



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Formação de biofilme e análise bidimensional  
de proteínas de *Xanthomonas campestris*  
pv. *viticola***

**Myrzânia de Lira Guerra**

**Recife - PE  
2015**

**MYRZÂNIA DE LIRA GUERRA**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE BIDIMENSIONAL DE  
PROTEÍNAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

**RECIFE-PE  
JULHO-2015**

**MYRZÂNIA DE LIRA GUERRA**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE BIDIMENSIONAL DE  
PROTEÍNAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador(a): Dra. Prof<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza

Co-orientador(a): Dra. Prof<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva

**RECIFE-PE  
JULHO-2015**

Ficha catalográfica

G934f Guerra, Myrzânia de Lira  
Formação de biofilme e análise bidimensional de  
proteínas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* / Myrzânia  
de Lira Guerra. – Recife, 2015.  
58 f. : il.

Orientador(a): Elineide Barbosa de Souza.  
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2015.

Referências.

1. *Vitis vinifera* 2. Cancro bacteriano da videira 3. MCL  
4. MEV 5. Motilidade swarming I. Souza, Elineide Barbosa  
de, orientadora II. Título

CDD 632

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE BIDIMENSIONAL DE  
PROTEÍNAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

**MYRZÂNIA DE LIRA GUERRA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 24/07/2015.

ORIENTADORA:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

EXAMINADORES:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Rosa Peixoto (UNEB)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Cortêz de Oliveira (UFRPE-UAG)

---

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Siqueira Gama (UFRPE)

**RECIFE-PE  
JULHO-2015**

A minha família e ao meu noivo “Coelho”,  
presente em todos os momentos desta  
trajetória.

*Ofereço*

As duas grandes mulheres da minha vida: Maria  
de Fátima (mãe) e Yrlânia (irmã), sendo meu  
alicerce nos momentos difíceis e sempre  
acreditando na minha vitória.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por estar sempre presente em minha vida: guiando-me e sustentado nos diversos momentos desta trajetória;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio institucional e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudo;

A minha orientadora professora Dra. Elineide Barbosa de Souza pela orientação, amizade, paciência, disponibilidade e incentivo;

A minha co-orientadora professora Dra. Márcia Vanusa da Silva (UFPE) pela orientação, pelo apoio, incentivo e por me receber tão carinhosamente no Laboratório de Biologia Molecular;

A professora Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano pelos valiosos ensinamentos por quase 10 anos de convivência, amizade, apoio e dedicação;

Ao atencioso prof. Dr. Alexandre José Macedo pela disponibilidade e co-orientação no Campus do Vale/UFRGS (RS- Porto Alegre);

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia que contribuíram para a minha formação e aos funcionários do Departamento de Fitossanidade: Darci Martins e Romildo Angeiras, pela amizade e presteza ao longo do curso;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (UFPE): Carolina Malafaia e Túlio Diego pelos valiosos ensinamentos, dedicação e amizade;

Aos meus carismáticos companheiros do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE: Greecy, Meridiana, Edilaine, Kátia, Mirtis, Jéssica, Liliana, Walkíria, (Prof.) Marco Aurélio, Adriano, Nelson, Conrado, Elias e Willams pela amizade, pelo apoio nos momentos de indecisão, pela comilança e por tantos momentos alegres e tristes;

Aos estagiários Tássia, Luciana e Alexandre;

Ao senhor Luiz Coelho, amigo e companheiro nos trabalhos de “Casa de Vegetação”, por fazer dos mais diversos momentos uma eterna alegria.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	V
<b>RESUMO GERAL</b> .....	VII
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	VIII
<b>CAPÍTULO I</b> .....	01
Introdução geral .....	02
1. A cultura da videira.....	02
2. O cancro bacteriano da videira.....	04
3. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> .....	07
4. Biofilme.....	08
5. Proteômica.....	12
Referências bibliográficas .....	15
<b>CAPÍTULO II</b> .....	25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> : biofilm formation response to distinct conditions.....	26
Abstract.....	26
Introduction.....	26
Materials and methods.....	27
Results.....	29
Discussion.....	30
Rerefences.....	33
<b>CAPÍTULO III</b> .....	41
Two-dimensional profiling of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> proteins extracted by four different methods.....	42
Introduction.....	42
Materials and methods.....	43
Results and discussion.....	44
Conclusion.....	45
References.....	47
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	50



## RESUMO GERAL

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) é o agente causal do cancro bacteriano da videira. No Submédio do Vale São Francisco, no nordeste do Brasil, o cancro bacteriano é uma das doenças mais importantes dessa cultura, sendo responsável por grandes prejuízos, o que representa um sério risco para a viticultura brasileira. Os objetivos deste estudo foram: a) avaliar a capacidade de sete isolados de *Xcv* para aderir e formar biofilmes *in vitro* e determinar a influência do meio de cultura e das superfícies na formação de biofilme, além de investigar a arquitetura do biofilme e motilidade swarming; e b) otimizar um protocolo para extração de proteínas para análise da proteômica de *Xcv*, comparando a eficiência de quatro métodos com base no perfil de eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE). Todos os isolados aderiram aos poços da placa de microtitulação de poliestireno e formaram biofilmes nos meios de cultura líquidos testados (caldo nutriente-dextrose-extrato de levedura, extrato de levedura-dextrose-carbonato de cálcio, KADO 523 e Luria-Bertani), em níveis fraco, moderado e forte. Em tubos de vidro, apenas os isolados *Xcv*229 e *Xcv*158 formaram biofilmes. *Xcv*229 foi considerado um forte produtor de biofilme. Na microscopia confocal a laser (MCL) apenas em *Xcv*229 visualizou-se a matriz inicial da estrutura do biofilme, após 24 h de crescimento. As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Xcv*229 e *Xcv*158 crescidos durante 36 h em placas de microtitulação revelaram arquiteturas típicas de biofilme. O isolado *Xcv*158 apresentou uma maior motilidade swarming do que *Xcv*229, mostrando que, neste caso, a formação de biofilme é independente da motilidade. Este é o primeiro relato de produção de biofilme bacteriano pela fitobactéria *Xcv*. Os métodos Trizol<sup>®</sup>, fenol, centrifugação e lise foram analisados quantitativa e qualitativamente, para selecionar o mais adequado na obtenção de proteína de alta qualidade. Todos permitiram a extração de uma quantidade significativa de proteínas, no entanto, o método de centrifugação resultou numa maior concentração de proteínas solubilizadas. A análise das imagens do gel 2D-PAGE revelou um maior número de spots no método de lise, quando comparado com os outros. Levando-se em consideração a qualidade dos resultados e as vantagens práticas do método de lise, este é recomendado como a melhor opção para extração de proteínas totais de *Xcv* para estudos de proteômica.

**Palavras-chaves:** *Vitis vinifera*, cancro bacteriano da videira, MCL, MEV, motilidade swarming

## GENERAL ABSTRACT

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) is the causal agent of grapevine bacterial canker. In the Submédio do Vale São Francisco in the northeast of Brazil, bacterial canker is one of the most important grapevine diseases, responsible for severe damage and representing a serious risk to Brazilian viticulture and wine production. The aims of this study were to: a) evaluate the ability of seven *Xcv* strains to adhere and form biofilms *in vitro* and to determine the influence of the culture medium and surfaces on biofilm formation, besides to study the biofilm architecture and swarming motility; and b) optimize a method of protein extraction for proteomic analysis of the *Xcv*, comparing the efficiency of four methods, based on the two-dimensional gel electrophoresis profile (2D-PAGE). All the strains adhered to the wells of the polystyrene microtiter plate and formed biofilms in all liquid culture medium (nutrient broth-dextrose-yeast extract, yeast extract-dextrose-calcium carbonate, KADO 523 and Luria-Bertani), though to different degrees (weak, moderate and strong). In glass tubes, only *Xcv*229 and *Xcv*158 strains formed biofilms. We identified *Xcv*229 as a strong biofilm-producing strain. Using confocal laser scanning microscopy (CLMS) only *Xcv*229 showed an initial matrix of biofilm structure after 24 h of growth. Scanning electron microscopy (SEM) images of strains *Xcv*229 and *Xcv*158 grown for 36 h on microtiter plates revealed typical biofilm architectures. Strain *Xcv*158 displayed a higher swarming motility than *Xcv*229, showing that in this case, biofilm formation is not motility-dependent. This is the first report of biofilm production by the bacterial plant pathogen *Xcv*. Trizol<sup>®</sup>, Phenol, Centrifugation and Lysis methods were tested and through quantitative and qualitative analysis, the most suitable method to obtain high-quality protein was selected. All methods enabled the extraction of a significant amount of proteins; nevertheless, the centrifugation method allowed obtaining the highest concentration of solubilized proteins. However, the analysis of the 2D-PAGE gel images revealed a larger number of spots in the lysis method when compared to the others. Taking into consideration the quality of the results and the practical advantages of the lysis method, this is recommended as the best option for total protein extraction of *Xcv* for proteomic studies.

**Keywords:** *Vitis vinifera*, grapevine bacterial canker, CLMS, SEM, swarming motility

## **CAPÍTULO I**

---

### **Introdução Geral**

# FORMAÇÃO DE BIOFILME E ANÁLISE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A cultura da videira

A videira (*Vitis* spp.), planta pertencente à ordem Rhamnales e família Vitaceae tem como provável centro de origem a Groelândia, onde os fósseis de seus ancestrais foram encontrados. No entanto, o cultivo e domesticação da cultura provavelmente ocorreram, em áreas geográficas, entre o mar Negro e o Irã, entre o sétimo e quarto milênio a.C., a partir dessas áreas a cultura foi difundida para o Oriente Próximo (Europa Meridional), Oriente Médio e Europa Central (TERRAL et al., 2010). No Brasil, o cultivo da videira teve início por volta do ano de 1532, na capitania de São Vicente, atual estado de São Paulo, sendo introduzida por Martin Afonso de Souza (GUERREIRO, 2006; POMMER; MAIA, 2003). O cultivo desta espécie estabeleceu-se alguns anos depois nos estados da Bahia e de Pernambuco (POMMER; MAIA, 2003), mas desapareceu durante o século XVII devido, principalmente, à expansão do cultivo da cana-de-açúcar e café. Entre 1830-1840, com o surgimento de novas variedades americanas e a chegada dos imigrantes italianos, a cultura da videira toma novo impulso adquirindo grande importância econômica principalmente na região sul do Brasil (POMMER; MAIA, 2003).

Esta cultura pode ser classificada em dois tipos: a europeia (*Vitis vinifera* L.), conhecida como uvas finas, oriunda do centro da Ásia Central, de regiões que possuem o clima típico mediterrâneo, e a americana (*Vitis labrusca* L.), conhecida como uvas rústicas, oriunda do continente norte americano (CORRÊA; BOLIANE; FRACARO, 2008; POMMER; MAIA, 2003). A videira é adaptada a vários tipos de solo e clima, o que possibilita o cultivo em quase todas as regiões do mundo (QUEIROZ-VOLTAN; PIRES, 2003). É uma planta que se fixa a outras plantas ou substratos através das gavinhas, sendo lenhosa e de porte arbustivo; suas folhas são alternas, pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados; as flores são pequenas com coloração branco esverdeada, dispostas em rácimos; os frutos são bagas reunidas em cachos, contendo cada uma duas ou três sementes, variando de cor de acordo com o tipo de uva (SCHLEIER, 2004).

As uvas são bastante sensíveis às condições edafoclimáticas em que se desenvolvem, apresentando características diferenciadoras como sabor, acidez, doçura, formato, coloração, resistência da casca, tamanho, quantidade de sementes e formato dos cachos (QUEIROZ-VOLTAN; PIRES, 2003). Esta planta também possui uma sucessão de ciclos vegetativos, intercalados por períodos de repouso. Portanto, em regiões com condições climáticas bem definidas, essas fases acompanham as variações das estações do ano, com brotações ocorrendo durante a primavera e queda das folhas no outono. A videira se adapta muito bem em regiões com verões longos e secos, moderadamente quentes, e com invernos frios satisfazendo a necessidade de repouso vegetativo, principalmente na estação seca (POMMER; MAIA, 2003).

O clima quente associado ao manejo adequado da irrigação acelera os processos fisiológicos e o ciclo produtivo da planta que oscila em torno de 120 dias, e permite ao viticultor obter duas colheitas sucessivas no mesmo ano (LEÃO, 2004; PEDRO JÚNIOR; SENTELHAS, 2003; POMMER; MAIA, 2003). Além disso, tais condições climáticas permitem a colheita dos frutos nos períodos de preços mais elevados, o que torna a viticultura uma atividade que apresenta menor grau de incerteza e elevada rentabilidade econômica (LEÃO, 2004).

Em 2013 os seis principais países produtores de uva no cenário mundial foram China, Itália, Estados Unidos, Espanha, França e Turquia, conseguinte o Brasil ocupa a posição de décimo segundo lugar (FAOSTAT, 2015). Neste ano, a produção de uvas no Brasil foi de 1.439.535 toneladas e, deste montante, 807.693 toneladas foram produzidas pelo Rio Grande do Sul, principal estado produtor, e 284.325 toneladas foram produzidas no Nordeste. Na região Nordeste, a produção de uva se concentra no polo agrícola Petrolina (Pernambuco)/Juazeiro (Bahia), situado no Submédio do Vale São Francisco. É importante ressaltar que devido à expansão da produção, o estado de Pernambuco situa-se como o segundo maior produtor nacional, tendo sido responsável pela produção de 228.727 toneladas de uva (IBGE, 2015).

