

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*
PV CAMPESTRIS NA INTERAÇÃO COM A PLANTA HOSPEDEIRA *BRASSICA*
*OLEARACEA***

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Conselho de Administração**

Luis Carlos Guedes Pinto

Presidente

Silvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Helio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes

Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 93

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE
XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV CAMPESTRIS NA
INTERAÇÃO COM A PLANTA HOSPEDEIRA BRASSICA
OLEARACEA**

**Aretusa E. Andrade
Glenda C. Felix
Angelica C. Oliveira
Eliane F. Noronha
Jackeline L. Pereira
Luzia H. C. Lima
Yoko B. Rosato
Jorge A. T. Melo
Carlos Bloch Jr
Angela Mehta**

Brasília, DF
2005

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)

3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Marante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

- E 96 Expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas campestris* pv na interação com a planta hospedeira *Brassica oleracea* / Aretusa E. Andrade ... [et. al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 14.p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 93)

1. Podridão negra. 2. Couve. 3. 2-DE. 3. Análise química. 4. Expressão *in vivo*. I. Felix, Glenda C. II. Oliveira, Angelica C. III. Noronha, Eliane F. IV. Pereira, Jackeline L. V. Lima, Luzia H. C. VI. Rosato, Yoko B. VII. Melo, Jorge A. T. VIII. Bloch Junior, Carlos. IX. Mehta, Ângela. X. Série.

632.4 – CDD 21

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. 1. Linhagens bacterianas e condições de cultura | 11 |
| 2. 2. Infiltração e recuperação de células bacterianas de folhas de Brassica oleracea | 11 |
| 2. 3. Extração de proteínas | 13 |
| 2. 4. Eletroforese bidimensional de proteínas | 13 |
| 2. 5. Espectrometria de massa e análise dos dados | 14 |
| 2. 6. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares | 14 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 15 |
| 4. AGRADECIMENTOS | 19 |
| 5. REFÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 20 |

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV *CAMPESTRIS* NA INTERAÇÃO COM A PLANTA HOSPEDEIRA *BRASSICA OLEARACEA*

Aretusa E. Andrade¹

Glenda C. Felix²

Angelica C. Oliveira³

Eliane F. Noronha⁴

Jackeline L. Pereira⁵

Luzia H. C. Lima⁶

Yoko B. Rosato⁷

Jorge A. T. Melo⁸

Carlos Bloch Jr⁹

Angela Mehta¹⁰

RESUMO

O gênero *Xanthomonas* possui várias espécies que causam grandes prejuízos para a agricultura em todo o mundo. No Brasil, uma das espécies de maior relevância é a *X. campestris* pv. *campestris* responsável pela podridão negra em crucíferas. Este patógeno é responsável por perdas substanciais em várias culturas incluindo repolho, couve, brócolis, entre outras. Embora a seqüência do genoma dessa bactéria tenha sido revelada, há pouca informação sobre a expressão de genes e proteínas deste patógeno em condições controladas ou na interação com a planta hospedeira. O objetivo do presente trabalho foi analisar as

¹ Faculdade da Terra de Brasília-FTB, Brasília, DF

² Faculdade da Terra de Brasília-FTB, Brasília, DF

³ Centro Universitário de Brasília, Brasília, DF

⁴ Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF

⁵ Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF

⁶ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁷ Universidade Estadual de Campinas, Campinas

⁸ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília

⁹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília

¹⁰ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília

proteínas de *X. campestris* pv. *campestris* expressas durante a interação com a planta hospedeira *Brassica oleracea*. A bactéria foi infiltrada nas folhas da planta suscetível e posteriormente recuperadas para análise. As células recuperadas foram utilizadas para extração de proteínas e separadas através de eletroforese bidimensional. O perfil obtido foi comparado ao da bactéria cultivada em meio complexo NYG. Algumas proteínas diferenciais observadas foram analisadas através de espectrometria de massa e identificadas utilizando o Programa Mascot. Foi realizada também a determinação da atividade de algumas enzimas hidrolíticas extracelulares de *X. campestris* pv. *campestris* *in vivo*, envolvidas na degradação da parede celular das células hospedeiras, incluindo xilanases, α -arabinofuranosidases e celulases.

