

**Carolina Munari Rodrigues**

**Análise da resistência a cobre e zinco sobre o crescimento e  
expressão gênica em *Xylella fastidiosa* em condições de  
biofilme**

Botucatu  
Estado de São Paulo, Brasil  
2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Carolina Munari Rodrigues**

**Análise da resistência a cobre e zinco sobre o crescimento e  
expressão gênica em *Xylella fastidiosa* em condições de  
biofilme**

Dissertação apresentada para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências  
Biológicas, Área de Concentração em  
Genética

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

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

Botucatu

Estado de São Paulo, Brasil

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Rodrigues, Carolina Munari.

Análise da resistência a cobre e zinco sobre o crescimento e expressão gênica em *Xylella fastidiosa* em condições de biofilme / Carolina Munari Rodrigues. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Marcos Antonio Machado

Co-orientadora: Alexandra Alves de Souza

Assunto CAPES: 20202008

1. Genética 2. Drogas - Resistência em microorganismos

CDD 575.21

Palavras-chave: Compostos antimicrobianos; RT-qPCR e EPS

Aos meus pais Clóvis e Heloisa,  
Por todo amor, ensinamentos, apoio e incentivo

## DEDICO

Aos meus irmãos Cláudia e Marcos, por estarem  
sempre presentes em todos os momentos de  
minha vida.

À Ellen pelo apoio e incentivo.

A minha querida sobrinha Gabriela

E para Alex, pelo amor, dedicação e paciência

## OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Ao Dr. Marcos Antonio Machado pela orientação, oportunidade e apoio para a realização desse trabalho.

Agradeço imensamente a Dra. Alessandra Alves de Souza pela orientação, ensinamentos, amizade e dedicação.

Aos pesquisadores, Dr. Marco Aurélio Takita, Dr. Helvécio Della Coletta Filho e Dra. Mariângela Cristofani, pelos ensinamentos, atenção e auxílio na realização desse trabalho.

Ao departamento de Genética, IBB / Unesp – Botucatu, professores e departamento de Pós-graduação que foram de essencial importância para a realização do trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC e a todos seus funcionários ....

As amigas Raquel Caserta, Mariana S. e Silva, Juliana Baptista, Eliane Locali, Renata Luizon, Silvia Dorta e Marines Bastianel pelo companherismo, conselhos, ajuda e amizade que são muito importantes para mim.

Aos colegas da pós-graduação, Fernanda, Rafael, Karen, Rodrigo, Thiago, Flávia e Aparecido pela boa convivência e amizade.

À Jacqueline e Lígia pela colaboração na realização desse trabalho.

Aos companheiros, amigos e estagiários do Laboratório de Biotecnologia, Kleber, Kely, Amélia, Chica, Luis, Adriana e Adriano.

Agradeço aos pesquisadores doutores, Maria Luiza, Sérgio, Valdenice, Alexandre, Bergen, Andrea, Andreia, Juliana, Eduardo, Raquel, Carla pelo auxílio e atenção.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização desse trabalho.

## ABREVIACOES

PW	Meio de cultura <i>Periwinkle wilt</i>
XDM2	Meio de cultura definido de <i>Xylella fastidiosa</i>
BCYE	Meio de cultura <i>buffered charcoal yeast extract</i>
EPS	Matriz extracelular de exopolissacarídeo
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinco
pPW	Células de <i>X. fastidiosa</i> na condição planctônica cultivadas no meio de cultura PW
bPW	Células de <i>X. fastidiosa</i> em biofilme cultivadas no meio de cultura PW
pXDM2	Células de <i>X. fastidiosa</i> na condição planctônica cultivadas no meio de cultura XDM2
bXDM2	Células de <i>X. fastidiosa</i> em biofilme cultivadas no meio de cultura XDM2
pBCYE	Células de <i>X. fastidiosa</i> na condição planctônica cultivadas no meio de cultura BCYE
bBCYE	Células de <i>X. fastidiosa</i> em biofilme cultivadas no meio de cultura BCYE
CVC	Clorose variegada do citros
DO	Densidade ptica
UFC	Unidade formadora de colônia
MIC	Concentração mínima inibitória
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
CE	Controle endógeno

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	2
3. OBJETIVO.....	2
3.1. Geral.....	2
3.2. Específicos.....	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
4.1. Clorose variegada dos citros (CVC).....	3
4.2. A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	6
4.3. Genoma funcional da <i>Xylella fastidiosa</i> .....	11
4.4. A formação do biofilme e seu papel na patogenicidade e adaptação da <i>X. fastidiosa</i> .....	13
4.5. Família ABC-Transporte.....	19
4.6. Família “P-Type ATPase”.....	21
4.7. Família Resistência-Nodulação-Divisão celular (RND).....	23
4.8. Família Facilitadora de Difusão de Cátions (CDF).....	25
4.9. Outros genes envolvidos na resistência a metais.....	27
CAPÍTULO 1. Curva de Crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i> no meio definido.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. OBJETIVO.....	32

2.1. Geral.....	32
2.2. Específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4. RESULTADOS.....	33
5. DISCUSSÃO.....	35
CAPÍTULO 2. Avaliação da resistência de <i>Xylella fastidiosa</i> a cobre e zinco em condições de crescimento planctônico e em biofilme.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. OBJETIVO.....	41
2.1 Geral.....	41
2.2 Específicos.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Estirpe bacteriana e condições de cultivo.....	41
3.2. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) das células planctônicas.....	42
3.3. Determinação da MIC para as células em biofilme.....	44
3.4. Determinação de exopolissacarídeos (EPS).....	46
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de CuSO <sub>4</sub> das células planctônicas e em biofilme.....	46
4.2. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de ZnSO <sub>4</sub> das células planctônicas e em biofilme.....	49
4.3. Teor de EPS nas células planctônicas e em biofilme.....	51
5. DISCUSSÃO.....	53
CAPÍTULO 3. Análise da expressão gênica de <i>Xylella fastidiosa</i> na condição de biofilme em diferentes concentrações de cobre e zinco.....	57



RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. OBJETIVO.....	62
2.1 Geral.....	62
2.2 Específicos.....	62
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	62
3.2. Síntese e validação dos <i>primers</i> .....	63
3.3. Eficiência de amplificação.....	65
3.4. Análise da expressão gênica.....	65
4. RESULTADOS.....	67
4.1. RNA total e validação dos <i>primers</i> .....	67
4.2. Expressão relativa dos genes associados à resistência a cobre e zinco no biofilme de <i>X. fastidiosa</i> .....	70
4.2.1. Expressão relativa dos genes associados à resistência a cobre no biofilme.....	70
4.2.2. Expressão relativa dos genes associados à resistência a zinco no biofilme.....	74
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

## **Análise da resistência a cobre e zinco sobre o crescimento e expressão gênica em *Xylella fastidiosa* em condições de biofilme**

### **RESUMO**

Baseado nas informações geradas após o seqüenciamento do genoma, foi desenvolvido uma série de meios de cultura de composição definida (XDM1, XDM2, XDM3, XDM4 e XDM5). Portanto, um dos objetivos do presente trabalho foi estabelecer a curva de crescimento da *X. fastidiosa* no meio definido XDM2. Foi utilizada a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* mantida nesse mesmo meio de cultura. A medida da taxa de crescimento bacteriano foi realizada através de leituras de densidade óptica durante dezesseis dias com intervalos de 48 horas. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através da contagem de unidade formadora de colônia (UFC) por diluição seriada. As duas avaliações apresentaram uma alta correlação ( $R_2= 0,91$ ) verificada através de regressão exponencial. O início da fase estacionária foi obtido após 10 dias de crescimento. De posse dos dados de UFC, foi possível calcular o tempo de geração da *X. fastidiosa* no meio XDM2, de aproximadamente 21 horas. Comparando o tempo de geração obtido na curva de crescimento em meio PW (11,37h), foi comprovado que a bactéria apresenta um crescimento mais rápido em meio PW do que no meio definido XDM2.

Outro aspecto interessante revelado no estudo do genoma funcional da *X. fastidiosa* está relacionado à expressão de genes associados à patogenicidade. O principal mecanismo de patogenicidade é a formação de biofilme no xilema da planta hospedeira conduzindo ao bloqueio dos vasos do xilema. Análise da expressão diferencial de genes desse fitopatógeno em condição de virulência e durante a formação do biofilme revela padrões de genes associados à adaptação e competitividade no ambiente do hospedeiro. Esses genes possivelmente são ativados no biofilme maduro e são essenciais para sua manutenção na planta. Além disso, sabe-se que bactérias que formam biofilme apresentam resistência crescente a compostos antimicrobianos, tais como, antibióticos, metais pesados e toxinas, à medida que o biofilme se estrutura. Baseado nessas informações esse trabalho avaliou a resposta de resistência a cobre e zinco de *X. fastidiosa* com crescimento em

biofilme comparado ao planctônico, e também a expressão de genes possivelmente associados à resistência dessa bactéria submetidos a diferentes concentrações desses metais. Os genes avaliados pertencem a famílias de RND (resistance-nodulation-division), transportadores ABC (ATP-binding cassette), “P-type ATPase” e facilitadora de difusão de cátions (CDF). Além desses, outros genes pertencentes ao operon *cut*, que provavelmente estão envolvidos na homeostase de cobre, também foram analisados. A expressão foi avaliada utilizando PCR quantitativo em tempo real. Foram utilizados biofilmes tratados com diferentes concentrações de cobre e zinco. Esses biofilmes foram formados em dois meios de cultura (definido e indefinido) para cada metal avaliado. Esse procedimento foi adotado para verificar se os níveis de expressão podem variar de acordo com o meio em que o biofilme é formado.

Em relação à análise da resistência do biofilme comparada às células planctônicas, os resultados demonstraram que a *X. fastidiosa* em biofilme apresenta maior resistência ao cobre e zinco. Além dessa análise, também foi medida a quantidade exopolissacarídeo (EPS) produzida pelas células de *X. fastidiosa* nas duas condições de crescimento, e em diferentes meios de cultura. Como resultado foi verificado que o biofilme de *X. fastidiosa* apresentou uma quantidade significativamente maior ( $P \leq 0,05$ ) de EPS em relação às células planctônicas, indicando que essa substância possivelmente é de grande importância na resistência a substâncias nocivas. Adicionalmente, após análise da expressão gênica, foi verificado que os genes demonstraram uma indução significativa na presença de cobre e zinco na maioria dos genes avaliados. Os maiores níveis de expressão foram observados nos meios complexos, tanto para cobre (PW) quanto para zinco (BCYE). Em XDM2, para ambos os compostos antimicrobianos testados, houve uma diminuição na indução dos genes em relação aos meios indefinidos.

Provavelmente, a ação conjunta desses genes e mais a proteção física conferida pelo EPS promovem a resistência de *X. fastidiosa* aos compostos antimicrobianos, tendo um papel fundamental na sobrevivência das células e sugerindo que um eventual controle dessa bactéria por algum componente bactericida possa ser ainda mais difícil quando biofilmes são formados no interior do xilema.

**Palavras-chave:** compostos antimicrobianos, RT-qPCR, EPS.

## **Analysis of resistance to cooper and zinc ever the growth and gene expression in *Xylella fastidiosa* in biofilm condition**

### **ABSTRACT**

Based on informations generated after the genome sequencing, a series of culture media of defined composition were developed (XDM1, XDM2, XDM3, XDM4 e XDM5). Therefore, one of the objectives of the present work was to establish the growth curve of *X. fastidiosa* in the defined medium XDM2. For this, we utilized the 9a5c strain of *X. fastidiosa* maintained in this medium. The measurement of the bacterial growth rate was done by optical density analysis during sixteen days with intervals of 48 hours. The evaluation of cellular viability was carried out counting the colony units forming (CFU) by serial dilution. Both evaluations presented a high correlation ( $R_2 = 0,91$ ) verified by exponential regression. The beginning of the stationary phase was observed after ten days of growth. With the data of CFU, it was possible to calculate the generation time of *X. fastidiosa* in XDM2 medium, estimated to be of approximated 21 hours. Comparing the generation time obtained for the growth curve in PW medium (11,37 hours), we proved that the bacteria grow faster in PW compared with the defined medium XDM2.

Another interesting aspect reveled by the study of functional genome of *X. fastidiosa* is related to the expression of genes associated with pathogenicity. The main mechanism of its pathogenicity is the formation of a biofilm in the xylem of the host plant, causing the blockage of the xylem vessels. Analysis of the differential expression of genes of this phytophathogen in condition of virulence and during the biofilm formation reveals standards associated to adaptation and competition in the host environment. These genes are possibly activated in the mature biofilm and are essential for its maintenance in the plant. Besides, it is known that bacteria that form biofilm present elevated resistance to antimicrobial compounds while biofilm is structured, like antibiotics, heavy metals, and toxins. Based on these information, in this work we evaluated the resistance response of *X. fastidiosa* growing in biofilm to cooper and zinc compared to planktonic growth. Moreover, we also analyzed the

expression of genes possibly associated to resistance, when the bacteria are submitted to different concentrations of these metals. The genes evaluated belong to the RND family (resistance-nodulation-division), ABC transporters (ATP-binding cassette), P-type ATPases, and Cations Diffusion Facilitators (CDF). Besides these genes, others from the *cut* operon, which are probably involved in copper homeostasis, were also analyzed. The expression was evaluated using real time quantitative PCR. Biofilms, treated with different concentrations of copper and zinc, were used for the analysis. These biofilms were formed in two culture media (defined and undefined) for the evaluations. This procedure was adopted to verify whether the levels of expression could vary according to the medium where the biofilm is formed.

In relation to the analysis of resistance of biofilm compared to planktonic cells, the results demonstrated that *X. fastidiosa* in biofilm presents higher resistance to copper and zinc. In addition, the amount of exopolysaccharide (EPS) produced by *X. fastidiosa* cells in both growth conditions and in the different culture media was measured. We verified that the biofilm of *X. fastidiosa* presented an amount of EPS significantly higher ( $P \leq 0.05$ ) than the planktonic cells, indicating that this substance is possibly important in the resistance to harmful substances. Furthermore, after analysis of gene expression, it was verified that they show a significant induction in presence of copper and zinc in the majority of the evaluated genes. The higher levels of expression were observed in the complex medium both for copper and zinc. In XDM2, for both antimicrobial compounds tested, there was a reduction in the induction of genes in comparison to the undefined media.

Probably, the action of these genes together and the physical protection conferred by the EPS promote the resistance of *X. fastidiosa* to the antimicrobial compounds, representing a fundamental role in the survival of the cells and suggesting that an eventual control of this bacteria by some bactericide component would be even more difficult when biofilms are formed inside of xylem vessels.

**Key-words:** antimicrobial compounds, RT-qPCR, EPS.

## 1. Introdução

Os citros são plantas nativas do sudeste do continente asiático de onde foram distribuídos para várias partes do mundo. Nas Américas, provavelmente essas plantas foram introduzidas a partir de 1493 através de sementes trazidas por Colombo (Webber et al., 1967). No Brasil, os citros foram introduzidos por volta de 1530 com o primeiro relato em Cananéia (SP), expandindo-se para outras partes do Brasil rapidamente (Hasse, 1987). O Brasil entrou no século XXI com uma produção de 18,5 milhões de toneladas de citros, sendo o maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado (Amaro and Salva, 2001). No entanto, o setor do agronegócio tem enfrentado problemas principalmente de ordem fitossanitária devido ao grande número de pragas e doenças. Dentre essas a clorose variegada dos citros (CVC) é, sem dúvida, uma das mais preocupantes.

A CVC é causada pela *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram negativa, de crescimento fastidioso e limitada ao xilema das plantas. Ela também é responsável por outras doenças economicamente importantes, como mal de Pierce em videiras, escaldadura da ameixeira, entre outras.

Devido à importância econômica da CVC, a *X. fastidiosa* foi o primeiro patógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado gerando um grande número de informações (Simpson et al., 2000). Após o seqüenciamento, houve a necessidade de estudos sobre genoma funcional que auxiliassem no entendimento das funções dos genes putativamente identificados.

Um dos aspectos interessantes para serem pesquisados no genoma funcional da *X. fastidiosa* está relacionado à expressão de genes associados a patogenicidade da bactéria, junto com outros de adaptação e competitividade no ambiente do hospedeiro. Dentre as hipóteses relacionadas à patogenicidade, a formação do biofilme ao longo do processo de colonização da bactéria dentro dos vasos do xilema é considerado um dos principais mecanismos de patogenicidade (Souza et al., 2003; Osiro et al., 2004). O crescimento em biofilme favorece a resistência a compostos antimicrobianos.

A principal estratégia de controle de bacterioses em vários patossistemas é a aplicação de compostos antimicrobianos, como antibióticos e compostos cúpricos. Entretanto, os estudos de respostas a estes compostos em bactérias que formam

biofilme como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Brooun et al., 2000; Teitzel and Parsek, 2003; Fux et al., 2004) têm mostrado que a dose necessária para controle é geralmente muito maior do que a utilizada quando as células crescem de forma planctônica, sugerindo dificuldades no controle ao se utilizar essa estratégia. Alguns ensaios em meio sólido já foram realizados para determinar as concentrações mínimas inibitórias (MICs) de *X. fastidiosa* a cobre e zinco (Caldana et al., 2001). Contudo, apesar de *X. fastidiosa* crescer em biofilme, e este estar envolvido com o mecanismo de patogenicidade, nenhum estudo visando o entendimento de resistência a compostos antimicrobianos nestas condições de crescimento foi até agora realizado. Portanto, o objetivo principal desse trabalho foi o de avaliar a resposta da bactéria, tanto em crescimento em biofilme quanto planctônico, a compostos antimicrobianos.

Com os resultados dos estudos biológicos e moleculares da resistência do biofilme da *X. fastidiosa* pretende-se esclarecer prováveis mecanismos da resistência a esses compostos estabelecendo assim possíveis estratégias para o controle da CVC.

## **2. Hipótese do trabalho**

Células de *X. fastidiosa* em biofilme são menos sensíveis a compostos antimicrobianos do que células que crescem de forma planctônica. Essa menor sensibilidade estaria relacionada ao efeito sinérgico entre diferentes mecanismos de resposta adaptativa da bactéria às condições de crescimento.

## **3. Objetivo**

### **3.1. Geral:**

- Avaliar a resposta de resistência de *X. fastidiosa* a cobre e zinco em condições de crescimento em biofilme e planctônico;
- Avaliar a expressão de genes possivelmente associados à resistência do biofilme de *X. fastidiosa*.

### 3.2. Específicos:

- Estabelecer a curva de crescimento para *X. fastidiosa* em meio definido;
- Determinar concentração mínima inibitória (MICs) de CuSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> no crescimento de *X. fastidiosa* nas condições de biofilme e planctônica;
- Avaliar por qPCR a expressão relativa dos genes *metI*, *acrA*, *acrB*, *czcA*, *mexE*, *czcD*, *copB*, *cutA*, *cutB*, *cutC* sob diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> na condição de biofilme.

## 4. Revisão Bibliográfica

### 4.1. Clorose variegada dos citros (CVC).

Atualmente, o Brasil é o maior exportador de suco de laranja, responsável por 53% do suco produzido no mundo e por 80% das exportações (ANBA). Só no Estado de São Paulo esta atividade responde por aproximadamente 400.000 empregos diretos e indiretos, gerando 1,5 bilhões de dólares na exportação de suco concentrado congelado, suco não concentrado e outros produtos, como pectina e pellets para ração. Esses dados demonstram que o agronegócio citrícola tem contribuído nos sucessivos superávits comerciais no Brasil, gerando divisas e ao mesmo tempo empregos. Apesar das condições climáticas e de cultivo serem apropriadas, a produtividade brasileira ainda é baixa quando comparada a outros países (duas caixas de 40,8 kg/planta/ano no Brasil, contra seis na Flórida), o que pode ser atribuído a fatores como pragas, doenças e ausência de irrigação (Amaro et al., 2001). Dentre essas doenças que afetam essa produtividade, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *X. fastidiosa*, é sem dúvida uma das mais preocupantes, afetando todas as variedades comerciais de laranjas doces no Brasil (Lee et al., 1992).

Dados recentes demonstram que aproximadamente 40% dos pomares no Estado de São Paulo e no sul do Triângulo Mineiro apresentam incidência da doença. O levantamento amostral de CVC feito pelo Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) entre os meses de julho e agosto do ano de 2006, mostrou que ela se mantém no mesmo nível nos últimos três anos. As estimativas dos danos econômicos

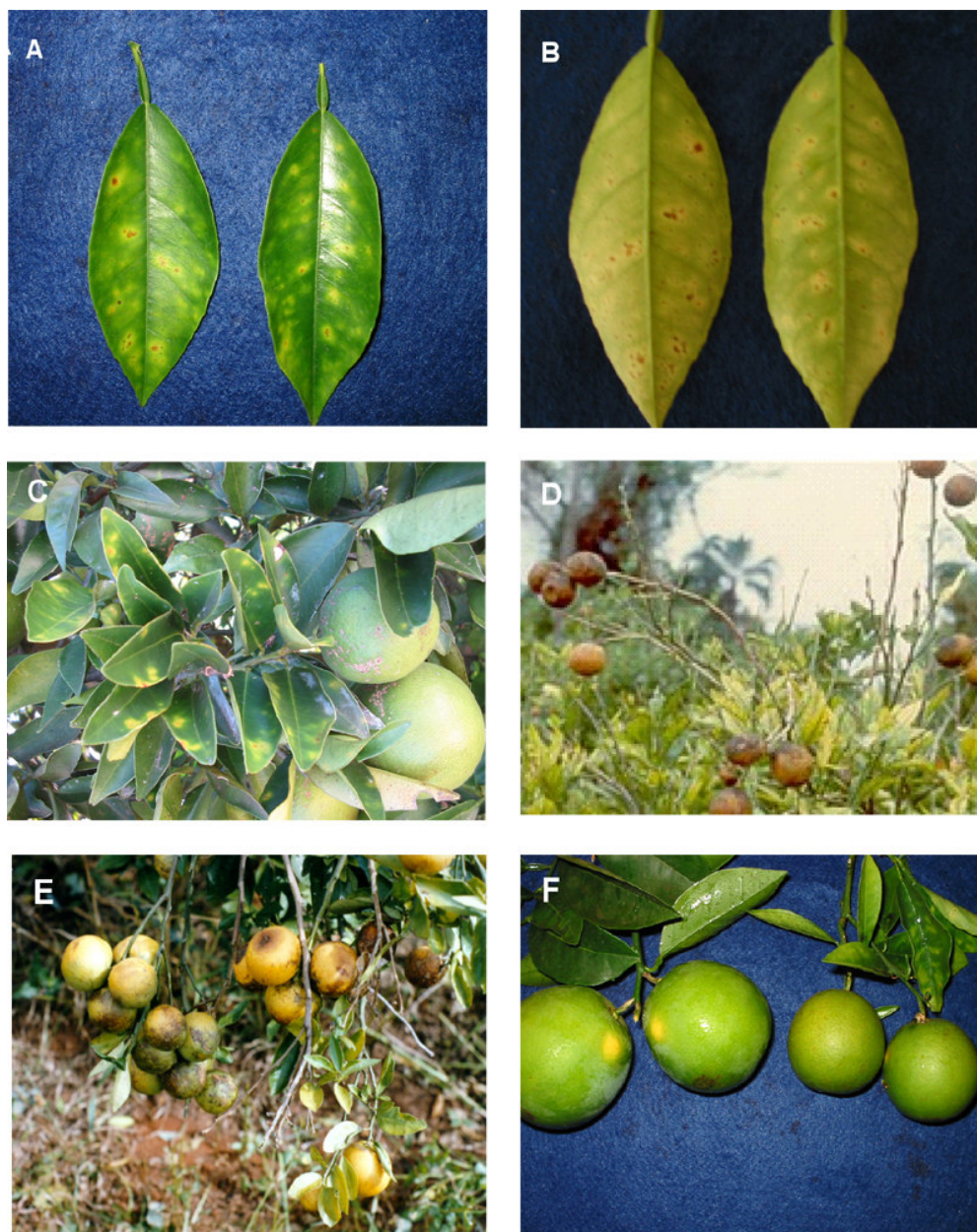


causados pela CVC são da ordem de 286 – 322 milhões de dólares na forma de replantio, poda de plantas infectadas e controle químico do vetor (Fernandes-Jr, 2003).

Em 1987, foram observada pela primeira vez, laranjeiras com sintomas ainda desconhecidos no sudoeste de Minas Gerais e no norte do Estado de São Paulo (De Negri, 1990). Essa nova doença foi denominada “amarelino” ou clorose variegada dos citros (CVC). Nessas plantas sintomáticas foi detectada a presença de bactérias associadas ao xilema, e sua morfologia assemelhava-se à bactéria *X. fastidiosa*, causadora do mal de Pierce em videiras. Em análise por microscopia eletrônica dessas bactérias limitadas ao xilema, admitiu-se a hipótese da bactéria *X. fastidiosa* ser o agente causal da CVC (Rossetti et al., 1990).

Os sintomas típicos da CVC incluem pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha que inicialmente não são muito extensas. As cloroses na face inferior da folha correspondem às manchas variando entre o vermelho e o marrom. Quando a folhas ficam mais velhas, as áreas que apresentam essas lesões podem coalescer e necrosarem (Rossetti and De Negri, 1990) (Figuras 1A, B e C). Em plantas muito afetadas, ocorre atrofia da copa, desfolhas dos ramos mais altos, morte dos ponteiros, encurtamento de internódios, podendo ocorrer a murcha dos ramos (Figura 1D). As gemas dos ramos afetados tendem a brotar com mais frequência e vigor formando novos ramos doentes, portanto, debilitando ainda mais a planta (Laranjeira, 1997).

Após os sintomas foliares, surgem os sintomas nos frutos que estão presentes nos ramos sintomáticos, havendo uma tendência à frutificação em “pencas” (Rossetti and De Negri, 1990; Laranjeira, 1997) (Figura 1E). Os frutos afetados apresentam redução no tamanho, ficam endurecidos e com deficiência de potássio (Figura 1F). Outras características dos frutos doentes são o amarelecimento precoce, surgimento de lesões marrom-escuras (tipo queimadura) podendo estar relacionado ao fato dos frutos apresentarem casca fina (Laranjeira, 1997). Essas características prejudicam a produção de suco e até mesmo o consumo *in natura*.



**Figura 1.** Sintomas da clorose variegada do citros (CVC). A, B e C: sintomas foliares; D: sintomas de desfolha de ramos. E: sintomas dos frutos em “penca”. F: mostrando a diferença dos frutos sadios e doentes. (Fonte: H.D. Coletta Filho).

A transmissão da *X. fastidiosa* causadora da CVC é feita por cigarrinhas (Hemíptera: Cicadellidae) que se alimentam da seiva do xilema das plantas (Hopkins, 1989). As espécies mais importantes em citros são: *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* (Lopes et al., 1996;

Roberto et al., 1996). Entretanto, outras cigarrinhas da família Cicadelidae foram comprovadas como sendo transmissoras em citros, constituindo onze espécies vetoras (Lopes, 1999). Essas cigarrinhas ao se alimentarem da seiva do xilema de plantas infectadas adquirem a bactéria, que também é capaz de se multiplicar no aparelho bucal. Todas as fases de desenvolvimento das cigarrinhas podem transmitir a bactéria, exceto a fase ninfa devido às ecdises (Purcell and Finlay, 1979; Purcell, 1994). Entretanto, a fase adulta é a mais eficiente na transmissão e uma vez adquirida a bactéria, os insetos podem transmiti-la pelo resto de suas vidas (Hill and Purcell, 1995). Embora as cigarrinhas atuem como vetores da *X. fastidiosa*, a eficiência de aquisição e transmissão pode variar em função da espécie, da afinidade com a planta hospedeira (Purcell and Hopkins, 1996; Marucci, 2003) e do local de alimentação nas plantas (Lopes, 1996).

Outra forma de transmissão da *X. fastidiosa* se dá por enxertia de borbulhas infectadas (Jacomino et al., 1993) podendo ser perpetuada da mesma forma (Rosseti et al., 1995; Coletta-Filho et al., 2000). Também foi mostrada a transmissão da bactéria por enxertia natural de raízes (He et al., 2000). Mais recentemente, foi comprovada a presença da *X. fastidiosa* em sementes e frutos de laranja doce com sintomas de CVC que poderiam ser passadas para as plântulas originárias dessas sementes (Li et al., 2003). Não foi constatado a transmissão mecânica dessa bactéria através de objetos cortantes.