A nível mundial, o Brasil apresenta uma participação bastante discreta no comércio exterior de uva de mesa, contribuindo apenas com cerca de 1,4% das exportações mundiais da fruta (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013). O polo agrícola Petrolina/Juazeiro é o principal centro produtor e exportador de uvas de mesa, sendo responsável por 99% das exportações nacionais, possuindo uma grande importância socioeconômica pelo número de empregos gerados (LAZZAROTTO; FIORAVANÇO, 2013; NASCIMENTO; MASHIMA; LIMA, 2000; SILVA; CORREIA, 2000). Este polo possui uma característica ímpar na

produção de uva, em virtude da sua capacidade de produzir mais de duas safras por ano, fato que ocorre devido às condições climáticas da região, entretanto, esta característica está ameaçada devido à severidade do ataque das doenças e pragas.

A modernização da agricultura brasileira e à implantação de projetos de desenvolvimento no Nordeste têm provocado profundas transformações na estrutura produtiva dessa região, favorecendo o processo de sua integração a uma economia de mercado agroindustrial (SILVA; CORREIA, 2000).

O aumento da comercialização de uvas gerou uma intensificação do seu cultivo e o desenvolvimento de variedades buscando uma melhor qualidade resultou no surgimento de diversos problemas fitossanitários causados por fungos, vírus e bactérias, afetando diretamente a produção e a produtividade. Dentre estes problemas fitossanitários destaca-se o cancro bacteriano causado por uma fitobactéria.

## **2. Cancro bacteriano da videira**

Inicialmente, o cancro bacteriano da videira, cujo agente causal é *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (*Xcv*), foi relatado na Índia pela primeira vez em 1969 com a observação da presença dos sintomas característicos da doença em parreirais com a cultivar Anab-e-Shahi no Colégio Agrícola de Tirupati (NAYUDU, 1972). No Brasil, essa doença foi detectada pela primeira vez no início de 1998 em parreirais do Submédio do Vale São Francisco, no município de Petrolina (Pernambuco), ocasionando grandes prejuízos em cultivares suscetíveis (MALAVOLTA JR. et al., 1999; NASCIMENTO; MARIANO, 2004). Além da Índia e do Brasil o cancro bacteriano só foi detectado na Tailândia, (BUENSANTEAI, 2004), mas gera impacto econômico apenas no Brasil.

No Brasil a bactéria é uma praga quarentenária presente (A2) ocorrendo atualmente nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima. Segundo Freire e Oliveira (2001), alguns produtores do Submédio do Vale São Francisco foram responsáveis pela introdução deste patógeno, devido ao transporte indevido do material propagativo contaminado da cultivar Red Globe. Nessa região, esta doença caracteriza-se como uma das mais importantes enfermidades, sendo responsável por danos severos e representando sério potencial de risco ao desenvolvimento da viticultura nacional (ARAUJO et al., 2005).

Durante os anos de 1998 e 1999, um levantamento para detecção de *Xcv* foi realizado pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semiárido, no qual das 358 amostras de videira analisadas 197 (55%) estavam infectadas e destas, 127 eram de 'Red Globe' (LIMA;

FERREIRA, 2000). Em 2004, outro levantamento foi realizado, e em 17 das 18 propriedades visitadas, a incidência do cancro bacteriano variou de 10 a 100% e de 92 a 100% nas parcelas com 'Festival' e 'Red Globe', respectivamente (LOPES; NASCIMENTO, 2004). Os sintomas da doença foram registrados em videiras das cultivares Red Globe, Perlette, Itália, Festival, Brasil, Ribier, Piratininga, Patrícia, Catalunha e Benitaka. As variedades pertencentes à espécie *V. vinifera* são mais suscetíveis ao cancro bacteriano do que as pertencentes à *V. labrusca* (MALAVOLTA JR. et al., 2003).

Os sintomas do cancro bacteriano são visualizados nas folhas como pontos necróticos, com a presença ou ausência de halos amarelados, que podem coalescer e causar crestamento, destruindo uma grande área do limbo foliar. Nas folhas pode ocorrer a formação de manchas setoriais e pardacentas (NASCIMENTO; MASHIMA; LIMA, 2000). Manchas escuras e alongadas evoluem com a infecção e se transformam em cancos atingindo de 3 a 5 cm de extensão que podem se aprofundar nos tecidos. Essas manchas podem afetar os vasos condutores e provocar o colapso no transporte da seiva, sendo observados nos pecíolos, nas nervuras das folhas, nos ramos e ráquis dos frutos (FREIRE; OLIVEIRA, 2001). As inflorescências da videira também são afetadas por *Xcv* causando necrose nos cachos formados. Em relação às bagas, os sintomas observados são desuniformidade em tamanho e cor, causando uma lesão necrótica, ligeiramente arredondada e semelhante a cancos (MALAVOLTA JR. et al., 1999). Os cachos formados apresentam sintomas de murcha nas bagas, após a necrose da ráquis e pedicelo (LIMA, 2000). No primeiro semestre do ano, época que apresenta temperatura elevada e alta umidade relativa, os sintomas da doença são mais intensos (ARAÚJO; ROBBS; MACIEL, 1999), esta intensidade pode variar de acordo com o nível de tolerância da variedade à doença (LIMA, 2000).

Em condições de alta umidade e temperatura *Xcv* sobrevive de um ciclo para outro epifiticamente em órgãos da parte aérea ou em plantas infectadas com maior adesão sobre nervuras e tricomas (ARAUJO; ROBBS, 2000). Esta fitobactéria também sobrevive em hospedeiros alternativos (PEIXOTO et al., 2007; SANTOS et al., 2014) e em restos culturais (SILVA et al., 2012). Pode ser introduzida em parreirais veiculada em mudas e bacelos infectados, que irão originar plantas doentes. Os bacelos podem ser contaminados durante a etapa de imersão em água, uma vez que a bactéria esteja presente nesta água (FERREIRA-TONIN, 2012). *Xcv* pode ser disseminada através do material utilizado na colheita (luvas, tesouras de poda e contentores), nos tratos culturais (colheita, poda, desbrota e raleio de bagas), material propagativo infectado, chuvas e ventos. Outra forma de favorecer a distribuição da doença é pela irrigação por aspersão convencional e pivô central

(NASCIMENTO; MARIANO, 2004). Apesar do curto período chuvoso na região semi-árida do Nordeste, a disseminação da bactéria é mais eficiente durante esse período (NASCIMENTO; MASHIMA; LIMA, 2000).

A penetração da *Xcv* ocorre no hospedeiro através do mesófilo, por meio de aberturas naturais, como os estômatos, e lesões no tecido vegetal, principalmente aqueles causados por tratamentos culturais, ventos fortes (NASCIMENTO; MARIANO, 2004) e danos nos tricomas (ARAUJO; ROBBS, 2000). Posteriormente a penetração, a bactéria multiplica-se rapidamente, colonizando os espaços intercelulares, a partir do qual invade o sistema vascular resultando em infecções sistêmicas (ARAUJO; ROBBS, 2000; NASCIMENTO; MARIANO, 2004). Estudos de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram células bacterianas aderidas à superfície da planta por meio de fixação não polar em monocamada, e que os locais de adesão mais frequentes são a superfície de vasos e tricomas no limbo foliar (ARAUJO et al., 2004). Tostes et al. (2014) visualizaram em amostras de sementes agregadas bacterianas de *Xcv* associados à superfície do invólucro e na primeira camada do parênquima abaixo do tegumento da semente.

De acordo com a Instrução Normativa nº 2 de 06 de fevereiro de 2014 (INSTRUÇÃO NORMATIVA - MAPA 2/2014), o manejo do cancro bacteriano da videira pode ser realizado pelo produtor, importador, comerciante ou detentor de plantas e partes de plantas de espécies do gênero *Vitis*, adotando-se algumas medidas preventivas e de erradicação: I- Desinfestação de veículos, máquinas, implementos, equipamentos e material de colheita, com produtos sanitizantes recomendados pela pesquisa; II- Destruição de material contaminado; controle químico com produtos recomendados pela pesquisa; III- Eliminação de hospedeiras alternativas da *Xcv*; VI- Eliminação de todo o material resultante das podas, por meio de enterrio ou queima, para as variedades mais suscetíveis e sintomáticas; V- Fazer inspeções visuais em todo o viveiro semanalmente, concentrando-se nas variedades mais suscetíveis e nos períodos de condições ambientais favoráveis a ocorrência da doença e VI- Comunicar imediatamente ao Órgão Oficial de Defesa Agropecuária (Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco—ADAGRO) sobre qualquer suspeita de ocorrência do cancro bacteriano da videira.

Atualmente, o controle do cancro bacteriano na videira é muito complexo, pois não existem produtos registrados específicos para esta doença. O controle químico é realizado de forma preventiva, logo após a poda e brotação ou quando há ferimentos nas plantas, através da aplicação de compostos cúpricos e calda bordalesa. Entretanto, existem isolados de *Xcv*



que apresentaram variabilidade na tolerância ao cobre (MARQUES; UESUGI; FERREIRA, 2009).

Recentemente, um estudo sobre a desinfestação de tesouras de podas utilizadas na colheita de uvas verificou que hipoclorito de sódio (5000 ppm) e cloreto de docecil dimetil amônio (570 ppm) foram 100% eficazes na eliminação de *Xcv* (NAUE et al., 2014a). No entanto, termoterapia, bactericidas e sanitizantes não foram eficientes para erradicar a bactéria de bacelos infectados (NAUE et al., 2014b). Para a obtenção de material propagativo livre do patógeno, Silva et al. (2013) recomendam a indexação de plantas de videira regeneradas *in vitro*, sendo esta uma alternativa econômica e eficiente para produção de mudas de alta qualidade fitossanitária.

### **3. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

De acordo com a classificação filogenética, baseada em comparações de sequências nucleotídicas, o gênero *Xanthomonas* Dowson está classificado no Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales e Família Xanthomonadaceae (GARRITY; HOLT, 2000). Inicialmente a bactéria *Xcv* foi classificada por Nayudu, em 1972, como *Pseudomonas viticola* Nayudu sp. nov. Entretanto, Young et al. (1978) sugeriram alterações no sistema classificatório das bactérias fitopatogênicas e oficializaram o uso do termo patovar, designado temporariamente para classificação infra-subespecífica de fitobactérias. Neste contexto, mais de 100 fitobactérias foram reclassificadas como patovares de *X. campestris* (Pammel) Dowson tomando como base as características fenotípicas e a gama de hospedeiros. Dessa forma, *P. viticola* foi reclassificada como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (YOUNG et al., 1978).

Espécies de *Xanthomonas* foram estudadas por Vauterin et al. (1995), que realizaram o primeiro grande estudo de hibridização DNA-DNA dentro do gênero *Xanthomonas* e sugeriram que *X. campestris* abrigasse exclusivamente isolados patogênicos a brassicáceas. Neste momento, foi proposto que o patovar *viticola* e outros patovares de *X. campestris* não reclassificados fossem cuidadosamente analisados por meio de abordagens polifásicas e designados para outras espécies ou elevados ao nível de espécie (VAUTERIN et al., 1995). Takita et al. (2004) analisando a região *rpf* (Regulação de Fatores de Patogenicidade) de 21 isolados pertencentes a diferentes patovares de *X. campestris* verificaram que o patovar *viticola* teve maior similaridade com *X. axonopodis* pv. *citri*, sugerindo que *Xcv* fosse agrupada na espécie *axonopodis* do gênero *Xanthomonas*. No entanto, devido à ausência de

estudos taxonômicos mais abrangentes com o agente causal do cancro bacteriano, o Comitê sobre a Taxonomia de Fitobactérias da Sociedade Internacional de Fitopatologistas (Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria - International Society of Plant Pathology) recomenda o uso do epíteto *X. campestris* pv. *viticola* (BULL et al., 2010).

A bactéria *Xcv* é um bastonete Gram-negativo, com dimensões de 0,6 x 1,2 - 2,5 µm, possui um flagelo polar e metabolismo aeróbico (ARAUJO; ROBBS, 2000; NAYUDU, 1972). As colônias de *Xcv* são arredondadas, brilhantes, com borda lisa e coloração esbranquiçada em meio ágar nutritivo, por não produzir xantomonadina, pigmento característico do gênero *Xanthomonas*. Possui a capacidade de crescer em meio de cultura líquido com temperatura entre 5-35°C, tendo um crescimento ótimo entre 27-29°C e pH de 7,5 (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005). Apresenta reação de hipersensibilidade negativa em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) cv. White Burley (LIMA et al., 1999) e positiva em folhas de tomate da cultivar Santa Clara (MALAVOLTA JR. et al., 1999). Os melhores métodos de preservação de culturas de *Xcv* são dessecação em papel de filtro e preservação em água destilada esterilizada (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005).

A identificação da *Xcv* atualmente é realizada através de testes bioquímicos, culturais, fisiológicos, moleculares e de patogenicidade (MALAVOLTA et al., 1999; MIRANDA, 2011; TRINDADE et al., 2007).

Para o sucesso no controle do cancro bacteriano é necessário o conhecimento dos mecanismos de patogênese de *Xcv*. Mecanismos de ataque do patógeno envolvido tanto na colonização como na expressão de genes de virulência têm sido alvo de estudos nos últimos anos, a exemplo de formação de biofilmes e análise de proteoma.