Palavras-chave: *Xanthomonas*; interação planta-patógeno, 2-DE, espectrometria de massa, expressão *in vivo*.

ABSTRACT

The genus *Xanthomonas* is formed by several species which cause severe losses in agriculture around the world. In Brazil, one of the most relevant species is *X. campestris* pv. *campestris*, which is responsible for black rot in cruciferous plants. This pathogen causes yield losses in several cultures, including cabbage, cauliflower and broccoli. Although the sequence of this bacterium has been revealed, there is little information about the gene and protein expression of this pathogen in controlled environmental condition or in the interaction with the host plant. The objective of the present work was to analyze the proteins of *X. campestris* pv. *campestris* expressed during the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. The bacterium was infiltrated in leaves of the susceptible plant and later recovered for analysis. The recovered cells were used for protein extraction and separated by bidimensional gel electrophoresis. The profile obtained was compared to that of the bacterium cultured in the complex medium NYG. Some differentially expressed proteins were analyzed by mass spectrometry and identified using the Mascot Program. The activity of some hydrolytic extracellular enzymes of *X. campestris* pv. *campestris* *in vivo*, involved in the degradation of the cell wall of the host cells, was also determined in this study, including xylanases, α -arabinofuranosidases and cellulases.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira e mundial é bastante afetada por várias doenças causadas por espécies do gênero *Xanthomonas*, ocasionando assim perdas substanciais em várias culturas de grande importância econômica. A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é considerada uma das doenças mais destrutivas de crucíferas. A família Cruciferae/Brassicaceae inclui uma grande variedade de culturas de importância econômica cultivadas para alimentação, preparo de condimentos e plantas ornamentais. A podridão negra ocorre em todas as regiões produtoras de crucíferas em todo o mundo causando perdas na produção e qualidade das culturas. Atualmente, essa doença tem sido parcialmente controlada pela utilização de cultivares resistentes. Entretanto, essa bactéria ainda representa uma ameaça para agricultura do país e portanto, métodos mais eficientes de controle dessa doença devem ser desenvolvidos. Embora a sequência do genoma de *X. campestris* pv. *campestris* tenha sido revelada, informações a respeito da expressão de proteínas e genes desse patógeno em condições controladas ou na interação com a planta hospedeira permanecem escassos.

O interesse em análises de proteoma tem aumentado recentemente devido ao alto número de seqüências disponibilizadas pelos projetos de sequenciamento de genomas. O estudo do proteoma de um organismo pode ser realizado pela exploração da alta capacidade de resolução da eletroforese bidimensional (2-DE) (JUNGBLUT e WITTMANN-LIEBOLD, 1995) acoplada à análise das massas dos peptídeos das proteínas através da espectrometria de massa. Estes dados, quando complementados pelos dados de sequenciamento de genomas, permitem a identificação de proteínas envolvidas na patogenicidade ou no crescimento celular em larga escala. As técnicas de proteoma (2-DE e espectrometria de massa) têm tido grandes avanços recentes e têm sido considerados métodos importantes para compreender e identificar a função de genes e proteínas (JOO e KIM, 2005). Desta forma, a análise de genoma através do estudo das proteínas expressas revela informações relevantes sobre a expressão, regulação e modificações na transcrição e tradução (JUNGBLUT e WITTMANN-LIEBOLD, 1995). Esta abordagem tem sido utilizada para vários microrganismos como *Helicobacter pylori*, *Thiobacillus ferrooxidans*, entre outros (BUMANN et al., 2002; HE et

al., 2005) e várias proteínas têm sido identificadas. Em *Chlamydia trachomatis* por exemplo, 250 proteínas foram identificadas por espectrometria de massa de um total de 700 spots observados no gel de poliacrilamida, sendo que 144 representavam genes distintos (SHAW et al., 2002).