#### **4.2. A bactéria *Xylella fastidiosa*.**

A *X. fastidiosa* foi relatada pela primeira vez em 1973 (Goheen et al., 1973; Hopkins and Mollenhaver, 1973) inicialmente associada à doença de Pierce (PD) em videira. Na época, devido à dificuldade de isolamento, ela foi classificada como próxima a “rickettsiae” da família Rickettsiaceae por razões de semelhança ao crescimento lento e necessidade de um vetor para transmissão (Gohen et al., 1973; Hopkins and Mollenhaver, 1973). Em 1978, a *X. fastidiosa* associada à PD foi isolada pela primeira vez em meio de cultivo da rickettsiaceae *Rochalimaea quitana* (Davis et al., 1978). No entanto, estudos do DNA de *X. fastidiosa* revelaram uma composição de G+C diferente do padrão do grupo das rickettsiaceas, indicando que esse microrganismo não seria semelhante às bactérias desse grupo (Kamper et al.,

1985; Wells et al., 1987). Mais tarde, as bactérias limitadas ao xilema de difícil isolamento passaram a ser chamadas de XLB, do inglês “xylem-limited bacteria”, e a *X. fastidiosa* passou a pertencer a esse grupo (Hopkins, 1989).

Posteriormente, análises da região 16S, conteúdos de GC, tamanhos de genoma e comparação de ácidos graxos entre isolados de bactérias limitadas ao xilema indicaram similaridades entre esses microrganismos, que então foram agrupados (Wells and Raju, 1984; Kamper et al., 1985). Em 1987, Wells e colaboradores classificaram o gênero *Xylella* pertencente ao Filo Proteobacteria, sub-divisão Gama, Ordem Lysobacterales, Família Lysobacteriaceae, representado pela espécie *X. fastidiosa* que está relacionada geneticamente às bactérias do grupo *Xanthomonas*.

Em 1991, a identidade da *X. fastidiosa* associada à CVC foi confirmada por Leite Junior and Leite. No entanto, só em 1993, os postulados de Koch foram cumpridos (Chang et al., 1993) e confirmados posteriormente (Lee et al., 1993; Hartung et al., 1994), determinando assim a *X. fastidiosa* como o agente causal da CVC.

Recentemente, foi proposta a divisão da espécie *X. fastidiosa* em três subespécies através da comparação das seqüências das regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S (ITS). A primeira subespécie, *piercei*, incluiria cepas de videira, alfavaca, duas amendoeiras e arce, com 85% de identidade entre elas. A segunda, *multiplex*, com 84% de identidade, compreendia as estirpes de pêssigo, ulmeiro, ameixa, videira “pigeon”; plátamo e amendoeira. E a terceira subespécie, *pauca*, incluiria somente as estirpes de citros com 87% de identidade (Schaad et al., 2004).

A *X. fastidiosa* é uma bactéria Gram negativa, com formato de bastonete e de tamanho variável, podendo chegar até 0,7 µm de diâmetro e 4 µm de comprimento. Caracteriza-se pelo crescimento lento em meio de cultura, sendo suas colônias circulares, discretas, medindo até 0,6 mm de diâmetro após 10 dias de incubação a 28°C, podendo alcançar 1,5 mm depois de 30 dias, com variações decorrentes do meio de cultura utilizado (Coletta-Filho, 2002). Essa bactéria não apresenta motilidade devido à falta de flagelos, também não apresenta pigmentação e é aeróbica. Seu crescimento se dá na condição de 26 e 28°C com pH ótimo entre 6,5 e 6,9, não hidrolisa gelatina, utiliza hipurato, não fermenta glicose, sendo negativa para indol, H<sub>2</sub>S, lipase, amilase, fosfatase e b-galactosidase, mas positiva para catalase e hidrólise de amido (Lacava and Miranda, 2000). O conteúdo de guanina e citosina

(G+C) é de 52,7% (Simpson et al., 2000). Essa bactéria é sensível a polimixina, clorafenicol, tetraciclina, netilmicina (Miranda and Lacava, 2000), gentamicina e kanamicina (Ribeiro, 2002).

Ela é limitada ao xilema das plantas hospedeiras, sendo encontrada em raízes, caules, folhas, frutos e sementes (Hopkins, 1989; Purcel and Hopkins, 1996; Beretta et al., 1997; Li et al., 2003). Coloniza, ainda, o lúmen do canal alimentar de insetos vetores (cigarrinhas) (Hopkins, 1995). Possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo membros de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (Freitag, 1951; Raju and Wells, 1986; Wells et al., 1987; Hopkins, 1989; Purcell and Hopkins, 1996).

*X. fastidiosa* é causadora de doenças em culturas de grande importância econômica, dentre elas estão a alfafa, amendoeira, ameixeiras japonesas, amoreira, cafeeiro, carvalho, citros, espirradeira, olmo, pecan, pessegueiro, pereira e videira (Goheen et al., 1973; Hopkins and Mollenhauer, 1973; Kitajima et al., 1975; Mircetich et al., 1976; Hearon et al., 1980; Rossetti et al., 1990; Leu and Su, 1993; Paradela Filho et al., 1995; Purcel and Saunders, 1999; Sanderlin and Heyderich-Alger, 2000).

A *X. fastidiosa* foi o primeiro patógeno de planta a ter seu genoma completamente seqüenciado (Simpson et al., 2000). O isolado seqüenciado foi o clone 9a5c obtido de laranja Valência. O genoma dessa bactéria é composto de um cromossomo principal de 2.679.305 pares de base (pb) com um conteúdo de 52,7% de G+C (guanina e citosina), e dois plasmídeos menores, um com 51.158 pb, possuindo 49,6% de G+C e outro com 1.285 pb contendo 55,6% de G+C, onde estão codificadas 2.448 proteínas, sendo 48% delas semelhantes a proteínas já descritas em outros organismos (Simpson et al., 2000). Essas proteínas homólogas foram categorizadas em diferentes grupos funcionais ([www.aeg.lbi.unicamp.br/xf](http://www.aeg.lbi.unicamp.br/xf)). Dentre essas categorias, 147 proteínas foram associadas estando envolvidas na patogenicidade, virulência e adaptação.

O genoma da *X. fastidiosa* apresenta cerca de 7% de seqüências homólogas a de fagos, o que explicaria a grande diversidade entre as estirpes, admitindo-se que os bacteriófagos são considerados mediadores da evolução e da transferência de fatores de virulência sendo responsável pelo surgimento de novas espécies (Simpson et al., 2000).

O sistema de transporte parece ser o componente central das interações patógeno/hospedeiro. Em *X. fastidiosa* foram encontrados cerca de 140 genes codificando proteínas relacionadas ao transporte, dos quais, 66 genes parecem estar relacionados ao metabolismo de ferro. Esses genes aparentemente podem estar associados à absorção de micronutrientes no xilema, contribuindo na redução de ferro e outros íons de transição, o que poderia contribuir para os sintomas típicos da doença nas folhas. (Simpson et al., 2000). Com o seqüenciamento genômico desse fitopatógeno pode-se traçar as vias de síntese de aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e o metabolismo energético, que possui como fonte principal o açúcar. A maquinaria de transcrição e tradução da estirpe 9a5c é semelhante à de *E. coli*.

Curiosamente, não foram encontrados no genoma da *X. fastidiosa* os genes responsáveis pela especificidade planta/patógeno que geralmente são encontrados em bactérias fitopatogênicas. Esses genes de avirulência (*avr*) presentes nos patógenos interagem com as proteínas de resistência do hospedeiro (R) (Baker et al., 1997). Acreditava-se que esses genes poderiam estar entre os genes com função ainda não determinada. No entanto, isso não seria possível já que os genes *avr* são dependentes do sistema de secreção tipo III e são extremamente conservados, descartando assim essa hipótese. A ausência de genes *avr* pode ser explicada pelo modo de vida dessa bactéria e tipo de transmissão, que não necessitam de invasão e/ou lise das células dos hospedeiros para a sua infecção e sobrevivência (Dow and Daniels, 2000; Lambais et al., 2000; Simpson et al., 2000).

Antes do seqüenciamento do genoma, as informações sobre seu mecanismo de patogenicidade não eram bem esclarecidas. Acreditava-se que a oclusão do xilema pelas bactérias, tiloses e goma, além da produção de fitotoxinas e o desbalanço de reguladores de crescimento, seriam responsáveis pela patogenicidade da *X. fastidiosa* (Hopkins, 1989). No entanto, nenhum experimento conseguiu comprovar ou excluir nenhuma dessas hipóteses. Com a publicação do genoma e baseado nos sintomas da CVC, puderam-se esclarecer algumas hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na patogenicidade da *X. fastidiosa*.

Uma das hipóteses sobre os mecanismos está relacionada à produção de exoenzimas que degradam a parede celular, sendo três endo-1,4- $\beta$ -glucanases e uma celobiohidrolase. A ação dessas enzimas promove a movimentação da bactéria entre os vasos através da degradação das membranas laterais do xilema. Foi demonstrado

que essa movimentação está associada à patogenicidade da *X. fastidiosa* causadora da doença de “Pierce” e de CVC (Hopkins, 1985; Almeida et al., 2001).

A *X. fastidiosa* produz ainda uma grande quantidade de toxinas que provavelmente estão relacionadas aos sintomas foliares. Entre essas toxinas, foram encontradas cinco similares a hemolisinas, sendo quatro delas pertencentes à família de toxinas RTX que são importantes fatores de virulência, com ampla disseminação em bactérias Gram-negativas (Coote, 1992). Também foram encontrados no genoma genes que codificam colicina V, um polipeptídeo tóxico que age em bactérias sensíveis. Além dessas toxinas, apesar de não possuir as vias completas, foi verificado a presença de alguns policetídeos, uma importante classe de toxinas (Simpson et al., 2000).

O genoma revelou, ainda, genes relacionados à resistência a estresse osmótico, estresse oxidativo e um eficiente sistema de absorção de nutrientes, uma vez que o xilema é um ambiente pobre em nutrientes. Além desses, houve a identificação de alguns genes envolvidos com a resistência a compostos antimicrobianos, sugerindo que essa bactéria possa apresentar um mecanismo de defesa contra toxinas ou antibióticos produzidos por endofíticos encontrados no xilema. Esses genes podem desempenhar um importante papel na interação da bactéria com o hospedeiro, conferindo vantagens competitivas no ambiente colonizado que contribuam para a sua adaptação (Simpson et al., 2000).

O mecanismo de patogenicidade mais sugerido e pesquisado está relacionado ao bloqueio dos vasos xilemáticos através de agregados da bactéria, produção de polissacarídeos e tiloses. Essa hipótese é sustentada devido aos hospedeiros infectados apresentarem sintomas típicos de estresse hídrico. A *X. fastidiosa* deve possuir um importante mecanismo de agregação entre as células e a parede dos vasos colonizados, uma vez que habita micro-ambientes específicos, como o xilema e o canal alimentar do vetor, que estão sujeitos a uma forte turbulência e pressão. (Hopkins, 1989).

Em relação à hipótese envolvendo o bloqueio dos vasos do xilema, foram detectados vários genes responsáveis pela adesão na superfície dos vasos do xilema do hospedeiro e do cibário do vetor, inclusive genes que até o momento só haviam sido detectados apenas no processo de adesão de patógenos de humanos (Simpson et al., 2000). Através de micro-análises por raios-X dos agregados da *X. fastidiosa* in

*planta e in vitro*, admite-se que a adesão dessa bactéria ocorre por interações entre as cargas negativas da parede do xilema e os grupos tiol (SR) da membrana externa da bactéria. Esses grupos tiol também promovem a agregação das bactérias por meio da formação de pontes de dissulfeto entre os grupos presentes nas membranas das células vizinhas (Leite et al., 2002). A adesão e agregação das bactérias aos vasos do xilema podem ser ainda mediadas por estruturas tipo fímbrias, que são visualizadas por microscopia eletrônica da *X. fastidiosa* tanto na planta como no inseto vetor. No genoma dessa bactéria foram detectados 26 genes relacionados à biossíntese e função de filamentos de fímbrias (Simpson et al., 2000) Também foi descrita uma via completa para a síntese de um exopolissacarídeo (EPS) denominado “goma fastidiana” (da Silva et al., 2001). Esse EPS promove a proteção das células contra fatores de defesa do hospedeiro, como toxinas e antibióticos, tendo um importante papel na adaptação da bactéria (O’ Toole et al., 2000).

Contudo, estudos de genoma funcional são necessários para comprovar essas hipóteses sobre a patogenicidade da *X. fastidiosa*.

#### **4.3. Genoma funcional da *Xylella fastidiosa*.**

Após o seqüenciamento do genoma da *X. fastidiosa*, foram iniciados os trabalhos relacionados ao genoma funcional visando o entendimento das funções dos genes identificados no genoma. Um dos focos desses estudos sempre esteve voltado ao entendimento do mecanismo de patogenicidade dessa bactéria que, como já mencionado, não apresenta genes específicos planta-patógeno que são comuns entre as bactérias fitopatogênicas. Um importante fato relacionado à *X. fastidiosa* foi a identificação de genes associados à adesão da bactéria em superfícies, sendo muitos deles similares a genes que possuem esta função em bactéria patogênicas de humanos (Simpson et al., 2000). Nessas bactérias, o principal mecanismo de patogenicidade está relacionado à sua capacidade de formar biofilme na superfície colonizada do hospedeiro. O termo biofilme descreve a habilidade das bactérias em aderir superfícies e formar uma comunidade microbiana (Costerton et al., 1995). Trabalhos publicados recentemente, demonstram que a *X. fastidiosa* possui a habilidade de formar biofilme em diferentes superfícies e que a morfologia parece variar de acordo com a estirpe e as condições ambientais analisadas (Marques et al.,



2002; Souza et al., 2004). Considerando o fato dos sintomas característicos da CVC serem decorrentes do bloqueio dos vasos do xilema em consequência da colonização bacteriana, a formação do biofilme é considerada o principal mecanismo de patogenicidade desse fitopatógeno (Leite et al., 2002; Souza et al., 2003; Newman et al., 2004; Osiro et al., 2004; Guilharbert and Kirkpatrick, 2005).

No entanto, além de trabalhos relacionados ao entendimento do mecanismo de patogenicidade da *X. fastidiosa*, diversos trabalhos baseados no genoma funcional dessa bactéria geraram um amplo conhecimento a respeito da sua biologia. Alguns dos principais conhecimentos gerados foram a determinação de meio de cultivo definido (Lemos et al., 2003; Almeida et al., 2004), análise global de proteínas expressas (Smolka et al., 2003; Bellato et al., 2004), modulação da expressão gênica (Coltri and Rosato, 2004; Coldri and Rosato, 2005; Pashalidis et al., 2005); resistência a antibióticos (Ribeiro et al., 2005); análise de transportadores (Meidanis et al., 2002) e muitos outros trabalhos importantes para o entendimento desse microrganismo.

O seqüenciamento gera um grande número de informações que são depositadas nos bancos de dados. Para a identificação da função dos genes após o seqüenciamento, são realizados estudos de genoma funcional. Portanto, a função de um gene pode ser determinada a partir do padrão de expressão gênica, ou da proteína gerada ou até mesmo pelos metabólitos resultantes, quando medidos numa determinada situação fisiológica da célula na sua condição de crescimento experimental. O padrão de expressão é medido através do nível de RNA, onde este estudo recebe o nome de transcriptoma, a nível de proteína que é denominado proteoma e através de produtos metabólicos, metaboloma.

No presente trabalho, foi realizado o estudo do transcriptoma para a análise dos genes. Diversas ferramentas podem ser usadas nos estudos pós-genômicos. Para o estudo através do transcriptoma, que se baseia em análises de expressão gênica, podem ser utilizadas as técnicas de macro ou micro arranjos de DNA sobre membranas ou lâminas de vidro, mas que necessitam ser validados em experimentos subsequentes através de outras técnicas como o Northern blotting ou PCR quantitativo em tempo real (qPCR), por exemplo. Além destas, pode ser feita uma validação final da expressão através da mutagênese sítio dirigida. Para análises mais globais do genoma de um determinado organismo, são utilizadas as técnicas de

*macroarray* e *microarray*, no entanto, para a avaliação específica é utilizada a técnica de qPCR (Souza et al., 2006).

A técnica do qPCR pode ser utilizada na identificação de alelos em DNA genômico, na análise de seqüências virais, bacterianas e de protozoários a partir de várias fontes. Essa técnica permite a quantificação das amostras amplificadas, sendo de grande relevância para diagnósticos de patógenos e doenças genéticas. Dentre as vantagens desta técnica estão a PCR qualitativa, a facilidade na quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle na qualidade no processo e menor risco de contaminação (Novais et al., 2004). Em relação à verificação da expressão gênica, o qPCR é utilizado na análise de genes específicos, o que difere da técnica de *microarray*, que analisa de uma forma global.

#### **4.4. A formação do biofilme e seu papel na patogenicidade e adaptação da *X. fastidiosa*.**

A formação do biofilme é composta por diferentes estádios iniciando-se pela adesão na superfície, proliferação bacteriana dentro de microcolônias e expansão destas, formando estruturas altamente organizadas. Stoodley et al, (2002) dividiu a formação do biofilme em cinco diferentes estádios (Figura 2). O estágio 1, correspondente à adesão reversível das células na superfície; o estágio 2, referente à adesão irreversível mediada principalmente pela produção de substâncias exopoliméricas; no estágio 3, onde inicia-se a primeira fase de maturação do biofilme caracterizada pelo início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; a segunda fase de maturação, estágio 4, corresponde ao biofilme totalmente maduro, com alta densidade celular, e a arquitetura do biofilme apresenta-se de forma complexa; o estágio 5 é referente à fase de dispersão das células do biofilme.

*X. fastidiosa* apresenta a formação do biofilme tal quais bactérias patogênicas de humanos, com pelo menos cinco fases distintas, no entanto com o tempo de formação bem mais lento que outras bactérias, o que se explica por seu crescimento fastidioso (Souza et al., 2004). Em um trabalho realizado para análise do biofilme de *X. fastidiosa* nos diferentes dias de formação do biofilme *in vitro*, verificou-se que após três dias de crescimento inicia-se a formação do biofilme, com 15 dias o

biofilme inicia sua maturação, após 20 dias ele se torna maduro, e após 30 dias ocorre a fase de dispersão celular (Souza et al., 2003) (Figura 3).

No primeiro estágio de formação do biofilme da *X. fastidiosa*, onde as células se aderem na superfície a ser colonizada, é necessária a expressão de genes relacionados com adesão. Foi demonstrado que *X. fastidiosa* necessita da expressão de genes de adesão para colonizar a planta (Souza et al., 2003, Guilharbert and Kirkpatrick, 2005, Meng et al., 2005). Este processo é importante, uma vez que, a bactéria coloniza o xilema, um ambiente sujeito a forte turbulência e pressão negativa. Adesinas fimbriais pertencentes a fímbrias do tipo I e IV parecem ser essenciais na etapa inicial de adesão na superfície, e posterior colonização do hospedeiro. Souza et al (2003, 2004), através de *microarray* e RT-PCR, verificaram maior expressão de fímbria do tipo IV nos estádios iniciais de colonização. Mutantes para a *X. fastidiosa* causadora da doença de Pierce apresentam reduzida capacidade de agregação celular (Feil et al., 2003) e diminuição do biofilme (Meng et al., 2005), demonstrando que as fímbrias do tipo I são importantes no início da formação do biofilme. Também foram obtidos mutantes para as fímbrias do tipo IV, e estes são incapazes de se movimentarem tanto nas condições *in planta* quanto *in vitro*. Esses resultados indicam que fímbrias do tipo IV seriam responsáveis pela movimentação sistêmica, portanto, essenciais para a colonização da bactéria no interior do vaso (Meng et al., 2005).

Além das fímbrias, adesinas afimbriais parecem também contribuir para o processo de adesão célula-célula e formação da arquitetura do biofilme. Em *X. fastidiosa* foram encontrados genes que codificam para adesinas afimbriais com similaridade para *uspA1* de *Moraxella catarrhalis*, dois *hsf* de *Haemophilus influenzae*, sendo esses relacionados à adesão da bactéria às células epiteliais do trato respiratório (St. Geme et al., 1996), e três *pspA* com alta similaridade a hemaglutinina de *Neisseria meningitidis*. Sugere-se que a atuação em conjunto desses genes promove uma forte agregação bacteriana resultando na formação do biofilme (Souza et al., 2006). Os genes *uspA1* e *hsf* foram encontrados expressando no início e no estágio intermediário da formação do biofilme, sugerindo que além do papel no início dessa formação, esses genes podem estar envolvidos na formação da arquitetura do biofilme (Souza et al., 2003, 2005). Um outro gene codificando para uma adesina similar a uma hemaglutinina, foi expresso na fase madura do biofilme de

*X. fastidiosa* causadora da CVC. Este gene parece estar envolvido na adesão célula-célula. Uma evidência disto é o fato de mutantes para este gene em *X. fastidiosa* PD foram incapazes de promover esta adesão entre as células. Esses mutantes apresentaram colonização muito mais rápida no hospedeiro que o tipo selvagem, sugerindo que o processo de adesão célula-célula retarda a formação do biofilme sendo considerado um fator de avirulência (Guilharbert & Kirkpatrick, 2005).

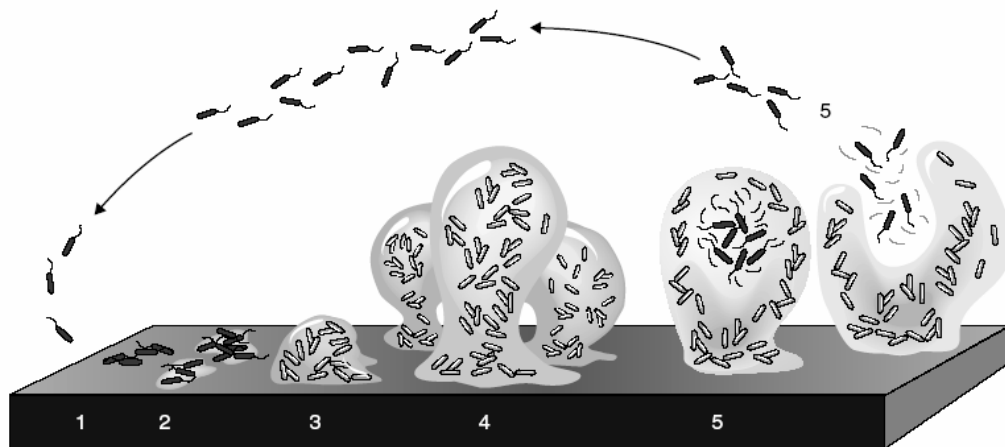
Um outro fato relacionado à formação do biofilme é a ausência da goma fastidiana (exopolissacarídeo) no processo de adesão na superfície do hospedeiro e entre as células de *X. fastidiosa* causadora da CVC, uma vez que, não foi observada a presença dessa goma nos estádios iniciais da formação do biofilme. Essa observação sugere que o início do processo de formação de biofilme independe da goma fastidiana (Leite et al., 2002; Osiro et al., 2004). Baseado nessa verificação foi proposto que o processo inicial de formação do biofilme é dependente da atração eletrostática entre proteínas de superfícies carregadas positivamente de *X. fastidiosa*, tais como adesinas fimbriais e afimbriais, e a superfície do hospedeiro. A manutenção dessa adesão seria realizada por uma enzima denominada metionina sulfóxido redutase (MsrA; EC 1.8.4.6) (Leite et al., 2002). O gene *msrA* que codifica essa enzima, teve sua expressão aumentada em estirpes virulentas de *X. fastidiosa* causadora da CVC, esse aumento da expressão foi associado tanto na manutenção do estado adesivo das proteínas fimbriais e afimbriais na superfície do hospedeiro, quanto na resposta de defesa ao estresse oxidativo (Souza et al., 2003).

Baseado no estudo funcional da *X. fastidiosa* causadora da CVC, foi proposto um modelo da formação do biofilme dessa bactéria no xilema da planta (Figura 4) (Souza et al., 2006). Quando as células bacterianas atingem o estágio de biofilme maduro é ativado um sistema de sinalização denominado “quorum sensing”. Esta sinalização permite que as bactérias regulem a expressão de genes específicos como os associados a fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, respostas de defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e transferência de plasmídeos por conjugação (De Kievit and Iglewski, 1999; Davey and O’Toole, 2000; Rahmati et al., 2002; Molin and Tolker-Nielsen, 2003). Estas características permitem que as células em biofilme apresentem grande vantagem adaptativa e competitiva no hospedeiro (Davey and O’Toole, 2000). Tem sido demonstrado, por exemplo, que células em biofilme são 500 vezes mais

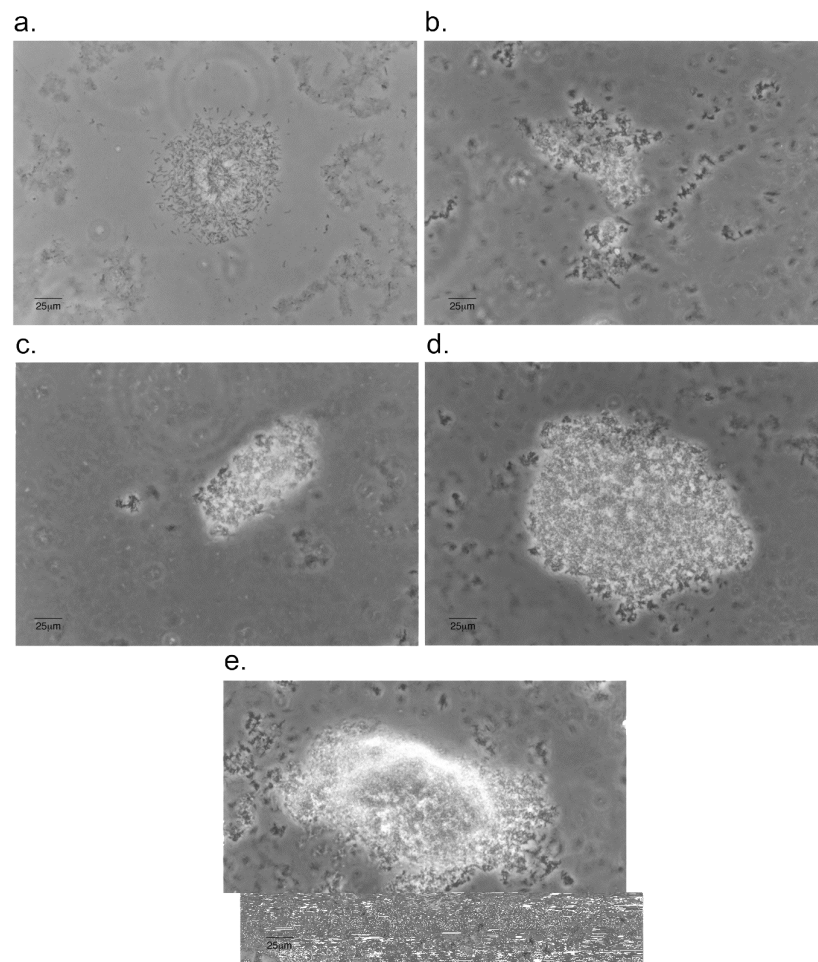
resistentes a compostos antimicrobianos que em crescimento planctônico (Costerton et al., 1995).

Apesar do elevado número de estudos envolvendo a expressão de genes associados ao crescimento em biofilme, poucas são as informações sobre a expressão de genes envolvidos no biofilme de patógenos de planta. Souza et al (2004), verificaram através de microarranjos de DNA, que um grande número de genes apresenta indução no biofilme da *X. fastidiosa* quando comparado ao crescimento planctônico, sendo muitos deles associados à resistência a compostos antimicrobianos. A expressão de genes majoritariamente expressos em condição de biofilme e associados à resistência a antibióticos, metais pesados, competição com endofíticos e outros fatores, sugere que as células, nessa condição, desenvolvem através da síntese de proteínas *de novo* um mecanismo de auto-proteção, tornando-se mais resistentes a uma ampla gama de agentes biocidas ou biostáticos. Além dos genes identificados nesse trabalho, outros genes foram detectados no genoma da *X. fastidiosa* como possivelmente envolvidos no mecanismo de resistência a metais, que podem ser positivamente regulados na presença do composto.