#### **4. Biofilme**

Na natureza, bactérias são constantemente encontradas envolvidas numa matriz polissacarídica extracelular em contato com uma superfície sólida, a qual oferece uma proteção contra ambientes hostis, constituindo os biofilmes. Eles são caracterizados por uma comunidade multicelular densa de micro-organismos que podem ser formados por meio da ligação das bactérias a uma superfície biótica ou abiótica (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). Biofilmes maduros são incorporados numa matriz polimérica extracelular auto-produzida composta principalmente de exopolissacárideos (EPS), proteínas especializadas, adesinas e, ocasionalmente, DNA extracelular (MARTÍNEZ; VADYVALOO 2014; VALLE et al., 2012).

A presença da matriz no biofilme bacteriano confere uma série de vantagens seletivas, tais como proteção contra variações ambientais, agregação de células bacterianas, fonte de nutrientes, retenção de água, absorção e adsorção de íons, barreira protetora, troca de informação genética, atividade enzimática, entre outras (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Danhorn e Fuqua (2007) relataram que a disponibilidade de nutrientes essenciais, adesão à superfície, motilidade e a presença de outros micro-organismos são alguns fatores que influenciam a formação do biofilme. Existem características que podem limitar a adesão e a formação do biofilme bacteriano tais como a expressão dos fatores de virulência, produção da cápsula exopolimérica, material aderente, condições ambientais e uma variedade de outros fatores (CAIXETA, 2008; FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005).

Os biofilmes podem compreender uma determinada espécie microbiana simples ou múltiplas espécies de micro-organismos (LUCCHESI, 2006; O'TOLLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). O biofilme formado por uma única espécie é o eixo de estudo de um considerável grupo de pesquisas científicas (O'TOLLE; KAPLAN; KOLTER, 2000) visando uma maior compreensão e aplicabilidade no manejo da doença causada por patógenos.

Para ocorrer a formação do biofilme, uma série de etapas são observadas. A adesão reversível bacteriana é a primeira etapa na formação de biofilme e pode ocorrer em uma superfície abiótica (como por exemplo, plásticos e metais), mediada por interações físico-química não específica, ou biótica (células e tecidos vegetais) que é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante (DUNNE, 2002; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). A segunda etapa denominada de adesão irreversível ocorre quando os micro-organismos patogênicos ligados fracamente à superfície consolidam o processo de adesão, através da produção de matriz polissacarídica. Nesta etapa, os fitopatógenos são capazes de formar ligações com suas próprias células ou com células de diferentes espécies, formando agregados que vão estar firmemente ligados à superfície (STOODLEY et al., 2002; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). A terceira etapa é a maturação do biofilme que está envolto pela matriz polissacarídica sendo permeado por canais de água. A última etapa é caracterizada pelo desprendimento das células planctônicas (células bacterianas livres) ou de grupos de células unidas pela matriz que ocorre quando o ambiente não se encontra mais favorável ou devido a uma programação celular para a virulência (BAYLES, 2007; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). A adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme possuem um papel importante na patogênese (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Boari et al. (2009), comparando as bactérias Gram-negativas com as

Gram-positivas relatou que devido a suas estruturas peculiares (pili, fímbrias e flagelos, bem como pela membrana externa) as Gram-negativas apresentam uma vantagem competitiva em relação à adesão inicial, colonização da superfície e formação do biofilme.

No processo de formação de biofilme em plantas, inicialmente a bactéria entra em contato com a superfície da planta, o que requer a motilidade ativa. Isso é seguido pela adesão na superfície, multiplicação celular, produção célula-a-célula de moléculas de sinalização e, eventualmente, desadesão de bactérias planctônicas do biofilme (DANHORN; FUQUA, 2007; KARATAN; WATNICK, 2009). Por estímulos bioquímicos a bactéria pode acionar a motilidade identificando o local ideal para sua fixação e agregação na superfície da planta (MHEDBI-HAJRI et al., 2011). As bactérias podem colonizar diferentes partes da planta e a formação de biofilme pode desempenhar um papel fundamental na colonização. Nos vasos, biofilmes são muito importantes uma vez que as células necessitam sobreviver em um habitat competitivo onde os compostos de defesa da planta são produzidos em resposta à infecção (DANHORN; FUQUA, 2007). Assim, os processos de agregação e auto desenvolvimento de biofilme são relevantes para colonização e sobrevivência da bactéria na planta hospedeira (BOGINO et al., 2013).

Os biofilmes e agregados de células produzem e respondem a uma variedade de sistemas de sinalizações que influenciam a atividade microbiana, seu comportamento e sua persistência no ambiente da planta. Essas interações exigem sistemas de comunicação célula-célula para distribuir e modular as várias funções dentro de uma comunidade bacteriana, processo conhecido como "*quorum sensing*" (DAVIES et al., 1998; HUBER et al., 2001). Este é um mecanismo intercelular de sinalização, que tanto pode ocorrer em células microbianas da mesma espécie como em interespecies (RHOADS et al., 2008), contudo é um mecanismo particularmente valioso para a regulação de genes em biofilmes densamente povoados. O *quorum sensing* foi demonstrado como sendo necessário, em vários estudos de casos, para a formação de biofilmes (DAVIES et al., 1998; HUBER et al., 2001). Estudos sobre as implicações do flagelo na formação de biofilme demonstraram que tanto o flagelo quanto a motilidade dependente do flagelo são importantes na adesão inicial à superfície e que ambos contribuem tanto para o desenvolvimento de biofilmes maduros quanto para sua dispersão (MALAMUD et al., 2011). As bactérias, formadoras de biofilme possuem a mesma origem genética das bactérias planctônicas, entretanto, suas atividades bioquímicas diferem em 40%, o que as torna mais difíceis de serem eliminadas, pela maior resistência adquirida (MEDONLINE, 2008).

Diversas bactérias, mas não todas, possuem a capacidade de se movimentar em certas condições favoráveis as mesmas. Esse movimento pode ser alcançado através de alguns mecanismos de: swarming, swimming, twitching, sliding, gliding e darting. O swarming é o movimento multicelular de bactérias através da superfície e é realizado por meio de flagelos rotativos helicoidais (KEARNS; LOSICK, 2003). A motilidade fornece uma vantagem de sobrevivência sob uma grande variedade de ambientes, permitindo as bactérias responderem a condições favoráveis ou desfavoráveis para competirem com sucesso com outros microrganismos, assim como está envolvida na formação de biofilme (DARNTON et al., 2010; HARSHEY, 2003).

Diversas espécies bacterianas causadoras de doenças em plantas têm a capacidade de aderir e formar biofilmes, mesmo mostrando um fenótipo distinto e causando diferentes doenças (CASSERTA et al., 2010; LAGONENKO; LAGONENKO; EVTUSHENKOV, 2014; SENA-VÉLEZ et al., 2014; ZIMARO et al., 2013). Biofilmes em bactérias fitopatogênicas podem atuar como um fator de virulência em estágios iniciais de colonização e infecção (FLEMMING; WINGENDER, 2010; GUTTENPLAN; KEARNS, 2013). Dentre as espécies bacterianas fitopatogênicas gram-negativas que formam biofilme destacam-se *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) Schaad et al. (BAHAR; DE LA FUENTE; BURDMAN, 2010) *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. (KOCZAN et al., 2011), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Hauben et al. (HOSSAIN; TSUYUMU, 2006), *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (CROSSMAN; DOW, 2004; DOW et al., 2003), *X. axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al. (RIGANO et al., 2007; TORRES et al., 2007; ZIMARO et al., 2013), *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al.) Swings et al. (ZHANG et al., 2013), *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (YAO; ALLEN, 2007) e *Xylella fastidiosa* Wells et al. (CASERTA et al., 2010; MARQUES et al., 2002). Não foram encontrados trabalhos que relatassem a formação de biofilme em *Xcv*, servindo como justificativa para essa pesquisa.

Os biofilmes podem ser detectados em testes realizados *in vitro*. Por ser um processo complexo, a formação do mesmo pode ser afetada por diversos fatores, tais como as características físico-químicas das bactérias e do meio de crescimento, a hidrofobicidade da superfície ou substrato e outras condições (DONLAN; COSTERTON, 2002; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). O meio de cultura tem influência direta no tamanho do biofilme, uma vez que o seu crescimento, maturação e aderência estão relacionadas com o meio de cultura e a sua composição (TANG et al., 2012) e, dependendo do meio, um mesmo isolado pode ser classificado como forte, moderado, fraco ou não formador de biofilme

(STEPANOVIC et al., 2000). A superfície sobre a qual o organismo procura adaptar-se pode exercer uma forte influência sobre a sua adesão e torna-se um fator decisivo na formação do biofilme. Superfícies hidrofóbicas, tais como os plásticos são normalmente mais facilmente aderidos por micro-organismos em comparação com os hidrófilos, tais como vidro ou metal (RODRIGUES et al., 2009). Entre os diversos materiais que favoreçam a formação de biofilme, o vidro é menos propício a adesão de micro-organismos. Neste sentido, a preferência da bactéria para o poliestireno pode ser esperada uma vez que a superfície da planta (folhas, caule e vasos, por exemplo) é geralmente extremamente hidrofóbica. No entanto, esta classificação deve ser interpretada com extrema cautela, pois os resultados podem diferir entre as espécies bacterianas estudadas e as condições do ensaio *in vitro* (MEYER, 2003).

Nos estudos da arquitetura do biofilme a microscopia eletrônica é uma ferramenta utilizada na avaliação da interação microbiana na matriz exopolissacarídica, uma vez que este método preserva as estruturas associadas ao biofilme, mantendo-as em um estado hidratado e viável (MARQUES, 2005). Outra técnica bastante usada para análises de viabilidade bacteriana de biofilmes é a microscopia confocal a laser (VITKOV et al., 2005), a qual permite a reconstrução tridimensional e o seccionamento óptico, sendo possível a observação e localização exata da distribuição espacial das bactérias no biofilme (SUNDE et al., 2003).

## **5. Proteômica**

Em 1994, surgiu o termo “proteoma” denominando um conjunto de proteínas expressas no genoma de uma célula, em um ambiente definido (ANDERSON; ANDERSON, 1998). A proteômica faz parte da era pós-genômica, devido aos avanços no sequenciamento em larga escala do DNA (PANDEY; MANN, 2000). O início da proteômica foi marcado pela caracterização de perfis proteicos, focando em seguida outros aspectos como a quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações pós-traducionais (SALVATO; CARVALHO, 2010).

Nos últimos 15 anos, a biologia molecular tem apresentado avanços com o sequenciamento em larga escala de diversos genomas gerando uma quantidade imensa de dados. No entanto, sozinhas essas informações são escassas em relação a eventuais modificações pós-traducionais e ao controle da atividade gênica em resposta a condições ambientais específicas. Por conseguinte, apenas o entendimento genômico não possibilita uma compreensão completa acerca dos diversos mecanismos fisiológicos ou patológicos que

operam nos patógenos, fato devido ao repositório estático da informação genética. Por outro lado, estudos funcionais, como a análise proteômica, envolvem as respostas celulares às mais diversas situações dinâmicas (HONDERMARCK et al., 2008). O proteoma reflete a expressão funcional do genoma condicionada ao estágio de desenvolvimento e diferenciação, o que torna o estudo proteômico bastante desafiador, pois a expressão gênica de uma célula é bastante dinâmica (MANN; HENDRICKSON; PANDEY 2001).

A proteômica aponta a caracterização de um conjunto de proteínas expressas em um dado momento, e surge como mais uma ramificação complementar nos estudos da biologia molecular das células e atualmente uma importante ferramenta molecular (SALVATO; CARVALHO, 2010).

A eletroforese bidimensional (2D) é a principal técnica de separação de proteínas, sendo bastante aprimorada nos últimos tempos e tem sido muito utilizada no estudo de diversas bactérias patogênicas (FACINCANI, 2007). Esta técnica pioneira foi descrita por O'Farrel (1975) e Klose (1975), e carece de duas corridas eletroforéticas sequenciais em duas dimensões: a primeira dimensão é a focalização isoeletrica (IEF) e a segunda dimensão é a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS-PAGE). Na focalização isoeletrica, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico em tiras de pH imobilizado (GÖRG et al., 1995; GÖRG et al., 2007). Após esta etapa, é realizada a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, na qual as proteínas distribuídas de acordo com seu ponto isoeletrico são separadas de acordo com suas massas moleculares. Sua vantagem em relação às outras técnicas deve-se a sua capacidade de separar com alta resolução, de uma amostra complexa, um elevado número de proteínas, e isto possibilita a análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões proteicos (CHROMY et al., 2004; QUALTIERI et al., 2007). Segundo O'farrel (1975), através desta resolução chega-se numa análise de um mapa global ou perfil no qual todos os produtos gênicos presentes na célula num dado momento ou condição experimental são visualizados.

Através da utilização da eletroforese bidimensional juntamente com a espectrometria de massas é possível separar, quantificar e identificar as proteínas de um material em estudo (FACINCANI, 2007; O'FARREL, 1975). Esta separação das proteínas é possível visto que essas modificações conferem propriedades diferentes à proteína, em particular, um diferente ponto isoeletrico ou massa molecular (KIM et al., 2007; YAMAGATA et al., 2002). No entanto, para a obtenção de amostras de proteína de alta qualidade é necessário que a amostra esteja livre de contaminantes (níveis elevados de sais, ácidos nucleicos, polissacarídeos, compostos fenólicos, pigmentos e outros compostos) que podem interferir com o 2D-PAGE

(CHAN; LO; HODGKISS, 2002; CHAN; HODGKISS; LO, 2004, CHAN et al., 2004). Assim, um método eficiente de extração é um pré-requisito para o sucesso da implementação da proteômica (MEHMETI; KIRAN; OSMANAGAOGLU, 2011).