Em bactérias fitopatogênicas, esta abordagem tem sido raramente empregada. A expressão de proteínas de *X. fastidiosa* no meio BCYE foi recentemente reportada e 111 proteínas foram identificadas por espectrometria de massa (SMOLKA et al., 2003). Atualmente, pouco se sabe a respeito da expressão gênica de espécies de *Xanthomonas* em diferentes condições biológicas. Alguns genes e algumas proteínas diferencialmente expressas em resposta a presença de extrato de folhas foram identificadas (MEHTA E ROSATO, 2001; TAHARA et al., 2003). Embora genes de *Xanthomonas* envolvidos na patogenicidade já tenham sido isolados, os mecanismos de patogenicidade não estão bem estabelecidos. O envolvimento de polissacarídeos e enzimas extracelulares que degradam a parede celular das plantas hospedeiras no processo de infecção desta bactéria já é bem conhecido (SILVA et al., 2002), entretanto não se têm estudos a respeito da detecção e quantificação da expressão dessas enzimas em condições *in vivo*.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão de proteínas de *X. campestris* pv. *campestris* na interação com a planta hospedeira e realizar a análise da atividade de algumas enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo as atividades de celulasas, xilanases e α -arabinofuranosidases. Recentemente foi desenvolvido um método para a recuperação de células de *X. axonopodis* pv. *citri* de folhas de *Citrus sinensis* infiltrada, possibilitando uma análise da expressão *in vivo* (MEHTA e ROSATO, 2003). Este método foi utilizado no presente trabalho para *X. campestris* pv. *campestris* na tentativa de identificar proteínas expressas durante a interação planta-patógeno.

2. MATERIAL E METÓDOS

2. 1. Linhagens bacterianas e condições de cultura

X. campestris pv. *campestris* 11078 (ATCC 33913), obtida da coleção de culturas de bactérias fitopatogênicas do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), foi utilizada no presente estudo. Esta linhagem bacteriana, utilizada para o sequenciamento do

genoma, foi cultivada em meio complexo Nutrient Yeast Glycerol (NYG) (DANIELS et al., 1984) a 28 °C.

2. 2. Infiltração e recuperação de células bacterianas de folhas de *Brassica oleracea*

A infiltração e recuperação de células bacterianas de folhas da planta hospedeira foram realizadas conforme MEHTA e ROSATO (2003). Folhas jovens de repolho (*B. oleracea*), da variedade suscetível Coração de Boi foram infiltradas com *X. campestris* pv. *campestris*. Para a preparação do inóculo, a bactéria foi cultivada em meio NYG por aproximadamente 18 horas para a obtenção de massa celular. As células foram centrifugadas, lavadas e resuspendidas em água destilada, e a suspensão ajustada para aproximadamente $A_{600}=0.6$. A suspensão foi então utilizada para infiltrar 4-6 folhas jovens por planta utilizando uma seringa.

Para o estudo de dinâmica de população bacteriana, discos de 6 mm de diâmetro foram cortados das folhas infiltradas nos tempos 0 (logo após a infiltração), 1, 2, 4 e 6 dias após a infiltração, macerados em 1 ml de água destilada estéril e 100 μ l das diluições foram plaqueadas em meio NYG.

Para a análise da expressão diferencial, as folhas infiltradas foram coletadas 6 dias após a infiltração e descontaminadas com água corrente. As folhas foram cortadas em pedaços utilizando uma lâmina estéril e mantidas por 45 min em placas de Petri estéreis contendo 20 ml de água destilada. As folhas foram separadas da suspensão através de pipetagem da solução, a qual foi centrifugada. As células bacterianas foram lavadas com água e utilizadas para a extração de proteínas. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para as análises de atividade de enzimas extracelulares conforme descrito abaixo. O perfil de proteínas da bactéria cultivada *in vivo* foi comparado ao da bactéria cultivada em meio complexo NYG, utilizado como controle. A bactéria foi cultivada por 12 h em meio NYG, atingindo aproximadamente $A_{600}=1,2$, e posteriormente utilizada para extração de proteínas.