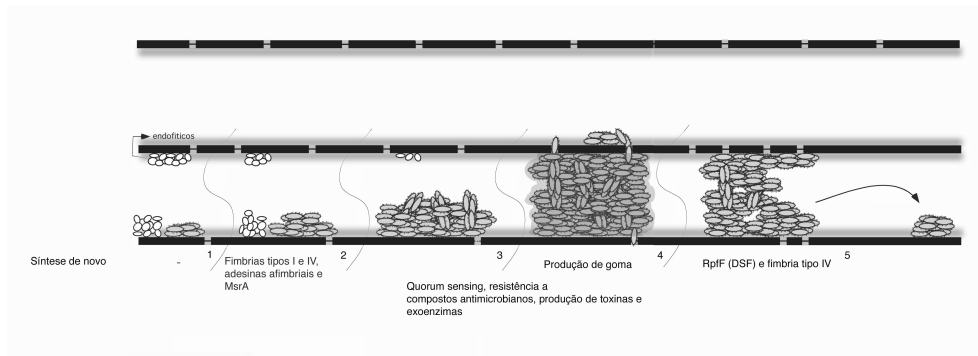
Os genes detectados como possivelmente envolvidos na resistência a cobre e zinco em *X. fastidiosa* pertencem a diferentes famílias, porém todas estas estão agrupadas por possuírem atividade de transportadores de efluxo de compostos antimicrobianos. Dentre essas famílias estão a RND (resistance-nodulation-division), que funcionam associadas a proteínas da família de fatores de membrana externa (out membrane factors-OMF) e MFP (periplasmatic membrane fusion protein) (Zgurskaya and Nikaido, 2000), a família de transportadores ABC (ATP-binding cassette) com proteínas relacionadas a um sistema de secreção (Andersen, 2003; Lage, 2003), a “P-type ATPase”, que constitui uma superfamília de proteínas de transporte que são dirigidas por hidrólise de ATP (Fagan et al., 1994) e os genes do *operon cut* que provavelmente estão envolvidos na homeostase de cobre.



**Figura 2.** Modelo dos estádios de desenvolvimento de biofilme bacteriano. 1) Estádio onde as células bacterianas aderem de forma reversível na superfície. 2) Estádio que as células perdem sua motilidade e aderem na superfície de forma irreversível, uma etapa mediada principalmente por substâncias exopoliméricas. 3) Estádio correspondente ao início da maturação do biofilme, indicado pelo desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. 4) Estádio de total maturação do biofilme, indicado por uma complexa arquitetura do biofilme. 5) Estádio de dispersão, com o aparecimento de células móveis que deixam as microcolônias (Stoodley et al, 2002).



**Figura 3.** Biofilme de *Xylella fastidiosa*. Crescimento celular em superfícies de vidro visualizadas em microscopia óptica durante diferentes estádios da formação do biofilme. 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d) e 30 (e) dias após inoculação (Souza et al., 2003).



**Figura 4.** Modelo de interação e formação de biofilme das células de *X. fastidiosa* com a superfície do hospedeiro. Feixe vascular contendo endofíticos e seiva do xilema. 1. As células de *X. fastidiosa* são inoculadas pelo vetor. As células aderem à superfície do xilema devido a atração eletrostática mediada pela carga positiva das adesinas com a carga negativa dos vasos. 2. Multiplicação das células e início da formação do biofilme. Aumento da expressão de genes associados a adesão célula-célula e manutenção da adesão pela ação da enzima metionina sulfóxido redutase. 3. Formação de biofilme maduro e ativação de genes que conferem vantagens adaptativas e competitivas para a comunidade microbiana. 4. Aumento do biofilme resultando no bloqueio do feixe vascular e movimento das células através da degradação das pitmembranas. 5. Dispersão celular, possivelmente mediada pela sinalização por pequenas moléculas difusíveis (DSF), movimento dentro do vaso através de fímbrias do tipo IV e início da formação de biofilme em outra região da superfície do xilema.

#### 4.5. Família ABC-Transporte.

A superfamília dos transportadores ABC (ATP-binding cassette) está presente em todas as formas de vida e usa a energia liberada pela hidrólise do ATP para promover o transporte ativo de substâncias através da membrana citoplasmática. Os transportadores ABC são compostos de duas cópias do domínio ABC com uma sequência conservada LSGG reconhecível entre os motivos “Walker” A e B do sítio ATP-binding (Walker et al., 1982), e duas cópias do domínio transmembranar (TM), geralmente consistindo de seis  $\alpha$  hélices (Holland and Blight, 1999). Alguns sistemas ABC transporte fazem a importação, enquanto outros a exportação, mas nenhum sistema conhecido faz ambas as funções. Um típico sistema ABC para importação de solutos é composto de três unidades que aparecem juntas como genes em cluster: um receptor, um componente de membrana e um componente do ATP-binding citoplasmático. Os receptores não são, geralmente, requeridos nos sistemas



de exportação dos ABC transportes. O melhor componente conservado deste sistema é o ATP-binding. Esse motivo é completamente conservado em todos os organismos (Meidanis et al., 2002).

Os transportadores ABC são agrupados em sete classes estruturais, ou subfamílias, baseados na seqüência de aminoácidos e organização dos domínios (Croop, 1998). Esses transportadores são coletivamente capazes de transportar uma diversidade muito grande e incomum de substratos. Esta diversidade de funções é manifestada a nível de família, mas também em membros individuais dela, como por exemplo, aqueles associadas com resistência a multidrogas (MDR) (Sheps et al., 2004).

As bactérias usam os transportadores ABC tanto para importar substâncias, onde a função principal é de fornecer nutrientes essenciais às bactérias, quanto para exportar substâncias nocivas e toxinas. Em contraste, os eucariontes só utilizam este sistema para exportação (Saurin et al., 1999). Este tipo de proteína transportadora está ligada na membrana interna de bactérias gram-negativas ou na única membrana de gram-positivas ou células eucarióticas. No caso de bactérias gram-negativas, não só é necessário proteger o citoplasma, mas também é necessário fazer o transporte de substâncias nocivas das células através da membrana externa, para a proteção do periplasma aos danos causados por essas substâncias. A família responsável por essa proteção está relacionada ao sistema ABC (Paulsen et al, 1997; Poole, 2001), essa função também foi identificada nos eucariontes, onde os sistemas ABC agem aumentando a resistência a múltiplas drogas (Gros et al, 1986).

Em *X. fastidiosa* foram encontrados trinta e dois sistemas de transporte ativo primários, dentre eles estão os transportadores dirigidos por hidrólise de ATP. Foram identificados vinte e três sistemas dessa superfamília no genoma da bactéria, onde nove sistemas foram classificados como envolvidos na importação de diversos substratos, e quatorze sistemas relacionados a exportação. O gene DR1357 de *X. fastidiosa* codifica uma permease que possui um domínio AbcD, o qual está envolvido no sistema de transporte de metais (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esse gene foi nomeado como *metI* segundo a nova classificação dos genes de *X. fastidiosa* que está sendo feita pelo LNCC (Laboratório Nacional de computação científica) (<http://www.xylella.lncc.br>). O domínio ABC também está envolvido no sistema de transporte de íons de metais em muitos organismos, inclusive em

bactérias gram-negativas (Paulsen et al, 1997). Broeks et al (1996), obtiveram mutantes de transportadores ABC em células excretoras de *Caenorhabditis elegans*. Três mutantes apresentaram um fenótipo de hipersensibilidade a metais pesados como cádmio e arsênico.

#### 4.6. Família “P-Type ATPase”.

As “P-type ATPases” constituem uma superfamília de proteínas de transporte que são dirigidas por hidrólise de ATP. Os transportadores “P-type ATPases” podem tanto importar cátions de fora ou do periplasma para dentro do citoplasma como exportar do citoplasma para o periplasma ou meio extracelular (Fagan and Saier 1994). As proteínas dessa família estão envolvidas no transporte de substratos que são carregados através de membranas biológicas (Axelsen and Palmgren, 1998). Em *X. fastidiosa* apenas dois genes (*copA* e *copB*) envolvidos na homeostase de cobre foram associados como membros dessa família.

Os substratos transportados pela família “P-Type ATPase” são cátions inorgânicos como  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  (Saier, 1994). Na homeostase de metais pesados, os transportadores “P-Type ATPases” podem tanto importar como exportar esses substratos. Foi verificado que os sistemas de importação de macromoléculas  $Mg^{2+}$  também podem importar metais pesados (Snively et al., 1989). A exportação através do efluxo dos cátions de metais pesados por essa família pode detoxificar as células (Nies, 2003).

Os membros da superfamília “P-Type ATPase” que transportam metais pesados possuem um resíduo de prolina conservado, precedido e/ou seguido por um resíduo de cisteína. Este domínio é essencial para a função dessa família (Fan and Rosen, 2002). Devido a característica do domínio CPC ou CPH das ATPases de metais pesados ser intramembranoso, foi sugerido que essas ATPases fossem chamadas de “CPx-type ATPases” (Solioz and Vulp, 1996). O domínio CPx está localizado no meio da sexta hélice da membrana, na estrutura central mais conservada da enzima e aparentemente constitui parte do canal de íons através da membrana. ATPases de cobre têm sido surpreendentemente conservadas em bactérias de humanos (Nies, 2003).

Dentro dessa superfamília existem vários membros que possuem diferentes substratos. Uma família “CPx-Type ATPases” envolvida na exportação de  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Ag}^{2+}$ , foi nomeada como “Cu-CPx-type ATPases” (Rensing et al., 1999; Rensing and Grass 2003). Esta família foi descrita em muitos organismos, como por exemplo, em *E. coli* (Rensing et al., 2000), *Enterococcus hirae* (Bissig et al., 2001), na cianobactéria *Synechocystis* (Tottey et al., 2001) e também em organismos eucariotos como, *Dictyostelium* (Burlando et al., 2002), *Candida albicans* (Riggle and Kumamoto, 2000) e em muitos outros organismos. Uma outra família, a “Zn-CPx-type ATPases”, está relacionada ao transporte de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ , também é encontrada em *Listeria monocytogenes* (Bal et al., 2001), *E. coli* (Beard et al., 1997; Mitra and Sharma, 2001) e *S. cerevisiae* (Shiraishi et al., 2000). No entanto, essa família não parece ter uma distribuição muito ampla como a “Cu-CPx-type ATPases” (Nies, 2003).

Na análise da topologia da membrana das “CPx-type ATPases”, foram verificados oito segmentos transmembranares com o domínio CPC conservado localizado na sexta posição desse segmento. Um domínio ATP-binding foi situado em um largo domínio citoplasmático que segue esta transmembrana. O amino-terminal com 109 aminoácidos carrega um domínio CXXC que também está presente em muitos membros da CPx-type ATPases (Tsai et al., 2002). Embora cátions de metais pesados serem capazes de se ligar ao domínio amino-terminal (DiDonato et al., 2002), este não é essencial para o transporte (Mitra and Sharma, 2001).

O transporte realizado pelas “CPx-type ATPases” em bactérias, é principalmente a exportação para fora do periplasma, mas a outra direção também parece ocorrer. O primeiro exemplo de “Cu-CPx-type ATPases” foi na bactéria *E. hirae*. Essa bactéria Gram-negativa possui o sistema de homeostase de cobre melhor entendido entre os organismos. O *operon* que é responsável por essa homeostase é constituído por quatro genes sendo eles, *copY*, *copZ*, *copA* e *copB*. Os produtos dos genes *copA* e *B* são transportadores ATPases. *copY* codifica um repressor de resposta a cobre e *copZ* codifica para uma chaperona, a qual serve para o transporte intracelular do cobre (Ordematt et al., 1993; Ordenatt and Solioz, 1995). De acordo com o modelo, o produto do gene *copA* é responsável pela importação do cobre, enquanto que, o do gene *copB* expulsa o excesso de cobre, a CopY regula a

expressão do operon *cop* e CopZ transfere intracelularmente o cobre (Ordermatt et al., 1994; Wunderliye and Solioz, 1999).

Uma distribuição putativa da família “CPx-type ATPases” no genoma dos procariontes foi analisada e revelou dezesseis grupos de “Cu-CPx-type ATPases” e doze grupos de “Zn-CPx-type ATPases”, que foram encontrados por múltiplos alinhamentos. Em sessenta e quatro grupos de procariontes analisados, só oito espécies não continham um gene para uma “P-type ATPase” putativa. Cinco espécies continham no mínimo uma “P-Type ATPases”, mas nenhuma CPx-type. Vinte e nove espécies possuíam “CPx-type ATPases” de ambas famílias, a “Cu-CPx-type ATPases” e “Zn-CPx-type ATPases”. Os procariontes possuem somente um membro dessas duas famílias, na sua maioria foram encontrados membros da “Cu-CPx-type ATPases” (18 espécies) e somente quatro casos de “Zn-CPx-type APTases”. Portanto, aproximadamente metade das espécies analisadas continha membros de ambas as famílias, o que indica a importância na resistência mediada por essas proteínas (Nies, 2003).

#### **4.7. Família Resistência-Nodulação-Divisão celular (RND).**

A resistência a metais é conferida principalmente por sistemas de transporte. Um dos principais sistemas é composto por membros da família RND (resistance-nodulation-division) responsável pela exportação de cátions e compostos orgânicos para o citoplasma. Adjacente a um gene que codifica uma proteína RND está, em muitos casos, um segundo gene que codifica uma proteína da família de membrana de fusão (membrane fusion protein, MFP), também denominada de família de proteínas de efluxo periplasmático. Além das MFPs, muitas proteínas RNDs cooperam ainda com uma terceira proteína que pertence a família de fatores de membrana externa (out membrane factors, OMF). Estas três proteínas formam um complexo de proteínas de efluxo que podem exportar o substrato do citoplasma diretamente para fora da célula (Nies, 2003). A posição do gene OMF varia de *operon* para *operon*. Esse gene pode estar localizado na posição 5' terminal de alguns *operons*, ou na posição 3' de outros. O gene OMF pode não fazer parte do *operon*, como é o caso do *tolC*, que interage com vários sistemas de efluxo que são dirigidos

por proteínas RND e também com sistemas de transporte ABC (Anersen et al., 2001).

Essa família é conhecida por transportar vários substratos, incluindo muitas classes de antibióticos, biocidas, tintas, detergentes, inibidores metabólicos, hidrocarbonatos aromáticos (solventes orgânicos), peptídeos antimicrobianos catiônicos, ácidos tóxicos gordurosos e homoserina lactonas associadas ao “*quorum sensing*” (Poole, 2001; Poole, 2002). Para realizar o transporte dessas moléculas, a família RND-MFP-OMF utiliza a força motiva de prótons. Os transportadores dependentes da força motiva de prótons são predominantes entre os mecanismos de resistência, exceto a família dos transportadores ABC que utilizam ATP (Poole, 2002).

Sistemas de efluxo RND-MFP-OMF têm sido descritos na resistência de um amplo número de bactérias Gram-negativas patogênicas e não patogênicas. Os melhores sistemas caracterizados de efluxo RND-MFP-OMF são os encontrados em *E. coli* (Nikaido and Zgurskaya, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* (Poole, 2001) e *Neisseria gonorrhoeae* (Shafer et al., 2001).

A resistência a antibióticos mediada por proteínas RND foi responsável por metade da resistência a múltiplas drogas em estirpes de *P. aeruginosa*. Este patógeno possui no mínimo treze sistemas de transporte RND. Um deles é o HME-RND que exporta metais pesados e os outros doze são provavelmente proteínas HAE-RND. O sistema melhor caracterizado entre essas proteínas são os MexB, MexD e MexF. Juntos com seus respectivos MFPs (MexA, MexC, MexE) e OMFs (OprM, OprJ, OprN), estes sistemas detoxificam uma variedade de substâncias (Nies, 2003).

A bactéria *E. coli* possui o sistema AcrAB-TolC que a protege contra uma variedade de substâncias tóxicas especialmente durante o baixo crescimento (Rand et al., 2002). Esse sistema demonstra claramente o complexo de efluxo das proteínas RND-MFP-OMF.

Outros sistemas HAE-RND foram caracterizados, como AcrAB de *Haemophilus influenzae* (Sánchez et al., 1998), AdeABC de *Acinetobacter baumannii* (Magnet et al., 2001), SrpABC e TtgDEF de *P. putida* (Ramos et al., 1998; Mosqueta and Ramos., 2000), MtrCDE de *N. gonorrhoeae* (Hagman et al., 1997; Veal et al., 2002) e muitos outros em diversos organismos.

Em *Ralstonia metallidurans*, os genes que formam o operon *czcCBA* são responsáveis por conferir resistência a metais catiônicos. Após seqüenciamento, foi verificado que *czcC* pertence à família OMF, *czcB* à família MFP e *czcA* à RND. Este operon é flanqueado por genes envolvidos na regulação da expressão de *czcCBA* (Nies, 2003).

No genoma da *X. fastidiosa* foram encontrados oito genes que codificam para RNDs, sendo cinco deles associados a bombas de efluxo de cátions e multidrogas, dois codificando proteínas de membrana (translocase) e uma outra proteína que possui como substrato drogas e antibióticos. Também foram identificados cinco MFPs, sendo três delas associadas a membros RND e duas com ABC (Meidanis et al., 2002). Resultados da expressão em *X. fastidiosa* crescendo em biofilme e genes associados à patogenicidade (Souza et al., 2003; Souza et al., 2004; Souza et al., 2005) demonstram a expressão de dois destes clusters relacionados à RND-MFP.

Em biofilme um dos genes expressos foi o *czcA*, associado a resistência a metais e multidrogas, cujo domínio AcrB trabalha junto com MFP que é codificado pelo gene *mexE*, que possui o domínio AcrA para exportar o substrato para o meio externo. A jusante desses genes está um regulador de transcrição pertencente à família AcrR. O gene *acrF* codifica uma proteína RND que possui o domínio ACR-tran e o domínio AcrB. Esse gene coopera com o gene *acrA*, que apresenta o domínio MFP de bombas de efluxo de cátions e multidrogas, similares a membros da família RND. Neste trabalho, o gene *acrF* foi nomeado como *acrB* por possuir o domínio AcrB. Esses possíveis *operons* apresentam similaridades com o sistema RND, indicando que possivelmente estão associados à resistência a metais ou a drogas. A expressão constitutiva destes genes no biofilme de *X. fastidiosa* sugere que a regulação possa estar associada a esta condição de crescimento.

#### **4.8. Família Facilitadora de Difusão de Cátions (CDF).**

As proteínas CDF formam uma família de transportadores de metais (Paulsen and Saier, 1997). O principal substrato dessa família é o  $Zn^{2+}$ , no entanto, ela também está envolvida no transporte de  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ . Os transportadores CDF são dirigidos por gradiente de concentração, podendo ser, um gradiente

quimiosmótico  $\Delta\Psi$ ,  $\Delta\text{pH}$  ou por gradiente de potássio (Bloss et al., 2002; Guffanti et al., 2002).

Até o momento, todas as proteínas descritas dessa família em bactérias estão envolvidas na resistência a  $\text{Zn}^{2+}$  e outros metais pesados. *R. metallidurans* foi o primeiro organismo a ser descrito apresentando um regulador de expressão do sistema de resistência CzcABC, o qual é responsável pelo efluxo de metais (Nies, 1992). No entanto, CzcD também é capaz de mediar um pequeno grau na resistência a  $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$  na ausência do sistema CzcABC. A presença do CzcD diminui a concentração desses metais no citoplasma (Anton et al., 1999). Na expressão heteróloga em *E. coli*, o gene *czcD* apresentou efluxo para  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ , mas não para  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  (Nies, 2003).

Genes codificando para CDF foram encontrados em muitos organismos seqüenciados, entretanto, poucos têm sido caracterizados. Em *Bacillus subtilis*, o gene *czcD* está em um *operon* junto com o gene que codifica uma desidrogenase Trka (Sturr et al., 1997), e estudos com mutantes mostraram o envolvimento desse gene na resistência a cobalto (Wang et al., 2000).

Em *E. coli*, duas proteínas CDF foram caracterizadas, a Zitb, que é codificada pelo gene *ybgR*, o qual atua no sistema de resistência a zinco (Grass et al., 2001). Essa proteína diminuiu a acumulação de  $\text{Zn}^{2+}$  e é dirigida por gradiente de potássio em adição a força motiva de próton (Lee et al., 2002). O outro gene *yiiP*, é putativo para uma proteína CDF. A expressão dessa proteína foi induzida por zinco, entretanto, a deleção e a super-expressão desse gene não apresentaram efeito (Grass et al., 2001). A função dessa proteína ainda é desconhecida.

Os eucariontes também possuem proteínas CDF. *S. cerevisiae* contém cinco genes que codificam para CDF (Paulsen et al., 1998). ZRC1 foi nomeada como CzcD por muitos anos e está relacionado à resistência a zinco e cádmio (Kamizono et al., 1989). Essa família foi encontrada em muitos outros organismos, inclusive em animais. No entanto, experimentos indicam que essas proteínas também podem estar envolvidas na importação dos substratos para a célula (Nies, 2003).

A primeira proteína CDF descrita em plantas foi a ZAT. A super-expressão desse gene em *Arabidopsis thaliana* apresentou um aumento na resistência a  $\text{Zn}^{2+}$  e uma alta diminuição de  $\text{Zn}^{2+}$  na raiz sob alta exposição a  $\text{Zn}^{2+}$  (van der Zall et al., 1999). A proteína ZAT foi purificada e funcionou como um sistema de “uptake” de

zinco em vários sistemas modelos de bactérias (Bloss and Nies, 2002). Assim como nos animais, uma variedade de proteínas CDF pode ser responsável pela homeostase de zinco (Nies, 2003).

Em *X. fastidiosa* foi encontrado um gene que codifica uma proteína CDF com domínio CzcD similar ao de *E. coli* (Meidanis et al., 2002). Provavelmente, o gene *czcD* de *X. fastidiosa* seja responsável pela homeostase de zinco assim como em outros organismos que foram descritos acima.

#### **4.9. Outros genes envolvidos na resistência a metais.**

Alguns genes têm sido relacionados a resistência a cobre em muitos organismos. Em *E. coli*, o sistema de resistência *cutABCDEF* foi identificado como, possivelmente, envolvido na absorção e efluxo de cobre. Contudo, esses genes não foram diretamente ligados ao metabolismo, transporte ou regulação de cobre (Rouch et al., 1989). Além disso, o *cutR*, um gene regulador desse *operon cut*, foi identificado (Brown et al., 1994). O locus *cutA* consiste em dois *operons*, um contendo o gene *cutA1*, que codifica uma proteína citoplasmática, e o outro consistindo de dois genes, *cutA2* e *cutA3*, codificando proteínas de membrana interna. O gene *cutA2*, que é um alelo do gene *dipZ* (Fong et al., 1995), que codifica uma proteína dissulfeto isomerase necessária para biogênese do citocromo tipo C (Crooke and Cole, 1995). As funções de *cutA1* e *cutA3* ainda não são muito claras (Fong et al., 1995).

O gene *cutE* é um alelo de *Int*, que codifica uma “apolipoproteína N-aciltransferase” (Gupta et al., 1993), e a proteína CutE é composta de 512 resíduos de aminoácidos que possuem a sequência, H-F-Q-M-A-R-M, a qual é homóloga a um domínio putativo que está presente em proteínas que conferem resistência a cobre em *P. syringae* e *E. coli* (Kohara et al., 1987; Rogers et al., 1991; Brow et al., 1994).

Mutantes para os genes *cutC* e *cutF* de *E. coli* foram sensíveis a cobre, e a temperatura sendo condicionalmente dependente de cobre, respectivamente. Ambos os mutantes acumularam cobre (Rouch et al., 1989). Análises da sequência do gene clonado *cutC* sugerem que CutC é uma proteína citoplasmática ligada a cobre. Evidências mostraram que os mutantes *cutC* e *cutF* apresentaram fenótipo de sensibilidade a cobre (Gupta et al., 1995). O gene *cutC* foi postulado como



codificando uma proteína de efluxo que remove o excesso de cobre do citoplasma de *E. coli* (Rouch et al., 1989). O N-terminal do CutC contém a sequência M-1-PRMEKIM-8, similar a motivo putativo ligado a cobre presente na ATPase CopB de *E. hirae*. A similaridade desse gene com o *copB* de *E. hirae*, é um forte indício da sua relação com a resistência a cobre, visto que, esse microrganismo é o mais bem caracterizado no efluxo de cobre. O gene *cutF* (NlpE) contém uma sequência M-124-TPMTRLRGMFYFYM-136 que é similar a um motivo M-X-X-X-X-MX-X-M putativo ligado a cobre presente no N terminal da CopB ATPase de *E. hirae* (Ordematt et al., 1993)

Os genes pertencentes ao sistema *cut*, têm sido relacionados à resistência a cobre em outros organismos. Em um trabalho realizado com *Salmonella typhimurium* três clones diferentes da biblioteca genômica foram identificados contendo fenotipo de sensibilidade a cobre semelhante aos mutantes dos genes *cutF* de *E. coli*. Um desses clones, o pCUTFS2, também diminuiu a tolerância a cobre para os mutantes dos genes *cutA*, *cutC*, e *cutE* de *E. coli*. As seqüências analisadas desses fragmentos revelaram quatro frames (ORF120, ORF627, ORF207, e ORF168) que foram organizados em dois operons. Um operon consistindo em um único gene, *scsA* (ORF120), e os outros operons contendo os genes *scsB* (ORF627), *scsC* (ORF207), e *scsD* (ORF168). A comparação das seqüências de aminoácidos indicou que os produtos desses genes, ScsB, ScsC, e ScsD possuem significativa homologia com proteínas “thiol-disulfide interchange” (CutA2, DipZ, CycZ, e DsbD) de *E. coli* e *Haemophilus influenzae*, com uma proteína de membrana externa (Com1) de *Coxiella burnetii*, e com proteínas “thioredoxin” e “thioredoxin-like”, respectivamente. Os dois operons subclonados nos plasmídeos compatíveis, e análises de complementação indicaram que as quatro proteínas foram requeridas para a diminuição da tolerância de cobre em mutantes de *E. coli* (Gupta et al., 1997).

Em *X. fastidiosa* foram identificados três genes do sistema *cut*, *cutA* e *dsdB* que estão em cluster e possuem similaridade com os genes de *E. coli*. Por este motivo, neste trabalho esses genes foram nomeados como *cutA1* (*cutA*) e *cutA2* (*dsdB*), além de apresentarem o domínio CutA. O terceiro gene identificado foi o *cutC*, este não está em cluster com os outros genes. Os genes *cut* parecem estar distribuídos randomicamente no cromossomo da *E. coli*, e provavelmente, eles funcionam de maneira coordenada (Gupta et al., 1997).

## **Capítulo 1. Curva de Crescimento de *Xylella fastidiosa* no meio definido.**

### **Resumo**

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria de crescimento lento e difícil isolamento, necessitando de meios de cultura ricos em nutrientes. O meio *Periwinkle wilt* (PW) é o mais utilizado para o cultivo de todas as estirpes de *X. fastidiosa*, entretanto é um meio de composição complexa e não definida. Por este motivo, baseado nas informações geradas após o seqüenciamento do genoma completo, alguns meios de cultura de composição definida foram desenvolvidos (XDM1, XDM2, XDM3, XDM4 e XDM5). Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer a curva de crescimento da *X. fastidiosa* no meio de cultura definido XDM2, uma vez que, nesse meio a bactéria apresentou maior quantidade de proteínas totais e densidade óptica em relação aos outros meios XDMs anteriormente desenvolvidos. Contudo, nenhuma curva de crescimento celular, associada à viabilidade das células e o tempo de geração, havia sido desenvolvida com esse meio de cultura. Para a realização da curva de crescimento foi utilizada a estirpe 9a5c. A medida da taxa de crescimento bacteriano foi realizada através de leituras de densidade óptica durante dezesseis dias com intervalos de 48 horas. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através da contagem de UFC (unidade formadora de colônia) por diluição seriada. As duas avaliações apresentaram uma alta correlação ( $R_2= 0,91$ ) verificada através de regressão exponencial. Como resultado foi determinado que a fase estacionária, que representa a maior densidade celular, foi obtida após 10 dias de crescimento. Esses resultados são similares aos da curva de quantidade de proteína e densidade óptica já publicada utilizando o meio XDM2, que atingiu maior crescimento após 12 dias. De posse dos dados de UFC gerados após a realização da curva de crescimento, foi possível calcular o tempo de geração da *X. fastidiosa* no meio XDM2, que foi de aproximadamente 21 horas. Comparando o tempo de geração obtido na curva de crescimento em meio PW (11,37h), foi possível comprovar que a bactéria apresenta um crescimento mais rápido em meio PW do que no meio definido XDM2.

**Palavras-chave:** XDM2, densidade óptica, unidade formadora de colônia.

## **Chapter 1. Growth curve of *Xylella fastidiosa* in the defined medium.**

### **Abstract**

*Xylella fastidiosa* is a bacterium that grows slow and is difficult to isolate, needing nutrient rich culture medium. The *Periwinkle wilt* (PW) medium is the most used for cultivation of all strains of *X. fastidiosa*. However, this is an undefined medium of complex composition. Because of that, based on information generated after the complete genome sequencing of this bacterium, some culture media of defined composition were developed (XDM1, XDM2, XDM3, XDM4 e XDM5). The goal of the present work was to establish the growth curve of *X. fastidiosa* in the defined medium XDM2 since in this medium the bacteria presented higher amounts of total protein and optical density compared to the other XDM media previously developed. Nevertheless, no growth curve associated with viability of the cells and generation time had been done with this culture medium. We used the 9a5c strain for this growth curve experiment. The measurement of the bacterial growth rate was done through optical density analysis for sixteen days with intervals of 48 hours. The evaluation of cellular viability was carried out counting the colony forming units (CFU) in serial dilution. Both evaluations presented a high correlation ( $R_2 = 0.91$ ) verified by exponential regression. In this analysis, it was determined that the stationary phase, which represents the highest cellular density, was obtained after ten days of growth. These results are similar to those obtained for the curve of protein and optical density already published using the XDM2 medium that was approximately twelve days. The UFC data allowed us to estimate the generation time of *X. fastidiosa* in the XDM2 medium to be approximated 21 hours. Comparing with the generation time observed in PW medium (11,37 hours), it was proved that this bacterium grows faster in PW than in the defined medium XDM2.

