vetor pUC18.

Como a ORF Xf-810 possui dois sítios internos de restrição para a enzima *BglII*, o pNAW22 foi digerido com esta enzima, produzindo um fragmento de 1.068 pb da ORF Xf-810 que foi descartado e substituído pelo cassete *lacZ-Km^R* de 4,7 kb, proveniente do plasmídeo pKOK6 digerido com *BamHI*, no vetor pUC18 resultando no plasmídeo pSG30, que possui o cassete *lacZ-Km^R* flanqueado pelos segmentos 5' e 3' da ORF com 322 pb e 384 pb, respectivamente. A construção do pSG30 foi confirmada pela digestão com *PstI* produzindo as bandas de tamanho esperado de 4,7 kb e 3.612 pb, e quando digerido com *BamHI* produziu o plasmídeo linearizado de 11.845 pb (Figuras 9A e 10).

Para a obtenção de vetor para disrupção da ORF Xf-1940 um fragmento de 1.152 pb foi amplificado a partir do cosmídeo Xf-03H12, utilizando os *primers* Mrsa1243 e Mrsa2778 (Tabela 2) (Figura 9B). Este fragmento foi clonado no sítio *SmaI* em pUC18 obtendo-se o plasmídeo pSG50 e confirmado pela digestão deste plasmídeo com *BamHI* e *SstI*, observando-se a banda de 1.152 pb referente ao fragmento contendo a ORF e 2.686 pb do vetor (Figura 9C). Desde que a ORF Xf-1940 apresenta um sítio interno para a enzima *PstI* que divide o fragmento de 1.152 pb em duas partes com tamanho suficiente para ocorrência de evento de recombinação (633 e 519 pb), o pSG50 foi parcialmente digerido com *PstI*, pois o vetor pUC18 também apresenta um sítio de restrição para esta enzima, e no sítio *PstI* interno à ORF foi inserido o cassete *lacZ-Km^R*,

isolado por digestão com esta mesma enzima a partir do pKOK6. O plasmídeo resultando foi denominado de pSG51 (Figura 10). Na Figura 9C pode-se observar a confirmação da clonagem do cassete *lacZ-Km^R*, após digestão do plasmídeo com *EcoRV*, originando as bandas de 7.343 pb e 1.228 pb, confirmado que a ORF Xf-1940 e o cassete *lacZ-Km^R* estão na mesma orientação.

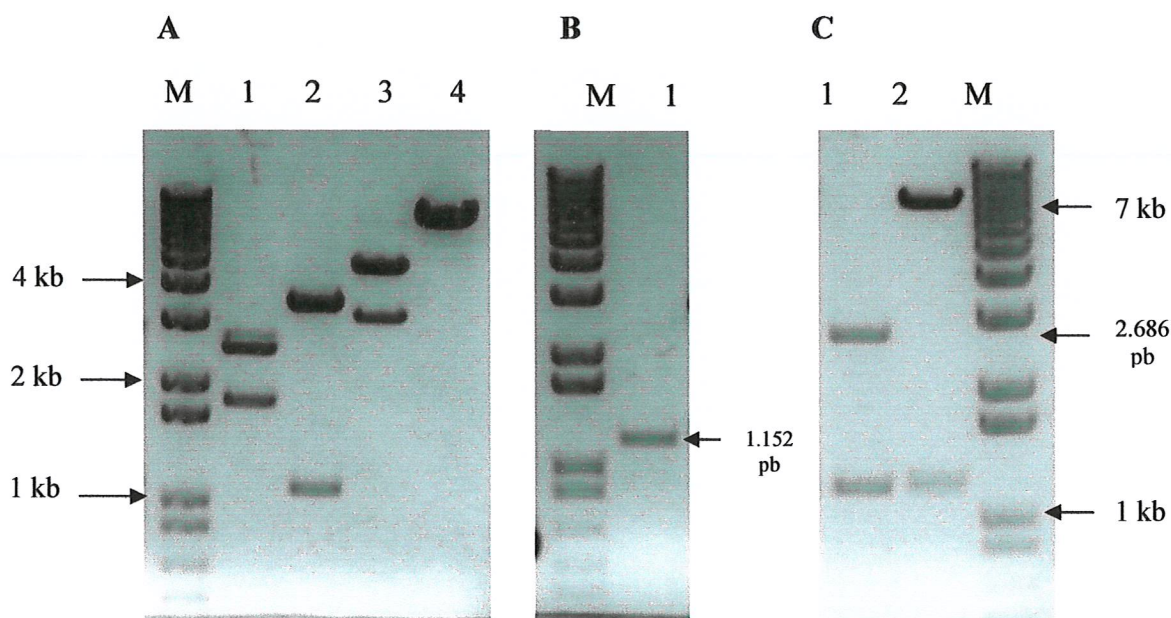
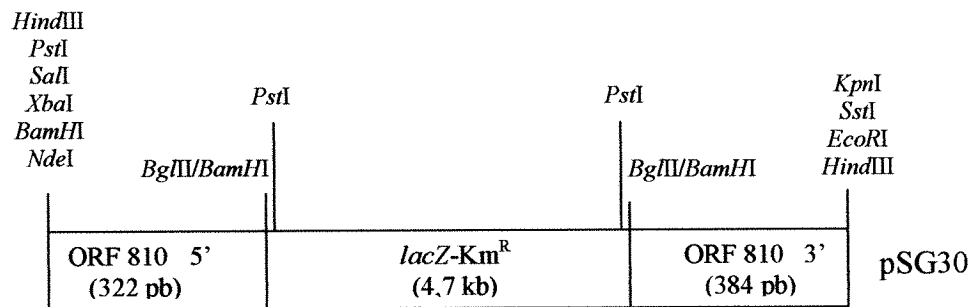


Figura 9 – Confirmação das construções para interrupção utilizando *lacZ-Km^R*. A. Linha 1: pNAW22 digerido com *NdeI* e *HindIII*; linha 2: pNAW22 digerido com *BglII*; linha 3: pSG30 digerido com *PstI* confirmando a clonagem do *lacZ-Km^R* (4,7 kb e 3.612 pb do restante do vetor); linha 4: pSG30 digerido com *BamHI* (11845 pb). B. Linha 1: fragmento de 1.152 pb contendo a ORF Xf-1940 amplificada via PCR. C. Linha 1: digestão do pSG50 confirmando a presença do inserto de 1.152 pb e do vetor de 2.686 pb; linha 2: pSG51 digerido com *EcoRV* confirmando que a ORF e o LacZ estão na mesma orientação (7.343 pb e 1.228 pb)

A.



B.

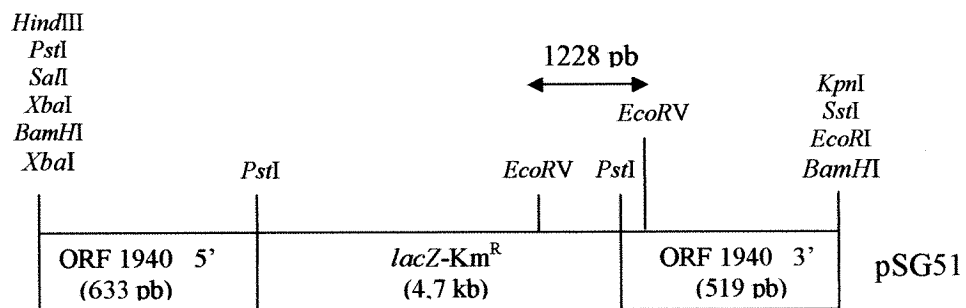


Figura 10 – Esquemas representando os plasmídeos pSG30 e pSG51.

A. Disrupção da ORF Xf-810 pelo cassete *lacZ-Km^R* (pSG30)

B. Disrupção da ORF Xf-1940 pelo cassete *lacZ-Km^R* (pSG51)

4.4 Clonagem da origem de replicação (*OriC*) de *Xylella fastidiosa*

Para ser possível a replicação do plasmídeo transformado dentro da célula de *X. fastidiosa*-CVC é necessário a presença da origem de replicação nativa dessa bactéria, podendo ser tanto a origem de replicação cromossômica (Monteiro et al., 2001) ou uma origem de replicação plasmidial (Qin & Hartung, 2001; Silva Neto et al., 2002). No presente trabalho optou-se por utilizar a origem de replicação cromossômica (*OriC*).

A *OriC* de 366 pb obtida após digestão do plasmídeo p16Kori (Monteiro et al., 2001b) com *BamHI* foi clonada nos plasmídeos pSG4, pSG14, pSG25, pSG30 e pSG57 linearizados com *BamHI*, resultando nos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26, pSG31 e pSG59, respectivamente, representados nas Figuras 13 e 14. A confirmação deste plasmídeos finais construídos está mostrada na Figura 12 onde a digestão com *BamHI* resultou nos fragmentos de 366 pb (*OriC*) e de 4.894 pb (pSG5), 5.040 (pSG15), 4.943 pb (pSG26), 11.845 pb (pSG31) e 4.904 pb (pSG59).

O pSG51 apresenta dois sítios de restrição para *BamHI*, então fez-se a digestão parcial deste plasmídeo para linearizá-lo (Figura 11). Como controle de tamanho linear, pSG51 foi digerido com *SaII* (8.571 pb, linha 3 – Figura 11). Os fragmentos lineares de 8.571 pb das linhas 4, 5, 6, 7 e 8 (Figura 11) foram purificados do gel de agarose e usados para a clonagem da *OriC* com 366 pb obtido da digestão do plasmídeo p16Kori e da *OriC* de 1,9 kb obtida do p16KdAori, resultando nos plasmídeos pSG52 e pSG53, respectivamente, representados na Figura 14. Para a confirmação da clonagem, os plasmídeos finais foram digeridos novamente com *BamHI* confirmando a presença da *OriC* de 366 pb (pSG52) e 1,9 kb (pSG53) (Figura 12).

4.5 Confirmação das construções finais por seqüenciamento

O seqüenciamento de nucleotídeos dos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59 utilizando os *primers* “forward” (F) usados nas ampliações dos fragmentos 5’ (Tabela 2) e separadamente o *primer* P1EY(G)FP (Tabela 3), para as construções

contendo o gene *yfp*, confirmaram as construções como também confirmou que o ATG, que codifica para o códon de iniciação, do gene *yfp* estava no mesmo quadro aberto de leitura com relação ao ATG das ORFs (Figura 15).