2. 3. Extração de proteínas

Proteínas totais foram extraídas das células bacterianas de acordo com de Mot e Vanderleiden (1989). Foi utilizado um tampão de extração (0,7 M sacarose, 0,5 M TrisHCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl e 40 mM DTT) e o mesmo volume de fenol. As proteínas foram lavadas com acetato de amônia 0,1 M em metanol e acetona 80%, secadas e solubilizadas em 30 µl de tampão de lise (9,8 M ureia, 0.2% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 100 mM DTT e 2% (v/v) de uma mistura de anfólitos de pH 5-8 e pH 3-10 (BioRad) em uma razão de 5:1). As amostras foram armazenadas a -20 °C. A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976).

2. 4. Eletroforese bidimensional de proteínas

A eletroforese de primeira dimensão foi realizada de acordo com Mot e Vanderleiden (1989). Um gel de poliacrilamida contendo 3,6% acrilamida, 0,21% bis-acrilamida, 7,2% anfólitos pH 5-7 e 3-10 na proporção de 5:1 (v/v); 2% Nonidet P-40 e 55% ureia foi utilizado. Aproximadamente 150 µg de proteínas foram aplicados neste gel após uma pré-corrida. A eletroforese foi realizada a 400 V por 18h, utilizando NaOH 20 mM no compartimento superior e H₃PO₄ 10 mM no compartimento inferior da cuba. Para a eletroforese de segunda dimensão, foi utilizado SDS-PAGE (“sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis”) conforme descrito por Laemmli (1970). Cada gel cilíndrico da primeira dimensão foi colocado sobre o gel SDS-PAGE da segunda dimensão. A eletroforese foi realizada utilizando tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM, glicina 0.192 mM e SDS 0.1%, pH 8.3) e o marcador de massa molecular “Benchmarck Protein Ladder” (Invitrogen). A coloração das proteínas foi realizada utilizando nitrato de prata de acordo com Blum et al. (1987) ou Comassie blue.

2. 5. Espectrometria de massa e análise dos dados

Proteínas diferenciais foram excisadas do gel e enzimaticamente clivadas em fragmentos de peptídeos utilizando tripsina de acordo com a metodologia descrita por Schevchenko et al. (1996). Os peptídeos foram extraídos e purificados para análise por espectrometria de massa. As amostras foram dessalinizadas utilizando a ponteira Perfectpure C-18 (Eppendorf) e os peptídeos foram analisados em MALDI-TOF Voyager DE STR (Applied Biosystems Inc.). Os perfis de massa obtidos foram utilizados para a identificação das proteínas utilizando o programa Mascot.

2. 6. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas extracelulares

As análises de atividade de enzimas hidrolíticas secretadas por *X. campestris* pv. *campestris* na condição *in vivo* foram realizadas utilizando métodos colorimétricos previamente estabelecidos. Foi analisado o sobrenadante da solução de recuperação de *X. campestris* pv. *campestris* de folhas infiltradas, após centrifugação, a qual deve conter as enzimas secretadas (Tratamento). Como controle, foram utilizadas folhas de repolho infiltradas com água destilada estéril (Controle).