As análises proteômicas têm sido realizadas para várias fitobactérias em diferentes condições biológicas, incluindo espécies de *Xanthomonas*, com o objetivo de determinar o perfil proteico da bactéria *in vitro* e na interação planta-patógeno (ANDRADE et al., 2005; MEHTA; ROSATO, 2001; TAHARA; MEHTA; ROSATO, 2003).

Proteínas foram diferencialmente expressas em *X. axonopodis* pv. *citri* Valterin et al. cultivada em meio de cultura suplementado com extrato foliar de citros (*Citrus aurantium* L.) e meio de cultura mínimo, sendo 20 e 36 proteínas diferenciais respectivamente entre as duas condições de cultivo (MEHTA; ROSATO, 2001). Comparando dois isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, um cultivado em meio complexo de nutrientes com glicerol e levedura e outro recuperado de folhas inoculadas da planta hospedeira *Brassica oleracea* L., foram verificadas 17 proteínas expressas diferencialmente sendo que dessas, duas tiveram a sua identidade revelada por espectrometria de massas (ANDRADE et al., 2005). Comparando os mapas proteômicos de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye cultivada em meio de cultura mínimo basal e em meio de indução contendo extrato foliar de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), verificou-se expressão diferencial de 20 proteínas, que podem estar envolvidas na interação planta-patógeno (TAHARA; MEHTA; ROSATO, 2003). Atualmente não há relatos científicos sobre análises proteômicas com a bactéria *Xcv*.

Malafaia et al. (2015) testaram para os métodos trizol, fenol, centrifugação e lise para extração de proteínas, e comprovaram que o método de lise foi o mais eficiente para as fitobactérias *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *R. solanacearum*, enquanto o de centrifugação foi melhor para *A. citrulli*. Os autores ressaltaram que uma amostra de boa qualidade, que depende do método utilizado para a extração de proteínas, é um passo fundamental para eletroforese 2D.

Os objetivos deste estudo foram: a) avaliar a capacidade de isolados de *Xcv* de aderir e formar biofilme *in vitro* e determinar a influência do meio de cultura e das superfícies na formação do biofilme; além de analisar a arquitetura do biofilme, utilizando a microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de varredura e investigar a relação da motilidade swarming com a formação do biofilme; b) otimizar um protocolo para extração de proteínas para análise da proteômica de *Xcv*, comparando a eficiência de quatro métodos com base no perfil de eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, n. 11, p. 1853-61, 1998.
- ANDRADE, A. E.; FELIX, G. C.; OLIVEIRA, A. C.; NORONHA, E. F.; PEREIRA, J. L.; LIMA, L. H. C.; ROSATO, Y. B.; MELO, J. A. T.; BLOCH JUNIOR, C.; MEHTA, A. **Expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* na interação com a planta hospedeira *Brassica oleracea***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - 2005. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2021353/bpd093.pdf/3441e697-af21-4b5d-b9a1-80d695cc76d8>>. Acesso em: 19 Jun. 2015.
- ARAUJO, J. S. P.; ROBBS, C. F. Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. **Agronomia (UFRRJ)**, Seropédica, v. 34, n. 1, p. 83-86, 2000.
- ARAUJO, J. S. P.; BUENO, J. R. F.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 305-9, 2005.
- ARAUJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; MACIEL, G. F. Incidência do cancro bacteriano da videira na estação chuvosa do Submédio São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 32, 1999, Fortaleza. **Resumos...** Curitiba: Fitopatologia Brasileira, 1999, v. 24, Suplemento, p. 246.
- ARAUJO, J. S. P.; OLIVEIRA, B. C.; OLIVARES, F. L.; REIS JR., F. B.; CRUZ, G. B.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Imunomarcagem de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 29-33, 2004.
- BAHAR, O.; DE LA FUENTE, L.; BURDMAN, S. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 312, n. 1, p. 33-9, 2010.
- BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 9, p. 721-26, 2007.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; REIS, V. M.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-95, 2009.
- BOGINO, P. C.; OLIVA, M. M.; SORROCHE, F. G.; GIODARNO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 8, p. 15838-59, 2013.
- BUENSANTEAI, N. **Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência da Tecnologia em culturas vegetais) - Universidade de Tecnologia em Suranaree, Muang District, 2004.

BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 92, n. 3, p. 551-92, 2010.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CASERTA, R.; TAKITA, M. A.; TARGON, M. L.; ROSSELLI-MURAI, L. K.; SOUZA, A. P.; PERONI, L.; STACH-MACHADO, D. R.; ANDRADE, A.; LABATE, C. A.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A.; SOUZA, A. A. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 13, p. 4250-59, 2010.

CHAN, L. L.; LO, S. C.; HODGKISS, I. J. Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, n. 9, p. 1169-86, 2002.

CHAN, L. L.; HODGKISS, I. J.; LO, S. C. Use of two-dimensional gel electrophoresis proteome reference maps of dinoflagellates for species recognition of causative agents of harmful algal blooms. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 1, p. 180-92, 2004.

CHAN, L. L.; HODGKISS, I. J.; WAN, J. M.; LUM, J. H.; MAK, A. S.; SIT, W. H.; LO, S. C. Proteomic study of a model causative agent of harmful algal blooms, *Prorocentrum triestinum* II: the use of differentially expressed protein profiles under different growth phases and growth conditions for bloom prediction. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 10, p. 3214-26, 2004.

CHROMY, B. A.; PERKINS, J.; HEIKBRINK, J. L.; GONZALES, A. D.; MURPHY, G. A.; FITCH, J. P.; McCUTCHEM-MALONEY, S. L. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbours. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 320, n. 2, p. 474-79, 2004.

CORRÊA, L. S.; BOLIANE, A. C.; FRACARO, A. A. Panorama do cultivo de uvas rústicas e propagação. In: CORRÊA, L. S.; BOLIANE, A. C.; FRACARO, A. A. (Eds.). **Uvas rústicas: cultivo processamento em Regiões Tropicais**. Jales: Editora Gráfica Universitária, 2008. p. 1-29.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, 1999.

CROSSMAN, L.; DOW J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, n. 6, p. 623-29, 2004.

DANIELS, M. J.; BARBER, C. E.; TURNER, P. C.; SAWCZYC, 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, v. 3, n. 13, p. 3323-28, 1984.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p. 401-22, 2007.

DARNTON, N. C.; TURNER, L.; ROJEVSKY, S.; BERG, H. C. Dynamics of bacterial swarming. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 98, n. 10, p. 2082-90, 2010.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, Washington, v. 280, n. 5361, p. 295-98, 1998.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; TANG, J. L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 10995-11000, 2003.

DUNNE JR., W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-66, 2002.

FACINCANI, A. P. **Análise proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2007. 153f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Paulista, Jaboticabal, 2007.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT, 2015**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>>. Acesso em: 08 Jun. 2015.

FERREIRA-TONIN, M. **Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012. 82f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 291-96, 2005.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 623-33, 2010.

FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará**. Fortaleza, 2001. Disponível em: <[http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_2495.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2495.pdf)>. Acesso em: 03 Jun. 2015.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. **An overview of the road map to the manual: Systematic bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 2000. 20p.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. (Ed). **Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual**. Technische Universitat Munchen, 2007. 166p.

GÖRG, A.; BOGUTH, G.; OBERMAIER, C.; POSCH, A.; WEISS, W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. **Electrophoresis**, New York, v. 16, n. 1, p. 1079-86, 1995.

GUERREIRO; F. G. **Estudos histológicos e epidemiológicos para posterior desenvolvimento de um modelo de infecção para a podridão da uva madura**. Bento Gonçalves, 2006. Disponível em: <[http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/20095383329589tcc\\_francielegalvagniguerreiro.pdf](http://www.bento.ifrs.edu.br/site/midias/arquivos/20095383329589tcc_francielegalvagniguerreiro.pdf)>. Acesso em: 18 Jun. 2015.

GUTTENPLAN, S. B.; KEARNS, D. B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 37, n. 6, p. 849-71, 2013.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Review Microbiology**, Austin, v. 57, p. 249-73, 2003.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; TOILLON, R. A.; BOURHIS, X. L. Proteomics of breast cancer: The quest for markers and therapeutic targets. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 7, n. 4, p. 1403-11, 2008.

HOSSAIN, M. M.; TSUYUMU, S. Flagella-mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 72, n. 1, p. 34-39, 2006.

HUBER, B.; RIEDEL, K.; HENTZER, M.; HEYDORN, A.; GOTSCHILICH, M.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; EBERL, L. The *cep quorum sensing* system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, Oxford, v. 147, n. 9, p. 2517-28, 2001.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA, 2015**: Sistema de Recuperação Automática [on-line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=28&i=P>>. Acesso em: 18 Jun. 2015.

INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 02, de 06 de Fevereiro de 2014. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, Nº 27, 07 de fevereiro de 2014, seção 1, p. 09. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=07/02/2014&jornal=1&pagina=9&totalArquivos=140>>. Acesso em: 15 Jun. 2015.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 73, n. 2, p. 310-47, 2009.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, Cambridge, v. 49, n. 3, p. 581-90, 2003.

KIM, I. S.; YUN, H. S.; JIN, I. N. Comparative proteomic analyses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 strain against menadione-induced oxidative stress. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Korea, v. 17, n. 2, p. 207-17, 2007.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 231-43, 1975.

KOCZAN, J. M.; LENNEMAN, B. R.; MCGRATH, M. J.; SUNDIN, G. W. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 9, p. 7031-39, 2011.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the post antibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Washington, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013.

LAGONENKO, L.; LAGONENKO, A.; EVTUSHENKOV, A. Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria. **Journal of Biology and Earth Sciences**, Polônia, v. 3, p. B176-B181, 2013.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 43-58, 2013.

LEÃO, P. C. S. **Cultivo da videira**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/index.htm>>. Acesso em: 13 Jun. 2015.

LIMA, M. F. **Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***: Epidemiologia e manejo. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2000. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/8855/1/CTE54.pdf>>. Acesso em: 08 Jun. 2015.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Infecção latente em porta-enxerto de videira causada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.127, 2000.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, W. A.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 440-43, 1999.

LOPES, D. B. L.; NASCIMENTO, A. R. P. **Situação atual do cancro bacteriano da videira no semiárido nordestino**. In: Seminário novas perspectivas para o cultivo de uvas sem sementes no Vale do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2004, p. 68-76. (Documento, 185).

- LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- MALAFAIA, C. B.; GUERRA, M. L.; SILVA, T. D.; PAIVA, P. M.; SOUZA, E. B.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. **Proteome Science**, London, v. 13, n. 5, p. 1-7, 2015.
- MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, Cambridge, v. 157, n. 3, p. 819-29, 2011.
- MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 373-76, 2003.
- MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 26-27, 1999.
- MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 437-73, 2001.
- MARQUES, C. S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MARQUES, L. L. R.; CERI, H.; MANFIO, G. P.; REID, D. M.; OLSEN, M. E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* *in vitro*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 6, p. 633-38, 2002.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A. S. V. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 406-11, 2009.
- MARTÍNEZ, L. C.; VADYVALOO, V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 38, p. 1-15, 2014.
- MEDONLINE. Medicina on Line. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. **Revista Virtual de Medicina**. Disponível em: <<http://www.medonline.com.br>>. Acesso em: 18 Jun. 2015.
- MEHMETI, I.; KIRAN, F.; OSMANAGAOGLU, O. Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. **African Journal Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 11, p. 2178-85, 2011.

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, v.1, n. 9, p.1111-18, 2001.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 249-53, 2003.

MHEDBI-HAJRI, N.; DARRASSE, A.; PIGNE, S.; DURAND, K.; FOUTEAU, S.; BARBE, V.; MANCEAU, C.; LEMAIRE, C.; JACQUES, M. A. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 67-79, 2011.

MIRANDA, T. D. **Otimização da PCR para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras assintomáticas**. 2011. 37 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Biologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 301-07, 2004.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p.650-54, 2005.

NASCIMENTO, A. R. P.; MASHIMA, C. H.; LIMA, M. F. **Cancro Bacteriano: Nova doença da videira no Submédio São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2000. 22p. (Circular Técnica, 58).

NAUE, C. R.; COSTA, V. S. O.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cutting tools and water: survival and disinfection. **Journal of Plant Pathology**, London, v. 96, n. 3, p. 451-58, 2014a.

NAUE, C. R.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira Red Globe no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 853-61, 2014b.

NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a New Bacterial Disease of Grapevine. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlim, v. 73, n. 2, p. 183-86, 1972.

O'FAREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, n. 10, p. 4007-21, 1975.

O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, Massachusetts, v. 405, n. 6788, p. 837-46, 2000.