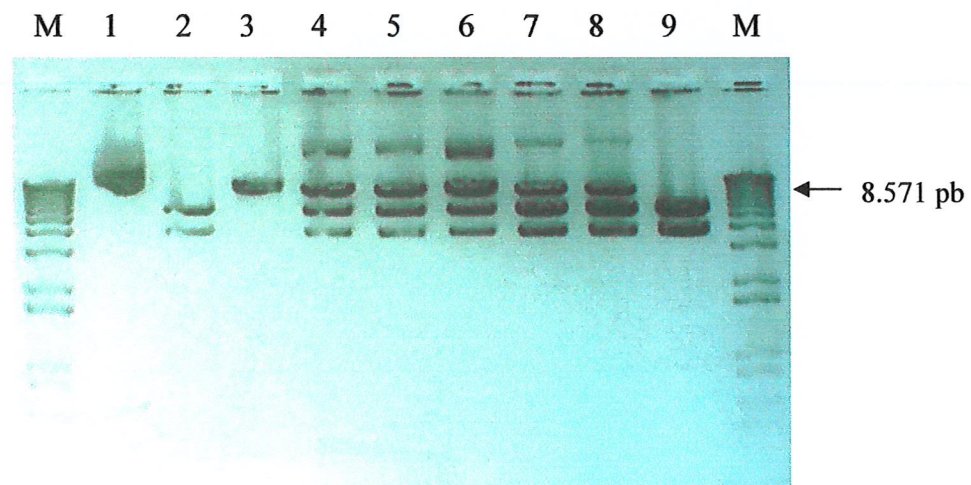


Figura 11 – Digestão parcial do pSG51. Linha 1: 2 μ L do pSG51 não digerido. Linha 2: pSG 51 digerido totalmente com *Bam*HI. Linha 3: pS51 linearizado com *Sal*I. Linhas 4 a 9: digestão parcial do pSG51 com *Bam*HI a 37 °C por 1, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos respectivamente. M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)

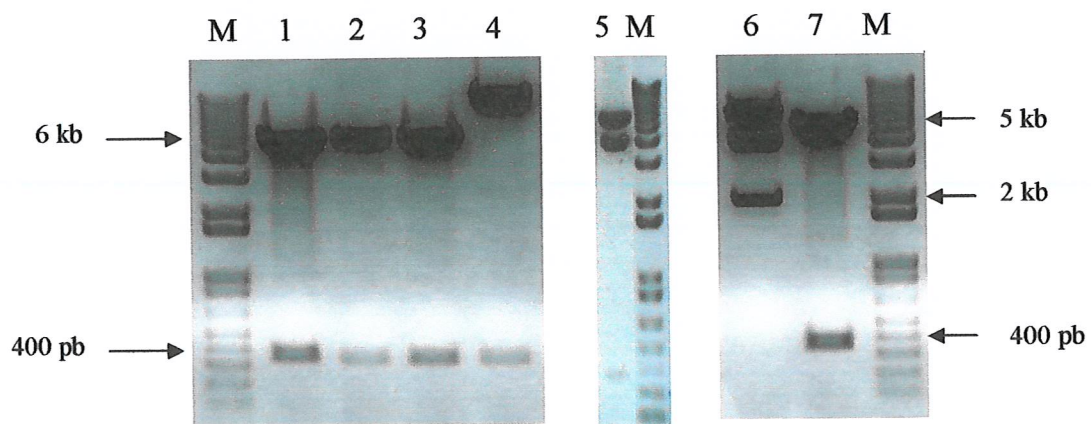


Figura 12 – Confirmação das clonagens da *OriC*. Linhas 1 a 7: digestão dos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26, pSG31, pSG52, pSG53 e pSG59 com *Bam*HI confirmando a clonagem da *OriC* de 366 pb (pSG5, pSG15, pSG26, pSG31, pSG52 e pSG59) ou 1,9 kb (pSG53). M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)

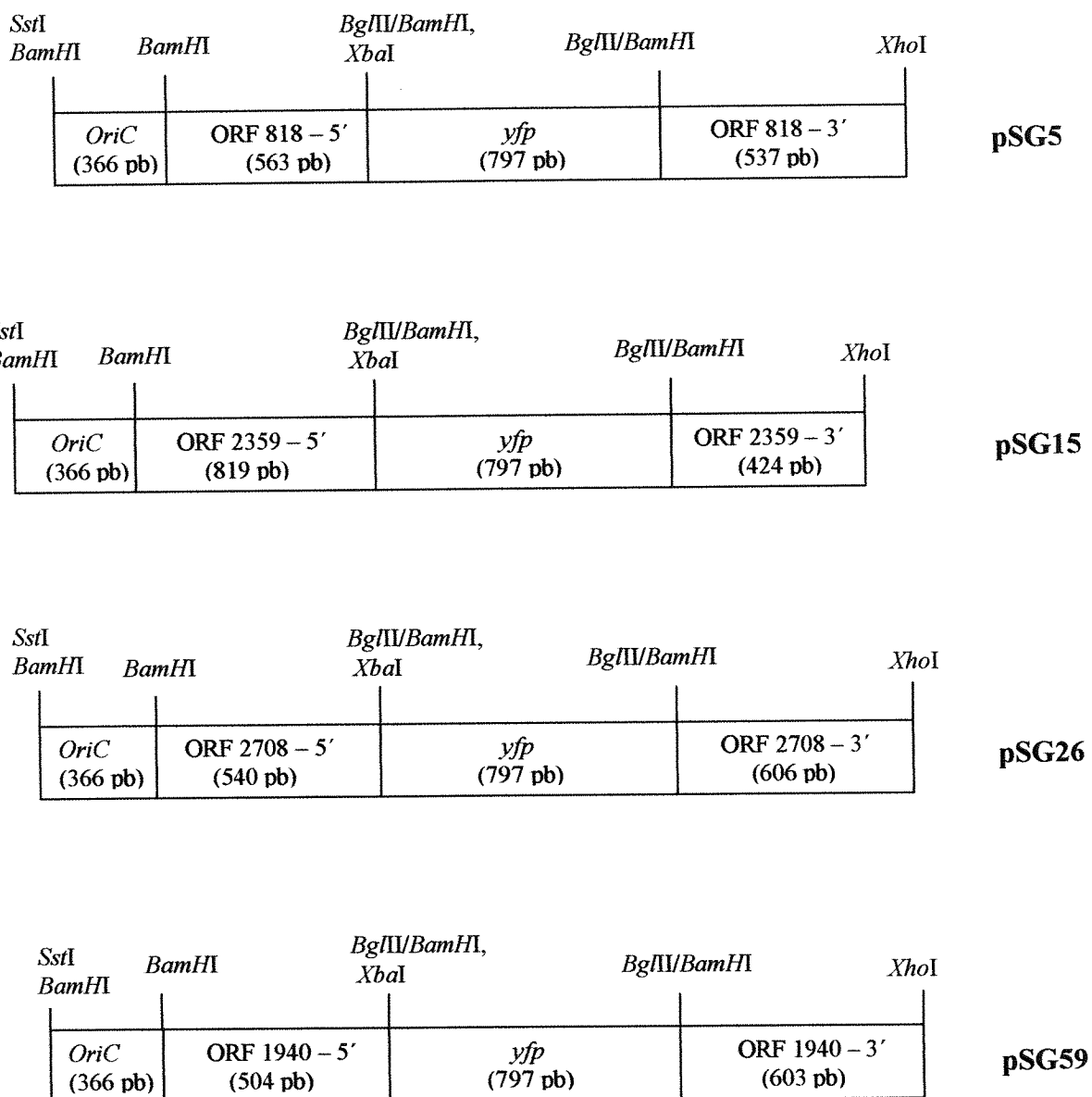


Figura 13 - Esquemas representando as plasmídeos finais pSG5, pSG15, pSG26 e pSG57 para a disrupção ORFs Xf-818, Xf-2359, Xf-2708 e Xf-1940 com o gene *yfp*

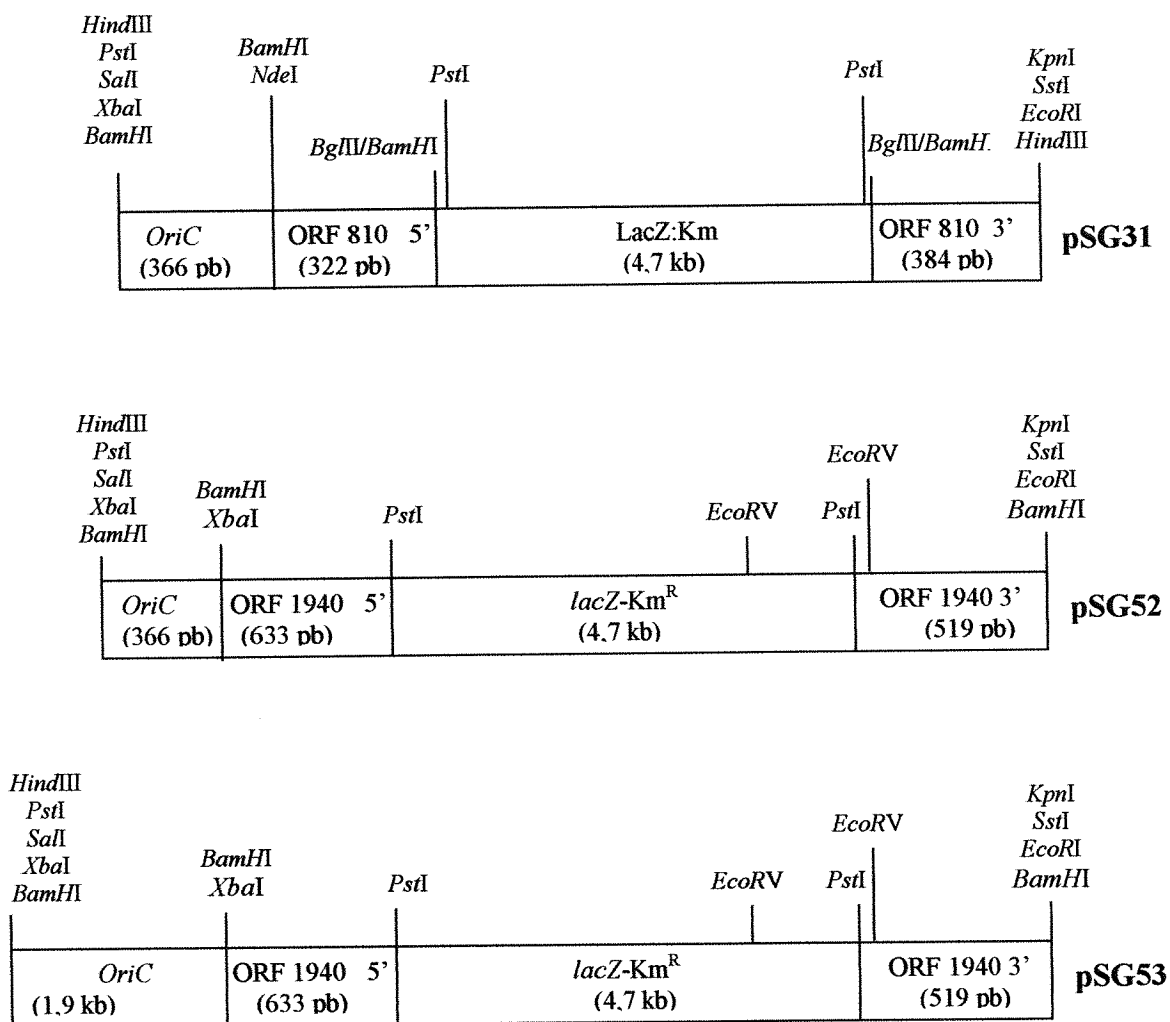


Figura 14 - Esquemas representando as plasmídeos finais pSG31, pSG52 e pSG53 para a disrupção ORFs Xf-810 e Xf-1940 com o cassete *lacZ-Km^R*

pSG5
 Xf-818 *yfp*
ATGTCGTTTTCCAAACACTTCAGATCCTCTAGAAATGGTGAG

pSG15
 Xf-2359 *yfp*
ATGACCGAATCTCCACATCACAGATCCTCTAGAAATGGTGAG

pSG26
 Xf-2708 *yfp*
ATGCCTATTTCTTTCTATGCAGATCCTCTAGAAATGGTGAG

pSG59
 Xf-1940 *yfp*
ATGGTACTGACAATCGAAGCCAGATCCTCTAGAAATGGTGAG

Figura 15 – Sequência do quadro aberto de leitura dos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59. O ATG (códon de iniciação da tradução) das ORFs estão no mesmo quadro aberto de leitura com relação ao ATG do gene *yfp*, nos plasmídeos vetores de interrupção de *X. fastidiosa*. O primeiro **ATG** refere-se a ORF alvo; a sequência AGATCC refere-se aos sítios *BgIII/BamHI* onde as ORFs foram fusionadas; o segundo **ATG** refere-se ao gene *yfp*

4.6 Análise da expressão dos genes *yfp* e *lacZ-Km^R* das construções finais em *E. coli*

As bactérias *E. coli* contendo os plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59 apresentaram a expressão da proteína YFP (Yellow Fluorescent Protein), observada em microscópio de fluorescência. Desde que foi usado o mesmo filtro que é utilizado para a proteína GFP (Green Fluorescent Protein), ocorreu fluorescência verde, confirmando a expressão do gene *yfp* nas construções preparadas para disrupção de *X. fastidiosa*. A Figura 16 A e B apresentam a expressão da YFP das bactérias transformadas com os plasmídeos pSG5 e pSG59, resultados semelhantes foram obtidos com os plasmídeos pSG15 e pSG26.