As atividades de celulasas (atividade celulolítica) contra celulose cristalina e de xilanases (atividade xilanolítica) foram determinadas conforme descrito por Lowe et al (1987), sendo que para as celulasas foi utilizado papel de filtro como substrato. Uma unidade de atividade celulolítica e xilanolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor e xilose, respectivamente, a cada minuto de reação. Para a análise da atividade enzimática de α -arabinofuranosidases foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- α -D-arabinofuranosídeo, conforme F. Filho et al (1996). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,1 unidade a absorbância a 410 nm a cada minuto de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, proteínas de *X. campestris* pv. *campestris* expressas na condição *in vivo* foram analisadas. Inicialmente, foi realizada dinâmica de população da bactéria na condição *in vivo*. A análise do crescimento celular nos diferentes tempos revelou que

1 dia após a infiltração da bactéria na planta, houve uma queda da população bacteriana (de $5,4 \times 10^6$ UFC/cm² para $1,6 \times 10^5$ UFC/cm²). O crescimento foi retomado após 2 dias ($1,4 \times 10^7$ UFC/cm²) e mantido aos 4 ($1,8 \times 10^7$ UFC/cm²) e 6 dias após a inoculação ($3,8 \times 10^7$ UFC/cm²), com um ligeiro aumento da população após 4 dias. Foi possível observar o início dos sintomas da podridão negra 3 dias após a inoculação (amarelecimento da área infiltrada) e início de necrose do tecido vegetal aos 6 dias após a inoculação (Figura 1). Após este período, foi observada necrose acentuada e queda das folhas e portanto as coletas das folhas para a recuperação de *X. campestris* pv. *campestris* foram realizadas 6 dias após a inoculação.

A análise das proteínas de *X. campestris* pv. *campestris* *in vivo* e cultivada em NYG foi realizada através de 2-DE. Os géis obtidos revelaram um total de aproximadamente 150 a 200 proteínas por gel, variando em massa de 10 a 120 kDa e pI de 4 a 8 (Figura 2). A maior parte das proteínas apresentou pI ácido, entre 4 e 6. Foi também observado um maior número de proteínas no mapa da bactéria cultivada em NYG. Resultados semelhantes foram reportados por Mehta e Rosato (2001) na comparação de *X. axonopodis* pv. *citri* cultivada na presença de extrato da planta hospedeira e no meio NYG. É possível que a presença de nutrientes e o acentuado crescimento celular no meio complexo favoreçam a expressão de um maior número de proteínas envolvidas na síntese e degradação de compostos.

A comparação do mapa da bactéria *in vivo* com o da bactéria cultivada em NYG revelou 17 proteínas diferencialmente expressas, sendo 9 induzidas (spots iv3, iv6, iv7, iv9, iv10, iv12, iv14, iv15 e iv16), 1 reprimida (spot iv13) e 7 novas (spots iv1, iv2, iv4, iv5, iv8, iv11 e iv17) (Figura 2). Foram também observadas 20 proteínas presentes apenas no mapa da bactéria cultivada em meio complexo (Figura 2). Para verificar se as proteínas diferenciais observadas no perfil *in vivo* representavam proteínas de repolho, foi realizada extração de proteínas utilizando folhas sadias de repolho. O mesmo procedimento utilizado para a recuperação de *X. campestris* pv. *campestris* foi realizado, entretanto foram utilizadas folhas de repolho não infiltradas. Foi realizada extração de proteínas e 2-DE (Figura 3) e o mapa obtido revelou algumas proteínas na região ácida do gel, que também estavam presentes no perfil da bactéria *in vivo* (Figura 2). Estas proteínas foram desconsideradas da análise.

Cinco “spots” diferenciais da condição *in vivo* foram selecionados para análise por espectrometria de massa, entretanto foram obtidos perfis de massas para duas proteínas (iv3 e iv9). As outras três proteínas estavam em quantidade insuficiente para análise.

A análise dos perfis de massas dos peptídeos revelou que o spot iv3 (pI 5,0 e massa 17 kDa) apresentou similaridade com o fator de reciclagem do ribossomo (“ribosome recycling factor” - RRF) (20,4 kDa e pI calculado 6,7) de *X. campestris* pv. *campestris*. Esta proteína libera o ribossomo do mRNA no códon de terminação, entretanto em *Brucella melitensis*, este fator teve a função de uma proteínas de choque de temperatura (TEIXEIRA-GOMES et al., 2000). A expressão diferencial da RRF foi também reportada em *Staphylococcus aureus* durante a infecção animal (LOWE et al., 1998). Teixeira-Gomes et al. (2000) sugerem que esta proteína possa estar envolvida na patogenicidade em algumas bactérias, embora ela seja fator importante para o crescimento celular (JANOSI et al., 1994).