- PEDRO JÚNIOR, M. J.; SENTELHAS, P. C. Clima e produção. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 63-107.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 161-64, 2007.
- POMMER, C. V.; MAIA, M. L. Introdução. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia da produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 11-36.
- QUALTIERI, A.; PERA, M. L.; URSO, E.; BONO, F.; VALENTINO, P.; SCORNAIENCHI, M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 125-133, 2007.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PIRES, E. J. P. A videira. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção pós-colheita mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 37-61.
- RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; OLIVEIRA, A. P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S. C.; TAGLIETTI, R. M. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella heidelberg* isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 3, p. 225-30, 2009.
- RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilm in wounds: management strategies. **Journal of Wound Care**, Texas, v. 17, n. 11, p. 502-8, 2008.
- RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.; QÜESTA, J.; DOW, J.; CASTAGNARO, A.; VOJNOV, A. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 10, p. 1222-30. 2007.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 727-34, 2010.
- SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; GAMA, M. A.; MARIANO, R. L. R.; BARBOSA, M. A. G.; PAZ, C. D. Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, p.595-98, 2014.
- SCHLEIER, R. **Constituintes fitoquímicos de *Vitis vinifera* L. (Uva)**. 2004. 46f. Monografia (Especialização em Fitoterapia) - Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, São Paulo, 2004.
- SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, Oxford, 2014. (DOI: 10.1111/ppa.12311).



- SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Org.). **A viticultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2000. p. 19-44.
- SILVA, A. M. F.; MELO, N. F.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Limpeza clonal de mudas de videira infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, p. 316-19, 2013.
- SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, p. 757-65, 2012.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 4, p. 573-83, 2010.
- SOUSA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. v. 1, 791p.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 175-79, 2000.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERNON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, 2002.
- SUNDE, P. T., OLSEN, I.; GÖBEL, U. B.; THEEGARTEN, D.; WINTER, S.; DEBELIAN, G. J.; TRONSTAD, L.; MOTER, A. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. **Microbiology**, England, v. 149, n. 5, p.1095-1102, 2003
- TAKITA, M. A.; SOUZA, A.; BORGES, K. M.; COLETA-FILHO, H. D.; RODRIGUES NETO, J.; MACHADO, M. A. A região *rpf* (regulation of pathogenicity factors) distingue espécies de *Xanthomonas*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n. 1, p. S253-54, 2004.
- 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, v. 3, n. 1, p. 95-102, 2003.
- TANG, J.; CHEN, J.; LIU, J.; ZHANG, R.; YANG, R.; CHEN, L. Effects of different cultivation conditions on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and diversity of adhesin genes. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 32, n. 2, p. 210-18, 2012.
- TERRAL, J. F.; TABARD, E.; BOUBY, L.; IVORRA, S.; PASTOR, T.; FIGUEIRAL, I.; PICQ, S.; CHEVANCE, J. B.; JUNG, C.; FABRE, L.; TARDY, C.; COMPAN, M.; BACILIERI, R.; LACOMBE, T.; THIS, P. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 6, p. 443-55, 2010.
- TORRES, P. S.; MALAMUD, F.; RIGANO, L. A.; RUSSO, D. M.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; ZORREGUIETA, A.; BOUARAB, K.; DOW, J. M.; VOJNOV, A.

- A. Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2101-09, 2007.
- TOSTES, G. O.; ARAUJO, J. S. P.; FARIAS, A. R. G.; FRADE, D. A. R.; OLIVARES, F. L. Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 134-140, 2014.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- TRINDADE, L. C.; MARQUES, E; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 16-23, 2007.
- VALLE, J.; LATASA, C.; GIL, C.; TOLEDO-ARANA, A.; SOLANO, C.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. Bap, a Biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to *gp96* host receptor. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. e1002843, 2012.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-89, 1995.
- VITKOV, L.; HANNIG, M.; KRAUTGARTNER, W. D.; HERRMANN, M.; FUCHS, K.; KLAPPACHER, M.; HERMANN, A. *Ex vivo* gingival-biofilm consortia. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.41, n.5, p.404-11, 2005.
- YAMAGATA, A.; KRISTENSEN, D. B.; TAKEDA, Y.; MIYAMOTO, Y.; OKADA, K.; INAMATSU, M.; YOSHIZATO, K. Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, n. 9, p. 1267-76, 2002.
- YAO, J.; ALLEN, C. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 17, p. 6415-24, 2007.
- YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 21, n. 1, p. 153-77, 1978.
- ZHANG, Y.; WEI, C.; JIANG, W.; WANG, L.; LI, C.; WANG, Y.; DOW, J. M.; SUN, W. The HD-GYP domain protein *RpfG* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* regulates synthesis of extracellular polysaccharides that contribute to biofilm formation and virulence on rice. **PLoS ONE**, California, v. 8, n. 3, p. e59428, 2013.
- ZIMARO, T.; THOMAS, L.; MARONDEDZE, C.; GARAVAGLIA, B. S.; GEHRING, C.; OTTADO, J.; GOTTIG, N. Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. **BMC Microbiology**, London, v. 13, n. 186, 14 p., 2013.

## CAPÍTULO II

---

### ***Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: biofilm formation response to distinct conditions**

1 ***Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: biofilm formation response to distinct**  
 2 **conditions**

3  
 4 **Myrzânia de Lira Guerra<sup>1</sup>, Carolina Barbosa Malafaia<sup>2</sup>, Alexandre da Silva**  
 5 **Xavier<sup>1</sup>, Alexandre José Macedo<sup>3</sup>, Márcia Vanusa Silva<sup>2</sup>, Rosa de Lima Ramos**  
 6 **Mariano<sup>1</sup>, Elineide Barbosa de Souza<sup>4</sup>**

7  
 8 **Abstract**

9 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* is the causal agent of bacterial canker, an  
 10 important disease of grapevine plants in Brazil. Seven strains of this pathogen were studied  
 11 for their ability to adhere and form biofilms in four culture media using microtiter plate and  
 12 glass tube techniques. The biofilm architecture was evaluated by confocal laser scanning  
 13 microscopy (CLMS) and scanning electron microscopy (SEM), and the swarming motility  
 14 was also investigated. Generally, all the strains adhered to the wells of the microtiter plate and  
 15 formed biofilms in all four types of culture medium, though to different degrees (weak,  
 16 moderate and strong). In glass tubes, only Xcv229 and Xcv158 strains formed biofilms. We  
 17 identified Xcv229 as a strong biofilm-producing strain. Only Xcv229 showed an initial matrix  
 18 of biofilm structure after 24 h of growth using CLSM. SEM images of strains Xcv229 and  
 19 Xcv158 grown for 36 h on polystyrene microtiter plates revealed typical biofilm architectures.  
 20 Strain Xcv158 displayed a higher swarming motility than Xcv229, showing that in this case,  
 21 biofilm formation is not motility-dependent. This work is the first report of biofilm production  
 22 by the bacterial plant pathogen *X. campestris* pv. *viticola*.

23 **Key words:** *Vitis vinifera*, bacterial canker disease, CLMS, SEM, swarming motility

24  
 25 **Introduction**

26 In plant pathogenic bacteria, biofilms may act as a virulence factor in the early stages  
 27 of colonization and infection (Flemming and Wingender 2010). First, the bacterium must  
 28 detect the plant surface, which requires active motility. Biochemical stimuli mediate motility,  
 29 so that the bacterium can locate an optimum site for attachment and aggregation on the plant  
 30 surface (Mhedbi-Hajri *et al.* 2011). This is followed by adhesion to the surface, cell

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco - Dept. de Agronomia, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco - Dept. of Bioquímica, Biologia Molecular, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-560, Brazil.

<sup>3</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 2752 - Azenha, Porto Alegre - RS, 90610-000, Brazil.

<sup>4</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco - Dept. de Biologia, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900, Brazil.

31 replication, production of cell-to-cell signaling molecules and, eventually, the release of  
32 planktonic bacteria from the biofilm (Danhorn and Fuqua 2007; Karatan and Watnick 2009).  
33 After invasion, the formation of a biofilm allows the bacterium to maintain a critical mass of  
34 cells within the plant tissues. The availability of key nutrients, chemotaxis towards the  
35 surface, motility of bacteria, surface adhesins and the presence of surfactants are factors that  
36 influence biofilm formation (Danhorn and Fuqua 2007).

37 *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) (Nayudu) Dye is a Gram-negative  
38 bacterium with dimensions of 0.6 x 1.2 to 2.5  $\mu\text{m}$ . It is rod-shaped, has a polar flagellum and  
39 undergoes aerobic metabolism. It causes bacterial canker of the grapevine (*Vitis vinifera* L.), a  
40 disease that has been detected in India, Brazil and Thailand but only has economic impact in  
41 Brazil. In the Vale do Submédio São Francisco in the northeast of Brazil, bacterial canker is  
42 one of the most important grapevine diseases, responsible for severe damage and representing  
43 a serious risk to Brazilian viticulture (Araujo *et al.* 2005). *Xcv* is present in the states of Bahia,  
44 Ceará and Pernambuco (Naue *et al.* 2014).

45 Due to the economic damage caused by the bacterial canker disease of grapevine  
46 plants, there has been a major effort to generate more information about *Xcv*. The biology and  
47 ecology of this bacterium is poorly understood, and little is known about its epiphytic growth,  
48 mechanisms of pathogenesis, and modes of dissemination and survival (Silva *et al.* 2012;  
49 Silva Regini and Negri 2013; Naue *et al.* 2014; Tostes *et al.* 2014). Several bacterial species  
50 that cause plant diseases have the capacity to adhere and form biofilms, showing distinct  
51 phenotypes and affecting different hosts (Lagonenko, Lagonenko and Evtushenkov 2013;  
52 Zimaro *et al.* 2013; Sena-Vélez *et al.* 2014). Although this characteristic may increase the  
53 bacterial virulence and hamper disease control, studies regarding the ability of the *Xcv* to form  
54 a biofilm were not found.

55 Therefore, the aims of this study were to evaluate the ability of *Xcv* strains to adhere  
56 and form biofilms *in vitro* and to determine the influence of the culture medium and surfaces  
57 on biofilm formation. In addition, the biofilm architecture and swarming motility were also  
58 investigated.

59

## 60 **Materials and Methods**

61 **Bacterial strains and growth conditions.** Seven strains of *Xcv* were selected based on a  
62 variability of the severity to the grapevine, as described in previous studies (Gama 2014).  
63 Strains Xcv154, Xcv158, Xcv207 and Xcv229 represented high virulence, and Xcv137,  
64 UnB1315 and ENA4598 represented low virulence.

65 The strains of *Xcv* were cultured in nutrient-dextrose-yeast extract liquid medium  
66 (NYD) for 36 h at 28 °C. The bacterial suspensions were prepared in water and adjusted to an  
67 optical density  $OD_{600} = 0.4$  nm, equivalent to  $10^8$  CFU  $mL^{-1}$ , using a SpectraMax<sup>®</sup> M2e  
68 Multimode Microplate Reader (Molecular Devices, California, USA).

69 **Biofilm formation.** Assays were conducted in microtiter plates and glass tubes utilizing  
70 distinct liquid media: NYD; yeast extract-dextrose-calcium carbonate (YDC); KADO 523  
71 (KADO); and Luria-Bertani (LB).

72 Standard sterile 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates (Costar 3599  
73 Corning Inc., Amsterdam, USA) were used to evaluate biofilm formation according to a  
74 protocol adapted from Trentin *et al.* (2011). To each well, 140  $\mu$ L of culture medium, 20  $\mu$ L  
75 of Milli-Q water and 40  $\mu$ L of bacterial suspension ( $10^8$  CFU  $mL^{-1}$ ) were added. Two controls  
76 were added: the antibiotic rifampicin ( $32 \mu g mL^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and a  
77 negative control that contained only culture medium (200  $\mu$ L). After 36 h of incubation ( $28 \pm$   
78  $2$  °C), the wells had their contents removed and were washed three times with sterile NaCl  
79 saline (0.9%). The plates were placed in the oven, and the fixation was performed for 1 h at  
80 60 °C. Then, the adherent layer of biofilm was stained with 0.4% crystal violet for 15 min  
81 under laboratory conditions, and the plate was washed with tap water. In each well, the  
82 biofilm was solubilized in 200  $\mu$ L of ethanol for 10 min with the lid closed to prevent  
83 evaporation. The plate was read at  $OD_{570}$ . Eight biological replicates were performed.

84 Biofilm formation was also evaluated in glass tubes according to a protocol adapted  
85 from Tang *et al.* (2011) by inoculating 1 mL of the bacterial suspension in each tube  
86 containing 4 mL of NYD, YDC, KADO or LB. The formation of biofilms on the walls of the  
87 tubes was verified using the same methodology as for the microtiter plates. Five biological  
88 replicates were performed.

89 The ability of biofilm formation of the *Xcv* strains followed the classification of  
90 Stepanovic *et al.* (2000), where the optical density (OD) of negative control is used as basis to  
91 determine the parameters to consider an isolated or non- biofilm producer (DOc). Therefore,  
92 the rating for the formation of biofilm or not follows the following rule:  $OD \leq ODc =$  no  
93 producer,  $ODc < OD \leq (2 \times ODc) =$  weak producer,  $(2 \times ODc) < OD \leq (4 \times ODc) =$  moderate  
94 producer and  $(4 \times ODc) < OD =$  strong producer.

95 **Biofilm architecture.** The strains *Xcv*229 and *Xcv*158 were grown in sterile 96-well  
96 microtiter plates in four different culture mediums, as already described, for 24 h. Samples  
97 were observed using an CLSM Olympus FluoView<sup>™</sup> 1000 (Olympus Corporation, Tokyo,  
98 Japan). Sample preparation was performed with dye conjugate concanavalin A (Con A),

99 following the manufacturer's instructions (Molecular Probes™, Eugene, USA), and the  
100 LIVE/DEAD® Bacterial Viability and Counting Kit (BacLight™, Oregon, EUA). Live cells  
101 were stained in green and dead cells in red. The images were analyzed using Olympus  
102 Fluoview 4.0 software (FV10-ASW, Tokyo, Japan).