As bactérias *E. coli* contendo os plasmídeos pSG31, pSG52 e pSG53, que apresentam o cassete *lacZ-Km^R* cresceram em meio contendo canamicina e X-Gal/IPTG, confirmando-se a expressão desses genes pelo crescimento de colônias resistentes ao antibiótico canamicina e pela expressão do gene *lacZ* produzindo a enzima β -galactosidase, que age sobre o substrato X-Gal produzindo um composto de cor azul. A Figura 17 A e B apresentam a expressão de bactérias *E. coli* transformadas com os plasmídeos pSG31 e pSG53, resultado semelhante foi obtido com o plasmídeo pSG52.

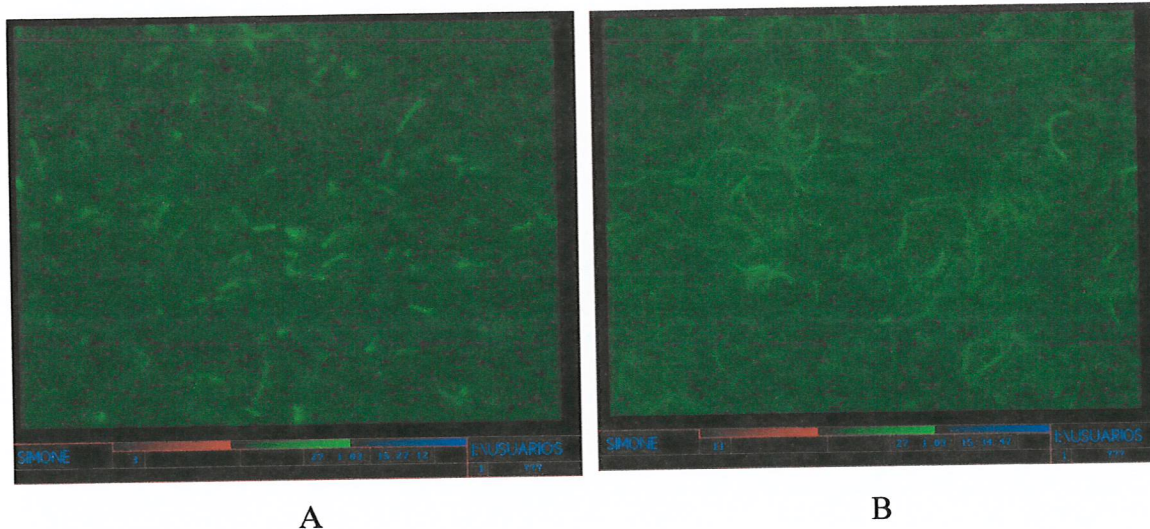


Figura 16 – Expressão do gene *yfp* em microscópio de fluorescência. Bactérias contendo os plasmídeos pSG5 (A) e pSG59(B) fluorescendo (aumento de 1000x)

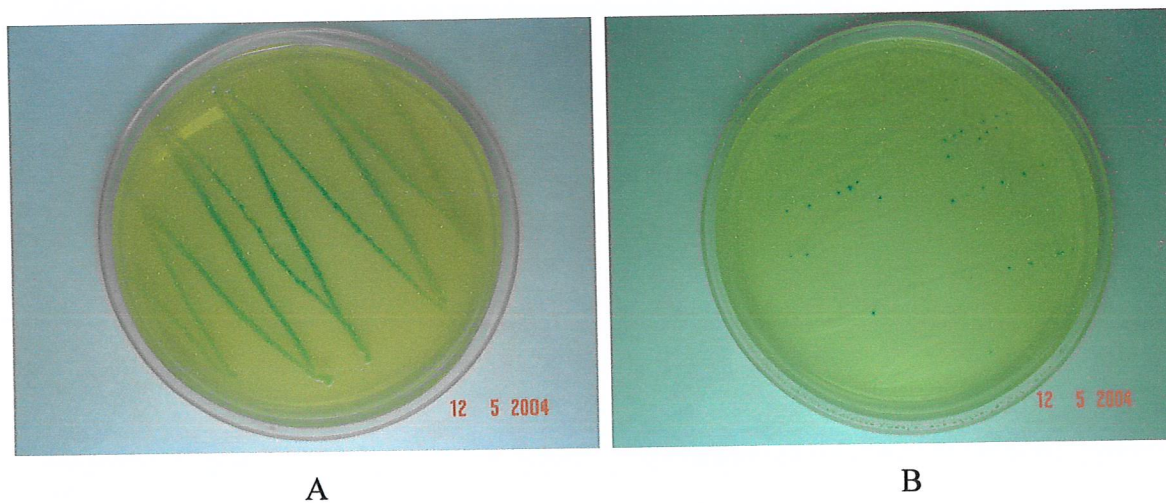


Figura 17 – Expressão do cassete *lacZ-Km^R*. Bactérias *E. coli* contendo os plasmídeos pSG31 (A) e pSG53 (B) que cresceram em meio LB contendo canamicina e produziram um precipitado de cor azul

4.7 Confirmação do isolado de *X. fastidiosa* e da obtenção de bactérias mutantes

DNA genômico extraído de *X. fastidiosa* linhagem J1a12 cultivada de acordo com o item 3.9, confirmou-se tratar de *Xylella fastidiosa*, pois os *primers* CVC1 e CVC272int. utilizados amplificaram um fragmento de 500 pb, que é característico da linhagem causadora de CVC (Figura 18).

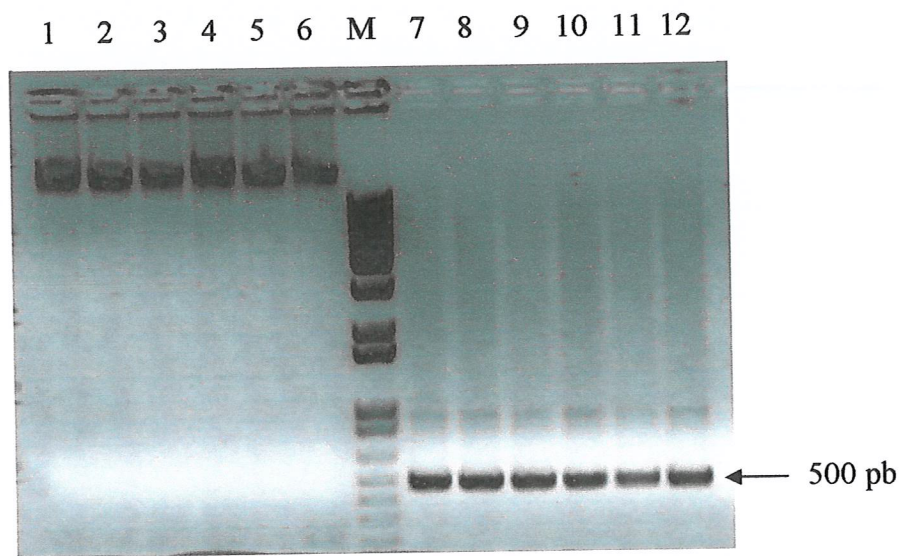


Figura 18 – DNA genômico e produto da amplificação do DNA de *X. fastidiosa* com *primers* CVC1 e CVC272int. Linhas 1 a 6: 2 μ L de DNA total de seis culturas de *Xylella fastidiosa* J1a12. Linhas 7 a 12: fragmentos de 500 pb confirmando as culturas de *X. fastidiosa*. M – marcador de massa molecular 1 kb plus DNA Ladder (Gibco BRL)

A obtenção de bactérias mutantes pela interrupção das ORFs Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708 utilizando o gene *yfp* foi realizada pela transformação via eletroporação com os plasmídeos vetores pSG5, pSG59, pSG15 e pSG26, respectivamente (item 3.10). Após 20 a 30 dias do evento de transformação as colônias de *X. fastidiosa* começaram a aparecer nas placas contendo meio PW sólido.

Nas transformações para a obtenção de bactérias mutantes através da inserção do cassete *lacZ-Km^R* interrompendo as ORFs Xf-810 e Xf-1940 foram utilizados o plasmídeo pSG31 para a primeira e os plasmídeos pSG52 e pSG53 para a segunda. A diferença entre estes dois últimos plasmídeos é o tamanho da *OriC*, pSG52 apresenta a *OriC* de 366 pb enquanto pSG53 apresenta a *OriC* inteira de aproximadamente 1,9 kb. Colônias de *X. fastidiosa* foram observadas depois de 20 a 30 dias de cultivo após a transformação e apresentaram coloração azul o que pode confirmar a expressão da proteína β -galactosidase.

A análise de obtenção dos transformantes foi realizada por reações de PCR. A amplificação de fragmentos de DNA de *X. fastidiosa* transformada com os plasmídeos pSG5, pSG15 e pSG26 foi feita utilizando o *primer* “forward” do fragmento 5’ e o *primer* P1EY(G)FP, confirmando-se a presença dos fragmentos de 681 pb, 933 pb e 654, respectivamente (Tabela 4, Figura 19). Para bactérias transformadas com o plasmídeo pSG59 o PCR foi feito utilizando o *primer* “reverse” do fragmento 3’ e o *primer* “forward” P2EY(G)FP, amplificando um fragmento de 637 pb (Tabela 4, Figura 19). Não ocorreu amplificação nos controles negativos (DNA de *X. fastidiosa* não transformada) (Figura 19). Estes resultados demonstram que estas bactérias apresentam as ORFs alvo interrompidas pelo gene *yfp*, conforme seus respectivos plasmídeos transformantes, mas não confirmava a integração do gene *yfp* no genoma da bactéria.