Outro “spot” identificado neste estudo foi o iv9 (28 kDa e pI 5,0) que apresentou similaridade com uma enoyl-CoA hidratase (28,6 kDa e pI calculado 5,8) de *X. campestris* pv. *campestris*. Esta enzima está envolvida com o catabolismo de ácidos graxos e pode ter papel importante na patogenicidade. O cluster de genes *rpf* (“regulation of pathogenicity factors”) tem sido extensamente reportado e estudado em *Xanthomonas* (BARBER et al., 1997; TANG et al., 1991; DOW et al., 2000; CROSSMAN e DOW, 2004). Este cluster é formado por pelo menos 8 genes (*rpfA-H*) envolvidos na síntese de enzimas extracelulares e polissacarídeos (DOW e DANIELS, 1994). Barber et al. (1997) reportaram que a seqüência de aminoácidos predita para a proteína *rpfF* mostrou similaridade com uma enoyl-CoA hidratase de *Rhizobium meliloti* e *Escherichia coli*. Sabe-se que mutações nos genes *rpfA-G* resultam em redução na produção de enzimas extracelulares e virulência. É possível que a enzima enoyl-CoA hidratase esteja envolvida na síntese de enzimas extracelulares de *X. campestris* pv. *campestris*, importantes para o processo de patogenicidade.

Foi também realizada neste estudo a determinação das atividades de enzimas hidrolíticas extracelulares, celulasas, xilanases e α -arabinofuranosidases. Para esta análise foi utilizado o sobrenadante obtido após centrifugação das células bacterianas

recuperadas das folhas infiltradas. Os resultados obtidos revelaram um aumento nas atividades de celulases e α -arabinofuranosidases (Tabela 1), quando comparadas ao controle. A presença de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação da parede celular tem sido amplamente reportada no gênero *Xanthomonas*. A podridão negra envolve degradação maciça de tecido vegetal e a análise do genoma de *X. campestris* pv. *campestris* revelou a presença de vários genes que codificam enzimas envolvidas neste processo, incluindo duas pectina esterases e poligalacturonases, cinco xilanases, quatro pectato liases e nove celulases (SLUYS et al., 2002). Embora estes genes tenham sido reportados em *X. campestris* pv. *campestris*, a detecção da atividade destas enzimas em condições *in vivo* não havia sido reportada anteriormente. Inesperadamente, neste estudo foi detectada uma menor atividade da xilanase na condição *in vivo* (Tabela 1). Como a coleta do material foi realizada no início do desenvolvimento dos sintomas, é possível que a sua maior atividade ocorra no final do processo de infecção. Estudos futuros devem ser realizados em diferentes tempos após a inoculação para verificar a expressão dessas enzimas durante o processo de infecção.

Tabela 1. Determinação das atividades enzimáticas dos sobrenadantes das infiltrações de folhas de repolho com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Tratamento) e com água destilada (Controle).

| | Controle ^a | Tratamento ^a |
|--|-----------------------|-------------------------|
| Atividade celulolítica-Fpase (U/ml⁻¹) | 0,33 | 0,46 |
| Atividade de α-Arabinofuranosidases (U/ml⁻¹) | 2,97 | 4,96 |
| Atividade xilanolítica (U/ml⁻¹) | 0,12 | 0,08 |

^a Os testes para determinação das atividades enzimáticas foram realizados em triplicata e o desvio padrão obtido foi menor que 12% das médias das atividades.