**Key-words:** XDM2, optical density, colony forming units.

## 1. Introdução

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria de crescimento lento e difícil isolamento, necessitando de meios de cultura ricos em nutrientes (Chagas et al., 1992). Conforme o meio de cultura utilizado, ocorrem variações de crescimento (Hopkins, 1989). O meio complexo *Periwinkle wilt* (PW) (Davis et al., 1981) é o mais utilizado para o isolamento e cultivo de todas as estirpes conhecidas de *X. fastidiosa* (Fry et al., 1990). Além desse meio, outro meio complexo utilizado para cultura da *X. fastidiosa* responsável pela CVC é o *buffered charcoal yeast extract* (BCYE) (Wells et al., 1981). Esses meios de cultura incluem peptona, triptona, extrato de levedura, cloreto de hemina ou pirofosfato férrico como fonte de ferro, aminoácidos, sais inorgânicos, citrato e succinato, amido, soro de albumina bovina ou carvão ativado. No entanto, componentes indefinidos desse meio não proporcionam informações para estudos sobre os requerimentos nutricionais para o crescimento normal da bactéria.

Com o seqüenciamento e anotação do genoma da *X. fastidiosa* estirpe 9a5c (Simpson et al., 2000), foi mostrado que essa bactéria pode ser eficiente na produção de energia usando uma variedade de fontes de carbono. Ela também possui vias metabólicas completas para aminoácidos, vias relacionadas à síntese de muitas purinas, pirimidinas, ácido fólico, tiamina, glutamina e muitas outras. Adicionalmente, o seqüenciamento revelou genes que codificam todas as vias metabólicas essenciais para o crescimento, usando muitos substratos simples como carboidratos, aminoácidos e sais inorgânicos. Portanto, baseado no genoma da *X. fastidiosa*, foi desenvolvido uma série de meios de culturas definidos (XDM1, XDM2, XDM3, XDM3 e XDM5) para a estirpe da CVC (Lemos et al., 2003).

Meios quimicamente definidos são necessários para conhecer compostos essenciais e bases nutricionais para o crescimento bacteriano. As informações nutricionais podem auxiliar na revelação de aspectos do crescimento e como a bactéria interage com a parede do xilema, além de fornecer informações sobre a expressão de genes requeridos para as vias metabólicas e promover informações sobre o processo de crescimento da *X. fastidiosa* na planta.

Dentre os meios XDM, o XDM2 apresentou maior quantidade de proteínas totais e densidade óptica (DO) indicando ser o mais adequado para o crescimento de *X. fastidiosa*. Contudo, nenhuma curva de crescimento celular, associada à

viabilidade das células, assim como, o tempo de geração havia ainda sido desenvolvido para este meio.

## **2. Objetivo**

### **2.1. Geral**

- Estabelecer a curva de crescimento de células viáveis de *X. fastidiosa* no meio de cultura definido e determinar o tempo de geração celular.

### **2.2. Específicos**

- Determinar a curva de crescimento de *X. fastidiosa* no meio XDM2 através da determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) e densidade óptica (DO);
- Calcular o tempo de geração das células crescidas em XDM2 e comparar com as crescidas em PW.

## **3. Material e Métodos**

Para a obtenção da curva de crescimento da bactéria *X. fastidiosa* no meio definido XDM2, foi utilizada a estirpe 9a5c mantida sob cultivo nesse mesmo meio de cultura. Devido ao não crescimento da bactéria em isolamento primário de plantas com CVC no meio XDM2, foi necessária adaptação para esse meio de cultura. Para essa adaptação o crescimento da *X. fastidiosa* foi primeiramente estabelecido em meio PW e então transferido para o meio XDM2.

Para a avaliação da multiplicação bacteriana, primeiramente foi produzido um pré-inóculo líquido, composto de bactéria crescida em 50 mL de meio XDM2 líquido por cinco dias a 28°C e 130rpm. Em cada tubo Falcon contendo 9 mL do meio XDM2, foi adicionado 10% do pré-inóculo. Foram utilizadas três repetições biológicas para cada ponto avaliado. Os frascos contendo as culturas foram

incubados sob agitação a 28°C a 130rpm. Após essa etapa, a cada 48 horas, foi retirada uma alíquota para avaliação da UFC e DO<sub>600 nm</sub>.

Para a realização da curva de crescimento da *X. fastidiosa* avaliada por UFC, foram utilizadas alíquotas de 100 µL retiradas de cada tubo correspondente às horas avaliadas e submetidas a diluições seriadas. Estas foram realizadas adicionando esses 100 µL de cada ponto avaliado em tubos contendo 900 µL de PBS (1:10 ou 10<sup>-1</sup>). Desta diluição foram retiradas 100 µL e transferidos para um novo tubo contendo 900 µL (10<sup>-2</sup>) e assim sucessivamente até a diluição de 10<sup>-9</sup>. Para cada ponto analisado foram utilizadas três repetições. Foram plaqueados 100 µL dessas diluições em placas com meio PW sólido e incubadas em BOD a 28°C para a contagem do número de colônias.

A avaliação do crescimento das células da *X. fastidiosa* também foi realizada através da densidade óptica a 600nm. Para esta análise, as leituras foram realizadas utilizando uma alíquota de 1 mL de cada ponto analisado em intervalos de 48 horas.

A relação entre os valores da DO<sub>600nm</sub> e UFC nos diferentes tempos de avaliação foi descrita por uma equação do tipo exponencial ( $Y=3191421 \times 592^X$ ) onde Y= UFC e X = DO. Para essa análise foi utilizado o Programa ASSISTAT versão 7.3 beta (2006) (<http://assistat.sites.uol.com.br>).

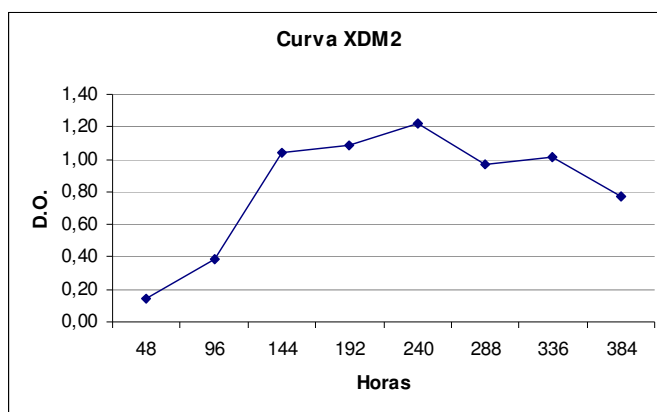
A partir das informações obtidas após a curva de crescimento avaliada pela UFC, calculou-se o tempo de geração (G) da *X. fastidiosa* utilizando a fórmula padrão de crescimento exponencial  $G=T/N$ , sendo que o T é o tempo transcorrido entre o início e o final do experimento e N é o número de gerações calculado pela fórmula  $N=\text{Log}(X/Y)/\text{Log} 2$ , onde Y é o número de UFC obtidas no final do período analisado e X é o número de UFC obtidas no início (Lamanna et al., 1973).

Como controle foi realizada a curva de crescimento da *X. fastidiosa* no meio de cultura PW utilizando as mesmas condições da curva realizada com o meio XDM2.

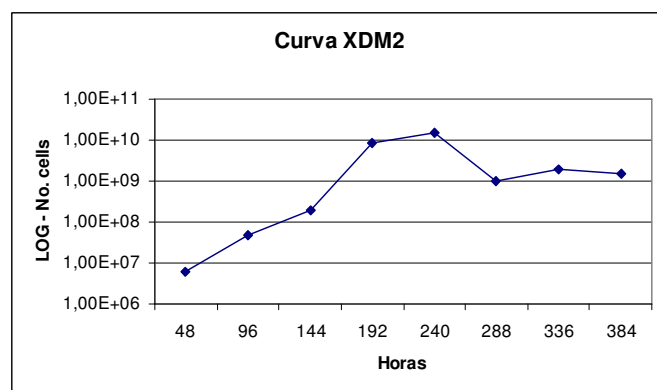
#### **4. Resultados**

O crescimento da *X. fastidiosa* no meio definido XDM2 foi avaliado por densidade óptica durante dezesseis dias. Como resultado, entre 48 a 240 horas, que correspondem ao segundo e décimo dia, respectivamente, foi obtida a fase de crescimento exponencial da bactéria. O início da fase estacionária foi verificado a

partir de 240 horas (10 dias). Este período corresponde à fase de maior densidade celular. (Fig. 1A).



(A)



(B)

**Figura 1.** Curva de crescimento da bactéria *X. fastidiosa* no meio XDM2 medida (A) como  $A_{600\text{ nm}}$  e (B) unidades formadoras de colônias.

O estabelecimento do crescimento da *X. fastidiosa* no meio definido XDM2 avaliado por UFC apresentou resultados similares ao da curva analisada através de DO. Também foi observada a fase exponencial entre 48 e 240 horas. Não foi possível detectar a fase inicial nas duas curvas de crescimento, provavelmente devido à alta quantidade de pré-inóculo adicionada nos tubos. O início da fase estacionária foi igual ao da curva avaliada por DO, correspondendo a 240 horas, e também à fase de maior densidade celular. A partir desse dia, houve uma diminuição do crescimento, porém este se manteve estável, o que é característico da fase estacionária (Fig. 1B).

A partir dos dados gerados após a realização das curvas de crescimento da *X. fastidiosa* no meio XDM2, a relação entre os valores da DO e UFC nos diferentes tempos de avaliação foi descrita por uma equação do tipo exponencial ( $Y=3191421 \times 592^X$ ) onde  $Y= UFC$  e  $X = DO$ . O alto valor do coeficiente de correlação simples obtido ( $R_2 = 0,91$ ) indica que os valores das duas variáveis estão proximamente relacionados e tendem a variar no mesmo sentido.

De posse das informações obtidas após a curva de crescimento avaliada pela UFC, calculou-se o tempo de geração (G) da *X. fastidiosa* no meio de cultura XDM2 utilizando a fórmula padrão de crescimento exponencial  $G=T/N$ . O tempo de geração da *X. fastidiosa* nesse meio de cultura definido foi de 21,30 horas. Entretanto, o tempo de geração no meio PW foi de 11, 37 horas. Esses resultados demonstram que a *X. fastidiosa* cultivada no meio PW se multiplica muito mais rápido do que quando cultivada no meio XDM2.

## 5. Discussão

A *X. fastidiosa* é uma bactéria que apresenta crescimento lento em meio de cultura. Suas células encontram-se embebidas em uma matriz densa composta por exopolissacarídeos (Chagas et al., 1992), o que implica na formação de agregados, dificultando a mensuração da multiplicação celular. Essa característica torna ainda mais difícil estabelecer curvas de crescimento mais precisas. Portanto, são poucos os trabalhos que reproduzem os padrões de crescimento bacteriano e tempo e geração. O crescimento bacteriano é dividido em quatro fases. A primeira é a inicial ou Lag, que corresponde à fase de adaptação ao meio e as células encontram-se latentes. No entanto, é a fase de maior atividade celular, ocorrendo à síntese de DNA, novas proteínas e enzimas, que são um pré-requisito para divisão. A outra fase é a exponencial, nesta fase, as células estão se dividindo a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento. A fase de crescimento exponencial normalmente chega ao final devido à depleção de nutrientes essenciais, diminuição de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos. A terceira fase é a estacionária, onde há rápido decréscimo na taxa de divisão celular. Nessa fase o número total de células em divisão é igual ao número de células mortas, e isto ocorre devido à redução de nutrientes no meio e ao acúmulo de metabólitos tóxicos,



resultando na verdadeira população celular estacionária. E finalmente a fase de morte ou declínio, quando as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, a multiplicação celular é mais lenta e as células mortas aumentam em números elevados.

Neste trabalho, foi possível determinar a fase exponencial da curva de crescimento de *X. fastidiosa*, assim como, determinar o tempo de geração desta bactéria nos meios XDM2 e PW. Na determinação da curva de crescimento da *X. fastidiosa* no meio XDM2 avaliada por densidade óptica e UFC, não foi possível observar a fase inicial ou Lag, possivelmente devido a grande quantidade de inóculo que foi adicionado para estabelecimento da curva de crescimento. A fase exponencial foi obtida entre 48 e 240 horas correspondendo ao segundo e décimo dias, respectivamente. O início da fase estacionária, que corresponde a maior densidade celular, foi obtida com 240 horas (10 dias). Esses resultados foram similares à curva de aumento da quantidade de proteínas e densidade óptica publicada por Lemos et al. (2003), onde após 12 dias foi observada maior quantidade de proteínas e valores de  $DO_{600\text{ nm}}$ . A diferença do tempo de obtenção de maior densidade celular, entre esse trabalho e o de Lemos et al. (2003), provavelmente ocorreu devido a diferenças entre as condições experimentais.

Ainda, não foi possível determinar com precisão a fase de declínio. Observando-se a curva de crescimento por DO, sugere-se que o declínio da população se inicia após 336 horas (14 dias). Contudo, um número maior de avaliações seria necessário para confirmar esta sugestão, uma vez que, o número de células viáveis, determinada por UFC, se manteve aproximadamente constante entre 288 a 384 horas. E é importante salientar que nas avaliações por DO também são medidas células mortas.

Através do número de UFC obtido na curva de crescimento da *X. fastidiosa* cultivada no meio XDM2 a taxa de multiplicação celular foi de 21,30 horas. Em meio PW o tempo estimado foi de 11,37 horas. Esses resultados são semelhantes àqueles obtidos por Caldana (2002) em meio PW de 13,5 horas. Comparando com outra bactéria de crescimento lento, como por exemplo, *Leifsonia xyli* que coloniza o xilema de plantas de cana-de-açúcar, e cujo tempo de geração é de 6,9 horas (Rosa, 2006), considera-se que o tempo de geração da *X. fastidiosa* em ambos meios de cultura é muito alto, o que certamente é associado ao caráter fastidioso desta bactéria.

As células crescidas no meio XDM2 apresentam uma certa turbidez no meio líquido que não é observado no meio PW. Contudo, como verificado na curva de crescimento por UFC e cálculo de tempo de geração, essa maior turbidez não está relacionada a um maior número de células viáveis. Possivelmente essa característica esteja relacionada a uma maior quantidade de EPS produzido por *X. fastidiosa* nesse meio de cultura (demonstrado no capítulo 2).

Comparando-se o crescimento dessa bactéria nos meios PW e XDM2, é observado que, neste último, o tempo de geração foi mais alto. É importante mencionar que para obter crescimento da *X. fastidiosa* em meio XDM2 deve-se primeiramente fazer uma adaptação das células ao meio. Visto que não é possível obter crescimento bacteriano de células recém-isoladas de plantas com sintomas de CVC, sendo necessário a estabilização do crescimento primeiramente em outro meio de cultura.

De posse dessas informações, foi possível inferir que a *X. fastidiosa* apresenta um crescimento mais rápido quando cultivada no meio PW. Provavelmente, essa diferença no crescimento entre os dois meios avaliados se deve ao fato do meio PW ser complexo e possuir mais nutrientes, o que auxilia na obtenção de um crescimento mais rápido. Contudo, o meio definido XDM2, apesar da taxa de multiplicação necessitar de um tempo maior, apresenta um bom crescimento celular e pode ser usado em experimentos utilizando a bactéria *X. fastidiosa* causadora de CVC. Entretanto, outros meios são necessários quando se tem por finalidade o isolamento desta bactéria das plantas hospedeiras.

## Capítulo 2. Avaliação da resistência de *Xylella fastidiosa* a cobre e zinco em condições de crescimento planctônico e em biofilme.

### Resumo

O principal mecanismo de patogenicidade da *Xylella fastidiosa* está associado à formação de biofilme no xilema da planta hospedeira conduzindo ao bloqueio no transporte de água e nutrientes. Uma das características de crescimento bacteriano em biofilme é o aumento da resistência a compostos antimicrobianos, maior que em crescimento planctônico. Apesar da *X. fastidiosa* apresentar crescimento em biofilme, nenhum estudo foi ainda realizado para testar a resistência do biofilme a compostos antimicrobianos. Assim, esse trabalho objetivou avaliar o nível de resistência de *X. fastidiosa* a cobre e zinco em crescimento planctônico comparado ao biofilme. O efeito do cobre foi avaliado nos meios PW e XDM2, e do zinco nos meios BCYE e XDM2. Para condição planctônica, as células foram mantidas nesses três meios de cultura até início da fase estacionária. Foram adicionados os sais em concentrações crescentes até a obtenção da concentração mínima inibitória (MIC). Para crescimento em biofilme foram utilizadas células recém-isoladas de laranja doce com sintomas de CVC. Após quinze dias do biofilme formado na interface líquido-ar, foram adicionados  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$  em concentrações a partir das MICs da condição planctônica. Após 24 h o efeito foi avaliado. Além dessa análise, também foi quantificada a formação de EPS. As MICs demonstram que células na condição de biofilme apresentam de duas a três vezes mais resistência a metais que células planctônicas. O biofilme de *X. fastidiosa* apresentou uma quantidade significativamente maior de EPS ( $P \leq 0,05$ ) em relação às células planctônicas, sugerindo que a proteção física conferida pelo EPS pode ter um importante papel na sobrevivência das células em presença desses metais.

**Palavras-chave:** concentração mínima inibitória, patogenicidade,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ .

## **Chapter 2. Avaliation of resistance of *Xylella fastidiosa* to cooper and zinc conditions of planctonic grownth and in biofilm.**

### **Abstract**

The main pathogenicity mechanism of *Xylella fastidiosa* is associated with formation of a biofilm in the xylem of the host plant leading to the interruption in the transport of water and nutrients. One characteristic of the bacterial growth in biofilm is the increase of the resistance to antimicrobial compounds, higher than in planktonic growth. *X. fastidiosa* presents growth in biofilm, but no study was done so far to test the resistance of its biofilm to antimicrobial compounds. Thus, the objective of this work was to evaluate the level of the resistance of *X. fastidiosa* to cooper and zinc in planktonic growth comparing it with the biofilm. The effects of cooper and zinc were evaluated in PW and XDM2, and BCYE and XDM2, respectively. For the planktonic conditions, the cells were kept in these three culture media until the beginning of the stationary phase. The salts were added in crescent concentrations until twe obtained of the minimum inhibitory concentration (MIC). For the biofilm, cells freshly isolated from sweet orange trees with symptoms of CVC were utilized. Fifteen days after the biofilm had formed in the liquid-air interface, CuSO<sub>4</sub> and ZnSO<sub>4</sub> were added in concentrations starting from the MICs identified for the planktonic conditions. After 24 hours, the effect was evaluated. Furthermore, the formation of EPS was quantified. The analysis of the MICs demonstrated that cells in biofilm condition are two to three times more resistant to metals than planktonic cells. The biofilm of *X. fastidiosa* presented an amount of EPS significantly higher ( $P \leq 0,05$ ) than planktonic cells, suggesting that the physical protection conferred by the EPS may play an important role in the survival of the cells in the presence of these metals.

**Key-words:** minimum inhibitory concentration, pathogenicity, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.

## 1. Introdução

*Xylella fastidiosa* é a bactéria responsável pela clorose variegada do citros (CVC), doença que afeta todas as variedades de laranja doce, causando grandes problemas de ordem fitossanitária para citricultura brasileira. As estimativas dos danos econômicos causados pela CVC são de 286 – 322 milhões de dólares (Fernandes-Jr, 2003), na forma de replantio, poda de plantas infectadas e controle químico do vetor. Os sintomas da CVC estão também associados ao bloqueio dos vasos condutores das plantas, causado pela colonização e multiplicação bacteriana, conduzindo ao aumento de estresse hídrico e deficiência de nutrientes (Machado et al., 1994; McElrone et al., 2001; Machado et al., 2001; Medina, 2002).

Um dos aspectos interessantes para serem pesquisados no genoma funcional dessa bactéria relaciona-se com o mecanismo de patogenicidade que difere de outras bactérias por não apresentar genes de avirulência (*avr*) (Baker et al., 1997). Devido à ausência desses genes no genoma da *X. fastidiosa*, existe uma hipótese de que a formação do biofilme, conhecido como a habilidade das bactérias em aderir a superfícies e estabelecer uma comunidade microbiana (De Kievit and Iglewski, 1999), é essencial para a bactéria colonizar o xilema da planta ou cibário do inseto vetor, sendo considerado um dos principais mecanismos de patogenicidade desse microrganismo (Souza et al., 2003; Osiro et al., 2004). As células em biofilme apresentam maior vantagem adaptativa em relação às células planctônicas. Tem sido demonstrado, por exemplo, que células em biofilme podem ser 500 vezes mais resistentes a compostos antimicrobianos que células em crescimento planctônico (Costerton et al., 1995).

A principal estratégia de controle de bacterioses em vários patossistemas é a aplicação de compostos antimicrobianos, como antibióticos e compostos cúpricos. Sabe-se que bactérias que formam biofilme apresentam resistência crescente a compostos antimicrobianos à medida que o biofilme se desenvolve. Entretanto, os estudos de respostas a estes compostos em bactérias que formam biofilme como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Brooun et al., 2000; Teitzel and Parsek, 2003; Fux et al., 2004) demonstram que as doses necessárias para controle são geralmente muito maiores do que as utilizadas quando as células crescem de forma planctônica. Apesar da *X. fastidiosa* também crescer em biofilme, e este estar

envolvido em sua patogenicidade, nenhum estudo visando verificar o nível de resistência a compostos antimicrobianos nestas condições de crescimento foi até agora realizado. Desse modo, esse trabalho teve como objetivo avaliar o nível de resistência a cobre e zinco de *X. fastidiosa* crescendo em biofilme e de forma planctônica.

## **2. Objetivo**

### **2.1. Geral**

- Avaliar o nível de resistência de *X. fastidiosa* a cobre e zinco, quando nas condições de crescimento em biofilme e planctônica;

### **2.2. Específicos**

- Determinar concentração mínima inibitória (MICs) de cobre e zinco no crescimento de *X. fastidiosa* nas condições de biofilme e planctônica;

- Determinar a quantidade de EPS produzido pelas células de *X. fastidiosa* em ambas as condições.

## **3. Material e Métodos**

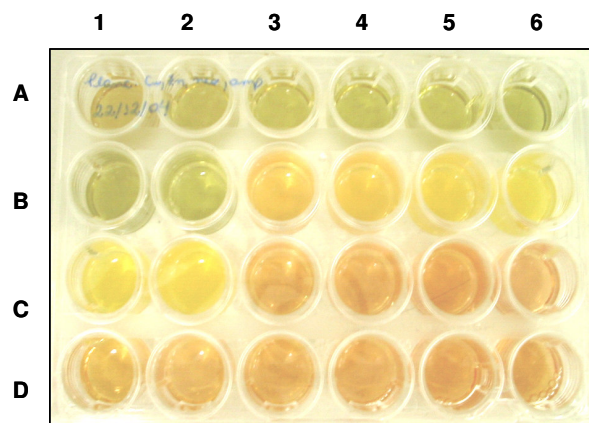
### **3.1. Estirpe bacteriana e condições de cultivo.**

Para a realização deste estudo foi utilizada a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* reisolada de plantas de laranja 'Pêra' com sintomas de CVC e mantidas em condições de casa de vegetação. Para o isolamento da bactéria, o pecíolo e a nervura central de cada amostra foliar foram destacados, desinfestados (2 min em hipoclorito de sódio 2%, 2 min em álcool 70%, água esterilizada), maceradas em PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e NaCL) e plaqueadas em meio PW (Davis et al.,1981). Após 10 a 15 dias em BOD a 28°C as primeiras colônias foram inoculadas em meio PW-líquido. Para obtenção das células em crescimento planctônico, as colônias bacterianas foram repicadas semanalmente em meio PW sólido por

aproximadamente 46 vezes. Em repicagem sucessiva a bactéria reduz sua capacidade de adesão a superfícies. Essas células foram inoculadas em Erlenmeyer com 50 mL de PW-líquido e mantidas sob agitação 130rpm a 28°C para formar o pré-inóculo. As células em biofilme foram obtidas a partir de várias colônias resultantes do isolamento bacteriano e inoculadas em meio PW-líquido. As bactérias foram mantidas nas mesmas condições das células planctônicas, no entanto, somente até a oitava repicagem.

### **3.2. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) das células planctônicas.**

Para a determinação da MIC na condição planctônica, foram adicionados 10% do pré-inóculo, formado de células bacterianas não aderidas, em Erlenmeyer com 50 mL de meio PW-líquido, meio definido XDM2 e meio indefinido BCYE. Os inóculos foram mantidos sob agitação a 130rpm a 28°C. Após 10 dias de crescimento (maior densidade celular medida por  $A_{600}$  e UFC), foi aliqotado 1 mL dessas culturas em placas “Nunclon delta SI Multidish 24 wells” (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). O tratamento com cobre foi conduzido nos meios PW e XDM2 enquanto que com o zinco, nos meios BCYE e XDM2 (Fig. 1). A concentração inicial utilizada de  $\text{CuSO}_4$  foi de 0,15mM para o meio PW e 1mM para o meio XDM2. A de  $\text{ZnSO}_4$  foi de 1mM para ambos os meios, sendo aumentada gradativamente até obtenção da MIC (Tab. 1). Após vinte e quatro horas, 100  $\mu\text{L}$  das culturas tratadas foram plaqueados em meio PW. Isso foi feito para a avaliação da redução do crescimento bacteriano comparado ao controle (inóculo sem o composto antimicrobiano). Para cada concentração avaliada foram utilizadas três repetições biológicas e três placas por repetição. A MIC para a condição planctônica foi definida quando no máximo uma colônia estivesse presente nas três placas inoculadas com a cultura não diluída (Brooun et al., 2000).



**Figura 1.** Ensaio de resistência de *X. fastidiosa* a cobre em crescimento planctônico.

**Tabela 1.** Determinação da MIC na condição de crescimento planctônica da *X. fastidiosa*. Diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$  nos diferentes meios de cultura utilizados nos experimentos.

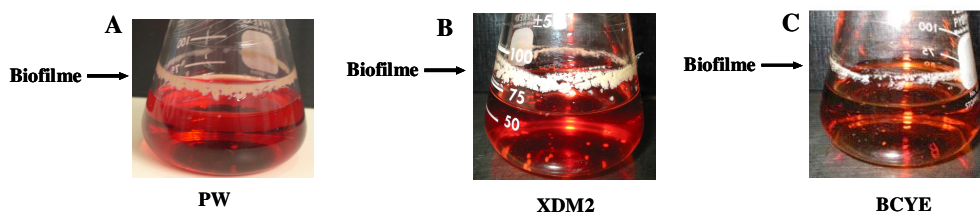
Planctônico			
PW	BCYE	XDM2	
$\text{CuSO}_4$ (mM)	$\text{ZnSO}_4$ (mM)	$\text{CuSO}_4$ (mM)	$\text{ZnSO}_4$ (mM)
0,15	1,0	1,0	1,0
0,20	2,0	2,0	2,0
0,25	3,0	3,0	3,0
0,30	4,0	4,0	4,0
0,35	5,0	5,0	5,0
0,45	6,0	6,0	6,0
0,50	8,0	8,0	8,0
0,60	10,0	10,0	10,0
0,70	-	15,0	15,0
0,80	-	20,0	20,0
1,0	-	30,0	30,0
3,0	-	-	-
3,5	-	-	-
4,0	-	-	-
5,0	-	-	-



### 3.3. Determinação da MIC para as células em biofilme.

Para determinar qual a fase de formação do biofilme seria mais resistente a compostos antimicrobianos, foi feita uma avaliação preliminar com diferentes concentrações de cobre e zinco. Para tal, foram utilizados biofilmes com 10, 15, 20 e 25 dias após inoculação (estádios de maior densidade celular) para os meios PW e XDM2 tratados com cobre, e BCYE e XDM2 tratados com zinco. Foi obtido crescimento celular semelhante sempre entre 15 e 20 dias, sendo que desta forma os experimentos foram conduzidos após 15 dias de formação do biofilme.