Para a confirmação da integração do gene *yfp* e do cassete *lacZ-Km^R* no genoma da bactéria, foram utilizados um conjunto de *primers* sendo que um deles não se pareava no plasmídeo transformante, somente no genoma da bactéria, e o outro se pareava no gene *yfp* ou no cassete *lacZ-Km^R* (Tabela 4). Após corrida em gel de agarose observou-se os fragmentos de 900 pb, 1.050 pb, 700 pb, 600 pb, 600 pb e 655 pb para as culturas de *X. fastidiosa* transformadas com pSG5, pSG15, pSG31, pSG52, pSG53 e pSG59,

respectivamente, e não ocorreu nenhuma amplificação nos controles negativos (DNA de *X. fastidiosa* não transformada) (Figura 20) e também não foi obtido resultado positivo para bactérias transformadas com pSG26 (dado não apresentado). Dessa maneira conclui-se que ocorreu a disrupção das ORFs Xf-818, Xf-2359 e Xf-1940 com o gene *yfp*, e das ORFs Xf-810 e Xf-1940 com o cassete *lacZ-Km^R*, ou seja, o método de transformação de *Xylella fastidiosa* utilizado foi eficiente.

Também foi observado que tanto a *OriC* de 366 pb como a de 1,9 kb tornaram possíveis o evento de transformação de *X. fastidiosa*.

Tabela 4. Conjunto de *primers* utilizados para a confirmação da transformação de *X. fastidiosa* e os tamanhos de fragmentos esperados

ORF	<i>Primers</i>	Tamanho do fragmento esperado (pb)
Xf-810	XF810R e KM Antisense	700
Xf-818	4941B e P1EY(G)FP	681
	XF818 e P1EY(G)FP	900
Xf-2708	2708P1SstIBamHI e P1EY(G)FP	654
	XF2708 e P1EY(G)FP	823
Xf-1940	Mrsa-XhoI e P2EY(G)FP	637
	XF1940 e P1EY(G)FP	655
	Mrsa-XhoI e KM Antisense	600
Xf-2359	PectatoP1SstIBamHI e P1EY(G)FP	933
	XF2359 e P1EY(G)FP	1.050

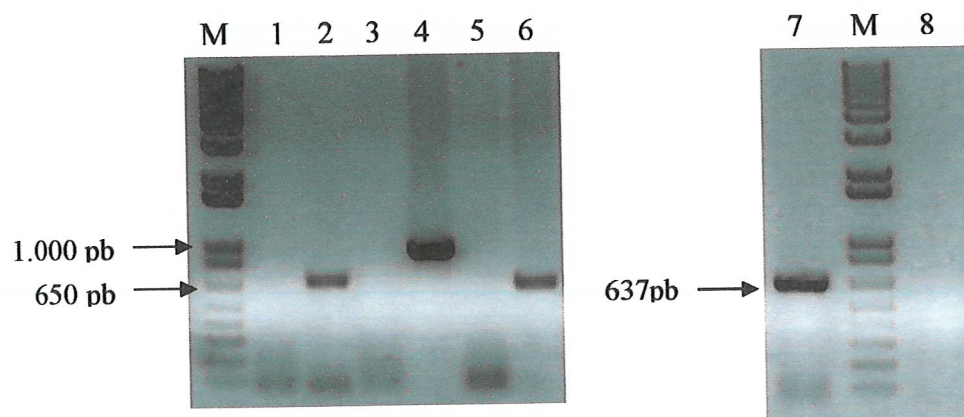


Figura 19 – Confirmação da presença das ORFs interrompidas pelo gene *yfp* por PCR. Linhas 1, 3, 5 e 8: DNA de *X. fastidiosa* não transformada utilizando os mesmos *primers* que para as transformações com os plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59, respectivamente (controles negativos). Linha 2: *X. fastidiosa* transformada com pSG5 (681 pb). Linha 4: *X. fastidiosa* transformada com pSG15 (933 pb). Linha 6: *X. fastidiosa* transformada com pSG26 (654 pb). Linha 7: *X. fastidiosa* transformada com pSG59 (637 pb)

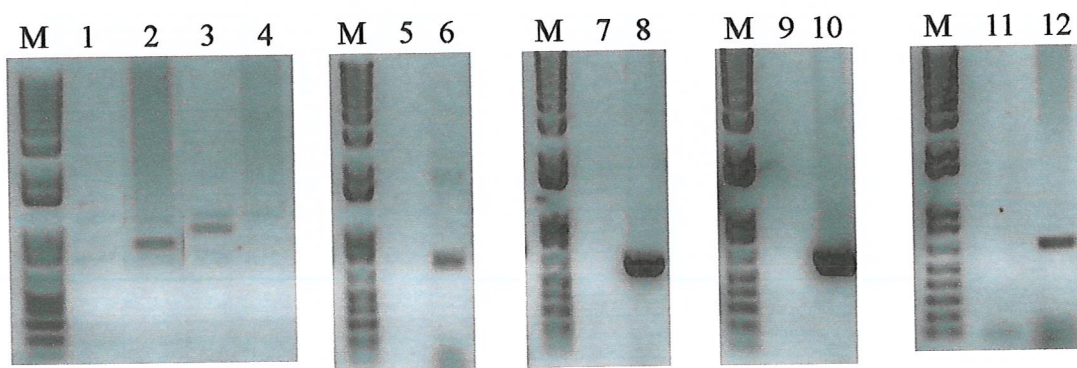


Figura 20 – Confirmação da disrupção das ORFs de *X. fastidiosa*. Linhas 1, 4, 5, 7, 9 e 11: PCR com DNA de *X. fastidiosa* não transformada utilizando os mesmos *primers* que para as transformações com os plasmídeos pSG5, pSG15, pSG31, pSG52, pSG53 e pSG59, respectivamente (controles negativos). Linha 2: *X. fastidiosa* transformada com pSG5 (900 pb). Linha 3: *X. fastidiosa* transformada com pSG15 (1.050 pb). Linha 6: *X. fastidiosa* transformada com pSG31 (700 pb). Linha 8: *X. fastidiosa* transformada com pSG52 (600 pb). Linha 10: *X. fastidiosa* transformada com pSG53 (600 pb). Linha 12: *X. fastidiosa* transformada com pSG59 (655 pb)

5 DISCUSSÃO

O seqüenciamento do genoma da *X. fastidiosa* por Simpson et al. (2000) identificou 2.904 ORFs, sendo que 47% apresentaram similaridade de seqüência com proteínas conhecidas já estudadas em outros organismos, entre estas ORFs, 147 apresentaram função biológica relacionada a genes de patogenicidade, virulência e adaptação do patógeno ao hospedeiro. Dois anos depois, o genoma de *X. fastidiosa* foi reanalisado por Bhattacharyya et al. (2002) e atualizou a anotação das ORFs, verificando 2.985 ORFs, das quais 58% apresentaram função biológica por similaridade de seqüência. O genoma de mais de 100 raças de bactérias está completamente seqüenciado. As ORFs representam 90 % do cromossomo bacteriano, mas a função de 40 a 60 % dos genes não é conhecida (Philippe et al., 2004). A confirmação da função biológica de uma ORF deve ser determinada experimentalmente e um método eficiente para isso, é pela obtenção de mutantes em que a ORF em estudo é interrompida e perde a sua função biológica.

A metodologia de disrupção gênica é amplamente utilizada em estudos de genes relacionados a patogenicidade de microrganismos e vem contribuindo marcadamente para a identificação da função de genes (Donovan et al., 2001; Huang et al., 2000; Provence & Curtiss, 1992). Esta metodologia é feita através da recombinação homóloga com conseqüente inativação do gene em estudo, substituindo-o por cassetes de expressão gênica como por exemplo, o *lacZ-Km^R* (Kokotek & Lotz, 1989) e também por genes repórteres como *gfp* e *yfp* que codificam para proteínas fluorescentes, verde e amarelada, respectivamente (Shen et al., 2003; Adaikkalam & Swarup, 2002). A

introdução de gene repórter no lugar do gene de interesse é preferencial, pois assim torna-se possível à monitoração “in situ” da expressão pelo promotor endógeno do gene.

A utilização de genes marcadores, que codificam para proteínas fluorescentes, apresentam muitas vantagens, pois podem ser detectadas “in situ” em células isoladas, mesmo que localizadas em sistemas complexos, usando microscópio de fluorescência (Normander et al., 1999) e a fluorescência é independente da presença de substrato, apesar de que para a expressão adequada da proteína é necessário a presença de oxigênio (Heim et al., 1994).

Griesbeck et al. (2001) obtiveram a expressão do gene *yfp* em *E. coli* e Miller et al. (2000) observaram a expressão deste gene em *E. coli* e também em outra bactéria gram-negativa, a *Campylobacter jejuni* que é parasita de animais. Já Stuurman et al. (2000) visualizaram a expressão da *yfp* em *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Vários outros estudos foram realizados utilizando a expressão do gene *yfp* como, por exemplo, em neurônios de rato (Narayan & Greif, 2004), em células de humanos (Kretschmar et al., 2004, Sorkina et al., 2003), em células de plantas como de *Arabidopsis thaliana* (Boisnard-Lorig et al., 2001, Van-Bruaene et al., 2003, Kiegle et al., 2000) e em células de epiderme de cebola (Duque & Chua, 2003), confirmando que o gene *yfp* apresenta-se muito útil para estudos de expressão gênica em diferentes organismos.

Neste trabalho foram construídos vetores de disrupção das ORFs de *X. fastidiosa* Xf-810, Xf-818, Xf-1940, Xf-2359 e Xf-2708. As ORFs Xf-818, Xf-2708, Xf-2359 e Xf-1940 foram interrompidas pela substituição utilizando o gene de fluorescência *yfp*, e as ORFs Xf-810 e, novamente, a Xf-1940 foram interrompidas com o cassete *lacZ-Km^R*.

Estas ORFs foram selecionadas pois possuem similaridade de seqüência com proteínas relacionadas a patogenicidade de microorganismos (Simpson et al., 2000; Bhattacharyya et al., 2002). A ORF Xf-1940 apresenta similaridade com a proteína MsrA (metionina sulfoxido redutase) que se mostrou importante no processo de manutenção da adesão da bactéria *X. fastidiosa* (Leite et al., 2002). As Orfs Xf-810 e Xf-818 apresentam similaridade de $3e^{-50}$ e $1e^{-145}$, respectivamente, com endoglicanase, que é uma celulase com mecanismo endoglicolítico de ataque às moléculas de celulose, de

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Gough et al., 1990). A ORF Xf-2708 também apresenta função de endoglicanase com similaridade de seqüência de $2e^{-85}$ com uma endoglicanase de *Ralstonia solanacearum* (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>; Wulff et al., 2003). A atividade celulásica desses genes de *X. fastidiosa* foi confirmada clonando-os em vetores de expressão e as respectivas proteínas foram produzidas em *E. coli*, e após ensaios enzimáticos foram caracterizadas como endoglicanases (Wulff, 2002), e também foi observada a expressão da ORF Xf-818 em bactérias *X. fastidiosa* crescendo em meio PW (Scarpari, 2001), confirmando a função biológica a elas atribuídas pela anotação das ORFs.

Para obter sucesso no ataque da célula hospedeira, o patógeno tem que passar pela barreira externa da célula, que em plantas é a parede celular que é composta principalmente pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina. Celulose representa o principal constituinte dos polissacarídeos da parede celular e consiste de polímeros lineares de resíduos de glicose. Os polímeros de celulose estão presentes em estruturas ordenadas (fibras), e a sua principal função é conferir rigidez à parede celular vegetal (Vries & Visser, 2001). A pectina é outra substância importante presente na parede celular primária e na lamela média de vegetais, mantendo a integridade estrutural das paredes de células de plantas superiores (Carpita & Gibeaut, 1993).