A metodologia de recuperação da bactéria da planta infiltrada utilizada neste estudo (MEHTA e ROSATO, 2003) foi previamente empregada para *X. axonopodis* pv. *citri* para a análise da expressão diferencial *in vivo* utilizando a técnica de cDNA RDA (Representational Difference Analysis) (MEHTA e ROSATO, 2005). Vários genes envolvidos com a patogenicidade foram identificados, incluindo *rpf*, hemolisina, entre outros (MEHTA e ROSATO, 2005). Neste estudo foi possível identificar dois genes, sendo que um deles (enoyl-CoA hidratase) pode estar diretamente envolvido na patogenicidade. Um maior número de proteínas deverá ser identificado por espectrometria de massa na tentativa de contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *X. campestris* pv. *campestris*.

4. AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da FAPDF/SCDT/CNPq.

5. REFÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARBER, C. E.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; PAN, M. Q.; WILSON, T. J.; SLATER, H.; DOW, J. M.; WILLIAMS, P.; DANIELS, M. J. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 24, p. 555-566, 1997.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, Germany, v. 8, p. 93-98, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUMANN, D.; AKSU, S.; WENDLAND, M.; JANEK, K.; ZIMNY-ARNDT, U.; SABARTH, N.; MEYER, T. F.; JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 3396-3403, 2002.

CROSSMAN, L.; DOW, J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, p. 623-629, 2004.

DANIELS, M. J.; BARBER, C. E.; TURNER, P. C.; SAWCZYK, M. K.; BYRDE, R. J. W.; FIELDING, A. H. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris*

pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **EMBO Journal**, Basingstoke, UK, v. 3, p. 3323-3328, 1984.

DOW, J. M.; DANEILS, M. J. Pathogenicity determinants and global regulation of pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In: DANGL, J. L. (Ed.). **Current Topics in Microbiology and Immunology**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. p. 29-41. Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals, v. 192.

DOW, J. M.; FENG, J. X.; BARBER, C. E.; TANG, J. L.; DANIELS, M. J. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the rpf gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, New York, v. 146, p. 885-891, 2000.

F. FILHO, E. X.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 168-173, 1996.

HE, Z. G.; HU, Y. H.; ZHONG, H.; HU, W. X.; XU, J. J. Preliminary proteomic analysis of *Thiobacillus ferrooxidans* growing on elemental sulphur and Fe²⁺ separately. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 38, p. 307-313, 2005.

JANOSI L.; SHIMIZU, I.; KAJI, A. Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 4249-4253, 1994.

JOO, W. A.; KIM, C. W. Proteomics of *Halophilic archaea*. **Journal of Chromatography, B, Amsterdam**, v. 815, p. 237-250, 2005.

JUNGBLUT, P.; WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 41, p. 111-120, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOWE, A. M.; BEATTIE, D.T.; DERESIEWICZ, R. L. Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 27, p. 967-976, 1998.

LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 1212-1223, 1987.

MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. A simple method for *in vivo* expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, p. 400-404, 2003.

MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**, Weinheim, Alemanha, v. 9, p. 1111-1118, 2001.

MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA. **Genetics and molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 140-149, 2005.

MOT, R. de; VANDERLEYDEN, J. Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, p. 960-967, 1989.

SHAW, A. C.; GEVAERT, K.; DEMOL, H.; HOORELBEKE, B.; VANDEKERCKHOVE, J.; LARSEN, M. R.; ROEPSTORFF, P.; HOLM A.; CHRISTIANSEN, G.; BIRKELUND, S. Comparative proteome analysis of *Chlamydia trachomatis* serovar A, D and L2. **Proteomics**, Weinheim, Alemanha, v. 2, p. 164-186, 2002

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry Washington, Washington**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, A. C. da; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SLUYS, M. A. van; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, p. 459-463, 2002.

SLUYS, M. A. van; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; MENCK, C. F.; SILVA, A. C. da; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, A. J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, USA, v. 40, p. 169-89, 2002.