Para o crescimento em biofilme foram utilizadas células recém-isoladas de plantas sintomáticas e que formaram biofilme na interface líquido-ar do meio de cultura. Para o pré-inóculo as células foram inoculadas em Erlenmeyers com 50 mL de meio PW. Após cinco dias de crescimento, o biofilme aderido na interface líquido-ar foi homogeneizado ao meio de cultura do próprio recipiente e as células foram distribuídas (10%) em outros Erlenmeyers com 50 mL de meio PW, para as avaliações do efeito do  $\text{CuSO}_4$ , no meio BCYE para os experimentos utilizando  $\text{ZnSO}_4$  e XDM2 para avaliação de ambos os metais, e deixados crescer sob agitação a 130rpm a 28°C. Após 15 dias de crescimento, foram adicionados os sais de cobre e zinco (Fig. 2A, B e C). Concentrações iguais e crescentes acima da concentração que determinou a MIC para condição planctônica foram utilizadas para iniciar os experimentos na condição de biofilme (Tab. 2). Após vinte e quatro horas foi avaliado o efeito bactericida, conforme descrito acima, para o experimento planctônico. O controle da viabilidade celular (inóculo sem o composto antimicrobiano) também foi incluído em todas as avaliações.



**Figura 2.** Ensaio para a avaliação da resistência do biofilme de *X. fastidiosa* a compostos antimicrobianos. Biofilme da *X. fastidiosa* com 15 dias de crescimento. Meios: A - PW, B - XDM2, C - BCYE.

**Tabela 2.** Determinação da MIC na condição de crescimento em biofilme de *X. fastidiosa*.

<b>Biofilme</b>			
<b>PW</b>	<b>BCYE</b>	<b>XDM2</b>	
<b>CuSO<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>CuSO<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> (mM)</b>
3,5	5,0	5,0	5,0
4,0	6,0	6,0	6,0
5,0	8,0	7,0	8,0
6,0	10,0	10,0	10,0
7,0	15,0	-	15,0
8,0	20,0	-	20,0
9,0	25,0	-	25,0
10,0	30,0	-	30,0
15,0	40,0	-	-
20,0	-	-	-
25,0	-	-	-
30,0	-	-	-

### 3.4. Determinação de exopolissacarídeos (EPS).

Para a análise da quantidade de EPS foi seguido o protocolo descrito por Dubois et al. (1956), onde inicialmente foi realizada uma curva padrão com glicose (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 50, 70, 100 e 150 mg/L). As células em biofilme e com crescimento planctônico foram crescidas até 15 e 10 dias, respectivamente, em 50 mL de meio PW, BCYE e XDM2. Todos os biofilmes e células planctônicas foram coletados nos mesmos dias. As culturas foram centrifugadas por 10 min a 5900xg. Após esta etapa, a massa celular de todas as amostras foi padronizada para 0,025 g e então ressuspensas em 1 mL de PBS. Para determinar o EPS nas duas condições de crescimento para o meio PW, o restante das células planctônicas e em biofilme foi padronizado para 0,1g. Para quantificar o EPS foram adicionados 200 µL de fenol 5% em 200 µL da suspensão bacteriana de cada amostra, em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 95-97%. O mesmo procedimento foi realizado com tampão PBS, utilizado como branco nas análises. A absorbância das amostras foi medida a 490<sub>nm</sub>. O experimento foi realizado com três repetições biológicas e seis repetições internas para cada amostra avaliada. Foram realizados testes estatísticos no programa ASSISTAT utilizando o teste *t* com 5% de probabilidade (Silva and Azevedo, 2006).

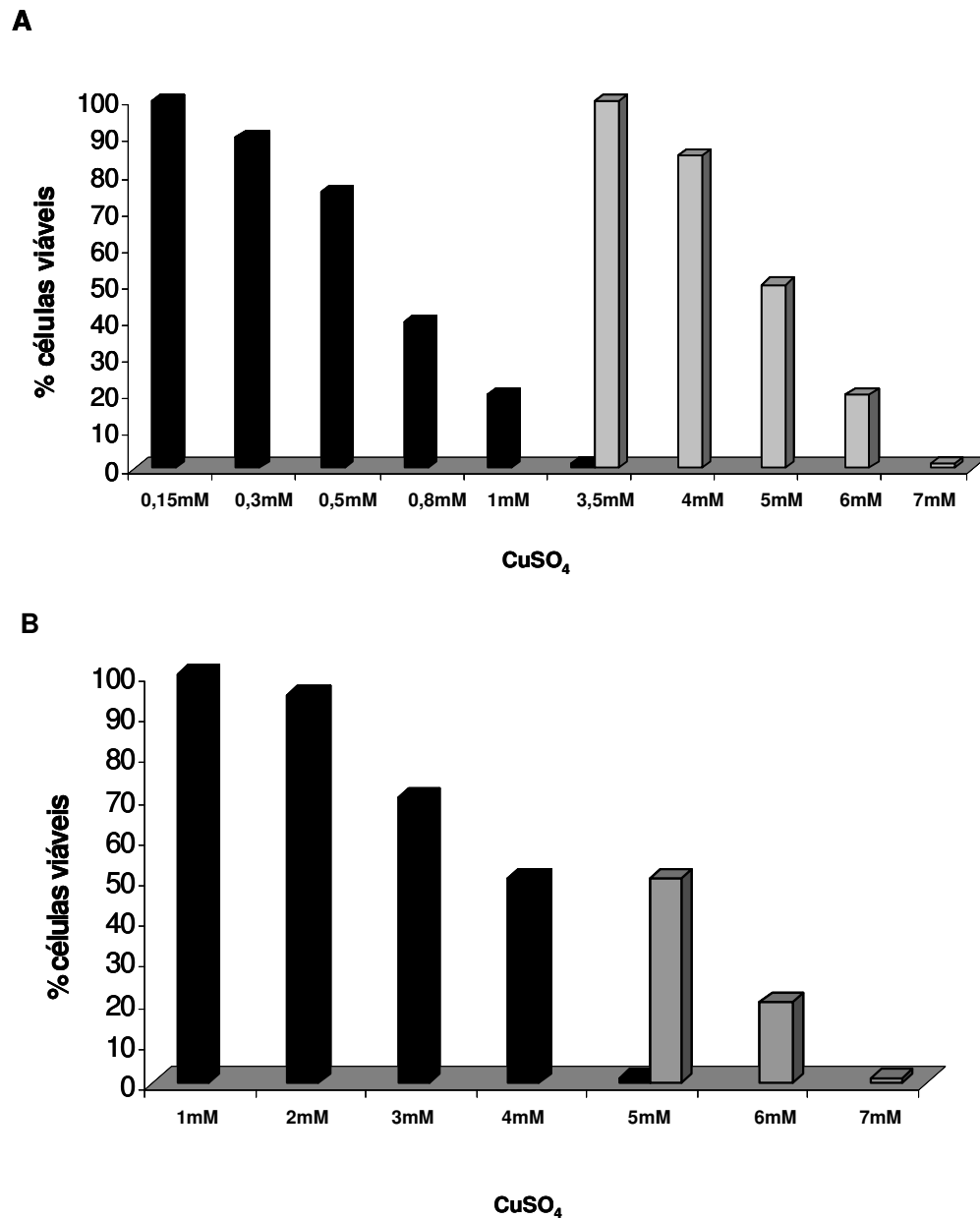
## 4. Resultados

### 4.1. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de CuSO<sub>4</sub> das células planctônicas e em biofilme.

As células planctônicas cultivadas no meio PW (pPW) foram tratadas com concentrações a partir de 0,15 a 5mM de CuSO<sub>4</sub>. A inibição inicial do crescimento, comparada ao controle (células sem CuSO<sub>4</sub>), foi observada somente com concentrações a partir de 0,30 mM. Essa inibição foi gradativa até a concentração de 3,5 mM, considerada a MIC (Fig. 3A). Adicionalmente, os biofilmes da *X. fastidiosa* formados no meio PW (bPW) apresentaram alta resistência ao cobre comparada às pPW. A concentração que determinou a MIC das células na condição planctônica (3,5mM), não apresentou nenhuma inibição no crescimento nos bPW. Para essas células a inibição do crescimento iniciou-se na concentração de 4 mM. A completa

erradicação dos bPW foi observada na concentração de 7mM de  $\text{CuSO}_4$  (MIC), o dobro da concentração que determinou a MIC das pPW (Fig. 3A).

As células planctônicas de *X. fastidiosa* cultivadas no meio XDM2 (pXDM2) apresentaram inibição do crescimento a partir da concentração de 2mM de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 3B). Contudo, a completa erradicação celular das pXDM2 foi obtida com 5mM de  $\text{CuSO}_4$ . Para os biofilmes formados no meio XDM2 (bXDM2) foi observada uma redução de aproximadamente 50% na população bacteriana na concentração de 5mM de  $\text{CuSO}_4$ , a MIC para as células planctônicas. No entanto, a completa erradicação das células em biofilme foi obtida na concentração de 7mM de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 3B). Similar as bPW, foram necessárias maiores concentrações de  $\text{CuSO}_4$  para completa inibição do crescimento das células em biofilme cultivadas em XDM2 comparado ao crescimento planctônico.



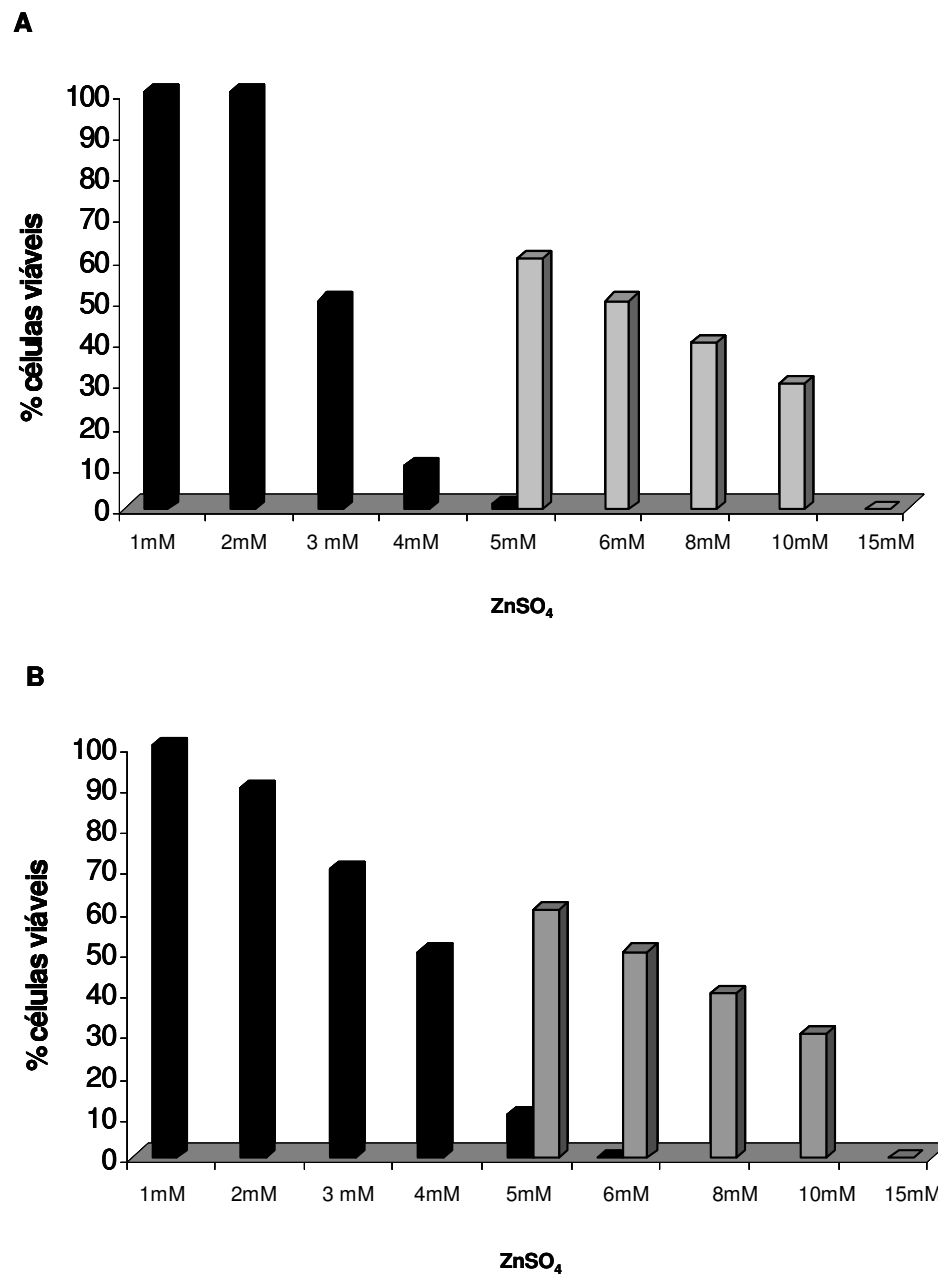
**Figura 3.** Porcentagem das células viáveis da *X. fastidiosa* em relação a diferentes concentrações de sulfato de cobre nas condições de crescimento planctônico e em biofilme da bactéria. A: porcentagem de células viáveis na condição planctônica (preto) e em biofilme (cinza) no meio PW com diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub>. B: porcentagem de células viáveis na condição planctônica (preto) e em biofilme (cinza) no meio XDM2 com diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub>.

#### **4.2. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de ZnSO<sub>4</sub> das células planctônicas e em biofilme.**

As células em crescimento planctônico no meio BCYE (pBCYE) e tratadas com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>, apresentaram uma inibição inicial do crescimento a partir de 3mM, que foi de 50% em relação ao controle (células sem ZnSO<sub>4</sub>). No entanto, a completa erradicação das células ocorreu com 5mM de ZnSO<sub>4</sub> (MIC) (Fig. 4A). Para as pXDM2, o início da inibição do crescimento foi similar ao observado nas pBCYE, entretanto, na concentração de 4mM o nível de inibição foi menor nas pXDM2 em relação as pBCYE. A concentração que determinou a MIC para as pXDM2 (6mM) foi um pouco maior do que a necessária para erradicar as células pBCYE (5mM) (Fig. 4B).

Em relação às células em biofilme foi observada alta resistência ao ZnSO<sub>4</sub> comparada às células planctônicas, em ambos meios de cultura (Fig. 4A e B). Para os biofilmes formados no meio BCYE (bBCYE), a concentração que determinou a MIC para condição planctônica (5mM) apresentou uma inibição de 60% no crescimento das células do biofilme (Fig. 4A). Essa inibição foi gradativa até 15mM de ZnSO<sub>4</sub>, concentração que determinou a completa erradicação celular. Essa concentração foi três vezes a concentração necessária para determinar a MIC para as pBCYE (Fig. 4A). Resultados similares foram observados para os pXDM2, tanto para o início da inibição, quanto para a concentração que determinou a MIC (15mM), que foi igual ao bBCYE (Fig. 4A e B).

Esses resultados demonstraram que as células em biofilme são menos suscetíveis ao ZnSO<sub>4</sub> do que as células planctônicas em ambos os meios de cultura, entretanto, os níveis de resistência foram diferentes dependendo do meio de cultura.



**Figura 4.** Porcentagem das células viáveis da *X. fastidiosa* em relação a diferentes concentrações de sulfato de zinco nas condições de crescimento planctônico e em biofilme da bactéria. A: porcentagem de células viáveis na condição planctônica (preto) e em biofilme (cinza) no meio BCYE com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>. B: porcentagem de células viáveis na condição planctônica e em biofilme no meio XDM2 com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub>.

### 4.3. Teor de EPS nas células planctônicas e em biofilme.

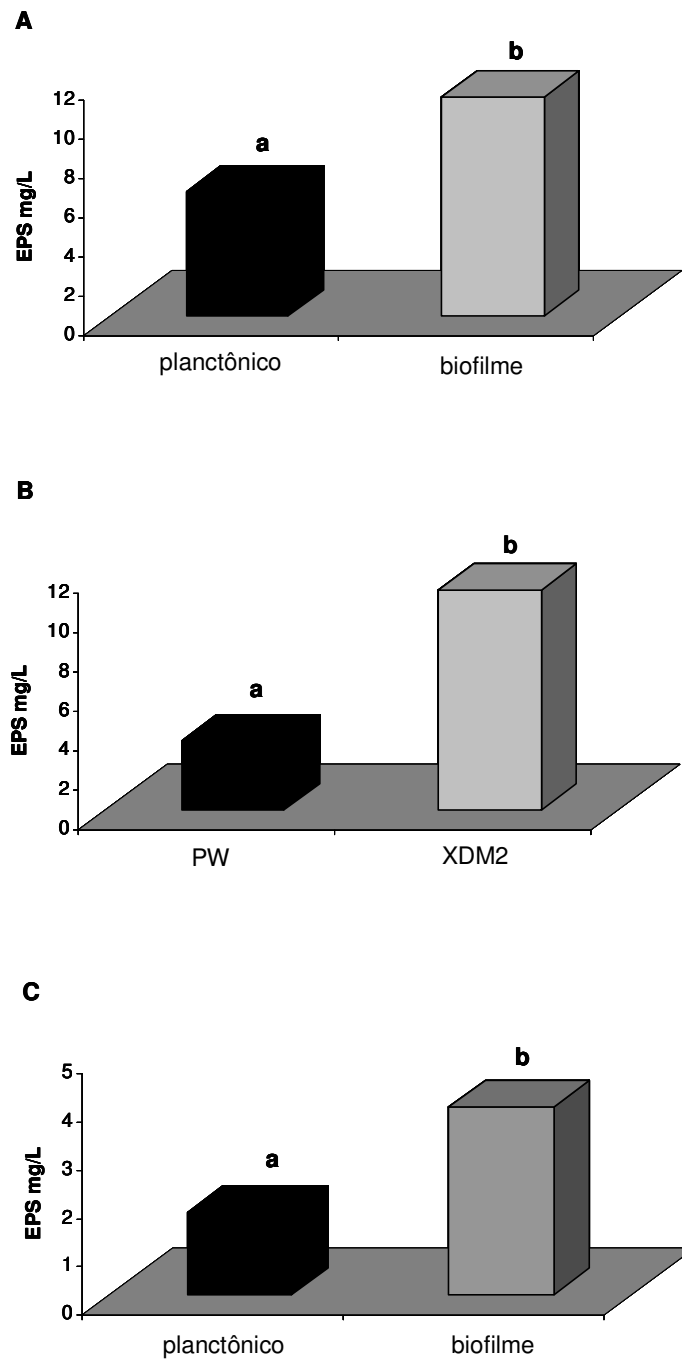
Células bacterianas com crescimento planctônico, independente do meio de cultura utilizado, apresentaram valor de densidade óptica menor que as células em biofilme (Tabela 3). Entretanto, não foi possível quantificar o EPS nas pPW e pBCYE, e nos bBCYE devido à baixa massa celular utilizada nas análises (Tabela 3). A quantidade de EPS produzido no bXDM2 foi significativamente maior que na condição planctônica (Fig. 5A). Também foi observada uma diferença na quantidade de EPS entre as células em biofilme do PW e XDM2, sendo que no bXDM2 a quantidade foi significativamente maior (Fig. 5B).

Demonstra-se que, assim como no meio XDM2, as células em biofilme no meio PW apresentaram significativamente mais EPS que as células planctônicas (Fig.5C).

**Tabela 3.** Teor de EPS das células planctônicas e em biofilme nos diferentes meios de cultura.

Meio	PW		BCYE		XDM2	
	Planctônico	Biofilme	Planctônico	Biofilme	Planctônico	Biofilme
A <sub>490</sub>	0,028	0,129	0,000	0,017	0,184	0,278
mg/L	ND	3,48	ND	ND	6,34	11,2





**Figura 5.** Teor de EPS das células de *X. fastidiosa* em diferentes meios de cultura e nas duas condições de crescimento. Letras distintas indicam diferença significativa a nível de 5% de probabilidade (teste *t*). A: crescimento planctônico e em biofilme no meio XDM2. B: crescimento em biofilme nos meios de cultura PW e XDM2. C: crescimento em biofilme e planctônico no meio de cultura PW.

## 5. Discussão

Desde que biofilmes foram associados a importantes doenças em humanos, esforços significativos têm sido direcionados para o entendimento dos mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos de células nessa condição de crescimento (Brooun et al., 2000; Mah and O'Toole, 2001, Yang et al., 2006). O mecanismo de patogenicidade da *X. fastidiosa* também está associado à formação de biofilme. No entanto, nenhum estudo foi ainda realizado nesse sentido. Devido ao cobre ser um composto antimicrobiano comumente utilizado no campo contra bactérias fitopatogênicas, nesse estudo foi verificada a resistência da *X. fastidiosa* a cobre e também a zinco, tanto em crescimento planctônico quanto em biofilme.

O outro interesse do presente trabalho, foi investigar se a composição do meio de cultura poderia afetar o nível de resistência das células de *X. fastidiosa*. Para tanto foram avaliados os meios PW (composição indefinida) e XDM2 (definido). Para zinco não foi possível utilizar o meio PW devido a problemas de precipitação do zinco como fosfatos. Para tanto foi utilizado o meio BCYE modificado (sem adição do carvão ativado).

Foi verificado que as células planctônicas em todos os meios de cultura foram mais suscetíveis ao cobre e ao zinco do que aquelas crescidas como biofilme. Entretanto, as pXDM2 foram menos suscetíveis ao cobre em relação àquelas com crescimento em meio PW. Este último é um meio de cultura complexo que possui diferentes componentes indefinidos e tem sido utilizado para cultura de todas as estirpes de *X. fastidiosa* (Fry et al., 1990). XDM2 é um meio de cultura definido que foi elaborado baseado na anotação do genoma *X. fastidiosa*, é composto por glicose, vitaminas e aminoácidos, compostos normalmente presentes na seiva do xilema (Lemos et al., 2003). Resultados similares foram observados para as células tratadas com zinco, sendo as de crescimento planctônico mais suscetíveis a esse metal do que as células em biofilme. Além disso, os níveis de resistência apresentados pelas células planctônicas cultivadas nos meios BCYE (complexo) e XDM2 também foram diferentes. As pXDM2 apresentaram maior resistência ao zinco do que as pBCYE.

É possível que a menor susceptibilidade aos metais das células planctônicas cultivadas em XDM2 comparada aos meios PW e BCYE esteja relacionada à maior

produção de EPS quando as células são cultivadas em XDM2. Sabe-se que a matriz EPS pode adsorver cátions de metais, reduzindo sua atividade biológica (Harrison et al., 2006).

Os resultados demonstram que, assim como bactérias patogênicas de humanos, *X. fastidiosa* em biofilme apresenta maior resistência a compostos antimicrobianos do que em crescimento planctônico. Foi observado que em biofilme, independente do meio de cultura utilizado, ocorre de duas a três vezes maior resistência a cobre e zinco. Bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* podem apresentar de duas a seiscentas vezes maior resistência a cobre quando em crescimento em biofilme (Teizel and Parsek, 2003). Uma das possibilidades para explicar o aumento da resistência do biofilme estaria relacionada à sua arquitetura, que no estágio maduro, apresenta as células fisicamente mais protegidas contra a ação de substâncias nocivas. Essa barreira física é formada por uma matriz extracelular de exopolissacarídeo (EPS) composta por polissacarídeos e proteínas que são produzidas pelas células em biofilme (Whitfield, 1988; Platt, et al., 1985; Flemming and Wingende, 2001, Whitchurch, et al., 2002;).

Nesse estudo, a quantidade de EPS no biofilme foi significativamente maior em relação às células planctônicas, sugerindo que o EPS produzido pela *X. fastidiosa* é responsável, em parte, pela maior resistência a metais na condição de biofilme. Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos que demonstraram que o EPS é capaz de complexar ou seqüestrar cátions de metais bivalentes. Uma evidência disto, é que polissacarídeos isolados de EPS foram reportados ligados a metais, em particular ao cobre (Chistensen et al., 1985; Mittelman and Geesey, 1985; Kazy et al., 2002), o que pode ser demonstrado inclusive por microscopia eletrônica de *P. aeruginosa* (Langley and Beveridge, 1999). As interações entre o biofilme e metais pesados resultam da adsorção destes no biofilme. Entretanto, os níveis dessa adsorção dentro dos biofilmes diminuíram com o aumento da concentração dos metais pesados (Jang et al., 2001). Muitos estudos mostraram que a adsorção é resultado de interações dos metais pesados com proteínas, lipídeos, lipoproteínas, que formam a matriz do biofilme.

Curiosamente, apesar da quantidade de EPS produzida pelas células em biofilme da *X. fastidiosa* no meio definido XDM2 ser maior em relação às células cultivadas em PW e BCYE, não houve diferença na resistência ao sulfato de cobre e

zinco entre os biofilmes nos diferentes meios de cultura. Isto sugere que não só a proteção física confere resistência às células, mas que outros mecanismos podem estar envolvidos.

A sinalização celular, denominada de “quorum sensing”, é um outro mecanismo que pode explicar uma possível ativação de mecanismos de resistência. Essa sinalização celular permite que as bactérias regulem a expressão de genes específicos como os associados a fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, respostas de defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e transferência de plasmídeos por conjugação (De Kievit and Iglewski, 1999; Davey and O’Toole, 2000; Molin and Tolker-Nielsen, 2003). Estas características permitem que as células em biofilme apresentem grande vantagem adaptativa e competitiva no hospedeiro (Davey and O’Toole, 2000).

Tanto as células planctônicas quanto as células em biofilme apresentaram um aumento na resistência na fase estacionária da curva de crescimento. O máximo da resistência em ambas as culturas ocorreu também nessa fase, onde as células em biofilme foram quinze vezes mais resistente que as células planctônicas. Esses resultados sugerem que a alta densidade celular deve ser um importante fator na resistência das células bacterianas (Desai et al., 1998). Nesse estudo foram utilizados biofilmes formados até 15 dias. Em um trabalho realizado por Souza et al (2004) o biofilme de *X. fastidiosa* encontrou-se possivelmente na fase correspondente ao início da maturidade aos 15 dias, sendo o biofilme maduro observado aos 20 dias. Contudo, no presente trabalho testes utilizando doses de sulfato de cobre e zinco em biofilmes formados com 10, 15 e 20 dias após inóculo, não foi observado diferença na resistência a esses metais entre 15 e 20 dias, entretanto, menor resistência foi observada aos 10 dias (dados não apresentados).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que as células de *X. fastidiosa* em biofilme apresentam menor susceptibilidade a cobre e zinco conferido possivelmente pela agregação do biofilme, onde a comunidade bacteriana apresenta maior quantidade de EPS dificultando a difusão desses metais. Esses fatores proporcionam uma importante estratégia de sobrevivência celular da bactéria em crescimento como biofilme. Outros estudos sugerem que diferentes mecanismos contribuem para a resistência bacteriana a diversos compostos antimicrobianos. Por exemplo, a baixa

taxa de crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* parece estar relacionada à resistência a tetraciclina, entretanto, não afeta a resistência a tobramicina, indicando que o crescimento lento possivelmente se relaciona à resistência, sugerindo que as células podem estar latentes nessa condição enquanto expulsam o excesso das substâncias nocivas (Brooun et al., 2000).

É importante entender o nível de resistência das bactérias, uma vez que, a principal estratégia tem sido a aplicação de compostos antimicrobianos como os cúpricos, bastante utilizados na agricultura como agentes bactericidas. Estudos como o que foi realizado com a *X. fastidiosa*, demonstram que as doses necessárias para um eventual controle da bactéria deverão ser significativamente maiores quando as células crescem em biofilme, o que dificultaria as estratégias de controle. Nesse sentido, qualquer estratégia de controle com cobre ou zinco deve considerar o crescimento da bactéria antes que o biofilme esteja estruturado.

### **Capítulo 3. Análise da expressão gênica de *Xylella fastidiosa* na condição de biofilme em diferentes concentrações de cobre e zinco.**

#### **Resumo**

A *Xylella fastidiosa* é um fitopatógeno que causa doenças em diferentes espécies de plantas. No Brasil é responsável pela clorose variegada do citros (CVC) que afeta toda a produção de laranja doce resultando em significativas perdas. Os sintomas da CVC estão associados à obstrução dos vasos do xilema causado pela formação do biofilme bacteriano. Recentemente foi demonstrado que há um aumento na expressão de alguns genes no biofilme de *X. fastidiosa* comparada às células planctônicas. Alguns desses genes codificam proteínas associadas com bombas de efluxo de cátions e multidrogas, que estão relacionadas aos mecanismos de resistência. Como verificado no capítulo 2, as células em biofilme apresentam menor sensibilidade a compostos antimicrobianos em relação às células planctônicas. Contudo, além da proteção física conferida pelo EPS, fatores genéticos também poderiam estar associados a essa resistência. Nesse estudo, foi avaliada, através do qPCR e em dois meios distintos, a expressão de genes associados a diferentes mecanismos de resistência a cobre e zinco no biofilme de *X. fastidiosa*. Os seguintes genes tiveram suas expressões avaliadas por qPCR: *acrA*, *acrB*, *mexE*, *czcA*, *czcD*, *metI*, *copB*, *cutA*, *cutB* e *cutC*.