Celulases são essenciais para a reciclagem da celulose, considerado o polímero mais abundante já encontrado até hoje. Devido o seu potencial uso na indústria (Bhat, 2000) e o seu proeminente papel como fator de patogenicidade, as celulases são focos de numerosos estudos bioquímicos e fisiológicos (Ahn et al., 2001; Vries & Visser, 2001; Wilson, 2004; Bera-Maillet et al., 2004). A pectato liase também é importante na degradação da parede celular, pois esta enzima quebra a pectina localizada na lamela média e na parede celular primária levando a maceração do tecido da planta (Lietzke et al., 1994), sendo esta degradação da pectina uma característica de muitas bactérias associadas a plantas, especialmente fitopatógenos (Bekri et al., 1999). As celulases juntamente com pectato liase são enzimas importantes que são utilizadas por patógenos para a obtenção de energia e também como um mecanismo de patogenicidade na

colonização do tecido vegetal (Nunes et al. 2003; Dow & Daniels, 2000; Lambais et al., 2000).

Enzimas extracelulares que degradam a pectina, comprovadamente contribuem para o desenvolvimento de sintomas em doenças de podridão de raiz e pode induzir resposta de defesa em um grande número de plantas (Walton, 1994). A maior barreira para uma definição mais precisa do papel da degradação da pectina no processo da doença é a presença na maioria dos microorganismos, de múltiplos genes que codificam enzimas que degradam a pectina. Para comprovar a importância da pectato liase na virulência de *Nectria hematococca* foi necessário a disrupção, simultaneamente, dos dois genes que codificam pectato liases presentes no microorganismo (Rogers et al., 2000). No genoma da *X. fastidiosa* não foi identificado a presença de nenhuma ORF classificada como pectato liase, mas a ORF Xf-2359 com 236 aminoácidos, apresentou similaridade ($1e^{-10}$) com a pectato liase de *Pseudomonas viridiflava* (Liao et al., 1988), a qual possui 896 aminoácidos. Esta diferença acentuada de tamanho pode acarretar na ausência de função desta ORF ou pode apresentar outra função biológica, pois *X. fastidiosa* não precisa de mecanismos para invadir a planta já que ela é depositada no xilema por insetos (Keen et al., 2000). Alves (2003) através de observações utilizando microscópio eletrônico de transmissão e varredura e imunomarcagem para componentes da parede celular, observaram fortes evidências de que *X. fastidiosa* é capaz de degradar a parede celular primária das pontuações dos vasos do xilema de citros e migrar para os vasos adjacentes, assim, se a ORF Xf-2359 não codificar uma pectato liase, restará uma dúvida sobre como a bactéria passa de um vaso para outro do xilema sem precisar degradar a pectina presente na parede celular primária e na lamela média. Em adição a esta observação também não foi detectada a expressão de um suposto precursor de poligalacturonase (Xf-2466) (Simpson et al., 2000) em culturas de *X. fastidiosa*, crescendo em meio PW sob condições de baixa e alta densidade celular (Scarpari, 2001).

Dessa maneira, a importância do estudo funcional das endoglicanases Xf-810, Xf-818, Xf-2708 e da suposta pectato liase Xf-2359 se deve ao fato de que um mecanismo patogênico importante envolve a degradação da parede celular vegetal por

uma bateria de enzimas secretadas por fitopatógenos, que degradam a celulose e a matriz de pectina por adição de água, quebrando as ligações glicosídicas (Herron et al., 2000).

Muitos genes relacionados com a produção de exoenzimas em bactérias gram-negativas foram estudados utilizando-se da tecnologia de disrupção gênica. Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, sete fatores relacionados com a patogenicidade necessários para a produção de pectato liases, proteases, endoglicanase, amilase e goma xantana foram identificados por esta tecnologia (Tang et al., 1991).

Com a disrupção de celulases foi observada a importância dessas enzimas na patogenicidade de muitos microorganismos como, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Mae et al., 1995), *Claviceps purpurea* (Muller et al. 1997), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Jahr et al., 2000) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Laine et al., 2000), sendo que nesses dois últimos microorganismos endoglicanases foram essenciais para o desenvolvimento de sintomas nos hospedeiros. Mutante de *Pseudomonas solanacearum* deficiente na produção de celulase (*egl*) mostrou-se menos virulento após inoculação em plantas de tomate (Roberts et al., 1988). A endoglicanase EngXCA de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é importante nos primeiros estágios da patogenicidade em nabo e rabanete. Quando essas plantas eram inoculadas com os mutantes os sintomas demoraram um dia a mais para surgirem (Gough et al., 1988; Gough et al., 1990).

Pectato liases de fitopatógenos também foram inativados por disrupção e essas mutações foram importantes para a confirmação da importância dessa enzima na virulência do fungo patogênico de planta *Nectria hematococca* (Rogers et al., 2000) e de *Colletotrichum gloeosporioides* em planta de abacateiro (Yakoby et al., 2001), mas não mostrou-se essencial na patogenicidade de *Glomerella cingulata* (Bowen et al., 1995). A produção de pectato liase pela bactéria *Xanthomonas campestris* possui relação direta com o desenvolvimento dos sintomas de podridão em tubérculos de batata e em pimentão (Liao et al., 1996).

Uma característica comum entre enzimas extracelulares degradadoras produzidas por microorganismos é a redundância, ou seja, muitos microorganismos apresentam duas ou mais proteínas que possuem atividade enzimática iguais ou similar (Görlach et

al., 1998), ou seja, a disrupção de um gene pode ser compensada por outras enzimas com atividades similares, e assim, individualmente, enzimas que degradam a parede celular podem não ser cruciais para patogenicidade de microorganismos, e uma bateria de tais enzimas certamente contribui para o desenvolvimento de muitas doenças de plantas (Sexton et al., 2000). A disrupção de apenas um gene em *X. fastidiosa* e a observação de que nesse mutante não ocorreu diminuição de patogenicidade pode levar a uma interpretação errada de que aquele gene não é importante para virulência da bactéria, por outro lado o gene pode ser essencial e apenas a disrupção dele possa ser suficiente para alterar o nível de patogenicidade da bactéria, essas dúvidas só serão esclarecidas experimentalmente através da disrupção de cada gene, e se possível todos eles simultaneamente, e a análise de patogenicidade da bactéria após inoculação em plantas de citros ou em plantas hospedeiras alternativas como tabaco (Lopes et al., 2000; Alves et al., 2003) ou vinca (Monteiro et al., 2001a).

Além das enzimas degradadoras da parede celular, a aderência do patógeno bacteriano às células eucarióticas é um passo crítico para a colonização e o sucesso da infecção (Finlay & Falkow, 1997). A proteína metionina sulfoxide redutase é codificada pelo gene *msrA* tendo sido encontrada em uma variedade de organismos e tecidos animais (Kuschel et al., 1999; Brot et al., 1981; Moskovitz et al., 1996). Esta proteína é bastante estudada devido apresentar importante papel antioxidante nas células (Lowther et al., 2000; Douglas et al., 2004; Yermolaieva et al., 2004), e por apresentar papel importante na adesão de microorganismos (Leite et al., 2002; Wizemann et al., 1996). A ORF Xf-1940 de *X. fastidiosa* apresenta similaridade de seqüência de $2e^{-67}$ com *msrA* de *Synechocystis* sp. e de $1e^{-60}$ com *msrA* de *Escherichia coli* (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>).

A disrupção do gene que codifica a MsrA em muitos patógenos bacterianos responsáveis por infecções em humanos resultou na perda da habilidade de colonizar células hospedeiras (Taylor et al., 2003), sendo comprovado o envolvimento dessa proteína na virulência de microorganismos patógenos de humanos como *Escherichia coli* (Moskovitz et al., 1995; John et al., 2001; Wizemann et al., 1996), *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* (Wizemann et al., 1996), *Mycoplasma genitalium*

(Dhandayuthapani et al., 2001), em células de leveduras (Moskovitz et al., 1998) e também foi demonstrado ser um fator de virulência para o patógeno de planta *Erwinia chrysanthemi* (Hassouni et al., 1999).

Xylella fastidiosa possui as cigarrinhas como importante vetor de disseminação da doença entre plantas, e devido à alta velocidade e pressão com que a seiva do xilema passa pelas peças bucais e trato intestinal desses vetores, a adesão da bactéria é essencial para a colonização no inseto (Simpson et al., 2000). Assim a inoculação de *X. fastidiosa* mutante para a produção da proteína MsrA nos insetos vetores será importante para avaliar se esta proteína participa neste processo. Também, esta proteína está envolvida no processo de aderência e formação de agregados nos vasos do xilema, que levam aos sintomas da CVC (Leite et al., 2002).

Eventos de transformação e mutagênese por recombinação homóloga na linhagem de *X. fastidiosa* de citros mostrou-se ser menos eficiente quando comparado com linhagens de *X. fastidiosa*-PD, que apresentaram facilmente recombinação homóloga por troca alélica (Feil et al., 2003). Por razões ainda não estabelecidas, a transformação de *X. fastidiosa* parece ser dependente da linhagem da bactéria utilizada, sendo que até o momento não foi possível a transformação das linhagens 9a5c, PR1111 e AR1111 que causam doença em citros e das linhagens CA1111 e CA3124 que causam doença em café, sendo possível apenas a transformação das linhagens de citros J1a12 e B111 (Monteiro et al., 2001b). Possivelmente, a presença de barreiras funcionais de restrição que degradam DNA exógeno, evidenciado pela presença no genoma da bactéria, de quatro endonucleases de restrição (Simpson et al., 2000) e a dificuldade do cultivo desta bactéria, poderia contribuir para dificultar o evento de transformação.

Para testar a presença de transformantes de *X. fastidiosa* linhagem J1a12 deste presente trabalho, alíquotas das culturas transformadas foram analisadas por PCR com *primers* específicos, confirmando a presença de *X. fastidiosa* mutantes contendo as ORFs Xf-818, Xf-2359 e Xf-1940 substituídas pelo gene *yfp* e as ORFs Xf-810 e Xf-1940 interrompidas pelo cassete *lacZ-Km^R*, confirmando a eficiência do método utilizado. O evento de recombinação homóloga com duas permutas foi possível,

demonstrando que o tamanho dos fragmentos 5', entre 322 e 819 pb, e dos fragmentos 3', entre 384 e 606 pb, são suficientes para a ocorrência de recombinação homóloga.

No trabalho de Monteiro et al. (2001b) foram obtidos a transformação de *X. fastidiosa*-CVC utilizando uma parte da *OriC* de 366 pb e também a *OriC* inteira de 1,9 kb oriundas da mesma bactéria, mas não obteve-se transformação quando utilizado plasmídeo vetor sem a *OriC*. No presente trabalho foi obtido a disrupção das ORFs utilizando tanto a *OriC* de 366 pb, que devido ao pequeno tamanho foi mais fácil de clonar nos plasmídeos vetores, como também com a *OriC* de 1,9 kb, corroborando os resultados obtidos por Monteiro et al. (2001b).

Até o momento não foi obtido resultado positivo por PCR da disrupção da ORF Xf-2708, pela integração do gene *yfp*, quando se utilizou *primer* específico cuja seqüência está presente no genoma de *X. fastidiosa* e ausente no plasmídeo vetor, mas quando utilizou-se *primers* internos ao plasmídeo vetor, o gene *yfp* estava presente. É possível ter ocorrido algum problema na escolha deste *primer* específico.