103 The biofilm architecture was also studied using SEM. Strains Xcv229 and Xcv158  
104 were grown in four different culture media in sterile 96-well microtiter plates containing  
105 Permanox® Cell Culture Slide (Nalge Nunc International, Rochester, USA) for 36 h. Samples  
106 were cut into pieces (0.7 x 0.5 mm) and prepared according to the methodology of Poto *et al.*  
107 (2009), modified. The samples were washed with sterile 0.9% NaCl, and the biofilm was  
108 fixed with 2.5% glutaraldehyde overnight and washed with cacodylate buffer. Then, the  
109 samples were dehydrated with increasing concentrations of acetone of 10, 30, 50, 70, 90 and  
110 100% for 10 min in each concentration, dried in a CO<sub>2</sub> critical point dryer (Bal-Tec 030,  
111 Shared Materials Instrumentation Facility, Durham, USA), and metalized with platinum. The  
112 samples were scanned using a JEOL SEM (JSM-5800 LV, Jeol Ltda., Tokyo, Japan), and the  
113 images were analyzed using NORAN System Six® software (Thermo Electron Scientific,  
114 Madison, USA). Each study was performed in triplicate.

115 **Swarming motility.** The strains Xcv229 and Xcv158 were assayed according to the  
116 methodology of Rashid and Kornberg (2000), modified. Bacteria were grown in NYDA for  
117 48 h, the cells were resuspended in sterile distilled water and the final concentration of the  
118 bacterial suspension was adjusted to 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. This suspension was deposited, 100 µL,  
119 in the center of plates containing swarming medium (beef extract 3 g L<sup>-1</sup>, yeast extract 5 g L<sup>-1</sup>,  
120 dextrose 5 g L<sup>-1</sup>, agar 5 g L<sup>-1</sup>), and the plates were incubated at 28 °C. The colony diameter  
121 was measured 72 h post-inoculation. Three biological replicates were performed, and the  
122 assay was performed thrice. Given that significant differences in the variances of the  
123 experimental replications were not observed (P≤0.05), the data were evaluated as replicates in  
124 time. The data were subjected to ANOVA, and the means were compared by Student's t-test  
125 (P≤0.05) using Statistix® software (version 10.0, Analytical Software, Tallahassee, USA).

126

## 127 **Results**

128 **Biofilm formation.** Generally, all strains of *Xcv* formed biofilms in all four types of culture  
129 medium in microtiter plates, though to different degrees (weak, moderate and strong).  
130 However, Xcv207 showed non-adherence in NYD (Fig. 1A). Xcv229 was the strongest  
131 biofilm producer in the four media. Xcv158 also stood out as strong biofilm producer,  
132 although it showed a weak formation in YDC.

133 In glass tubes, Xcv229 and Xcv158 showed, respectively, moderate to strong and  
134 weak to medium formations of biofilms in all culture media (Fig. 1B), except for Xcv158 in  
135 YDC. The other five *Xcv* strains did not form biofilms. The microtiter plate method was  
136 considered to be superior to the glass tube method (Fig. 1). In culture media with rifampicin  
137 ( $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), the growth of the bacterial strains was inhibited.

138 Based on the results of the biofilm formation, the Xcv229 and Xcv158 strains were  
139 selected for the other studies.

140 **Biofilm architecture.** The CLSM performed at 24 h showed some cells of Xcv229 beginning  
141 to adhere to the surface of the plate wells and characterized the initial formation of the biofilm  
142 matrix in KADO (Fig. 2 A1, A2 and A3) and YDC (Fig. 2 B1, B2 and B3) stained with  
143 concanavalin A; however, the majority of the cells remained dispersed. Xcv229 stained with  
144 Live/Dead showed a distinctly structured and dense biofilm consisting of large cell  
145 aggregations in YDC (Fig. 2 C1, C2 and C3). Biofilm formation was observed only in NYD  
146 amended with rifampicin and stained with Live/Dead (Fig. 2 D1, D2 and D3). Xcv158 did not  
147 adhere or form a biofilm matrix in any culture medium.

148 SEM revealed that strains Xcv229 and Xcv158 were able to form dense biofilms  
149 exhibiting typical biofilm architectures (Fig. 3). Xcv229 showed an initial phase with  
150 aggregates in YDC (Fig. 3 A and B) and the presence of a strong biofilm structure in LB (Fig.  
151 3 C and D). Xcv158 presented an initial formation of a biofilm matrix in NYD (Fig. 3 E and  
152 F) and LB (Fig. 3 G and H) with isolated aggregates.

153 **Swarming motility.** Strains showed the migration of cells (increase in colony diameter),  
154 forming smooth and flat colonies, which was considered positive swarming (Fig. 4A).  
155 However, Xcv158 displayed a higher swarming motility than Xcv229 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4B).  
156 Interestingly, we identified strain Xcv229 as a strong biofilm producer (Fig. 1).

157

## 158 Discussion

159 *Xcv* strains Xcv229 and Xcv158 were capable of forming a biofilm in all media tested.  
160 However, the results obtained herein show no direct correlation between virulence found by  
161 Gama (2014) and biofilm formation observed in this study. The ability to form a biofilm is a  
162 universal attribute of several bacteria, but the mechanism employed to pursue this  
163 characteristic may vary according to the specific strain and the diverse environments they  
164 occupy (Martínez and Vadyvaloo 2014). *Xcv* colonizes leaves, branches, rachis, berries and  
165 vascular system of the grapevine plants, and biofilm formation can play a role in the infection  
166 and virulence of the bacteria at these colonization sites. This was already demonstrated for



167 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Zimaro *et al.* 2013; Sena-Vélez *et al.* 2014), *Erwinia*  
168 *amylovora*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas*  
169 *campestris* pv. *campestris*, *Pectobacterium carotovorum* (Lagonenko, Lagonenko and  
170 Evtushenkov 2013), and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Sena-Vélez *et al.* 2014).  
171 The adhesion of microbial cells to a surface or substrate, the physicochemical characteristics  
172 of the substrate, and the environmental conditions are decisive factors in this process (Araújo  
173 *et al.* 2010). We tested the possible influence of the four culture media and the polypropylene  
174 and glass surfaces on cell adherence and biofilm formation by strains of *Xcv*.

175         Despite its various components, the different culture media tested had no distinct  
176 effect on biofilm formation by *Xcv* on microtiter plates, as a biofilm was observed in all  
177 media, although to different degrees (weak, moderate and strong) according to the strain (Fig.  
178 1A). One strain may be a strong biofilm producer in one culture medium and a poor biofilm  
179 producer in another medium (Harrison *et al.* 2006). Therefore, the composition of the medium  
180 has been documented as one of the factors that influence the bacterial ability to form a biofilm  
181 *in vitro* (Tang *et al.* 2011). In particular, the presence of glucose in the culture medium has  
182 been reported to enhance this process (Stepanovic *et al.* 2007). These findings do not fully  
183 agree with our studies, as the LB broth, which was the only medium without glucose, was as  
184 good a medium for biofilm formation as NYD and YDC (Fig. 1). Thus, to confirm a biofilm-  
185 producing strain, the use of at least two culture media is recommended (Knobloch *et al.*  
186 2002).

187         In glass tubes, only *Xcv*229 and *Xcv*158 formed a biofilm in most of the culture media  
188 (Fig. 1B), evidencing that the microtiter plate method (Fig. 1A) is superior to the glass tube  
189 method. The strain *Xcv*229 was the most versatile with respect to its ability to form a biofilm,  
190 regardless of the culture broth used in the microtiter plate and glass tubes. Bacterial adhesion  
191 is a complex process that can be affected by many factors, such as the physicochemical  
192 characteristics of the bacteria and the hydrophobicity of the surface or substrate (Simões,  
193 Simões and Vieira 2010). The surface on which the organism tries to adapt can exert a strong  
194 influence on its adhesion, and it becomes a decisive factor in biofilm formation. Hydrophobic  
195 surfaces such as plastics are usually more easily adhered to by microorganisms compared than  
196 hydrophilic ones such as glass or metal (Rodrigues *et al.* 2009).

197         In CLSM, viable cells, the initial matrix of the biofilm structure, the distinctly  
198 structured biofilm, cells embedded within an extracellular polymeric matrix, and aggregates  
199 probably connected by this matrix were visualized only for *Xcv*229 (Fig. 2). These structures

200 were also found as typical characteristics of mature *X. axonopodis* pv. *citri* biofilms on glass  
201 slides (Rigano *et al.* 2007).

202 The absence of adherence and biofilm matrix formation by strain Xcv158 on glass  
203 slides was probably due to the evaluation period. At 24 h, only Xcv229 was able to adhere  
204 and start biofilm formation, because it is a stronger biofilm producer, as observed in  
205 microtiter plate and glass tube assays (Fig. 1).

206 The observation of the high biofilm biomass in the NYD amended with rifampicin (32  
207 µg/ml) (Fig. 3D) indicates that Xcv229 possibly formed this structure before the action of the  
208 antibiotic, probably as a defense mechanism. Reiter *et al.* (2012) observed that rifampicin  
209 alone failed to kill biofilm-forming bacteria, demonstrating a stronger inability to eradicate a  
210 mature biofilm compared with vancomycin. In the same study, the concentration of  
211 vancomycin necessary for killing planktonic cells was not able to inhibit adherent cells or  
212 eradicate mature biofilms. Furthermore, the antibiotics tobramycin and tetracycline at sub-  
213 inhibitory concentrations increased *Pseudomonas aeruginosa* motility and the expression of  
214 its type III secretion system, respectively, inducing biofilm formation (Linares *et al.* 2006).

215 SEM images of strains Xcv158 and Xcv229 revealed typical biofilm architectures,  
216 from the initial formation of clumps to the presence of dense biofilms, varying according to  
217 the strain and culture medium utilized (Fig. 3). This result corroborates the findings obtained  
218 in the microtiter plate assay (Fig. 1A). Biofilms may have different sizes despite having the  
219 same time growing in a culture medium because its growth, adhesion and maturation are  
220 related to the culture medium and its composition (Tang *et al.* 2011). SEM showed that Xcv  
221 cells adhere to the plant surface mostly on the veins and trichomes of the leaf blades (Araujo  
222 *et al.* 2004). Seed grapevine samples showed bacterial aggregates associated with the  
223 tegument surface and the first parenchymal layer beneath the seed tegument (Tostes *et al.*  
224 2014).

225 Xcv229 presented a slow swarming motility under the conditions tested (Fig. 4),  
226 although it was classified as a strong biofilm producer (Fig. 1). Swarming is often considered  
227 a transitional step before the formation of stationary biofilm communities (Anyan *et al.* 2014).  
228 Flagella were necessary for swarming motility in *X. axonopodis* pv. *citri*, which in turn was  
229 important in determining the final structure of the biofilm (Gottig *et al.* 2009). Polar flagella  
230 may also play an important role in adhesion and biofilm formation and contribute to the  
231 pathogen virulence under certain environmental conditions, as evidenced in *Acidovorax*  
232 *citrulli* (Bahar, Goffer and Burdman 2009). However, flagella are important but not essential  
233 for surface attachment (Watnick and Kolter 1999). Studies with *P. aeruginosa* showed that

234 despite the importance of the flagella for the development of biofilms, there is not necessarily  
 235 a positive correlation between these two features, characterizing a process of trade-off  
 236 development, even if both are essential to the evolutionary success of the individual (such as  
 237 biofilm formation and motility) (Ditmarsch *et al.* 2013). In the evolution, this can be  
 238 explained by the great complexity of the bacterial biofilm and because flagella and other  
 239 external cell structures are influenced by the nutrient composition of the substrate, pH, fluid  
 240 hydrodynamics, and biotic or abiotic surfaces, among others (Flemming and Wingender  
 241 2010).

242 In conclusion, we report that strains of *Xcv* have different levels of biofilm formation  
 243 in different culture broths and that the microtiter plate method is a quantitative and reliable  
 244 method for the detection of biofilms. Additionally, we found that biofilm production by *Xcv* is  
 245 not dependent on swarming motility. This work is the first report of biofilm production by the  
 246 plant pathogenic bacterium *Xcv*.

247

#### 248 **Acknowledgements**

249 The authors thank FACEPE (IBPG-0138-5.01/11), CNPq (Proc.307348/2011-3,  
 250 APQ477521/2011-8) and Professor Carlos Termignoni for providing the Biotechnology  
 251 Laboratory (UFRGS) in support of this research.

252

#### 253 **Rereferences**

254 Anyan ME, Amiri A, Harvey CW, *et al.* Type IV pili interactions promote intercellular  
 255 association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*  
 256 2014;**111**:18013-18018.

257 Araújo EA, Andrade NJ, Carvalho AF, *et al.* Aspectos coloidais da adesão de micro-  
 258 organismos. *Quim. Nova* 2010;**33**:1940-1948.

259 Araujo JSP, Bueno JRF, Cruz GB, *et al.* Produção e caracterização de anticorpos  
 260 policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Pesqui Agropecu Bras* 2005;**40**:305-  
 261 309.

262 Araujo JSP, Oliveira BC, Olivares FL, *et al.* Imunomarcacão de *Xanthomonas*  
 263 *campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. *Agronomia* 2004;**38**:29-  
 264 33.