Após análise da expressão gênica, foi verificado que a maioria dos genes demonstrou uma indução significativa na presença de cobre e zinco. Os maiores níveis de indução foram observados nos meios complexos, tanto para cobre (PW) quanto para zinco (BCYE). Em XDM2 houve redução na expressão comparada com aos meios complexos. Os genes avaliados provavelmente estão envolvidos na resistência do biofilme de *X. fastidiosa* através da secreção ativa de metais para fora das células utilizando bombas de efluxo, além da provável ação dos genes *cuts* na homeostase de cobre. Também foi possível verificar que a expressão gênica é influenciada pelo meio. Contudo, é possível inferir que a ação conjunta de genes associados a diferentes mecanismos de resistência no biofilme de *X. fastidiosa* pode ter um importante papel na sobrevivência das células em presença desses metais.

Esses mecanismos são importantes para a bactéria que vive em constantes condições de estresse no hospedeiro.

**Palavras-chave:** qPCR, mecanismos de resistência, bombas de efluxo de multidrogas.

### **Chapter 3. Gene expression analysis of *Xylella fastidiosa* in biofilm condition in different concentrations of cooper and zinc.**

#### **Abstract**

*Xylella fastidiosa* is a phytopathogen that causes disease in different plant species. In Brazil it is responsible for the Citrus Variegated Chlorosis (CVC) that affects all the varieties of sweet orange, resulting in significant losses. The symptoms of CVC are related to the obstruction of the xylem vessels caused by the formation of a bacterial biofilm. It was recently demonstrated that there is an increase in the expression of some genes in the biofilm of *X. fastidiosa* compared to the planktonic cells. Some of these genes encode proteins associated to cation and multidrug efflux pumps related to resistance mechanisms. As it was verified in Chapter 2, biofilm cells presented a lower sensitivity to antimicrobial compounds compared to planktonic cells. Besides the physical protection conferred by the EPS, genetics factors could also be associated to this resistance. In this study, the expression of genes associated to different mechanisms of resistance to cooper and zinc in the biofilm of *X. fastidiosa* in two distinct media was evaluated by qPCR. The following genes had their expressions evaluated by qPCR: *acrA*, *acrB*, *mexE*, *czcA*, *czcD*, *metI*, *copB*, *cutA*, *cutB*, and *cutC*.

The gene expression analysis revealed that the majority of the evaluated genes presented a significant induction in the presence of cooper and zinc. The highest inductions were observed in the complex media, both for cooper (PW) and zinc (BCYE). In XDM2 there was a reduction in the expression compared to the complex media. The evaluated genes are probably involved in the resistance of biofilm of *X. fastidiosa* by the active secretion of metals to the outside of the cells using efflux pumps, besides the probable action of *cut* genes in the homeostasis of cooper. It was also possible to verify that the gene expression is influenced by the medium.

Nevertheless, we could also infer that the joint action of genes associated to different resistance mechanisms in the biofilm of *X. fastidiosa* may have an important role in the survival of the cells in presence of these metals. These



mechanisms are important for bacteria that live constantly under stress conditions in the host.

**Key-words:** qPCR, resistance mechanisms, multidrug efflux pumps.

## 1. Introdução

Devido à importância econômica da CVC, a *X. fastidiosa* foi o primeiro patógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado (Simpson et al., 2000). Após o seqüenciamento, houve a necessidade de estudos que auxiliassem no entendimento das funções dos genes identificados.

Foi verificado, através de microarranjos de DNA, que um grande número de genes é induzido em *X. fastidiosa* crescendo em biofilme quando comparado ao crescimento planctônico, sendo muitos deles associados à resistência a compostos antimicrobianos (Souza et al., 2004). O fato dos compostos antimicrobianos não terem sido adicionados sugere que as células em biofilme possam estar expressando constitutivamente genes associados à resistência que poderiam estar relacionados à adaptação. Além disso, genes possivelmente envolvidos no mecanismo de resistência a metais, foram detectados no genoma da *X. fastidiosa*. Contudo ainda não foi verificado se estes são positivamente regulados na presença do composto.

Os genes detectados como possivelmente envolvidos na resistência a cobre e zinco em *X. fastidiosa* pertencem a diferentes famílias, porém quase todas estas famílias estão agrupadas por possuírem atividade de transportadores de efluxo de compostos antimicrobianos. Dentre essas famílias estão a RND (resistance-nodulation-division), que funciona associada a proteínas da família de fatores de membrana externa (out membrane factors-OMF) e MFP (periplasmatic membrane fusion protein) (Zgurskaya et al., 2000), a família de transportadores ABC (ATP-binding cassette) com proteínas relacionadas a um sistema de secreção (Andersen, 2003; Lage, 2003), “P-type ATPase”, que constitui uma superfamília de proteínas de transporte que são dirigidas por hidrólise de ATP (Fagan et al., 1994) e a família CDF (cation diffusion facilitator). Além desses, outros genes pertencentes ao operon *cut*, que provavelmente estão envolvidos na homeostase de cobre em *E. coli*, também foram identificados no genoma da *X. fastidiosa*.

Com os resultados dos estudos biológicos e moleculares da resistência do biofilme da *X. fastidiosa* pretende-se esclarecer possíveis mecanismos de resistência a esses compostos estabelecendo assim possíveis estratégias para o controle da CVC.

## 2. Objetivo

### 2.1. Geral

- Avaliar a expressão de genes possivelmente associados à resistência de cobre e zinco em *X. fastidiosa* em condições de biofilme.

### 2.2. Específicos

- Avaliar por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) a expressão relativa dos genes *metI*, *acrA*, *acrB*, *czcA*, *mexE*, *copB*, *cutA*, *cutB*, *cutC* no biofilme de *X. fastidiosa* submetido a diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$  e em diferentes meios de cultura (definido e indefinido);

- Avaliar por qPCR a expressão relativa dos genes *metI*, *acrA*, *acrB*, *czcA*, *mexE*, *czcD* no biofilme de *X. fastidiosa* submetido a diferentes concentrações de  $\text{ZnSO}_4$  e em diferentes meios de cultura (definido e indefinido).

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA.

Para análise de expressão gênica foram utilizadas células em biofilme tratadas com concentrações subinibitórias e inibitórias de  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$  nos meios PW, BCYE e XDM2, assim como o controle (sem adição dos compostos). Após 24 horas de exposição aos metais, os biofilmes foram coletados por centrifugação a 5900xg por 6 min a 4°C em água tratada com DEPC (Dietil-Pirocarbonato). Após esta etapa, as células bacterianas foram armazenadas a -80°C para posterior extração do RNA total, extraído com RNeasy Mini Kit (Qiagen), tratados com DNase utilizando o sistema de coluna da Qiagen (Rnase-Free Dnase Set).

A concentração e a integridade dos RNAs foram analisadas no “RNA Nano Labchips” através do aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando o RNA Nano Labchips kit. Para síntese de cDNA foi utilizado 1 µg/µl do RNA total e adicionado 3µg de *random primer* (Invitrogen). A mistura foi acondicionado a 65°C

por 15 min. Após esta etapa, foram adicionados os seguintes reagentes: tampão da *SuperScript II* (Invitrogen), 2µL do 0,1M DTT (dithiothreitol), 1µg de *random primers* (Invitrogen), 2µL dNTP 10mM, 1µL do inibidor da RNase (Invitrogen) e 1µL de *SuperScript II reverse transcriptase* (200U/µL Invitrogen). A síntese do cDNA foi conduzida a 42°C por 60 min. Os RNAs foram utilizados como molde para a PCR utilizando os *primers* do controle endógeno (CE) (tabela 1). Tal procedimento foi usado para detectar alguma possível contaminação de DNA nas amostras.

### **3.2. Síntese e validação dos *primers*.**

Os *primers* para amplificação dos genes associados com resistência a cobre e zinco foram desenhados utilizando o programa PrimerExpress (Applied Biosystems). Os *primers* foram desenhados para os genes *acrA* (XF2093), *acrB* (XF2094), *mexE* (XF2084), *czcA* (XF2083), *metI* (XF0874), *copB* (XF0133), *czcD* (XF0866), *cutA1* (XF0619), *cutA2* (XF0620) e *cutC* (XF1341). Como controle endógeno foi utilizado o gene *petC* (XF0910), que codifica para *ubiquinol cytochrome C oxidoreductase* (tabela 1). Os *primers* foram utilizados para PCR usando DNA da *X. fastidiosa* como molde. O amplicon do tamanho correspondente aos fragmentos dos genes avaliados foi verificado por corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Os fragmentos foram purificados de acordo com o protocolo do kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences), e posteriormente seqüenciados. O seqüenciamento foi feito de acordo com as instruções da ABI para o “DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction”, v 3.0 e o seqüenciador utilizado foi o ABI 3730 – Applied Biosystems. A seqüência de nucleotídeos foi utilizada para pesquisa por similaridade no banco de dados de *X. fastidiosa* (<http://aeg.unicamp.xf.br>), utilizando a ferramenta BlastN e BlastX.

**Tabela 1.** Genes avaliados e sequências dos nucleotídeos dos *primers* usados para o qPCR.

Número ORF	Nome do gene	Sequência do Primer	Tamanho do fragmento (em pares de base)
XF2093	<i>acrA</i>	F- 5' TGGCCAACAGCGAGTTACTG 3' R- 5' ACTTCCCTGGTGTGTGCTT 3'	151
XF2094	<i>acrB</i>	F- 5' TGATTCCGGTCGCCTTACTC 3' R- 5' GTCATGATGCGCTCGACATT 3'	151
XF2084	<i>mexE</i>	F- 5' CGCTTGCCCTAACAGCATGT 3' R- 5' AAGCCAAGTTCGCTTTGAAC 3'	151
XF2083	<i>czcA</i>	F- 5' GAATCGGTACGCCAACAGATG 3' R- 5' TGTTGAGCGCAGCAAAGATG 3'	151
XF0874	<i>metI</i>	F- 5' GAGCAACCACCTGGCAACTC 3' R- 5' TAGGCGACGTCACCCAATC 3'	151
XF0133	<i>copB</i>	F- 5' TCAGCGGTTGATCCTGCAA 3' R- 5' GCGCTCCCAACCCACATAC 3'	151
XF0619	<i>cutA1</i>	F- 5' TTCTCGCGTATTGGTACAGGAA 3' R- 5' TTCACATGCACAGCGTTGGT 3'	141
XF0620	<i>cutA2</i>	F- 5' TTTGGAAAATCACCCGTCGTA 3' R- 5' ACGGCTCTCACCGCTTTTAG 3'	151
XF1341	<i>cutC</i>	F- 5' GGAGTGTTGCGTGCGTCTT 3' R- 5' ATCCGCACTGACATCAATCG 3'	151
XF0866	<i>czcD</i>	F- 5' ACCGACGTGTTTCGCGTTAAT 3' R- 5' AACGCCTCTAACCCTGCATAA 3'	151
XF0910	<i>petC</i> (CE)	F- 5' TCCAGCCAGGTCAGCAGAAC 3' R- 5' ACCAAAAAAGTCAACAACACTAGGAA 3'	151

<sup>†</sup> <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>

### 3.3. Eficiência de amplificação.

A avaliação da eficiência de amplificação das seqüências foi feita a partir da amplificação com quatro conhecidas diluições do cDNA. Essa eficiência é verificada através da relação linear entre o ciclo em que a fluorescência foi detectada (Ct) e o log da concentração de cDNA. Conforme diminui a concentração do cDNA, aumenta o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência (Ct). Através do valor da inclinação (*slope*) da curva foram calculadas as eficiências da amplificação usando a fórmula:

$$E_{(\text{eficiência de amplificação})} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Para verificar se todos os *primers* para os genes alvo apresentavam a mesma eficiência de amplificação que o controle endógeno, o cDNA de uma determinada condição foi utilizado para comparação. As amostras em triplicatas foram então submetidas ao qPCR utilizando a seguinte reação: 1µL de cDNA, 1µM de cada *primer* (direto e reverso) e 12,5 µL do “SYBR green PCR master mix” (Applied Biosystems), o volume final foi ajustado para 25 µL com água Milli-Q. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C. As amplificações foram checadas no ABI PRISM 7000 SDS versão 1.1 durante a amplificação. Uma boa eficiência foi considerada entre 95-100% (+ ou – 10%).

### 3.4. Análise da expressão gênica.

Para a realização das análises de expressão gênica através do qPCR, foi utilizado RNA total extraído de biofilmes tratados com diferentes concentrações de CuSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> e do biofilme sem adição dos compostos (calibrador e controle). Para cada gene avaliado foram feitas três repetições biológicas. As concentrações dos metais nos diferentes meios de cultura estão listadas na tabela 2. Os genes alvos avaliados para os biofilmes tratados com CuSO<sub>4</sub> foram: *acrA*, *acrB*, *mexE*, *czcA*, *metI*, *copB*, *cutA1*, *cutA2* e *cutC* e com ZnSO<sub>4</sub> foram: *acrA*, *acrB*, *mexE*, *czcA* e *czcD*. As reações foram feitas em triplicatas utilizando sempre controle sem cDNA

para detectar possíveis contaminações. Cada reação foi realizada conforme descrito no item 3.3.

As avaliações foram realizadas no ABI PRISM 7000 SDS versão 1.1 usando análises de quantificação relativa (Applied Biosystems). A detecção dos produtos de PCR foi medida por monitoramento do aumento da fluorescência emitida pelo marcador *SYBR green* que está intercalado na fita dupla de DNA. O CE (*petC*) foi utilizado para normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA. Os resultados foram normalizados usando o valor do Ct obtido do CE. Ct é definido como o primeiro ciclo de amplificação na qual a fluorescência do produto de PCR é detectada acima do limite mínimo (*threshold*). Este é um valor numérico designado para cada corrida, onde o nível de fluorescência da reação é detectada durante a fase exponencial. Para a normalização, foi utilizada a equação  $\Delta Ct = Ct$  (gene alvo) – Ct (controle endógeno). O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (amostra) -  $\Delta Ct$  (calibrador). O calibrador é o valor obtido para uma amostra específica. O aumento nos níveis de expressão é sempre obtido em relação ao calibrador específico utilizado. Neste caso, foi utilizado o valor obtido do biofilme sem adição dos metais. A quantificação foi obtida por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Para todas as reações feitas no qPCR foi realizada uma curva de dissociação através do aparelho ABI7000 para a verificação de amplificações inespecíficas decorrentes de possíveis contaminações.

As análises estatísticas dos valores da expressão relativa (RQ) dos genes associados à resistência a cobre e zinco foram avaliadas pela ANOVA e as médias de três repetições biológicas foram comparadas aplicando o teste *t* ( $P \leq 0.05$ ) através do programa Assistat 7.3 beta (<http://assistat.sites.uol.com.br>).

**Tabela 2.** Concentrações dos metais nos diferentes meios utilizadas nas análises de qPCR.

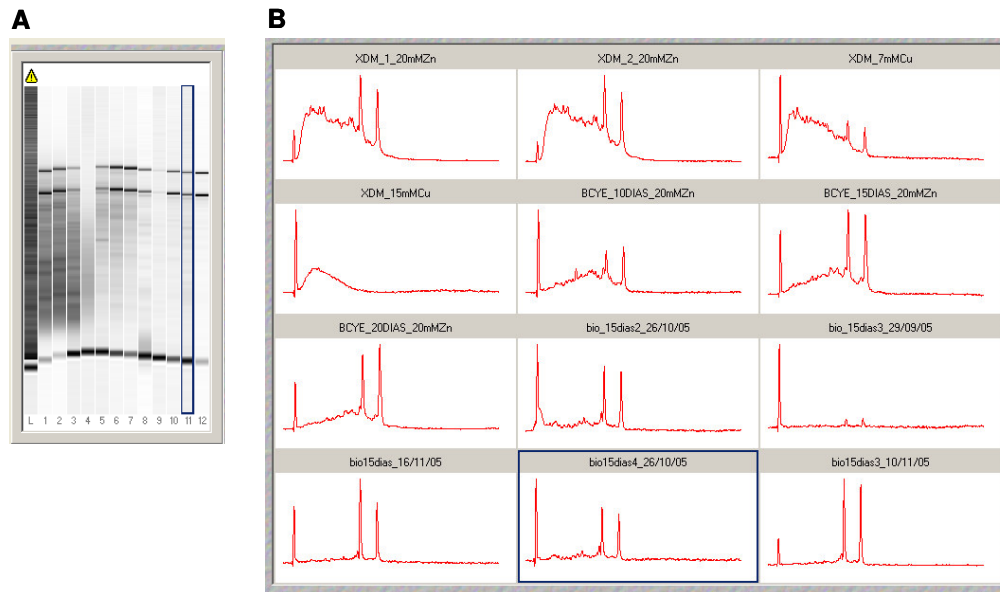
<b>Biofilme</b>			
<b>PW</b>	<b>BCYE</b>	<b>XDM2</b>	
<b>CuSO<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>CuSO<sub>4</sub> (mM)</b>	<b>ZnSO<sub>4</sub> (mM)</b>
3,0	10,0	3,0	10,0
4,0	15,0	5,0	15,0
5,0	20,0	7,0	20,0
6,0	30,0	-	30,0
7,0	-	-	-

## 4. Resultados

### 4.1. RNA total e validação dos *primers*.

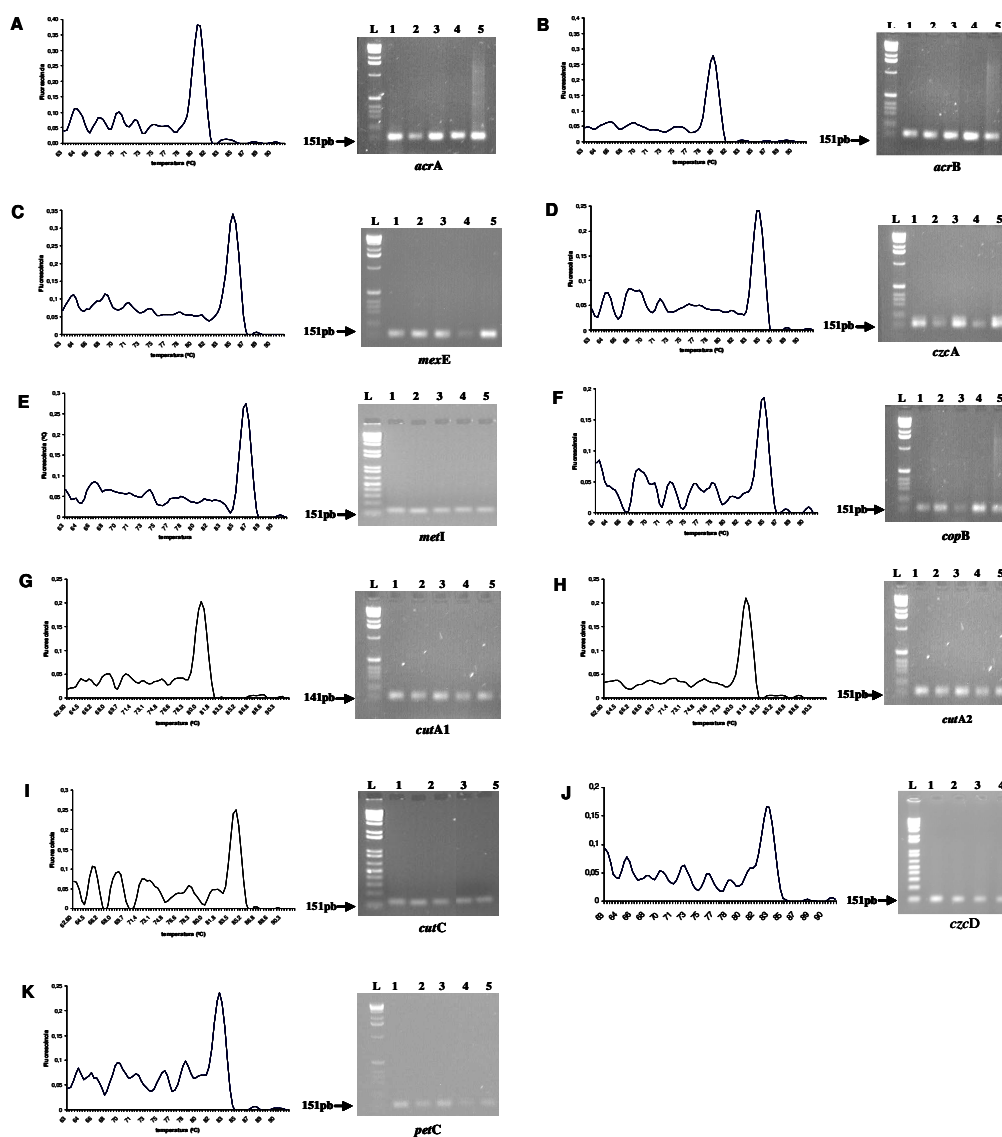
Após a extração do RNA total, a concentração e a integridade foram avaliadas utilizando “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Um exemplo de uma corrida com alguns RNAs avaliados pode ser observado na figura 1. Os RNAs contaminados e/ou degradados foram descartados. As concentrações dos RNAs selecionados foram padronizadas em 1 µg/µl para síntese dos cDNAs.





**Figura 1.** Concentração e integridade dos RNAs avaliados em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). (A). Imagem do gel gerado pelo aparelho, cada poço é referente a uma amostra. (B). Gráfico representando os picos de RNA ribossomal.

As amostras de RNA total de *X. fastidiosa*, utilizadas para verificar possíveis contaminações de DNA através da PCR, utilizando primers do *petC* (CE), não apresentaram produtos amplificados (dados não mostrados). Os primers utilizados para PCR usando DNA da *X. fastidiosa* como molde apresentaram um único amplicon do tamanho correspondente aos genes alvo e *petC* (CE) como verificado por corrida eletroforética em gel de agarose 1% (Fig. 2). Adicionalmente, após o seqüenciamento e pesquisa por similaridade no banco de dados de *X. fastidiosa*, foi verificado que todos os fragmentos apresentaram 100% de identidade com o genoma da *X. fastidiosa*. Nas análises da curva de dissociação, cada par de primers apresentou um único pico confirmando a existência de apenas um amplicon (Fig. 2). Esses resultados demonstraram que o valor de expressão gênica de todos os genes avaliados foi realmente devido às suas expressões na presença de cobre e zinco, e não devido a artefatos provenientes de amplificações inespecíficas ou contaminações.



**Figura 2.** Validação dos *primers* utilizados na qPCR. Genes A. *acrA*; B. *acrB*; C. *mexE*; D. *czcA*; E. *metI*; F. *copB*; G. *cutA1*; H. *cutA2*; I. *cutC*; J. *czcD* e K. *petC* (controle endógeno). Linhas: L = ladder 1Kb-plus (Invitrogen); linhas 1, 2, 3, 4 e 5 = amplificação do cDNA das células em biofilme incubadas durante 24h com 3, 4, 5, 6 ou 7mM de  $\text{CuSO}_4$ , respectivamente, exceto para J, onde as linhas 1, 2, 3 e 4 = amplificação do cDNA das células em biofilme incubadas durante 24h com 10, 15, 20 ou 30mM de  $\text{ZnSO}_4$ , respectivamente.

## 4.2. Expressão relativa dos genes associados à resistência a cobre e zinco no biofilme de *X. fastidiosa*.

Os possíveis mecanismos envolvidos na resistência a cobre e zinco do biofilme de *X. fastidiosa* podem incluir bombas de efluxo como ABC-transporte, membros da família resistência-nodulação e divisão celular (RND), família “P-type-ATPase”, a família facilitadora de difusão de cátions (CDF) e outras envolvidas com a resistência a cobre em outros organismos (Ordermatt et al., 1994; Paulsen and Saier, 1997; Brooun et al., 2000; Nies, 2003). Por esta razão, foram avaliados alguns genes na qPCR que possivelmente estão relacionados a esses mecanismos de resistência. Para a verificação da expressão desses genes, foram utilizados biofilmes de *X. fastidiosa* submetidos a concentrações subinibitórias, inibitórias e acima das concentrações que determinaram a completa inibição do crescimento bacteriano na presença dos metais.

### 4.2.1. Expressão relativa dos genes associados à resistência a cobre no biofilme.

Para a avaliação da expressão das células em biofilme cultivadas no meio PW (indefinido) na presença de cobre, foi realizada a comparação com a expressão em meio definido (XDM2), tendo sido analisada a expressão em três concentrações de  $\text{CuSO}_4$  (baixa, média e alta).

No crescimento em biofilme no meio PW (bPW) a maioria dos genes apresentou um aumento significativo ( $P \leq 0.05$ ) nos níveis de expressão quando o cobre foi adicionado. Isso foi observado em quase todas as concentrações avaliadas (Fig. 3). Para os biofilmes crescidos em XDM2 (bXDM2) houve uma diminuição na indução da expressão gênica comparada com bPW para a maioria dos genes avaliados (Fig. 4).

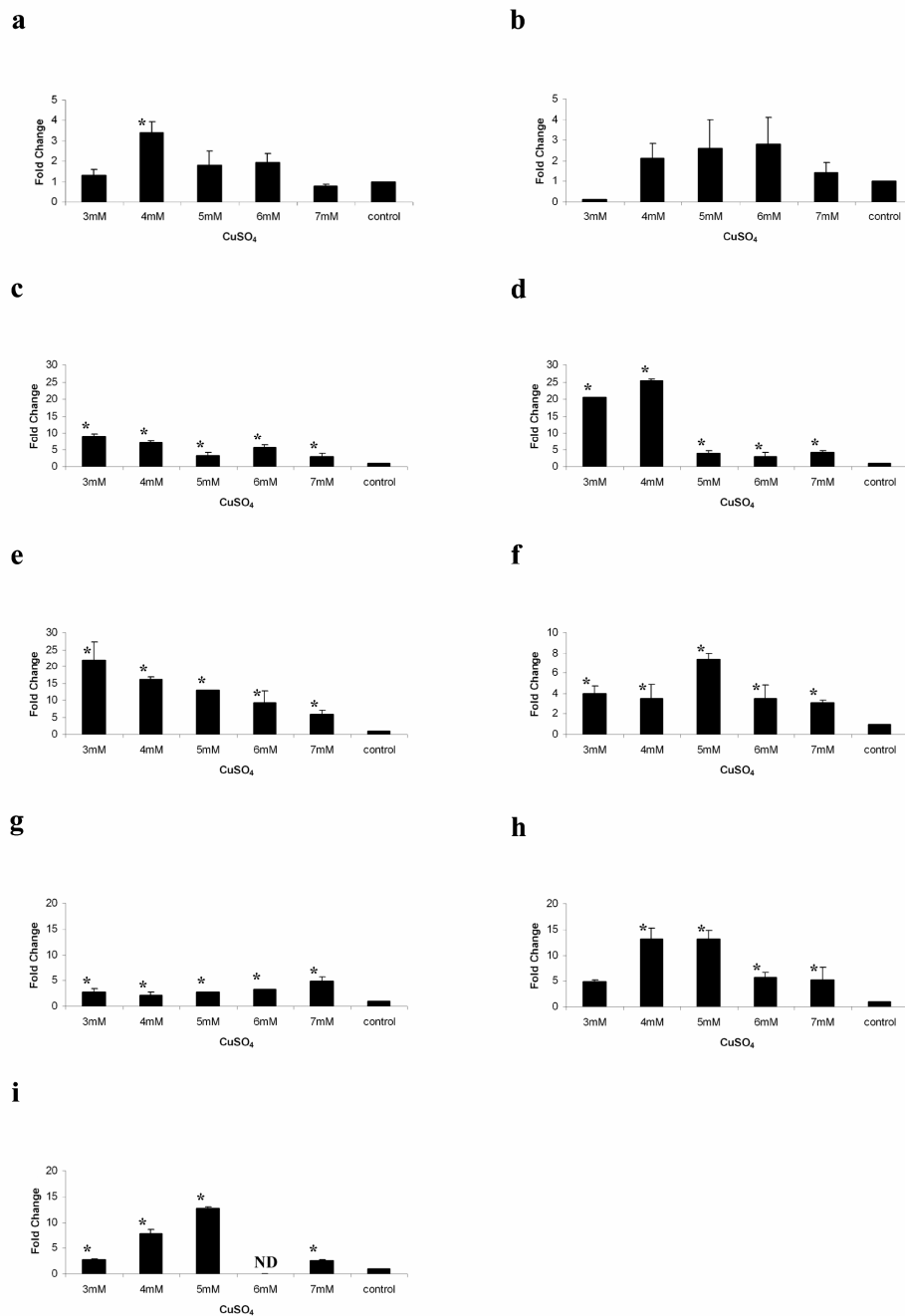
Os genes *acrA* e *acrB*, bem como *mexE* e *czcA*, estão em *operon*, respectivamente, e pertencem à família RND. Os genes *acrA* e *acrB* apresentaram alta indução em quase todas as concentrações subinibitórias avaliadas no bPW (Fig. 3A e 3B; 4A). No entanto, para bXDM2, regulação positiva foi observada apenas para o gene *acrA* na concentração de 3mM de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 4A).