A disrupção por recombinação homóloga com uma permuta já foi obtida para *X. fastidiosa* causadora da CVC (Silva Neto et al. 2002; Gaurivaud et al. 2002; Souza, 2002) e com duas permutas, como no caso deste trabalho, apenas um artigo foi publicado utilizando a linhagem J1a12 (Gaurivaud et al., 2002), e Sousa (2002) tentou, mas não obteve mutantes de *X. fastidiosa* J1a12 por troca alélica, demonstrando a dificuldade da ocorrência desse tipo de recombinação homóloga.

Mutantes de *X. fastidiosa* expressando o gene *lacZ* e o *Kam^R* usados para interromper as ORFs Xf-810 e Xf-1940 foram inoculados em meio PW líquido contendo o antibiótico canamicina. Após novas análises de PCR e Southern Blot para confirmar a cultura somente com mutantes, estes serão inoculados em plantas hospedeiras para análise funcional no hospedeiro. A seleção de colônias individuais expressando o gene *yfp* será mais trabalhosa devido o fato de não existir um agente seletivo, que permita o crescimento diferenciado das colônias transformadas, como também existe o risco de perda das bactérias *X. fastidiosa* mutantes devido à ausência de uma pressão de seleção. A presença de um gene de resistência a antibiótico na construção dos plasmídeos vetores facilitaria a seleção destas bactérias mutantes.

No trabalho de Souza (2002) não foi observado sintomas em plantas inoculadas com mutantes do operon *gum* de *X. fastidiosa* da linhagem J1a12 e nem com a linhagem selvagem controle, indicando que esta linhagem seja avirulenta ou tenha sua virulência reduzida. O autor sugere que é provável que a linhagem J1a12 seja uma linhagem naturalmente pouco virulenta ou que as sucessivas repicagens para a manutenção em laboratório, tenham comprometido a sua capacidade de colonizar a planta e desenvolver sintomas, apesar desta linhagem ter sido isolada de plantas sintomáticas para a CVC. Já foi comprovado que sucessivas repicagens em meio de cultura causa redução na virulência da linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* (Monteiro et al., 2001a). Souza et al. (2003) também confirmaram a perda da patogenicidade da bactéria *X. fastidiosa*-CVC após 46 repicagens com relação à bactéria recém isolada da planta, e utilizando DNA microarray observaram que a maioria dos genes induzidos nesta última condição eram associados com a adesão e provavelmente com a adaptação ao ambiente do hospedeiro, sugerindo que a falta ou diminuição da expressão desses genes na bactéria que sofreu muitas repicagens em meio de cultura, poderia ser responsável pela alteração da sua patogenicidade.

Os mutantes produzidos neste trabalho poderão ser inoculados em plantas hospedeiras de tabaco (Lopes et al. 2000; Alves et al., 2003) ou vinca (Monteiro et al., 2001a) ou até mesmo em plantas de citros, para a análise funcional biológica da importância desses genes na patogenicidade da bactéria. Maiores esforços devem ser voltados para a obtenção de mutantes de *X. fastidiosa* da linhagem 9a5c, comprovadamente virulenta, para confirmação dos resultados que serão obtidos das plantas infectadas com mutantes de *X. fastidiosa* linhagem J1a12.

X. fastidiosa mutante para a adesina MsrA, além de ser inoculada em plantas hospedeiras também será utilizada para estudos do processo de adesão da bactéria no aparelho bucal e no trato intestinal de insetos vetores. Também seria importante a produção de mutantes de *X. fastidiosa* apresentado a disrupção de todas as ORFs que codificam exoenzimas simultaneamente, pois como apresentado anteriormente, existe a redundância de enzimas extracelulares produzidas por microorganismos (Görlach et al.,

1998) e a disrupção simultânea dessas ORFs poderá permitir melhor caracterização desta classe de enzimas na patogenicidade da bactéria.

6 CONCLUSÕES

- Com o seqüenciamento e a observação da expressão da proteína amarela fluorescente em microscópio de fluorescência, dos plasmídeos pSG5, pSG15, pSG26 e pSG59 na bactéria *E. coli*, confirmou-se a correta construção dos vetores para a disrupção das ORFs Xf-818, Xf-2359, Xf-2708 e Xf-1940, respectivamente, utilizando a estratégia de substituição da ORF pelo gene *yfp*.
- Com a obtenção de colônias de *E. coli* apresentando os plasmídeos pSG31, pSG52 e pSG53, resistentes ao antibiótico canamicina e a expressão do gene *lacZ* conferindo coloração azul às colônias, em meio contendo substrato X-Gal, foram confirmados a correta construção dos vetores para a disrupção das ORFs Xf-810 (pSG31) e Xf-1940 (pSG52 e pSG53), usando a estratégia de interromper a ORF com o cassete *lacZ-Km^R*.
- Obteve-se a disrupção das ORFs Xf-810, Xf-818, Xf-1940 e Xf-2359 de *X. fastidiosa* linhagem J1a12, confirmadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando oligonucleotídeos específicos, demonstrando a obtenção de bactérias mutantes.
- A seleção de colônias de bactérias de *X. fastidiosa* transformadas e individualizadas, poderão ser utilizadas como importante estratégia para estudo funcional dessas ORFs, que codificam exoenzimas e uma adesina, na patogenicidade da bactéria e nos estudos do mecanismo de disseminação da doença pelos insetos vetores.

ANEXOS

Anexo A - Meio de cultura LB – “Luria-Bertani” (Sambrook et al., 1989):

Extrato de levedura ...	5 g
NaCl	10 g
Triptona	10 g
Água destilada	completa para 1 L

O pH do meio era de 7,0. O meio de cultura foi esterilizado através de autoclavagem a 121°C, 1 atm, durante 20 minutos. Para o preparo do meio sólido, adicionou-se 15 g/L de ágar antes da autoclavagem.

Anexo B - Preparo de células competentes de *Escherichia coli*

- 1) Pré inocular “over night”, em 10 mL de meio SOB, uma colônia de *E. coli* DH5 α de uma placa de LB recente, incubar a 37 °C por 16 horas, sob agitação constante de 220 rpm;
- 2) Inocular 1 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio SOB enriquecido com 1 mL de MgSO₄ 1 M e 1 mL de MgCl₂ 1 M, incubar nas mesmas condições de temperatura e rotação até atingir D.O._{600nm} entre 0,45 a 0,55;
- 3) Transferir a cultura para tubo de 200 mL de polipropileno da centrífuga Sorvall GSA autoclavado e a 0 °C, e deixar no gelo por 10 minutos. A cultura foi centrifugada a 3500xg por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado;
- 4) O precipitado resultante foi ressuscendido em 15 mL de tampão RF1 gelado e deixado no gelo por 15 minutos;
- 5) Em seguida a suspensão foi centrifugada a 3000xg, por 10 minutos, a 4°C;
- 6) O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscendido em 8 mL de tampão RF2 gelado e foi deixado no gelo por 30 minutos;
- 7) Aliquotas de 200 μ L foram distribuídas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL previamente resfriados. Esses tubos foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a – 70 °C até o momento de uso.

SOB (para 1 L):

Triptona	20 g
Extrato de levedura .	5 g
NaCl	0,586 g
KCl	0,186 g

RF1 (para 250 mL):

KAc 30 mM	7,5 mL solução 1M pH 7,5
RbCl 100 mM	3 g
MnCl 50 mM	2,5 g
CaCl ₂ 10 mM	0,38 g
Glicerol 15 % (p/v)..	37,5 g

Ajustar o pH para 5,8 com ácido acético 0,2 M e filtrar em millipore 0,2 µm.

RF2 (para 250 mL):

MOPS 10 mM	5 mL solução 0,5M pH 6,8
RbCl 10 mM	0,3 g
CaCl ₂ 75 mM	2,75 g
Glicerol 15 % (p/v)...	37,5 g

Ajustar o pH para 6,8 com NaOH 2,0 M.

Anexo C – Preparo de X-Gal/IPTG 2X

X-Gal	0,2 g
IPTG	0,048 g
DMF.....	10 mL

Anexo D - Tampão CTAB 10 % (para 100 mL):

CTAB	2 g
NaCl 1,4 M	28 mL de NaCl 5 M
EDTA 100 mM	4 mL EDTA 0,5 M
Tris-HCl 100 mM pH 8,0 ...	10 mL Tris-HCl 1 M

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIKKALAM, V.; SWARUP, S. Molecular characterization of an operon, *cueAR*, encoding a putative P1-type ATPase and a MerR-type regulatory protein involved in copper homeostasis in *Pseudomonas putida*. **Microbiology**, v.148, n.9, p.2857-2867, 2002.
- AHN, J.H.; SPOSATO, P.; KIM, S.I.; WALTON, J.D. Molecular cloning and characterization of *cel2* from the fungus *Cochliobolus carbonum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.65, n.6, p.1406-1411, 2001.
- ALBIBI, R.; CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; BANKS, D.; JARRET, R.L.; SMITH, B.J. RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains isolated from a vineyard in North Florida. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, n.2, p.347-352, 1998.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, n.4, p.382-386, 2001.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa* adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. Piracicaba, 2003. 122p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. **Journal of Phytopathology**, v.151, n.9, p.500-506, 2003.

- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI W. J.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.10, p.4906-4914, 2002.
- BANKS, D.; ALBIBI, R.; CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; JARRET, R.L.; SMITH, B.J. Specific detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains. **Current Microbiology**, v.39, n.2, p.85-88, 1999.
- BARBER, C.E.; TANG, J.L.; FENG, J.X.; PAN, M.Q.; WILSON, T.J.; SLATER, H.; DOW, J.M.; WILLIAMS, P.; DANIELS, M.J. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, v.24, n.3, p.555-566, 1997.
- BAULARD, A.; KREMER, L.; LOCHT, C. Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.11, p.3091-3098, 1996.
- BEKRI, M.A.; DESAIR, J.; KEIJERS, V.; PROOST, P., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.; VANDERLEYDEN, J.; VANDE BROEK, A. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.8, p.2440-2447, 1999.
- BERA-MAILLET, C.; RIBOT, Y.; FORANO, E. Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.4, p.2172-2179, 2004.
- BERETTA, M. J. G.; BARTHE, G. A.; CECCARDI, T. L.; LEE, R. F.; DERRICK, K. S. Survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, v.81, n.10, p.1196-1198, 1997.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, n.5, p.355-383, 2000.
- BHATTACHARYYA, A.; STILWAGEN, S.; IVANOVA, N. et al. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.99, n.19, p.12403-12408, 2002.

- BOCCARA, M.; AYMERIC, J.L.; CAMUS, C. Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.5, p.1524-1526, 1994.
- BOISNARD-LORIG, C.; COLON-CARMONA, A.; BAUCH, M.; HODGE, S.; DOERNER, P.; BANCHAREL, E.; DUMAS, C.; HASELOFF, J.; BERGER, F. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. **Plant Cell**, v.13, n.3, p.495-509, 2001.
- BOLTE, S.; BROWN, S.; SATIAT-JEUNEMAITRE, B. The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rabmc is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. **Journal of Cell Science**, v.117, n.6, p.943-954, 2004.
- BOWEN, J.K.; TEMPLETON, M.D.; SHARROCK, K.R.; CROWHURST, R.N.; RIKKERINK, E.H. Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnlA*. **Molecular And General Genetics**, v.246, n.2, p.196-205, 1995.
- BRLANSKY, R.H.; DAVIS, C.L.; TIMMER, L.W.; HOWD, D.S.; CONTRERAS, J. Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. **Phytopathology**, v.81, p.1210, 1991.
- BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J.; MCCOY, R.E. Colonization of the sharpshooter vectors *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulate* by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, n.4, p.530-535, 1983.
- BROT, N.; WEISSBACH, L.; WERTH, J.; WEISSBACH, H. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.78, n.4, p.2155-2158, 1981.
- CAO, T.B.; SAIER, M.H.J. Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. **Microbiology**, v.147, n.12, p.3201-3214, 2001.
- CARLOS, E.F.; RODRIGUES NETO, J.; BERETTA, M.J.G. A bactéria *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**. Araraquaral: Fundecitrus, 1997. p.22-36.

- CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.1-30, 1993.
- CARVALHO, M.L.V.; ROSSETTI, V.; POMPEU, J.R.J. Evolução da sintomatologia de clorose variegada dos citros em laranja doce (*C. sinensis*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, Supl. p.351, 1995. Suplemento.
- CHAGAS, C. M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M. J. G. Electron-microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.134, n.4, p.306-312, 1992.
- CHANG, C.L.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the bacterium causing CVC-a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, n.3, p.137-142, 1993.
- CHANG, J.H.; GOEL, A.K.; GRANT, S.R.; DANGL, J.L. Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, n.1, p.11-18, 2004.
- CHEN, J.; CHANG, C.J.; JARRET, R.L.; GAWEL, N. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**, v.82, n.9, p.973-977, 1992.
- CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C.J.; HOPKINS, D.L. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.1688-1690, 1995.
- CHEN, J.; JARRET, R.L.; QIN, X.; HARTUNG, J.S.; BANKS, D.; CHANG, C.J.; HOPKINS, D.L. 16S rDNA sequence analysis of *Xylella fastidiosa* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, n.3, p.349-354, 2000.
- CODY, C.W.; PRASHER, D.C.; WESTLER, W.M.; PRENDERGAST, F.G.; WARD, W.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemistry**, v.32, n.5, p.1212-1218, 1993.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v.411, n.6839, p.826-833, 2001.

- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, n.1, p.75-77, 1978.
- DELLA COLETTA-FILHO, H.; MACHADO, M.A. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.3731-3736, 2002.
- DE NEGRI, J.D.; GARCIA JUNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada de citros. **Laranja**, v.14, n.1, p.255-267, 1993.
- DHANDAYUTHAPANI, S.; BLAYLOCK, M.W.; BEBEAR, C.M.; RASMUSSEN, W.G.; BASEMAN, J.B. Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.19, p.5645-5650, 2001.
- DONADIO, L.D.; MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 1997. 162p.
- DONOVAN, W.P.; DONOVAN, J.C.; ENGLEMAN, J.T. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, n.1, p.45-51, 2001.
- DOUGLAS, T.; DANIEL, D.S.; PARIDA, B.K.; JAGANNATH, C.; DHANDAYUTHAPANI, S. Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.11, p.3590-3598, 2004.
- DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v.17, n.4, p.263-271, 2000.
- DOW, J.M.; SCOFIELD, G.; TRAFFORD, K.; TURNER, P.C.; DANIELS, M.J. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, n.2, p.261-271, 1987.
- DOW, J.M.; FENG, J.X.; BARBER, C.E.; TANG, J.L.; DANIELS, M.J. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, v.146, n.4, p.885-891, 2000.

- DUMS, F.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*-relatedness to secretion systems of other Gram-negative bacteria. **Molecular and General Genetics**, v.229, n.3, p.357-364, 1991.
- DUQUE, P.; CHUA, N.H. IMB1, a bromodomain protein induced during seed imbibition, regulates ABA- and phyA-mediated responses of germination in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.35, n.6, p.787-799, 2003.
- FEIL, H.; FEIL, W.S.; DETTER, J.C.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Site-directed disruption of the *fimA* and *fimB* fimbrial genes of *Xylella fastidiosa*. **Bacteriology**, v.93, n.6, p.675-682, 2003.
- FERNANDEZ, L.A.; BERENQUER, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.21-44, 2000.
- FERREIRA, H.; RODRIGUES NETO, J.; GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. A simplified subtractive hybridization protocol used to isolate DNA sequences specific to *Xylella fastidiosa*. **Microbiology**, v.145, n.8, p.1967-1975, 1999.
- FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.2, p.136-169, 1997.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Estatísticas: clorose variegada dos citros. <http://www.fundecitrus.com.br/> (05 maio 2004).
- GAURIVAUD, P.; SOUZA, L.C.; VIRGILIO, A.C.; MARIANO, A.G.; PALMA, R.R.; MONTEIRO, P.B. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p.4658-4665, 2002.
- GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Association a rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevinessand alfafa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. **Phytopathology**, v.63, n.3, p.341-345, 1973.

- GORLACH, J.M.; VAN DER KNAAP, E.; WALTON, J.D. Cloning and targeted disruption of *MLG1*, a gene encoding two of three extracellular mixed-linked glucanases of *Cochliobolus carbonum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.2, p.385-391, 1998.
- GOUGH, C.L.; DOW, J.M.; BARBER, C.E.; DANIELS, M.J. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.1, p.275-281, 1988.
- GOUGH, C.L.; DOW, J.M.; KEEN, J.; HENRISSAT, B.; DANIELS, M.J. Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Gene**, v.89, n.1, p.53-59, 1990.
- GRIESBECK, O.; BAIRD, G.S.; CAMPBELL, R.E.; ZACHARIAS, D.A.; TSIEN, R.Y. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.31, p.29188-29194, 2001.
- GUILHABERT, M.R.; HOFFMAN, L.M.; MILLS, D.A.; KIRKPATRICK, B.C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.14, n.6, p.701-706, 2001.
- GUILHABERT, M.R.; KIRKPATRICK, B.C. Transformation of *Xylella fastidiosa* with broad host range RSF1010 derivative plasmids. **Molecular Plant Pathology**, v.4, n.4, p. 279-285, 2003.
- HAMILTON, H.L.; SCHWARTZ, K.J.; DILLARD, J.P. Insertion-duplication mutagenesis of *neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.16, p.4718-4726, 2001.
- HANAHAHAN, D. Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, n.4, p.557-580, 1983.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, n.6, p.591-597, 1994.

- HASSOUNI, M.E.; CHAMBOST, J.P.; EXPERT, D.; VAN GIJSEGEM, F.; BARRAS, F. The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.96, n.3, p.887-892, 1999.
- HEIM, R.; PRASHER, D.C.; TSIEN, R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.91, n.26, p.12501-12504, 1994.
- HENDAWY, H.H.; FREER, J.H.; CLARKE, D.D.; ABYAD, M.S.; SALEH, Y.E. Pectate lyase isozymes and the pathogenicity of soft rotting strains of *Erwinia* for melon and cucumber. **Microbiological Research**, v.152, n.4, p.331-339, 1997.
- HERRON, S.R.; BENEN, J.A.E.; SCAVETTA, R.D.; VISSER, J.; JURNAK, F. Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.97, n.16, p.8762-8769, 2000.
- HE, S.Y.; JIN, Q. The Hrp pilus: learning from flagella. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, n.1, p.15-19, 2003.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v.85, n.2, p.209-212, 1995.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* and other fastidious bacteria of uncertain affiliation. In: SCHAAD, N.W. (Ed.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**, 2. ed. St. Paul: APS Press, p.95-113, 1988.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v.179, p.298-300, 1973.
- HUANG, G.Z.; ZHANG, L.H.; BIRCH, R.G. Characterization of the acyl carrier protein gene and the fab gene locus in *Xanthomonas albilineans*. **FEMS Microbiology Letters**, v.193, n.1, p.129-136, 2000.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. <http://www.ibge.gov.br/> (01 jun. 2004).
- JAHR, H.; DREIER, J.; MELETZUS, D.; BAHRO, R.; EICHENLAUB, R. The endo- β -1,4-glucanase of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, n.7, p.703–714, 2000.
- JOHN, G.S.; BROT, N.; RUAN, J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; WEISSBACH, H.; NATHAN, C. Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.17, p.9901-9906, 2001.
- KAIN, S.R. Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.4, n.7, p.304-312, 1999.
- KAISER, D.; LOSICK, R. How and why bacteria talk to each other. **Cell**, v.73, n.5, p.873-885, 1993.
- KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; IELMINI, M.V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.7, p.1607-1617, 1998.
- KEEN, N.T.; DUMENYO, C.K.; YANG, C.H.; COOKSEY, D.A. From rags to riches: insights from the first genomic sequence of a plant pathogenic bacterium. **Genome Biology**, v.1, n.3, p.1019.1-1019.4, 2000.
- KERR, J.R. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. **Molecular Pathology**, v.52, n.4, p.220-230, 1999.
- KOIDE, T.; DA SILVA NETO, J.F.; GOMES, S.L.; MARQUES, M.V. Insertional transposon mutagenesis in the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis strain with transposome. **Current Microbiology**, v.48, n.4, p.247-250, 2004.

- KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene**, v. 84, n.2, p.467-471, 1989.
- KOLPAK, F.J.; BLACKWELL, J. Determination of the structure of cellulose II. **Macromolecules**, v.9, p.273-278, 1976.
- KOSTKA, S.J.; TATTAR, T.A.; SHERALD, J.L. Elm leaf scorch: abnormal physiology in American elms infected with fastidious, xylem-inhabiting bacteria. **Canadian Journal of Forest Research**, v.16, p.1088-1091, 1986.
- KRETZSCHMAR, A.K.; DINGER, M.C.; HENZE, C.; BROCKE-HEIDRICH, K.; HORN, F. Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells. **Biochemical Journal**, v.377, n.2, p.289-297, 2004.
- KUSCHEL, L.; HANSEL, A.; SCHOHERR, R.; WEISSBACH, H.; BROT, N.; HOSHI, T.; HEINEMANN, S.H. Molecular cloning and functional expression of a human peptide methionine sulfoxide reductase (hMsrA). **FEBS Letters**, v.456, n.1, p.17-21, 1999.
- LAINE, M.J.; HAAPALAINEN, M.; WAHLROSS, T.; KANKARE, K.; NISSINEN, R.; KASSUWI, S.; METZLER, M.C. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.57, n.5, p.221-233, 2000.
- LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.; CAMARGO, L.E.; GOLDMAN, G.H. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, n.5, p.459-462, 2000.
- LEE, M.S.; SEOK, C.; MORRISON, D.A. Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.4796-4802, 1998.

- LEE, R.F.; DERRICK, K.F.; BERETTA, M.J.G.; CHAGAS, C.M.; ROSETTI, V. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. **Citrus Industry**, v.72, n.10, p.12-13, 1991.
- LEE, V.T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. **Genes & Development**, v.15, n.14, p.1725-1752, 2001.
- LEITE, B.; ISHIDA, M.L.; ALVES, E.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.6, p.645-650, 2002.
- LEITE, B.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W.; ISHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.119-157, 2001.
- LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE Júnior., R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de amexeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.54-57, 1997.
- LEMONS, E.G.; ALVES, L.M.; CAMPANHARO, J.C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.219, n.1, p.39-45, 2003.
- LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, v.77, n.7, p.642-646, 1993.
- LIAO, C.H. Analysis of pectate lyase produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.7, p.1677-1683, 1989.
- LIAO, C.H.; HUNG, H.Y.; CHATTERJEE, A.K. An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.1, p.199-206, 1988.