265 Bahar O, Goffer T, Burdman S. Type IV pili are required for virulence, twitching  
 266 motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Mol Plant Microbe*  
 267 *Interact* 2009;**22**:909-920.

- 268 Danhorn T, Fuqua, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev*  
269 *Microbiol* 2007;**61**:401-422.
- 270 Ditmarsch D van, Boyle KE, Sakhtah H, *et al.* Convergent evolution of hyper swarming  
271 leads to impaired biofilm formation in pathogenic bacteria. *Cell Rep* 2013;**4**:697-708.
- 272 Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:623-633.
- 273 Gama, MAS. Caracterização polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e  
274 reposicionamento de espécies de *Xanthomonas* patogênicas à videira e cajueiro. Ph.D. Thesis.  
275 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil. 2014.
- 276 Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, *et al.* A filamentous hemagglutinin-like protein  
277 of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is  
278 involved in bacterial virulence. *PLoS One* 2009;**4**:e4358.
- 279 Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, *et al.* The use of microscopy and three-dimensional  
280 visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary biofilm  
281 device. *Biol Proceed Online* 2006;**8**:194-215.
- 282 Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break  
283 bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009;**73**:310-347.
- 284 Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, *et al.* Evaluation of different detection methods  
285 of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002;**191**:101-106.
- 286 Lagonenko L, Lagonenko A, Evtushenkov A. Impact of salicylic acid on biofilm  
287 formation by plant pathogenic bacteria. *J Biol Earth Sci* 2013;**3**:B176-B181.
- 288 Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, *et al.* Antibiotics as intermicrobial signaling agents  
289 instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:19484-19489.
- 290 Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigne S, *et al.* Sensing and adhesion are adaptive  
291 functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol Biol* 2011;**11**:67.
- 292 Martinez LC, Vadyvaloo V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in  
293 bacterial biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;**4**:38.
- 294 Naue CR, Costa VSO, Barbosa MAG, *et al.* *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on  
295 grapevine cutting tools and water: survival and disinfection. *J Plant Pathol* 2014;**96**:451-458.
- 296 Poto AD, Sbarra MS, Provenza G, *et al.* The effect of photodynamic treatment combined  
297 with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms.  
298 *Biomaterials* 2009;**30**:3158-3166.
- 299 Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming,  
300 and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:4885-  
301 4890.

- 302 Reiter KC, Sambrano GE, Villa B, *et al.* Rifampicin fails to eradicate mature biofilm  
303 formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;**45**:471-  
304 474.
- 305 Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, *et al.* Biofilm formation, epiphytic fitness, and  
306 canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant-Microb Interact*  
307 2007;**20**:1222-1230.
- 308 Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, *et al.* Avaliação da Hidrofobicidade e da  
309 Formação de Biofilme em Poliestireno por Salmonella Heidelberg Isoladas de Abatedouro  
310 Avícola. *Acta Sci Vet* 2009;**37**:225-230.
- 311 Sena-Vélez M, Redondo C, Gell I, Ferragud E, Johnson E, Graham JH, Cubero J.  
312 Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. *Plant*  
313 *Pathol* 2014. (DOI: 10.1111/ppa.12311)
- 314 Silva AMF, Menezes EF, Souza EB, *et al.* Sobrevivência de *Xanthomonas campestris*  
315 pv. *viticola* em tecido infectado de videira. *Rev Bras Frutic* 2012;**34**:757-765.
- 316 Silva HR, Regini JRR, Negri M. Biofilme: ameaça invisível em ambientes cirúrgicos.  
317 *Braz J Surg Clin Res* 2013;**4**:43-48.
- 318 Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control  
319 strategies. *Food Sci Technol* 2010;**43**:573-583.
- 320 Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, *et al.* A modified microtiter-plate test for  
321 quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000;**40**:175-179.
- 322 Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates:  
323 overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm  
324 production by staphylococci. *APMIS* 2007;**115**:891-899.
- 325 Tang J, Kang M, Chen H, *et al.* The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation  
326 in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. *Sci China Life Sci* 2011;**54**:863-  
327 869.
- 328 Tostes GO, Araujo JSP, Farias ARG, Frade DAR, Olivares FL. Detection and cellular  
329 localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe'  
330 grapes. *Trop Plant Pathol* 2014;**39**:134-140.
- 331 Trentin DS, Gorziza DF, Abraham WR, *et al.* Antibiofilm activity of *Cobetia marina*  
332 filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. *Braz J Microbiol*  
333 2011;**42**:1329-1333.
- 334 Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm.  
335 *Mol Microbiol* 1999;**34**:586-595.

336 Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, *et al.* Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv.  
337 *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiology* 2013;**13**:186.  
338

339

340

341

342

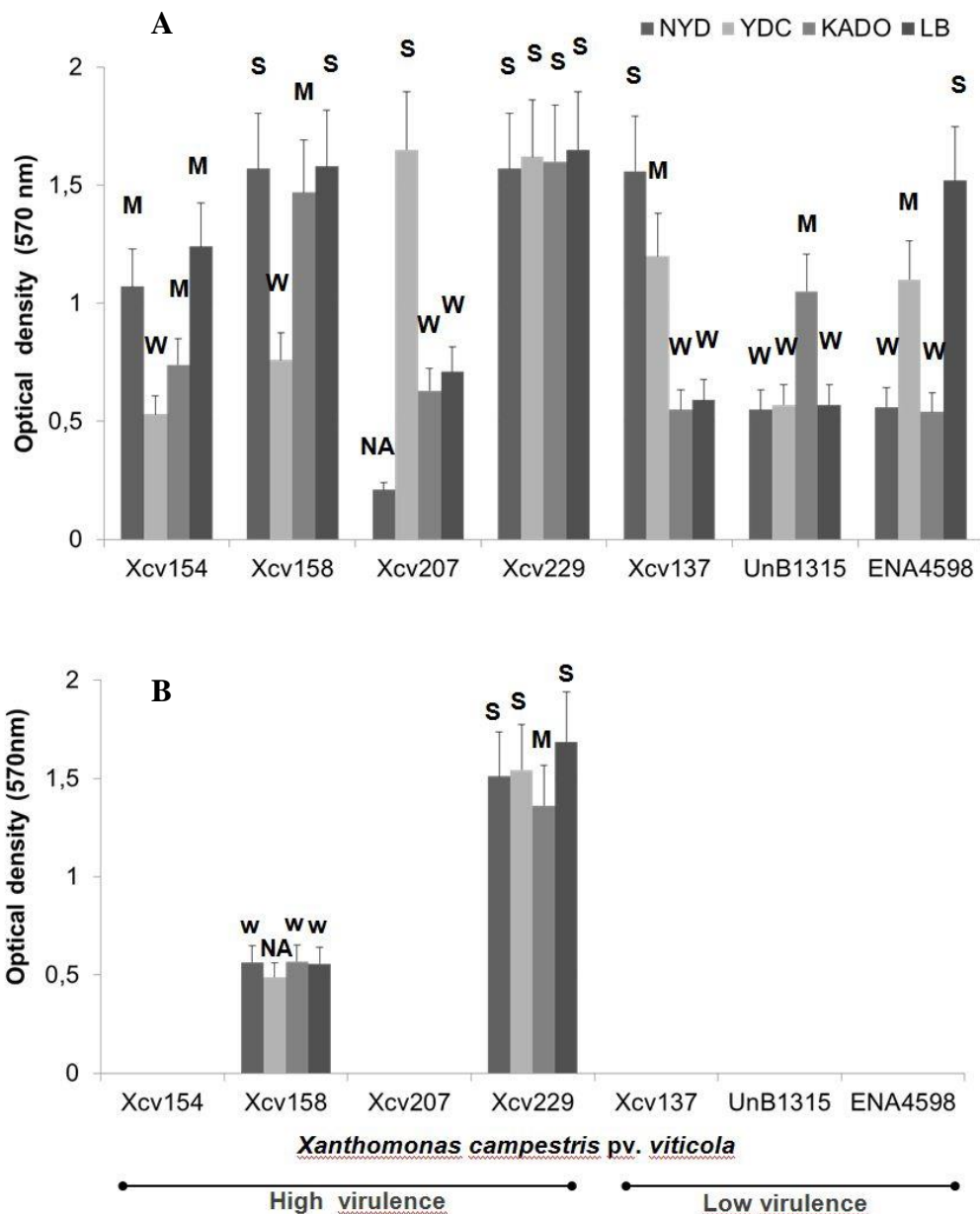
343

344

345

346

347



348

349

350

351

352

353

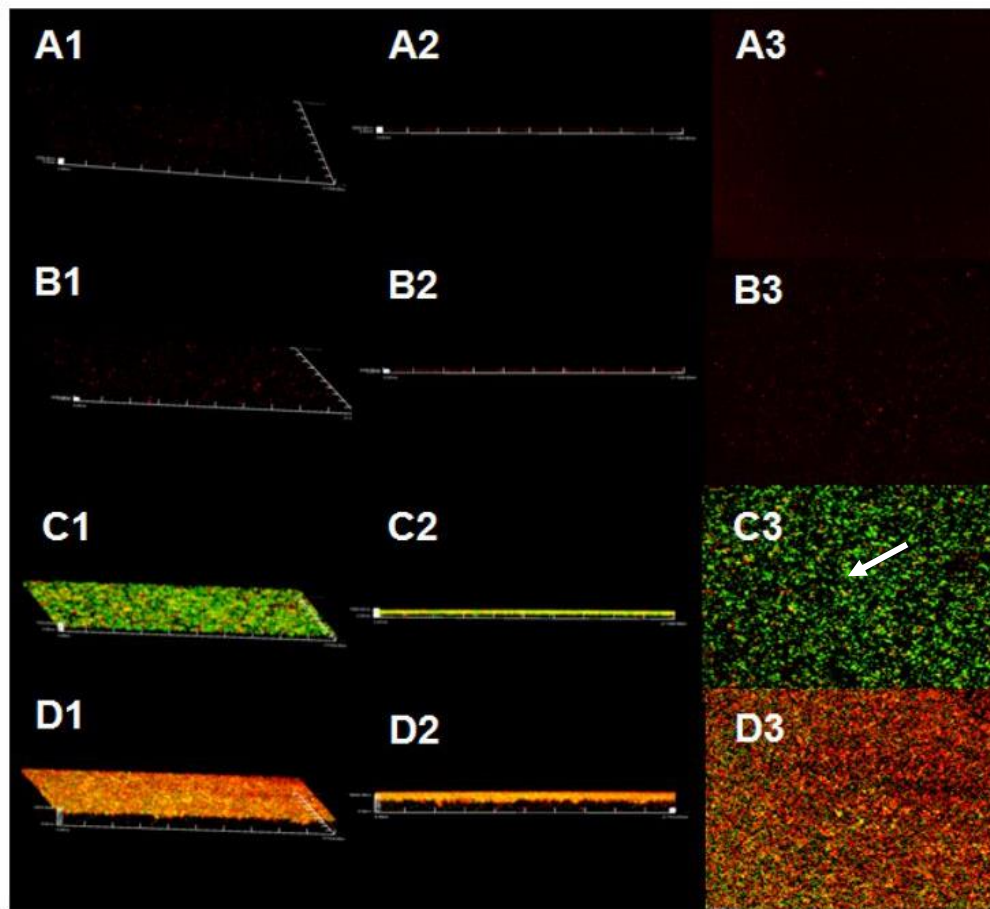
354

355

356

**Figure 1.** Biofilm formation on polystyrene microtiter plates (A) and glass tubes (B) by different strains of the *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **NA**: non adherent, **W**: weak, **S**: strong and **M**: moderate (Stepanovic *et al.*, 2000). Mean values were from four independent experiments, and each was performed with eight replicates. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. NYD, dextrose-yeast extract; YDC, yeast extract-dextrose-calcium carbonate; KADO, Kado 523; LB, Luria-Bertani.