Os genes *mexE* e *czcA* apresentaram indução significativa no bPW para todas as concentrações avaliadas. Os níveis de expressão mais altos foram observados em baixas concentrações de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 3B e 3C). Em bXDM2 não foi observada indução significativa para *czcA*, entretanto, foi observado um aumento significativo na expressão do gene *mexE* em todas as concentrações avaliadas (Fig. 4C).

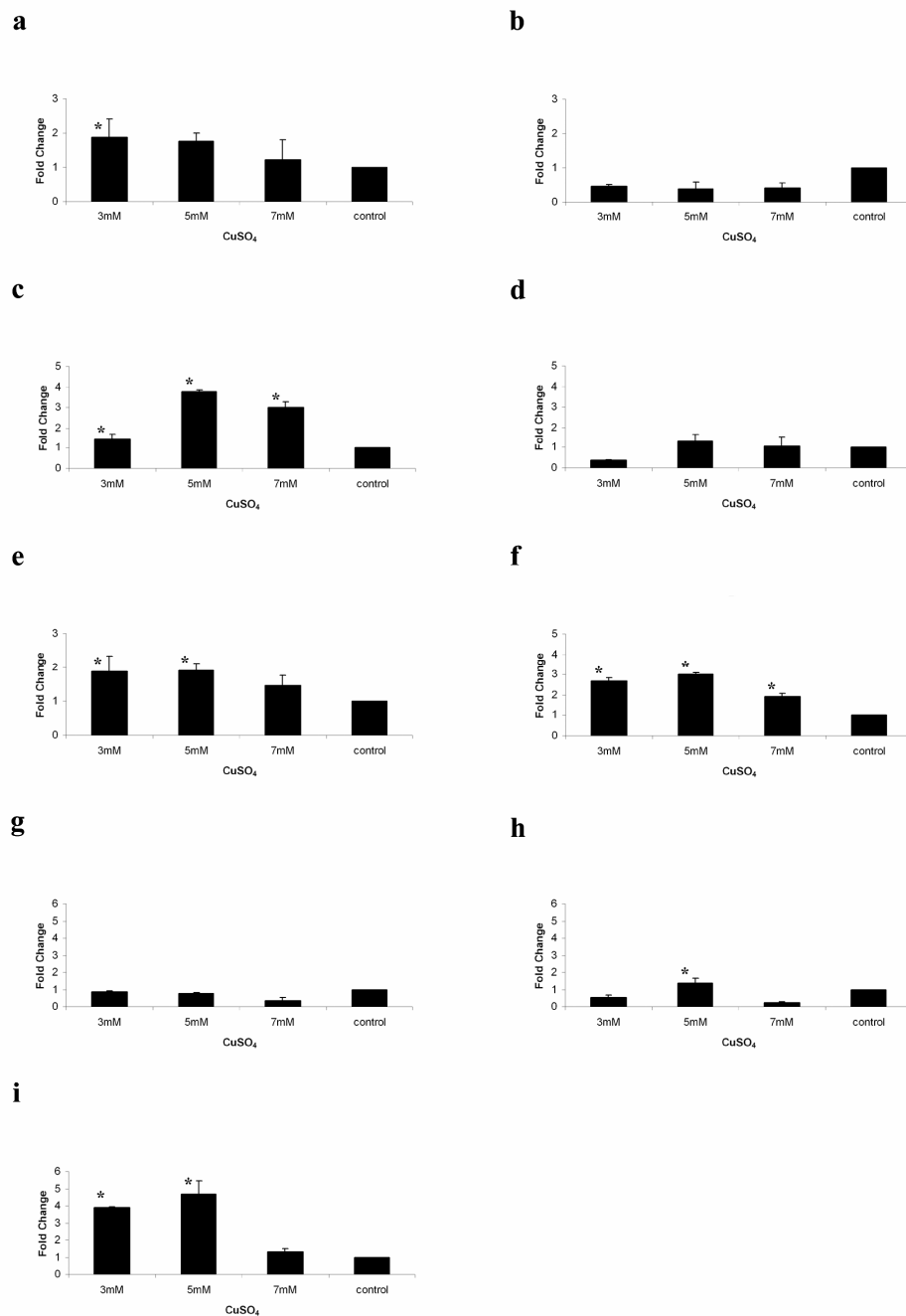
Similar ao *mexE* e *czcA* em bPW, *metI* apresentou alta indução em concentrações subinibitórias (Fig. 3E). Padrão semelhante foi observado em XDM2 (Fig. 4D). O gene *metI* de *X. fastidiosa* codifica uma proteína permease, membro dos transportadores ABC, o qual apresenta um domínio AbcD pertencente ao sistema de transporte de íons de metal tipo transporte ABC.

O gene *copB* pertencente a superfamília de proteínas transportadoras (P-type-ATPase), apresentou um aumento significativo nos níveis de expressão em todas as concentrações de cobre avaliadas no bPW (Fig. 3F). A maior indução foi observada em 5mM comparada com 3, 4, 6 e 7mM de  $\text{CuSO}_4$ , que apresentaram expressões similares (Fig. 3F). Esse gene foi também significativamente induzido em bXDM2 em todas as concentrações avaliadas (Fig. 4F).

Os outros genes possivelmente associados com a resistência a cobre, *cutA1*, *cutA2* (ou *dsbD*) e *cutC*, também foram avaliados. As análises mostraram aumentos significativos nos níveis de expressão em quase todas as concentrações avaliadas no bPW na presença do cobre. No entanto, a indução de *cutA1* foi menor que *cutA2* e *cutC*, embora, similar em todas as concentrações. Por outro lado, *cutA2* e *cutC* apresentaram picos de indução nas concentrações de 4 e 5mM de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 3G, H e I). Em bXDM2 a indução significativa foi observada somente para *cutA2* em 5mM de  $\text{CuSO}_4$  e *cutC* com 3 e 5mM de  $\text{CuSO}_4$  (Fig. 4G, H e I).



**Figura 3.** Quantificação relativa dos genes associados à resistência ao cobre através do PCR quantitativo em tempo real. cDNAs foram preparados de células em biofilme cultivadas no meio indefinido PW e incubadas durante 24h com 3, 4, 5, 6 e 7mM ou sem de CuSO<sub>4</sub> (controle). Médias de três repetições biológicas. a. *acrA*; b. *acrB*; c. *mexE*; d. *czcA*; e. *metI*; f. *copB*; g. *cutA1*; h. *cutA2*; i. *cutC*. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle. As barras indicam o desvio padrão entre as médias.



**Figura 4.** Quantificação relativa dos genes associados à resistência ao cobre através do PCR quantitativo em tempo real. cDNAs foram preparados de células em biofilme cultivadas no meio definido XDM2 e incubadas durante 24h com 3, 5 e 7mM ou sem (controle) de CuSO<sub>4</sub>. Médias de três repetições biológicas. a. *acrA*; b. *acrB*; c. *mexE*; d. *czcA*; e. *metI*; f. *copB*; g. *cutA1*; h. *cutA2*; i. *cutC*. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle. As barras indicam o desvio padrão entre as médias.

#### 4.2.2. Expressão relativa dos genes associados à resistência a zinco no biofilme.

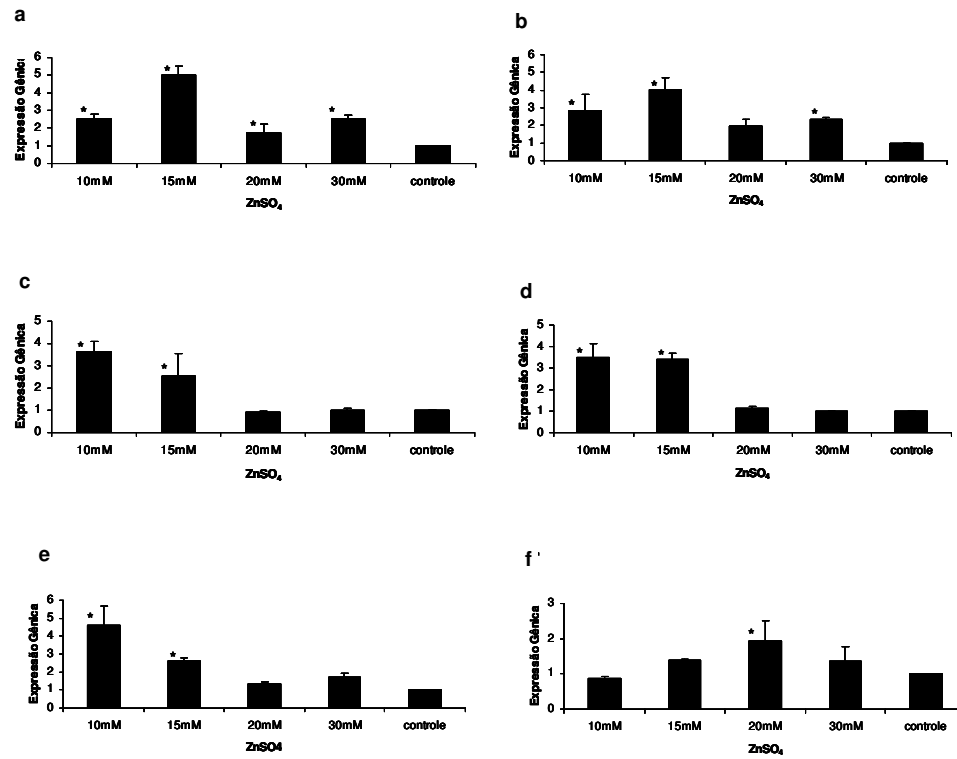
Biofilmes de *X. fastidiosa* formados nos meios BCYE (definido) e XDM2 (indefinido) com diferentes concentrações de ZnSO<sub>4</sub> foram utilizados para a avaliação da expressão gênica dos genes *acrA*, *acrB*, *mexE*, *czcA*, *metI* e *czcD*.

As células do biofilme crescidas no meio BCYE (bBCYE), apresentaram níveis maiores de expressão do que os observados nos biofilmes formados em XDM2 (bXDM2) após adição do zinco (Fig. 5 e 6). Em bBCYE, os genes *acrA* e *acrB* apresentaram altos níveis de indução em relação ao controle. Em todas as concentrações avaliadas, tanto as concentrações subinibitórias quanto inibitórias, foram significativamente expressos, exceto 20mM de ZnSO<sub>4</sub> para o gene *acrB* (Fig. 5A e B). Entretanto, em bXDM2, esses mesmos genes não mostraram aumentos significativos em nenhuma concentração avaliada (Fig. 6A e B).

Os genes *mexE* e *czcA* foram significativamente induzidos somente nas concentrações de 10mM (subinibitória) e 15mM de ZnSO<sub>4</sub> (MIC) quando avaliados em BCYE (Fig. 5C e D). Em bXDM2, assim como observado para *acrA* e *acrB*, não houve indução da expressão de *mexE* e *czcA*, exceto para *mexE* na concentração de 10mM de ZnSO<sub>4</sub> (Fig. 6C e D).

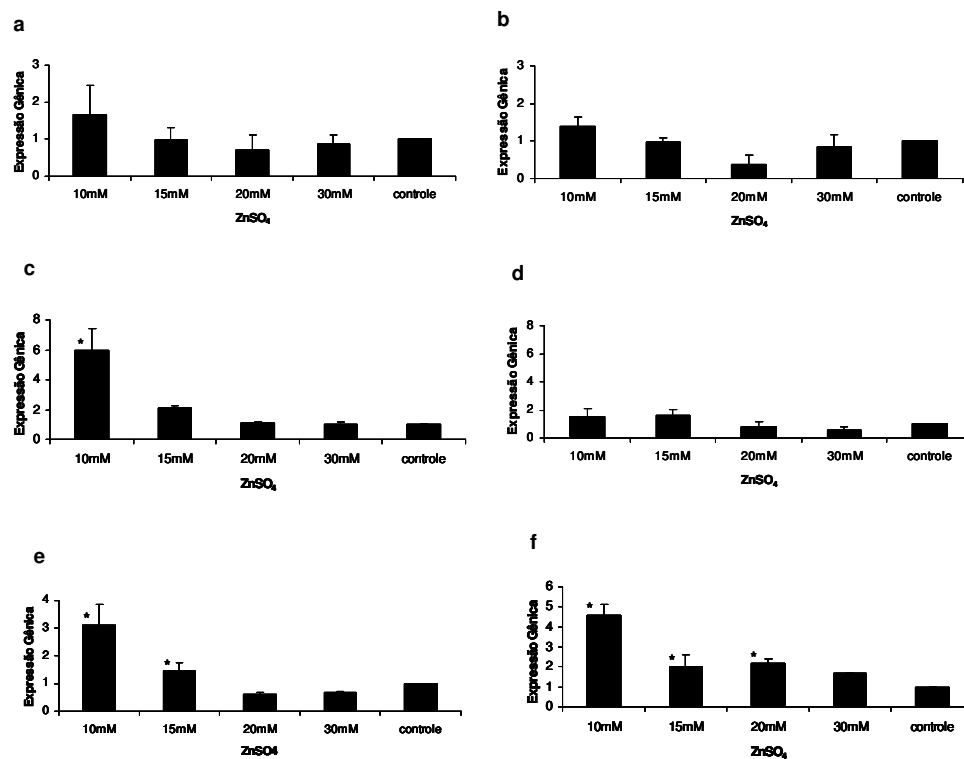
A expressão do gene *metI* foi similar a dos genes *mexE* e *czcA*, demonstrando níveis significativos nas concentrações subinibitórias e inibitória (MIC) em bBCYE (Fig. 5E). Em bXDM2, o padrão de expressão apresentado por esse gene foi similar ao obtido para bBCYE (Fig. 6E).

Adicionalmente, a maior indução observada para o gene *czcD*, o qual possui um domínio CzcD envolvido no efluxo de zinco, cádmio e cobalto, foi na concentração de 20mM de ZnSO<sub>4</sub> em bBCYE (Fig. 5F). Em bXDM2, foram observadas induções significativas nas concentrações 10, 15 e 20mM de ZnSO<sub>4</sub> (Fig. 6F).



**Figura 5.** Quantificação relativa dos genes associados à resistência ao zinco através do PCR quantitativo em tempo real. cDNAs foram preparados de células em biofilme cultivadas no meio indefinido BCYE e incubadas durante 24h com 10, 15, 20 e 30mM ou sem (controle) de ZnSO<sub>4</sub>. Médias de três repetições biológicas. A. *acrA*; B. *acrB*; C. *mexE*; D. *czcA*; E. *metI*; F. *czcD*. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle. As barras indicam o desvio padrão entre as médias.





**Figura 6.** Quantificação relativa dos genes associados à resistência ao zinco através do PCR quantitativo em tempo real. cDNAs foram preparados de células em biofilme cultivadas no meio definido XDM2 e incubadas durante 24h com 10, 15, 20 e 30mM ou sem (controle) de ZnSO<sub>4</sub>. Médias de três repetições biológicas. a. *acrA*; b. *acrB*; c. *mexE*; d. *czcA*; e. *melI*; f. *czcD*. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle. As barras indicam o desvio padrão entre as médias.

## 5. Discussão

Estudos têm revelado que não somente a estrutura complexa das células em biofilme é barreira para compostos antimicrobianos, mas que outros mecanismos distintos de resistência a agentes antimicrobianos são ativados por bactérias nesta condição de crescimento (Mah et al., 2003; Mukherjee et al., 2003). Esses mecanismos incluem efluxo de cátions e multidrogas para fora das células (Brooun et al., 2000; Poole K, 2001; Poole K, 2002; Nies, 2003).

A genética e a bioquímica dos mecanismos de resistência a metais têm sido cuidadosamente estudadas em organismos de vida livre (Teitzel and Parsek, 2003). Entretanto, não são concentrados muitos estudos relacionando a participação de mecanismos de resistência nas células em biofilme. No genoma da *X. fastidiosa* foram encontrados genes relacionados a quatro sistemas de efluxo, ABC transportes, família RND, “P-type-ATPases”, CDF e outros genes possivelmente envolvidos na resistência a cobre, como os homólogos a *cutA1*, *cutA2* e *cutC* de *E. coli* (Rouch et al., 1989). Esses genes foram selecionados para análise no qPCR não somente por desempenharem possíveis funções de resistência a cobre e zinco, mas também devido a expressão de alguns deles no biofilme de *X. fastidiosa* cultivadas em meio PW (Souza et al., 2003; Souza et al., 2004).

Foram avaliadas a expressão de quatro genes pertencentes à família RND (*acrA*, *acrB*, *mexE* e *czcA*), composta de três proteínas, RND-MFP-OMF que são conhecidas por transportarem diversas moléculas não relacionadas para fora das células. Foi verificado recentemente que TolC, uma proteína de membrana externa componente da RND, é funcional e necessária para a patogenicidade e, provavelmente, para a sobrevivência da *X. fastidiosa* em videira (Reddy et al., 2007). Além disso, compostos fenólicos também induzem a expressão de homólogo a *acrB* de *Erwinia chrysanthemi*. Em *X. fastidiosa* os genes *acrA* e *mexE* possuem o domínio conservado de AcrA (acriflavin resistance protein A), uma proteína de membrana de fusão (MFP). Adicionalmente, os genes *acrB* e *czcA* apresentam um domínio conservado AcrB (acriflavin resistance protein B). AcrB coopera com uma MFP (AcrA) e uma proteína que forma um canal de membrana externa (TolC), para expulsar as moléculas alvo. O presente trabalho mostrou que a presença de cobre induz a expressão em bPW principalmente em *mexE* e *czcA*. Para bXDM2, somente

*mexE* foi significativamente induzido por cobre, no entanto, uma tendência similar foi observada para *czcA*.

O outro gene avaliado foi o *metI*, o qual codifica uma proteína pertencente a família de transportadores ABC (ATP-binding cassette). Essa proteína possui um domínio conservado AbcD, o qual está relacionado ao transporte de íons de metais (COG2011). Os transportadores ABC, relacionados com o efluxo de compostos antimicrobianos, têm sido identificados em diversos organismos (Pattery et al., 1999). No entanto, a função desses transportadores na resistência a compostos antimicrobianos do biofilme foi somente investigada recentemente em *Candida albicans*. Células em biofilme apresentaram a regulação de ABC transportes na presença do antifúngico fluconazol (Ramage et al., 2002). Em *X. fastidiosa* *metI* foi expresso em todas as concentrações avaliadas de cobre, com maior indução nas concentrações mais baixas.

A família “P-type-ATPase” é a mais comum entre os mecanismos de bombas de efluxo de íons de metal para fora das células (Dameron and Harrison, 1998). Em *X. fastidiosa* foi avaliado a expressão do gene *copB*, o qual codifica uma proteína pertencente a essa família. Neste estudo, foi verificado que esse gene apresentou a maior indução em 5mM de  $\text{CuSO}_4$  no bPW. A expressão de *copB* em *X. fastidiosa* é somente observada no biofilme na presença de cobre, sugerindo que, como em outros organismos, esse gene está envolvido com a homeostase e poderia ser regulado positivamente em células do biofilme. O aumento da expressão desse gene é similar ao *Enterococcus hirae*, onde *copB* foi funcional para expelir o excesso de cobre (Ordermatt et al., 1994).

Em *E. coli* outros genes possivelmente envolvidos na homeostase, armazenamento intracelular, distribuição, e efluxo de cobre são os *cutABCDEF*. A associação desses genes na homeostase de cobre é baseada em resultados obtidos na caracterização de mutantes sensíveis a cobre. No entanto, pouco desses genes tem sido diretamente ligado ao metabolismo de cobre, transporte, ou regulação e a maioria dos genes *cuts* está provavelmente envolvido indiretamente na homeostase de cobre (Rouch et al., 1989). O locus *cutA* consiste em dois operons, um contendo o gene *cutA1*, que codifica uma proteína citoplasmática, e o outro consistindo de dois genes, *cutA2* e *cutA3*, codificando proteínas de membrana interna. Entre os genes *cuts* similares ao de *E. coli*, somente *cutA1*, *cutA2* e *cutC* foram encontrados no

genoma de *X. fastidiosa*. A indução de *cutA1* foi mais baixa em relação aos outros *cuts* em bPW e nenhuma expressão significativa foi observada em bXDM2. Por outro lado, *cutA2* e *cutC* apresentaram indução em ambas condições dos biofilmes. Outros mecanismos que conferem resistência a cobre em *E. coli* são os sistemas CuoO e Cus, entretanto estes não foram encontrados no genoma de *X. fastidiosa*.

Também foram avaliadas as expressões dos genes pertencentes à família RND nas células em biofilme na presença do zinco. Além desses genes, foi verificada a expressão do *metI* (ABC transporte) e o gene *czcD*, que possui um domínio relacionado ao efluxo de zinco.

Foi verificado, que assim como para cobre em bPW, o nível de expressão dos genes avaliado foi maior quando os biofilmes foram formados em bBCYE do que em bXDM2.

Os genes *acrA*, *acrB*, *mexE* e *czcA* apresentaram níveis significativos de expressão em bBCYE. Isto não foi observado em bXDM2. Esses resultados foram similares aos obtidos na avaliação desses genes em bPW e bXDM2 na presença de cobre, onde as maiores expressões foram observadas no meio complexo. Além dessa observação, as células de *X. fastidiosa* apresentaram a menor quantidade de EPS quando cultivadas no meio BCYE em relação aos outros meios (capítulo 2). Portanto, mais uma vez, a menor indução da expressão gênica dos biofilmes formados em XDM2, poderia ser explicada pela quantidade de EPS, que provavelmente diminui a concentração de cátions livres para o interior da célula, apresentada pelas células bacterianas quando são cultivadas nesse meio de cultura.

A expressão de *metI* na presença de zinco foi similar nos biofilmes formados nos dois meios de cultura (BCYE e XDM2). Os níveis significativos de indução foram observados nas concentrações mais baixas, similar ao observado em bPW e bXDM2 na presença do cobre. Os resultados sugerem que esse gene possui um importante papel no início do processo de expulsão dos metais, visto que, o padrão de expressão observado para esse gene em todos os meios avaliados e tratados com cobre e zinco foram muito similares.

O gene *czcD*, possui um domínio conservado com similaridade ao CzcD, o qual é componente do sistema de efluxo envolvido no transporte e metabolismo de zinco e outros metais (COG1230). Esse gene também possui similaridade com um outro domínio conservado de efluxo de cátions (pfam01545) que está relacionado ao

transporte de metais bivalentes. Os membros dessa família são proteínas de membrana relacionadas ao aumento da tolerância de metais bivalentes, incluindo o zinco. Em *X. fastidiosa*, foi verificado que esse gene apresentou a maior indução em 20mM de ZnSO<sub>4</sub> quando avaliado em bBCYE. Entretanto, em bXDM2, além da concentração observada em bBCYE, as concentrações abaixo de 20mM de ZnSO<sub>4</sub> também foram significativamente induzidas. Esses resultados indicam que esse gene provavelmente está envolvido na homeostase de zinco e apresenta regulação positiva em células em biofilme. Em *Ralstonia* sp. estirpe CH34, a mutação desse gene levou a expressão constitutiva dos genes pertencentes ao operon *czc*, indicando que CzcD está envolvida na regulação do sistema Czc (Anton et al., 1999).

Baixos níveis de indução na expressão gênica observados em bXDM2 comparado ao bPW e bBCYE poderiam ser explicados pela presença de grande quantidade de EPS produzido pela *X. fastidiosa* quando cultivada nesse meio (capítulo 2). A adsorção de cátions de metais pelos EPS poderia reduzir a quantidade de cobre e zinco que penetra nas células e, portanto, diminuiria a necessidade de ativar as bombas para eliminar esses compostos da célula. Outra possibilidade seria que alguns desses genes são expressos em células em biofilme quando cultivadas em XDM2 mesmo na ausência de cobre ou zinco. E por esta razão, a quantificação relativa (tratamento em relação ao controle) é baixa.

A principal característica associada à biofilmes microbianos é o aumento da resistência a compostos antimicrobianos. No entanto, pouco se sabe sobre as mudanças fenotípicas que ocorrem durante a transição de células planctônicas para o crescimento em biofilme de bactérias fitopatogênicas. Esses biofilmes foram resistentes aos metais, independentemente do meio de cultura utilizado. Contudo, os níveis de expressão podem variar de acordo com o meio onde os biofilmes foram formados. No presente trabalho, foi demonstrado que a resistência do biofilme de *X. fastidiosa* parece estar associada a um conjunto de mecanismos diferentes. Dentre esses mecanismos estariam a produção de EPS, expulsão dos metais para fora das células através de bombas de efluxo, e a provável ação dos genes *cuts*. As análises de expressão gênica demonstraram que a resistência do biofilme de *X. fastidiosa* aos metais é um fenômeno complexo que não pode ser explicado por um único mecanismo, e sim por multifatores que podem envolver diferentes mecanismos de resistência.

Outra observação interessante foi que nas concentrações que determinaram a inibição do crescimento bacteriano em biofilme para cobre (7mM) e zinco (15mM), ainda foi obtido RNA de boa qualidade e foi possível verificar a expressão de genes associados com a resistência desses metais em todas as repetições avaliadas. Esses resultados sugerem que o cobre e zinco podem penetrar, mas não matar completamente as células. Algumas hipóteses para explicar esses resultados podem ser especuladas. Uma delas seria que as células poderiam estar em um estado fisiológico de resistência ou então estaria ocorrendo morte celular programada bacteriana, um mecanismo recentemente descrito em bactérias relacionado com sobrevivência em estresse ambiental (Engelberg-Kulka et al., 2006). Por essa razão há uma drástica redução na população e, por causa do caráter fastidioso do crescimento da *X. fastidiosa*, as células que permanecem vivas não são suficientes para continuar o crescimento no meio de cultura. Entretanto, na planta hospedeira, após a ação do composto antimicrobiano, as células vivas poderiam ainda se recuperar e recolonizar o ambiente. Isto pode representar uma importante estratégia para a sobrevivência da população e também o controle pode ser muito difícil quando os biofilmes são formados. Contudo, essas hipóteses necessitam ser investigadas.

## 6. Conclusões Gerais

Os principais resultados obtidos no presente trabalho foram:

- ✓ *X. fastidiosa*, quando cultivada no meio definido XDM2, apresenta menor taxa de crescimento do que no meio PW, de composição indefinida.
- ✓ Independentemente do meio de cultura, *X. fastidiosa* em condição de crescimento em biofilme é menos sensível a compostos antimicrobianos do quando em crescimento planctônico.
- ✓ Independentemente do meio de cultura, a quantidade de EPS produzida pela bactéria em biofilme foi significativamente maior que a produzida na condição planctônica. No entanto, a quantidade produzida tanto pelas células planctônicas quanto para as células em biofilme nos diferentes meios de cultura foi da ordem de  $XDM2 > PW > BCYE$  ( $P \leq 0,05$ ).
- ✓ Os genes possivelmente envolvidos na resistência a cobre e zinco apresentaram regulação positiva nas células em biofilme, sugerindo o envolvimento no mecanismo de resistência aos metais avaliados.
- ✓ *X. fastidiosa* em biofilme demonstra ser mais resistente a cobre e zinco que em condições planctônicas. Essa maior resistência é provavelmente associada à proteção física conferida pelo EPS e por mecanismos bioquímicos associados à resistência. Esse efeito sinérgico pode ter um importante papel na sobrevivência das células em presença de cobre e zinco, conferindo importante estratégia de sobrevivência quando biofilmes são formados.