- LIAO, C.H.; MCCALLUS, D.E.; FETT, W.F. Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.7, n.3, p.391-400, 1994.
- LIAO, C.H.; GAFFNEY, T.D.; BRADLEY, S.P.; WONG, L.C. Cloning of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and comparison of its sequence relationship with pel genes of soft-rot *Erwinia* and *Pseudomonas*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.9, n.1, p.14-21, 1996.
- LIETZKE, S.E.; YODER, M.D.; KEEN, N.T.; JURNAK, F. The three-dimensional structure of pectate lyase e, a plant virulence factor from *Erwinia chrysanthemi*. **Plant Physiology**, v.106, n.3, p.849-862, 1994.
- LI, W.B.; ZHOU, C.H.; PRIA, W.D.; TEIXEIRA, D.C.; MIRANDA, V.S.; PEREIRA, E.O.; AYRES, A.J.; HARTUNG, J.S. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grapevine. **Plant Disease**, v.86, n.11, p.1206-1210, 2002.
- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R., CARLOS, E.F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v.82, n.1, p.94-97, 1998.
- LONG, S.R.; STASKAWICS, B.L. Prokaryotic plant parasites. **Cell**, v.73, p.921-935, 1993.
- LOPES, S.A.; ROBERTO, P.G.; FRANÇA, S.C. Hospedeiros alternativos da *Xylella fastidiosa* dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, Supl. p.250, 1999. Suplemento.
- LOPES, S.A.; RIBEIRO, D.M.; ROBERTO, P.G.; FRANCA, S.C.; SANTOS, J.M. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant - *Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, v.84, n.8, p.827-830, 2000.
- LOWTHER, W.T.; BROT, N.; WEISSBACH, H.; HONEK, J.F.; MATTHEWS, B.W. Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.12, p.6463-6468, 2000.

- MACHADO, M.A.; SILVÉRIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; CRISTOFANI, M. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, v.13, n.2, p.515-531, 1992.
- MAE, A.; HEIKINHEIMO, R.; PALVA, E.T. Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celVI* and the role of cellulase in phytopathogenicity. **Molecular and General Genetics**, v.247, n.1, p.17-26, 1995.
- MALHOTRA, V.; SHARMA, D.; RAMANATHAN, V.D.; SHAKILA, H.; SAINI, D.K.; CHAKRAVORTY, S.; DAS, T.K.; LI, Q.; SILVER, R.F.; NARAYANAN, P.R.; TYAGI, J.S. Disruption of response regulator gene, *devR*, leads to attenuation in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, n.2, p.237-245, 2004.
- MCELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, p.1160–1164, 2001.
- MCELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.381, p.419-430, 2003.
- MCNEILL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.625-663, 1984.
- MILLER, W.G.; BATES, A.H.; HORN, S.T.; BRANDL, M.T.; WACHTEL, M.R.; MANDRELL, R.E. Detection on surfaces and in Caco-2 cells of *Campylobacter jejuni* cells transformed with new *gfp*, *yfp*, and *cfp* marker plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5426-5436, 2000.
- MIRCETICH, S.M.; LOWE, S.K.; MOLLER, W.J.; NYLAND, G. Etiology of the almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, v.66, n.1, p.17-24, 1976.

- MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A.J.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.86, n.3, p.246-251, 2001a.
- MONTEIRO, P.B.; TEIXEIRA, D.C.; PALMA, R.R.; GARNIER, M.; BOVE, J.M.; RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with *oriC* plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.5, p.2263-2269, 2001b.
- MORRISON, D.A.; TROMBE, M.C.; HAYDEN, M.K.; WASZAK, G.A.; CHEN, J.D. Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM beta 1. **Journal of Bacteriology**, v.159, n.3, p.870-876, 1984.
- MOSKOVITZ, J.; FLESCHER, E.; BERLETT, B.S.; AZARE, J.; POSTON, J.M.; STADTMAN, E.R. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.95, n.24, p.14071-14075, 1998.
- MOSKOVITZ, J.; JENKINS, N.A.; GILBERT, D.J.; COPELAND, N.G.; JURSKY, F.; WEISSBACH, H.; BROT, N. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.93, n.8, p.3205-3208, 1996.
- MOSKOVITZ J.; RAHMAN M.A.; STRASSMAN J.; YANCEY S.O.; KUSHNER S.R.; BROT N.; WEISSBACH H. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: Regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.3, p.502-507, 1995.
- MULLER, U.; TENBERGE, K.B.; OESER, B.; TUDZYNSKI, P. *Cell*, probably encoding a cellobiohydrolase lacking the substrate binding domain, is expressed in the initial infection phase of *Claviceps purpurea* on *Secale cereale*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.10, n.2, p.268-279, 1997.

- NARAYAN, S.; GREIF, K.F. Transport of a synaptotagmin-YFP fusion protein in sympathetic neurons during early neurite outgrowth in vitro after transfection *in vivo*. **Journal of Neuroscience Methods**, v.133, n.1/2, p.91-98, 2004.
- SILVA NETO, J.F.; KOIDE, T.; GOMES, S.L.; MARQUES, M.V. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.210, n.1, p.105-110, 2002.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.101, n.6, p.1737-1742, 2004.
- NORMANDER, B.; HENDRIKSEN, N.B.; NYBROE, O. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4646-4651, 1999.
- NORMAN-SETTERBLAD, C.; VIDAL, S.; PALVA, E.T. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, n.4, p.430-438, 2000.
- NOWAK, K.; LUNIAK, N.; MEYER, S.; SCHULZE, J.; MENDEL, R.R.; HANSCH, R. Fluorescent proteins in poplar: a useful tool to study promoter function and protein localization. **Plant Biology**, v.6, n.1, p.65-73, 2004.
- NUNES, L.R.; ROSATO, Y.B.; MUTO, N.H.; YANAI, G.M.; DA SILVA, V.S.; LEITE, D.B.; GONCALVES, E.R.; DE SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; LOPES, S.A.; DE OLIVEIRA, R.C. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, v.13, n.4, p.570-578, 2003.
- PEREZ, S.; MAZEAU, K.; HERVE DU PENHOAT, C. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38 n.1/2, p.37-55, 2000.

- SCARPARI, L.M. Modulação da expressão de genes de patogenicidade putativos em *Xylella fastidiosa* sob condições de baixa e alta densidade celular. Piracicaba, 2001. 72p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SEXTON, A.C.; PAULSEN, M.; WOESTEMEYER, J.; HOWLETT, B.J. Cloning, characterization and chromosomal location of three genes encoding host-cell-wall-degrading enzymes in *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica* spp. **Gene**, v.248, n.1/2, p.89-97, 2000.
- SHEN, J.; HSU, C.M.; KANG, B.K.; ROSEN, B.P.; BHATTACHARJEE, H. The *Saccharomyces cerevisiae* Arr4p is involved in metal and heat tolerance. **Biometals**, v.16, n.3, p.369-378, 2003.
- SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Bacterial leaf scorch of landscape trees caused by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Arboriculture**, v.18, n.1, p.57-63, 1992.
- SHERALD, J.L.; WELLS, J.M.; HURTT, S.S.; KOSTKA, S.J. Association of fastidious, xylem-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple. **Plant Disease**, v.71, p.930-933, 1987.
- SILVA NETO, J.F.; KOIDE, T.; GOMES, S.L.; MARQUES, M.V. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.210, n.1, p.105-110, 2002.
- SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, n.2, p.165-171, 2001.
- SIMPSON, A.J.G; REINACH, F.C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, n.6792, p.151-157, 2000.
- SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C.E.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**, v.38, n.5, p.986-1003, 2000.

- TANG, J.L.; LIU, Y.N.; BARBER, C.E.; DOW, J.M.; WOOTTON, J.C.; DANIELS, M.J. 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**, v.226, n.3, p.409-417, 1991.
- TAYLOR, A.B.; BENGLIS D.M.J.; DHANDAYUTHAPANI, S.; HART, P.J. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* methionine sulfoxide reductase A in complex with protein-bound methionine. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.14, p.4119-4126, 2003.
- TEERI, T.T. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v.15, n.5, p.160-167, 1997.
- TSE, Y.C.; MO, B.; HILLMER, S.; ZHAO, M.; LO, S.W.; ROBINSON, D.G.; JIANG, L. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. **The Plant Cell**, v.16, n.3, p.672-693, 2004.
- TYSON, G.E.; STOJANOVIC, B.J.; KUKLINSKI, R.F.; DIVITTORIA, T.J.; SULLIVAN, M.L. Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. **Phytopathology**, v.75, n.3, p.264-269, 1985.
- VAN SLUYS, M.A.; DE OLIVEIRA, M.C.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. et al. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.3, p.1018-1026, 2003.
- VAN SLUYS, M.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.; MENCK, C.F.; DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; OLIVEIRA, M.C.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P.; SIMPSON, A.J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.169-189, 2002.
- VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, n.4, p.497-522, 2001.
- WALTON, J. D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, v.114, n.4, p.1113-1118, 1994.

- WEISSBACH, H.; ETIENNE, F.; HOSHI, T.; HEINEMANN, S.H.; LOWTHER, W.T.; MATTHEWS, B.; ST JOHN, G.; NATHAN, C.; BROT, N. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.397, n.2, p.172-178, 2002.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; JUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen nov., sp. nov. gram negative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. **Phytopathology**, v.73, p.859-862, 1983.
- WELLS, J.M.; WAVER, D.J.; RAJU, B.C. Distribution of rickettsia-like bacteria in peach, and their occurrence in plum, cherry, and some perennial weeds. **Phytopathology**, v.70, p.817-820, 1980.
- WILSON, D.B. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. **The Chemical Record**, v.4, n.2, p.72-82, 2004.
- WILSON, T.J.G.; BERTRAND, N.; TANG, J.L.; FENG, J.X.; PAN, M.Q.; BARBER, C.E.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J. The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. **Molecular Microbiology**, v.28, n.5, p.961-970, 1998.
- WIZEMANN, T.M.; MOSKOVITZ, J.; PEARCE, B.J.; CUNDELL, D.; ARVIDSON, C.G.; SO, M.; WEISSBACH, H.; BROT, N.; MASURE, H.R. Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.93, n.15, p.7985-7990, 1996.
- WULFF, N.A. Caracterização enzimática das celulases Xf-810, Xf-818 e Xf-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína Xf-818, expressas em *Escherichia coli*. Piracicaba, 2002. 196p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- WULFF, N.A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S.F. Cloning and expression of cellulose XF-818 of *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.715-721, 2003.
- XI, C.; LAMBRECHT, M.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Bi-funcional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. **Journal of Microbiological Methods**, v.35, n.1, p.85-92, 1999.
- YAKOBY, N.; BENO-MOUALEM, D.; KEEN, N.T.; DINOOR, A.; PINES, O.; PRUSKY, D. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.14, n.8, p.988-995, 2001.
- YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Trasmisção de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescens* e *Molomea cincta* (Hemíptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, Supl. p.128, 2000. Suplemento.
- YERMOLAIEVA, O.; XU, R.; SCHINSTOCK, C.; BROT, N.; WEISSBACH, H.; HEINEMANN, S.H.; HOSHI, T. Methionine sulfoxide reductase A protects neuronal cells against brief hypoxia/reoxygenation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v.101, n.5, p.1159-1164, 2004.