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**, Weinheim, Alemanha, v. 3, p. 224-237, 2003.

TAHARA, S. T.; MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in the interaction with leaf extract of the host plant (*Passiflorae edulis*). **Proteomics**, Weinheim, Alemanha, v. 3, p. 95-102, 2003.

TANG, J. L.; LIU, Y. N.; BARBER, C. E.; DOW, J. M.; WOOTTON, J. C.; DANIELS, M. J. Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, Germany, v. 226, p. 409-417, 1991.

TEIXEIRA-GOMES, A. P.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M. S. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 2954-2961, 2000.



Figura 1. Folhas de repolho (Coração de Boi) 6 dias após a inoculação com *X. campestris* pv. *campestris*, mostrando o início da necrose (setas).

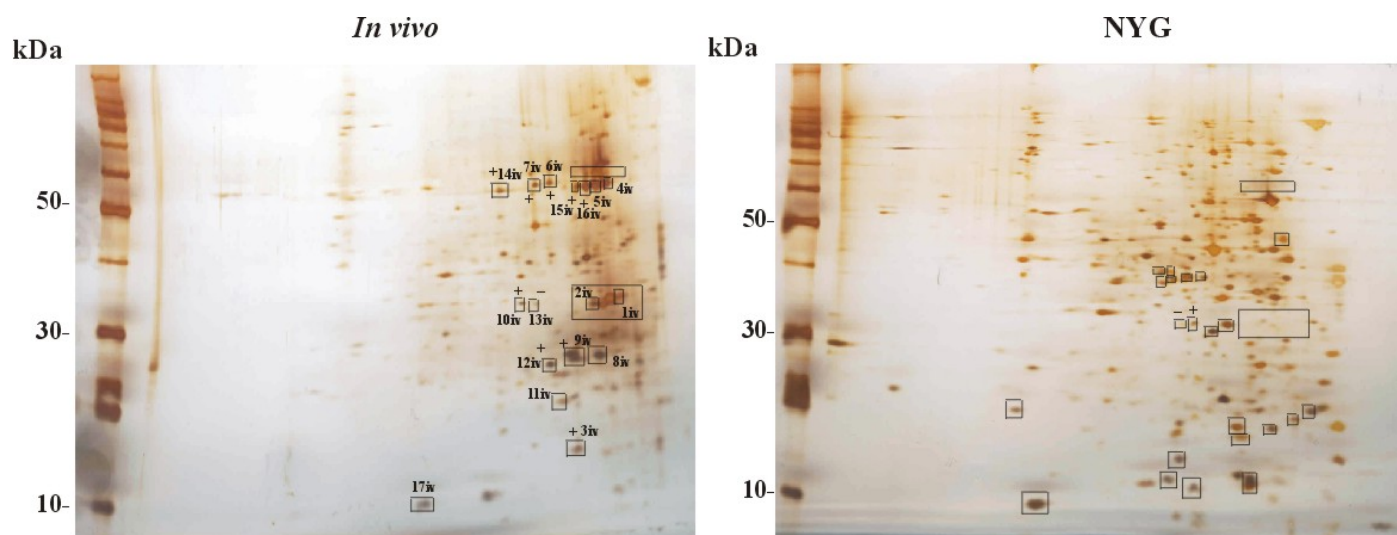


Figura 2. 2-DE de proteínas de *X. campestris* pv. *campestris* *in vivo* e cultivada em meio NYG, conforme indicado. Os sinais + e - indicam proteínas mais e menos intensas, respectivamente. Os quadrados sem símbolos indicam proteínas novas. Os retângulos indicam as regiões onde foram observadas proteínas de folhas sadias de *B. oleracea*. Estas proteínas estão ausentes no perfil NYG.



Figura 3. 2-DE de proteínas extraídas de folhas sadias de *B. oleracea*. Os retângulos indicam as proteínas observadas no perfil de *X. campestris* pv. *campestris* *in vivo*.