## 7. Referência Bibliográfica

- ALMEIDA R.P.P.; MANN R.; PURCELL A.H. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. **Curr Microbiol.**, v.48, p.368-72, 2004.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H. et al. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Dis.**, v.85, n.4, p.382-386, 2001.
- AMARO, A.A. AND SALVA, R.A. Production of citrus nursery trees in São Paulo State: an economic vision. In: **INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN**, Ribeirão Preto. Proceedings... Ribeirão Preto, v.6, p.55-66, 2001.
- AMARO, A.A.; VICENTE, M.C.M.; BAPTISTELLA, C.S.L. Citricultura paulista: tecnologia e mão de obra. **Laranja**, v.22, n. 1, p.1-37, 2001.
- ANBA (2006) Associação de notícias Brasil-Árabe  
<http://www.anba.com.br/anba/php>.
- ANDERSEN C. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**, v.147, p.122-65, 2003.
- ANDERSEN, C.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.13, p.412-416, 2001.
- ANTON, A.; GROME, C.; REIMMAN, J.; PRIBYL, T.; NIES, D.H. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. **J. Bacteriol.**, v.181, p.6876-6881, 1999.
- AXELSEN, K.B. AND PALMGREN, M.G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. **J. Mol. Evol.**, v.46, p.84-101, 1998.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v.276, p.726-733, 1997.
- BAL, N.; MINTZ, E.; GUILLAIN, F.; CATTY, P. A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd<sup>2+</sup>-ATPase. **FEBS Lett.**, v.506, p.249-252, 2001.
- BEARD, S.J.; HASHIM, R.; MEMBRILLOHERNANDEZ, J.; HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the



- zntA* gene encodes a cation transport ATPase. **Mol. Microbiol.**, v.25, p.883-891, 1997.
- BELLATO, C.M.; GARCIA, A.K.M.; MESTRINELLI, F.; TSAI, S.M.; MACHADO, M.A.; MEINHARDT, L.W. The induction of differentially expressed proteins of *Xylella fastidiosa* with citrus extract. **Braz. J. Microbiol.**, v.35, p.235-242, 2004.
- BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L. et al. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by Citrus Variegated Chlorosis and Citrus Blight in Brazil. **Plant Dis.**, v.81, n.10, p.1196-1198, 1997.
- BISSIG, K.D.; WUNDERLI-YE, H.; DUDA, P.W.; SOLIOZ, M. Structure-function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues. **Biochem. J.**, v.357, p.217-223, 2001.
- BLOSS, T.; CLEMENS, S. AND NIES, D.H. Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. **Planta**, v.214, p.783-791, 2002.
- BROEKS, A.; GERRARD, B.; ALLIKMETS, R.; DEAN, M.; PLASTERK, R.H.A. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J.**, v.15, p.6132-6143, 1996.
- BROOUN A.; LIU, S.; LEWIS, K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.44, n.3 p.640-646, 2000.
- BROWN, N. L.; LEE, B.T.O.; SILVER, S. Bacterial transport of and resistance to copper. **Met Ions Biol Syst.**, v.30, n.7, p.405-430, 1994.
- BURLANDO, B.; EVANGELISTI, V.; DONDERO, F.; PONS, G.; CAMAKARIS, J.; VIARENGO, A. Occurrence of Cu-ATPase in Dictyostelium: possible role in resistance to copper. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.291, p.476-483, 2002.
- CALDANA, C. **Avaliação de genes diferencialmente expressos em *Xylella fastidiosa* em condições de adesão.** 2002. p.32. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas-Unicamp.

- CALDANA C.; COLETTA-FILHO H.D.; MACHADO, M.A. Effect of copper, zinc, and boron on the growth of *Xylella fastidiosa* in vitro. **Rev. Bras. Fito. (suplemento)**, v.26, p.297, 2001.
- CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **J. Phytopathol**, v.134, p.306-312, 1992.
- CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V. et al. Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease. In: Conference of the International Organization of citrus virologists, 12., Riverside, 1993. **Proceedings...**p.294-300.
- CHRISTENSEN, B.E.; KJOSBAKKEN, J.; AND SMIDSROD, O. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. **Appl. Environ. Microbiol.** v.50, p.837-845, 1985.
- COLETTA-FILHO, H.D. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Xylella fastidiosa* analisadas através de RAPD e VNTR.** 2002 . 88p. Tese de (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de biologia. Campinas, SP.
- COLETTA-FILHO, H.D.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v.21, p.335-343, 2000.
- COLTRI P.P. AND ROSATO Y.B. Regulation of the *htpX* gene of *Xylella fastidiosa* and its expression in *E. coli*. **Curr Microbiol.**, v.48, p.391-395, 2004.
- COLTRI P.P. AND ROSATO Y.B. Transcription analysis of *pilS* and *xpsEL* genes from *Xylella fastidiosa*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.87:253-7. 2005.
- COOTE, J.G. Structural and functional relationships among RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v.8, n.2, p.137-161, 1992.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.; LAPPIN-SCOTT. Microbial Biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, V.49, p.711-745, 1995.
- CROOKE, H. AND COLE, J. The biogenesis of C-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulphide isomerase-like domain. **Mol. Microbiol.**, v.15, p.1139-1150, 1995.

- CROOP, J.M. Evolutionary relationships among ABC transporters. **Meth. Enzymol.**, v.292, p.101-116, 1998.
- DAMERON, C.T AND HARRISON, M.D. Mechanisms for protection against copper toxicity. **Am J Clin Nutr.**, v.67, p.1091S-7S, 1998.
- DA SILVA F.R.; VETTORE A.L.; KEMPER E.L.; LEITE A.; ARRUDA P. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiol Lett**, v.203, p.165-71, 2001.
- DAVEY, M.E. AND O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.64, p.847-867, 2000.
- DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum scald. **Curr. Microbiol.**, v.5, p.311-316, 1981.
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, p.75-77, 1978.
- DE KIEVIT, T.R. AND IGLEWSKI, B. H. Quorum sensing, Gene expression, and Pseudomonas Biofilms. In: **Meth. Enzymol.: Biofilms**. ed: Doyle, R.J. Academic Press, v. 310, p.117-119, 1999.
- DE NEGRI, J.D. **Clorose variegada dos citros**: nona anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais. Campinas, 1990. 6p. (CATI. Comunicado Técnico, 82).
- DESAI, M.; BUHLER, T.; WELLER, P.H.; BROWN, M.R.W. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. **J. Antimicrob. Chemother**, v.42, p. 153-160, 1998.
- DIDONATO, M.; ZHANG, J.Y.; QUE, L.; SARKAR, B. Zinc binding to the NH<sub>2</sub>-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase - Implications for in vivo metal ion-mediated regulation of ATPase activity. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.13409-13414, 2002.
- DOW, J.M. AND DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plant. **Yeast**, v.17, n.4, p.263-271, 2000.
- DUBOIS M.; GILLES K.A.; HAMILTON J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** v.28, n.3, p.350-354, 1956.

- ENGELBERG-KULKA, H.; AMITAI, S.; KOLODKIN-GAL, I.; HAZAN, R. Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria. **PLoS Genet.**, v.2, p.1518-1526, 2006.
- FAGAN, M.J. AND SAIER JR., M.H. P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence comparisons and construction of phylogenetic trees. **J. Mol. Evol.**, v.38, p.57-99, 1994.
- FAN, B. AND ROSEN, B.P. Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.46987-46992, 2002.
- FEIL, H.; FEIL, W.; DETTER, C. J.; PURCELL, H. A.; LINDOW, S. Site-Directed Disruption of the *fimA* and *fimF* Fimbrial Genes of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.93, p.675-682, 2003.
- FERNANDES JR., W.B. "Analyses of the World Processed Orange Industry." .2003. 108 p. Ph.D. Dissertation. Gainesville, FL: University of Florida, August.
- FLEMMING, H.C. AND WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I. Structural and ecological aspects. **Water Sci. Technol.** v.43,p.1–8, 2001.
- FONG, S.T.; CAMAKARIS, J.; LEE, B.T.O. Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v.15, p.1127-1137, 1995.
- FREITAG, J.H. Host range, of Pierce's disease virus of grape as determined by insect transmission. **Phytopathology**, v.41, p.920-934, 1951.
- FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D.; HUANG, P.Y. Isolation and growth of strains of *Xylella fastidiosa* from infected grapevines on nutrient agar media. **Plant Dis.**, v.74, p.522-524, 1990.
- FUNDECITRUS (2007). Fundo de defesa a citricultura. www. Fundecitrus.com.br
- FUX, C.A; WILSON, S.; STOODLEY, P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. **J Bacteriol.**, v.186, p.4486-4491, 2004.
- GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Association of rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevine. **Phytopathology**, v.63, n.3, p.341-345, 1973.

- GRASS, G.; FAN, B.; ROSEN, B.P.; FRANKE, S.; NIES, D.H.; RENSING, C. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.183, p.4664-4667, 2001.
- GROS P.Y.; BEN, N.B.; CROOP, J.M.; HOUSMAN, D.E. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. **Nature**, v.323, p.728-731, 1986.
- GUILHABERT, M.R. AND KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.18, p.856-868, 2005.
- GUFFANTI, A.A.; WEI, Y.; ROOD, S.V.; KRULWICH, T.A. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for Kp and Hp. **Mol. Microbiol.**, v.45, p.145-153, 2002.
- GUPTA, S.D.; GAN, K.; SCHMID, M.B.; WU, H.C. Characterization of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in apolipoprotein N-acyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.16551-16556, 1993.
- GUPTA, D.S.; LEE, B.T.O.; CAMAKARIS, J.; WU, H.C. Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) Genes Involved in Copper Tolerance in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.177, n.15, p. 4207-4215, 1995.
- GUPTA, S.D.; WU, H.C.; RICK, P.D. A *Salmonella typhimurium* Genetic Locus Which Confers Copper Tolerance on Copper-Sensitive Mutants of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, vol. 179, n.16, p. 4977-4984, 1997.
- HAGMAN, K.E.; LUCAS, C.E.; BALTHAZAR, J.T.; SNYDER, L.; NILLES, M.; JUDD, R.C.; SHAFER, W.M. The MtrD protein of *Neisseria gonorrhoeae* is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system. **Microbiology**, v.7, p.2117-2125, 1997.
- HARRISON, J.J.; RABIEL, M.; TURNER, R.J.; BADRY, E.A.; SPROULE, K.M.; CERI, H. Metal resistance in *Candida* biofilms. **FEMS Microbiol Ecol.**, v.55, n.3, p.479-91, 2006.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, J.; BRLANSKY, R.H. et al. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological

- relationships with other stains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, p.591-597, 1994.
- HASSE, G. A laranja no Brasil 1500-1987. **Lobe Propaganda**, p. 296, 1987. São Paulo: Edição de Duprat.
- HE, C.X. et al. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstock and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural roots grafts. **Plant Dis.**, v.84, p.622-626, 2000.
- HEARON, S.S.; SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Association of xylem-limited with elm, sycamore, and oak leaf scorch. **Can. J. Bot.**, v.58, p.1986-1993, 1980.
- HILL, B.L. AND PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995.
- HOLLAND, I.B. AND BLIGHT, M.A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. **J. Mol. Biol.**, v.29, p.:381-399, 1999.
- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, v.75, p.713-717, 1985.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S., SINGH, R.P., and KOHMOTO, K. (eds) Pathogenesis and host specificity in plant diseases. **Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Vol. 1 – Prokaryotes. Elsevier Science Ltda. Great Britain. p.185-197, 1995.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annu Rev Phytopathol**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L. AND MOLLENHAVER, H.H. Rickettsialike bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v.179, p.298-300, 1973.
- JACOMINO, A.P.; MODESTO, J.C.; BERETTA, M.J.G. et al. Transmissão controlada da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatol. Bras.**, v.18, agosto, 1993. Suplemento.
- JANG, A.; KIM, S.M.; KIM, S.Y.; LEE, S.G.; KIM, I.S. Effect of heavy metals (Cu, Pb, and Ni) on the compositions of EPS in biofilmes. **Water Sci. Technol.**, v.43, n.6, p. 41-48, 2001.

- KAMIZOMO, A., NISHIZAWA, M., TERANISHI, A., MURATA, K.; KIMURA, A. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v.219, p.161-167, 1989.
- KAMPER, S.M.; FRENCH, W.J.; DEKLOET, S.R. Genetic relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.35, p. 185-188, 1985.
- KAZY, S.K.; SAR, P.; SINGH, S.P.; SEN, A.K.; D'SOUZA, S.F. Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.18, p.583-588, 2002.
- KITAJIMA, E.W.; BAKARCIC, M.; FERNANDES-VALIEGA, M.V. Association of rickettsia like bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathology**, v.65, p.476-479, 1975.
- KOHARA, Y.; AKIYAMA, K.; ISONO, K. The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a larger genomic library. **Cell**, v.50, p.495-508, 1987.
- LACAVAL, P.M. AND MIRANDA, V.S. Utilização de provas bioquímicas na caracterização da bactéria *Xylella fastidiosa* dos citros. **Summa Phytopathology**, v.26, p.124-125, 2000.
- LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. **Int J Antimicrob Agents.**, v.22, p.188-99, 2003.
- LAMANNA, C.; MALLETE, M.F.; ZIMMERMAN, L.N. Its biological and chemical background. **Basic bacteriology**, p.1149, 1973.
- LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.; CAMARGO, L.E.; GOLDMAN, G.H. A genomic approach to the understanding of the *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.3, n.5, p.459-462, 2000.
- LANGLEY, S. AND BEVERIDGE, T.J. Metal binding by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is influenced by growth of the cells as a biofilm. **Can. J. Microbiol.**, v. 45, p. 616–622, 1999.
- LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica temporal e espacial da clorose variegada dos citros**. Piracicaba, 1997. p.150. Mestrado (Dissertação) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP, Piracicaba.

- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; HOOHER, M.E. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis a new disease of citrus in Brazil. **Annu. Meet. Fla. State Hort. Soc.**, v.105, p.32-35, 1992.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H. et al. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathol.**, v.19, p.123-125, 1993.
- LEE, S.M.; GRASS, G.; HANEY, C.J.; FAN, B.; ROSEN, B.P.; ANTON, A.; NIES, D.H.; RENSING, C. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. **Summa Phytopathol.**, v.215, p.273-278, 2002.
- LEITE, B.; ISHIDA, M.L; ALVES, E.; CARRER, H.; PASCHOAL, S.F.; KITAJIMA, E.W. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca<sup>2+</sup> and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.35, n.6, p.645-650, 2002.
- LEITE JUNIOR, R.P. & LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathol.**, v.17, p.7, 1991.
- LEMOES E.G.; ALVES, L.M.; CAMPANHARO, J.C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.219, 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 Dis.**, v.77, p.642-646, 1993.
- LI, W.B.; PRIA, JR, W.D.; LACAVA, P.M.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathol.**, v.93, n.8, p.953-958, 2003.
- LIVAK, K.J AND SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, p.329-344, 1999.
- LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Revista Laranja**, v.17, p.79-92, 1996.



- LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R. et al. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatol. Bras.** Brasília, v.21, p.343, 1996. Suplemento.
- MACHADO, M.A., COLETTA-FILHO, H.D., SOUZA, A.A., TAKITA, M.A.; KURAMAE, E.E. O projeto genoma da *Xylella fastidiosa*. In: Luz, W.C. (ed) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p. 63-77, 2001.
- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 6: p. 53-57, 1994.
- MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation- cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p.3375-3380, 2001.
- MAH, T.F.C AND O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, p.34-39, 2001.
- MAH, T.F; PITTS, B.; PELLOCK, B.; WALKER, G.C.; STEWART, P.S.; O'TOOLE, G.A. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. **Nature**, v.426, p.306-310, 2003.
- MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P.; REID, D.M. & OLSON, M.E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. **Plant Dis.**, v.86, p.633-638, 2002.
- MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemíptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffe arábica* L.** Piracicaba, 2003. p.139. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP.
- MCELDRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effects of walter stress on symptomatology and growth of Parthenocissus quinquefolia infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant. Dis.**, v. 85, p. 1160-1164, 2001.
- MEDINA, C.L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica.** Campinas, SP: (s.n.), Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de biologia. p, 147, 2002.

- MEIDANIS, J.; BRAGA, M.D.V.; ALMEIDA-VERJOVSKI, S. Whole-Genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiol Mol Biol.**, v.66, p.272-299, 2002.
- MENG, Y.; LI, Y.; GALVANI, C.D.; HAO, G.; TURNER, J.N.; BURR, T.J. & HOCH, H.C. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **J. Bacteriol.**, v.187, p.5560-5567, 2005.
- MIRANDA, V.S. AND LACAIVA, P.M. Teste de sensibilidade da bactéria *Xylella fastidiosa* dos citros frente a agentes antimicrobianos. **Summa Phytopathology**, v.26, p.124, 2000.
- MIRCETICH, S.M.; LOWE, S.K.; MOLLER, W.J. et al. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, v.66, p.17-24, 1976.
- MITTELMAN, M.W. AND GEESEY, G.G. Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p.846-851, 1985.
- MITRA, B. AND SHARMA, R. The cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*, is not essential for its function. **Biochemistry**, v.40, p.7694-699, 2001.
- MOLIN, S. AND TOLKER-NIELSEN, T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.14, p.255-261, 2003.
- MOSQUEDA, G. AND RAMOS, J.L. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas*. **J. Bacteriol.**, v.182, p.937- 943, 2000.
- MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; GHANNOUM, M.A. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. **Infect Immun.**, v. 71, p. 4333-4340, 2003.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H. & LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.101, p.1737-1742, 2004.
- NIES, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev.**, v.27, p.313-39, 2003.

- NIES, D.H. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. **J. Bacteriol.**, v.174, p.8102-8110, 1992.
- NIKAIDO, H. AND ZGURSKAYA, H.I. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.3, p.215-218, 2001.
- NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Rev Biotechnol Ciênc & Desenv.**, v.33, p.10-13, 2004.
- ORDERMATT, A.; KRAPF, R.; SOLIOZ, M. Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> extrusion by CopB. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.202, p.44-48, 1994.
- ORDERMATT, A. AND SOLIOZ, M. Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.4349-4357, 1995.
- ORDERMATT, A.; SUTER, H.; KRAPF, R.; SOLIOZ, M. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.12775-12779, 1993.
- OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.236, p. 313-318, 2004.
- O' TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.54, p.49-79, 2000.
- PARADELLA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.23, n.1, p.46-49, 1995.
- PASHALIDIS, S.; MOREIRA, L.M.; ZAINI, P.A.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.; CIAPINA, L.P.; VENCIO, R.Z.; LEMOS, E.G.; DA SILVA, A.M. & DA SILVA, A.C. Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. **OMICS**, v.9, p.77-90, 2005.
- PATTERY, T.; HERNALSTEENS, J.P.; DE GREVE, H. Identification and molecular characterization of a novel *Salmonella enteritidis* pathogenicity islet encoding an ABC transporter. **Mol Microbiol Biotechnol.**, v. 33, p.791-805, 1999.

- PAULSEN, I.T.; PARK, J.H.; CHOI, P.S.; SAIER, M.H. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.156, p.1-8, 1997.
- PAULSEN, I.T. AND SAIER, M.H. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. **J. Membr. Biol.**, v.156, p.99-103, 1997.
- PAULSEN, I.T.; SLIWINSKI, M.K.; NELISSEN, B.; GOFEAU, A.; SAIER, M.H. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v.430, p.116-125, 1998.
- PLATT, R.M.; GEESEY, G.G.; DAVIS, J.D.; White, D.C. Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p.675-680, 1985.
- POOLE K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **J Appl Microbiol.**, v.92, p.55S-64S, 2002.
- POOLE K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v.3, p.255-264, 2001.
- PURCELL, A.H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE CITROS, 3., Bebedouro, 1994. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p.195-209.
- PURCELL, A.H. AND FINALAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, v.69, n.4, p.393-395, 1979.
- PURCELL, A.H. AND HOPKINS D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu Rev Phytopathol.**, v.34, p.131-151,1996.
- PURCELL, A.H. AND SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strain of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Dis.**, v.83, p.825-830, 1999.
- RAHMATI, S.; YANG, S.; DAVIDSON, A.L. & ZECHIEDRICH, E.L. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. **Mol. Microbiol.**, v.43, p.677-685, 2002.

- RAJU, B.C. AND WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. **Plant Dis.**, v.70, n.3, p.182-186, 1986.
- RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T.F.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **J Antimicrob Chemother.**, v.49, p. 973-80, 2002.
- RAMOS, J.L., DUQUE, E., GODOY, P.; SEGURA, A. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT1E. **J. Bacteriol.**, v.180, 3p.323-3329, 1998.
- RAND, J.D.; DANBY, S.G.; GREENWAY, D.L.A.; ENGLAND, R.R. Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.207, p.91-95, 2002.
- REDDY, J.D.; REDDY, S.L.; HOPKINS, D.L.; GABRIEL, D.W. TolC is Required for Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* Grapevines. **Mol Plant Microbe Interact.**, v.20, p.403-410, 2007.
- RENSING, C.; FAN, B.; SHARMA, R.; MITRA, B.; ROSEN, B.P. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.652-656, 2000.
- RENSING, C. AND GRASS, G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.27, p.197-213, 2003.
- RENSING, C.; GHOSH, M.; ROSEN, B.P. Families of softmetal- ion-transporting ATPases. **J. Bacteriol.**, v.181, p.5891-5897, 1999.
- RIBEIRO, M.P.M.A. **Resistência a antibióticos, variabilidade genética e perfil protéico da *Xylella fastidiosa***. 2002. p.130. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba.
- RIBEIRO, M.D.; DELLIAS, M.D.; TSAI, S.M.; BOLMSTRON, A.; MEINHARDT, L.W. & BELLATO, C.D. Utilization of the Etest Assay for Comparative Antibiotic Susceptibility Profiles of Citrus Variegated Chlorosis and Pierce's Disease Strains of *Xylella fastidiosa*. **Curr Microbiol.**, v.51, p.262-266, 2005.
- RIGGLE, P.J. AND KUMAMOTO, C.A. Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. **J. Bacteriol.**, v.182, p.4899-4905, 2000.

- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F.  
Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*,  
*Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* em citros. **Fitopatol. Bras.**,  
v.21, p.517-518, 1996.
- ROGERS, S.D.; BHAVE, M.R.; MERCER, J. F. B.; CAMAKARIS, J.; LEE,  
B.T.O. Cloning and characterization of *cutE*, a gene involved in copper  
transport in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.173, p.6742-6748, 1991.
- ROSA, D. **Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento  
fastidioso de *Leifsonia xily* subsp. *xyl***. 2006. p.34. Dissertação (Mestrado).  
Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; CHAGAS, C.M. Ensaio de transmissão de  
clorose variegada dos citros (CVC) em campo. **Fitopatol. Bras.**, v.20, p.351,  
1995.
- ROSSETTI, V. AND DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos Citros: **revisão.**  
**Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.1-14, 1990.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. et al. Présence de bactéries dans le  
xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des  
agrumes au Brésil. **C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.**, v.310, p.345-349, 1990.
- ROUCH, D.; CAMAKARIS, J.; LEE, B.T.O. Copper transport in *E. coli*, p. 469-477.  
In D. H. Hamer and D. R. Winge (ed.), **Metal ion homeostasis: molecular  
biology and chemistry**. Alan R. Liss, Inc., New York 1989.
- SAIER, M.H.J. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanings  
evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. **Microbiol.  
Rev.**, v.58, p.71-93, 1994.
- SÁNCHEZ, L.; PAN, W.; VIÑAS, M.; NIKAIDO, H. The *acrAB* homolog of  
*Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. **J.  
Bacteriol.**, v.179, p.6855-6857, 1998.
- SANDERLIN, R.S. AND HEYDERICH-ALGER, K.I. Evidence that *Xylella*  
*fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan. **Plant Dis.**, v.84, n.12,  
p.1282-1286, 2000.
- SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; DASSA, E. Getting in or out: early segregation  
between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette  
(ABC) transporters. **J. Mol. Evol.**, v.48, p.22-41, 1999.

- SCHAAD, N.W. et al. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.27, p.290-300, 2004.
- SHAFER, W.M.; VEAL, W.L.; LEE, E.H.; ZARANTONELLI, L.; BALTHAZAR J.T.; ROUQUETTE, C. Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v.3, p.219-224, 2001.
- SHEPS, J.A.; RALPH, S.; ZHAO, Z.; BAILLIE, D.; LING, V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.*, v.5, p.1-17, 2004.
- SHIRAISHI, E.; INOUHE, M.; JOHO, M.; TOHOYAMA, H. The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.*, v.37, p.79-86, 2000.
- SILVA, F. DE A. S. E. AND AZEVEDO, C. A. V. DE. A New Version of The Assistat Statistical Assistance Software. In: World Congress On Computers In Agriculture, 4, Orlando-FL-USA: **Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers**, p.393-396, 2006.
- SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v.40, p.151-159, 2000.
- SMOLKA M.B.; MARTINS, D.; WINCK, F.V.; SANTORO, C.E.; CASTELLARI, R.R.; FERRARI, F.; BRUM I.J.; GALEMBECK, E.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; MARANGONI, S. & NOVELLO J. C. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics*, v.3, p. 224-37, 2003.
- SNAVELY, M.D.; FLORER, J.B.; MILLER, C.G.; MAGUIRE, M.E. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: 28Mg<sup>2+</sup> transport by CorA, MgtA, and MgtB systems. *J. Bacteriol.*, v.171, p.4761-4766, 1989.
- SOLIOZ, M. AND VULP, C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.*, v.21, p.237-241, 1996.

- SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; BARATA, R.M.; CAMARGO, L.E.A.; MACHADO, M.A. Genômica Funcional de Bactérias Fitopatogênicas . **Revisão anual de patologia de plantas**, Passo Fundo -RS, v. 14, p. 1-57, 2006.
- SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Mol Plant Microbe Interact**, v.16, p.867-875, 2003.
- SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.237, p.341-353, 2004.
- SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; PEREIRA, E.O.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in plant. **Curr. Microbiol.**, v.50, p.223-228, 2005.
- ST. GEME, J.W.; CUTTER, D.; BARENKAMP, S.J. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. **J. Bacteriol.**, v.178, p.6281-6287, 1996.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol.**, v.56, p.187-209, 2002.
- STURR, M.G.; ABLOOGLU, A.J.; KRULWICH, T.A. A *Bacillus subtilis* locus encoding several gene products affecting transport of cation. **Gene.**, v.188, p.91-94, 1997.
- TEITZEL, G.M AND PARSEK, M.R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.2313-2320, 2003.
- TOTTEY, S.; RICH, P.R.; RONDET, S.A.M.; ROBINSON, N.J. Two Menkes-type ATPases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.19999-20004, 2001.



- TSAI, K.J.; LIN, Y.F.; WONG, M.D.; YANG, H.H.C.; FU, H.L.; ROSEN, B.P.  
 Membrane topology of the pl258 CadA Cd(II)/ Pb(II)/Zn(II)-translocating P-  
 type ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.34, p.147-156, 2002.
- VAN DER ZAAL, B.J.; NEUTEBOOM, L.W.; PINAS, J.E.; CHARDONNENS,  
 A.N.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.C.; HOOYKAAS, P.J.J. Overexpression of  
 a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from  
 animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. **Plant Physiol.**,  
 v.119, p.1047-1055, 1999.
- VEAL, W.L.; NICHOLAS, R.A.; SHAFER, W.M. Overexpression of the MtrC-  
 MtrD-MtrE efflux pump due to an *mtrR* mutation is required for  
 chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **J.**  
 **Bacteriol.**, v.184, p.5619-5624, 2002.
- ZGURSKAYA, H. I. AND NIKAIDO, H. Multidrug resistance mechanisms: drug  
 efflux across two membranes. **Mol. Microbiol.**, v. 37, n.2, p.219-225, 2000.
- WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M.J.; GAY, N.J. Distantly related  
 sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases  
 and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.  
 **EMBO J.**, v.1, p.945-951, 1982.
- WANG, W.; GUFANTI, A.A.; WEI, Y.; ITO, M.; KRULWICH, T.A. Two types of  
 *Bacillus subtilis* tetA(L) deletion strains reveal the physiological importance of  
 TetA(L) in K $\phi$  acquisition as well as in Na $\phi$ , alkali, and tetracycline resistance.  
 **J. Bacteriol.**, v.182, p.2088-2095, 2000.
- WEEBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the  
 citrus industry. In: REUTHER, W. WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.).  
 **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1967. v.1, p.1-39.
- WELLS, H.J. AND RAJU, B.C. Cellular fatty acid composition of six fastidious  
 Gram-negative, xylem-limited bacteria from plants. **Curr. Microbiol.**, v.10,  
 p.231-236, 1984.
- WELLS, H.J.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y. *Xylella fastidiosa*: gram-negative, xylem-  
 limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* ssp. **Int. J. Syst.**  
 **Bacteriol.**, v.37, p.136-143, 1987.

- WELLS, H.J.; RAJU, B.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Medium for the isolation and growth of the bacteria associated with plum leaf scald and phony peach disease. **Appl. Environ. Microbiol**, v.42, p.357-363, 1981.
- WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Can. J. Microbiol**, v. 34, p.415-420, 1988.
- WHITCHURCH, C.B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C.; MATTICK, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v.295, p.1487, 2002.
- WUNDERLI-YE, H. AND SOLIOZ, M. Purification and functional analysis of the copper ATPase CopA of *Enterococcus hirae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.280, p.713-719, 1999.
- YANG, S.; LOPEZ, C.R.; ZECHIEDRICH, E.L. Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, p.2386-2391, 2006.