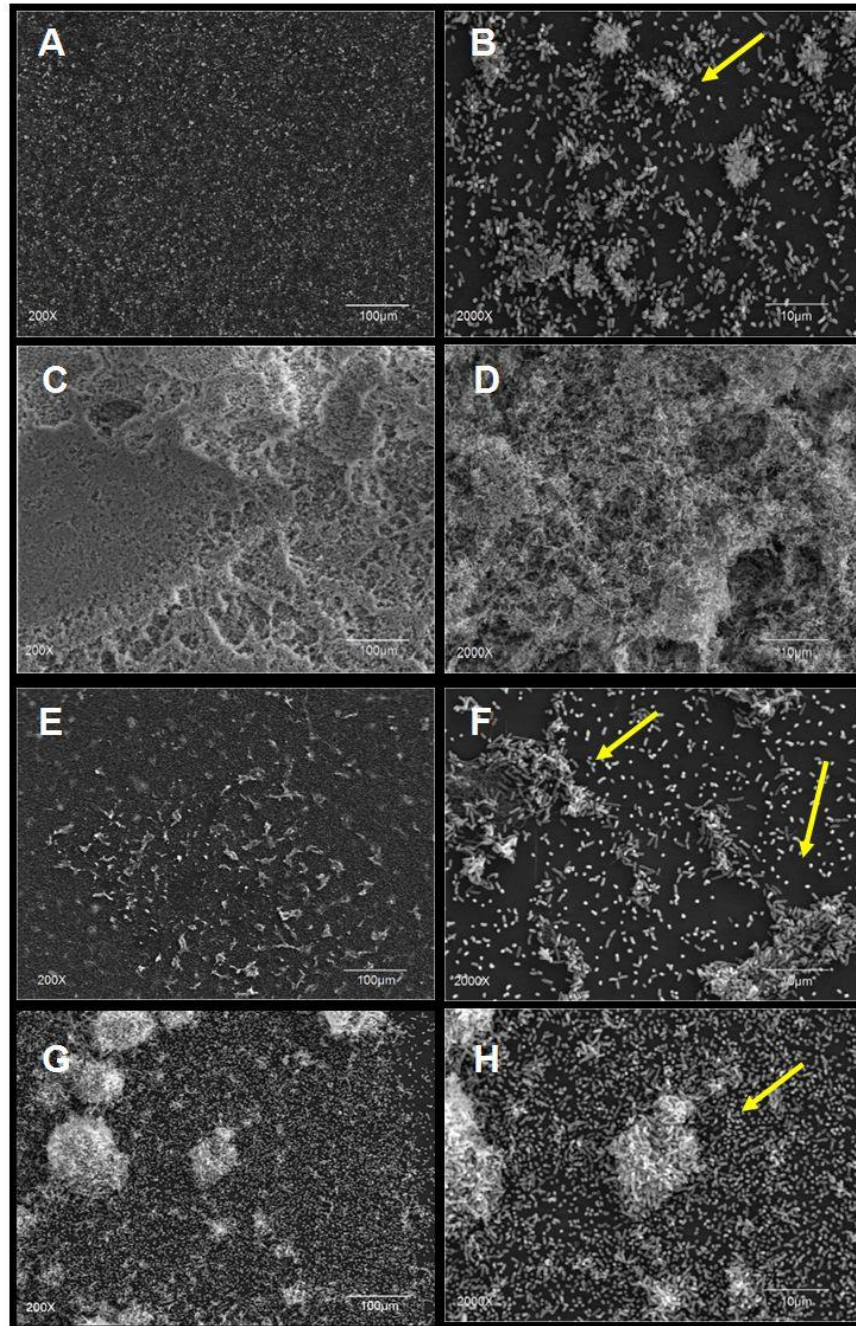
357  
 358  
 359  
 360  
 361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372  
 373  
 374  
 375



376 **Figure 2.** Biofilm architecture of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* strain Xcv229, 24 h-  
 377 grown in liquid culture media, analyzed by confocal laser scanning microscopy. **A-B:** in  
 378 KADO (A) and YDC (B) stained with concanavalin A - initial formation of the biofilm  
 379 matrix. Both live and dead cells are shown in red. **C-D:** in YDC stained with Live/Dead dye  
 380 (C) - formation of characteristic bacterial biofilm aggregates (arrows); in NYD + antibiotic  
 381 rifampicin (32 $\mu$ g/ml) stained with Live/Dead dye (D) - peaks of biofilm formation (images  
 382 were inverted for better analysis) before the action of the antibiotic. Live and dead cells are  
 383 shown in green and red, respectively. The numbers 1-2 and 3 represent the observations in 3D  
 384 and a horizontal slice of the sample, respectively.  
 385



386  
 387  
 388  
 389  
 390  
 391  
 392  
 393  
 394  
 395  
 396  
 397  
 398  
 399  
 400  
 401  
 402  
 403  
 404  
 405  
 406  
 407  
 408  
 409  
 410  
 411



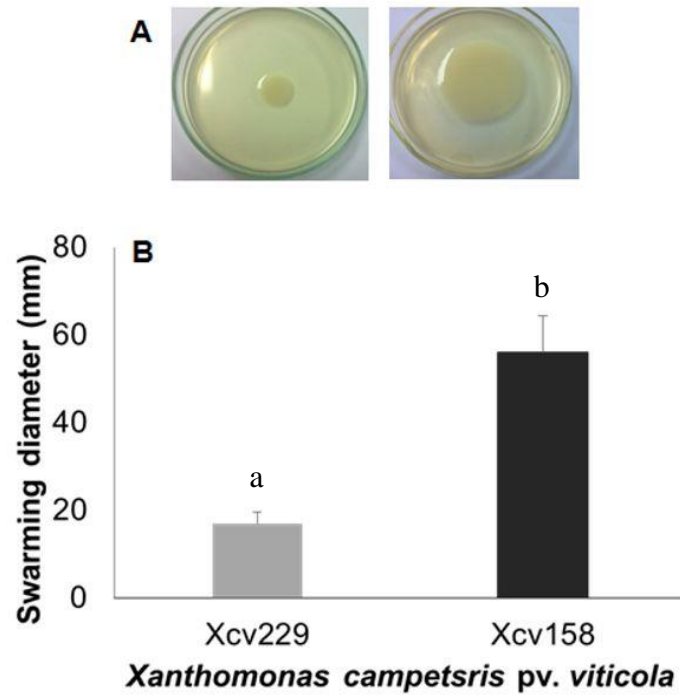
412 **Figure 3.** Biofilm architecture of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* 36 h-grown in liquid  
 413 culture media, analyzed by scanning electron microscopy. **A-D:** strain Xcv229 in YDC (A, B)  
 414 - initial biofilm formation with clumps; in LB (C, D) - strong biofilm formation. **E-H:** strain  
 415 Xcv158 in NYD (E, F) - initial biofilm formation; in LB (G, H) - formation of characteristic  
 416 clumps (arrows). A, C, E and G = 200X and B, D, F and H = 2000X.

417

418

419

420



421 **Figure 4.** Swarming motility of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* strains Xcv229 and  
422 Xcv158 on swarming medium plates at 72 h post-inoculation (A). Mean diameter of  
423 swarming halos formed (B). Values are means of three independent experiments, each  
424 performed with three replicates. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Bars  
425 labelled with different letters are significantly different, according to Student's t-test ( $P \leq 0.05$ ).

426

427

428

## CAPÍTULO III

---

### **Two-dimensional profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* proteins extracted by four different methods**

*Full Length Research Paper***Two-dimensional profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* proteins extracted by four different methods****Myrzânia de Lira Guerra<sup>1\*</sup>, Carolina Barbosa Malafaia<sup>2</sup>, Túlio Diego da Silva<sup>2</sup>, Rosa de Lima Ramos Mariano<sup>1</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>2</sup> and Elineide Barbosa de Souza<sup>3</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, 52171-270, Recife, PE, Brazil.<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Biologia Molecular, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, 50740-560, Brazil.<sup>3</sup>Departamento de Biologia/Microbiologia - UFRPE, 52171-030, Recife, PE, Brazil.

Received 30 May, 2014; Accepted 4 August, 2014

An efficient method for protein extraction is a prerequisite for the successful implementation of proteomics, which is being used as a tool in the study of the interaction between plants and phytopathogens. With the objective to optimize a method of protein extraction for proteomic analysis of the phyto bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, the efficiency of four methodologies were compared, based on the two-dimensional gel electrophoresis profile (2D-PAGE). Trizol<sup>®</sup>, phenol, centrifugation and lysis methods were tested and through quantitative and qualitative analysis, the most suitable method to obtain high-quality protein was selected. All methodologies enabled the extraction of a significant amount of proteins; nevertheless, the centrifugation method allowed obtaining the highest concentration of solubilized proteins. However, the analysis of the 2D-PAGE gel images revealed a larger number of spots in the lysis method when compared to the others. Taking into consideration the quality of the results and the practical advantages of the lysis method, this is recommended as the best option for total protein extraction of *X. campestris* pv. *viticola* for proteomic studies.

**Key words:** Bacterial canker, *Vitis vinifera*, proteomics, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE).

**INTRODUCTION**

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) (Nayudu) Dye is the causal agent of bacterial canker, one of the most important grapevine (*Vitis vinifera* L.) diseases, responsible for severe damage and representing a

serious potential risk to Brazilian viticulture (Silva et al., 2012). Outside of Brazil, this disease occurs only in India (Jambenal et al., 2011) and Thailand (Buensanteai, 2004), where, anyway, severe losses have not yet been

\*Corresponding author. E-mail: myrzgue@gmail.com. Tel: +55 81 9973-3785. Fax +55 81 3320-6205.

recorded. The characteristic symptoms of the disease are cankers in the branches, petioles and stems. Small dark and angular lesions are observed in the leaves; these lesions necrose large areas of the leaf when they coalesce. The veins become necrosed, particularly on the lower surface of the leaf blade (Nayudu, 1972; Trindade et al., 2007). Vein necrosis is an important symptom for diagnosis of the disease when the leaf lesions are atypical and cankers are absent. The berries of infected plants are non-uniform in size and color and may exhibit necrotic lesions (Rodrigues et al., 2011). For the successful control of bacterial canker of grapevine, it is necessary to understand the characteristics of *X. campestris* pv. *viticola* and the pathogenesis mechanisms involved in this plant-pathogen interaction, which have not yet been fully clarified (Tostes et al., 2014). Thus, proteomics technologies can integrate the basic knowledge necessary for the understanding of the mechanisms that phyto bacteria use to cause diseases in their host (Norbeck et al., 2006).

Proteomics is defined as the analysis of proteins expressed by a cell or any biological sample at a given time and under specific conditions (Dierick et al., 2002). Proteins are functional molecules that play key roles in cells (Görg et al., 1995), being important for comprehensive understanding of any biological system (Beranova-Giorgianni, 2003). In comparison with genomic studies, investigations of the proteome provide detailed information, such as the abundance of proteins and post-translational modifications (Galdos-Riveros et al., 2010).

Among the various technologies used for the investigation of protein expression on a large scale, two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) stands out. This method separates proteins using a relative isoelectric point and molecular weight on its mobile base in a polyacrylamide gel matrix (Kim et al., 2007). The spots generated are used to create databases. However, it is necessary to obtain high quality protein samples, that is, free from contaminants (high levels of salts, nucleic acids, polysaccharides, phenolic compounds, pigments and other compounds) that can interfere with 2D-PAGE (Chan et al., 2002; Chan et al., 2004a, 2004b). Thus, an efficient method of extraction is a prerequisite for the successful implementation of proteomics (Mehmeti et al., 2011) for studies of the plant-pathogen interaction and continues to be a challenge for scientists (Natarajan et al., 2005). In this context, four methodologies to extract proteins from the phyto bacterium *X. campestris* pv. *viticola* were tested, in order to optimize the sample preparation for two-dimensional electrophoresis.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture conditions

The isolate of *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv 137) used in the

experiments was obtained from the Culture Collection of the Phytobacteriology Laboratory of the Federal Rural University of Pernambuco (Universidade Federal Rural de Pernambuco), Brazil. It was grown in 20 ml of NYD liquid medium (10 g/L dextrose, 5 g/L peptone, 5 g/L yeast extract and 3 g/L meat extract) for 24 h at 28°C under shaking (150 rpm) to obtain the pre-inoculate. The concentrations of the bacterial suspensions were adjusted to  $A_{570} = 0.4$  ( $10^8$  CFU/ml) using a spectrophotometer (Analyser 500 M, São Paulo, Brazil). Following this, 180 ml of the same NYD medium were added and the culture maintained under the same growth conditions for 24 h.

### Protein extraction

In this study, four different extraction methods (Trizol<sup>®</sup>, phenol, centrifugation and lysis) were used to extract protein from a suspension of bacterial cells grown in NYD medium. The bacterial suspensions were then centrifuged at 10 000 × g for 5 min (CENTRIFUGE MCD-2000, Shanghai, China) and washed three times with saline solution (0.9% NaCl). The pellets were stored at 20°C and used in each method. Three biological replicates (independent cultures) were performed for each method.

### Trizol method

The protocol was carried out according to manufacturer's instructions of Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, USA), modifying only the protein resolubilization step by using 0.5 ml of rehydration buffer without the bromophenol blue (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS) instead of washing solution (0.3 M guanidine hypochlorite in 95% ethanol).

### Phenol method

The bacterial pellet was washed in phosphate buffer (1.24 g/l  $K_2HPO_4$ , 0.39 g/l  $KH_2PO_4$ , 8.8 g/l NaCl, pH 7.2) and 0.75 ml of extraction buffer (0.7 M sucrose, 0.5 M Tris-HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl and 40 mM DTT) was added, followed by incubation for 15 min at 28°C. The same volume of phenol was added, and after 15 min of agitation in a vortex, the suspension was centrifuged at 14 000 × g for 6 min at 4°C and the phenolic phase was recovered. This procedure was repeated two more times. Proteins were precipitated with the addition of five volumes of 0.1 M ammonium acetate in methanol (Mehta and Rosato, 2003). The precipitate was washed with 1 ml of 80% acetone and resolubilized as described in the previous paragraph.

### Centrifugation method

Resuspension of the bacterial pellet was performed in 500 µl of extraction buffer (0.3% SDS, 200 mM DTT, 28 mM Tris-HCl and 22 mM Tris). Subsequently, the Eppendorf tube containing the cell suspension was gently agitated for 10 min at 4°C. Afterward, the sample was centrifuged at 14 000 × g for 10 min at 4°C, incubated at 100°C for 5 min and then cooled on ice. Next, 24 µl of assay buffer (24 mM Tris, 476 mM Tris-HCl, 50 mM  $MgCl_2$ , 1 mg/ml DNase I and 0.25 mg/ml RNase A) were added, and the sample incubated on ice for 15 min. The reaction was stopped by the addition of four volumes of ice cold acetone and precipitation of proteins was left to occur on ice for 20 min. Cell debris were removed by centrifugation at 14 000 × g for 10 min at 4°C (Giard et al., 2001). The pellet was dissolved by using 0.5 ml of rehydration buffer (7 M urea; 2 M thiourea; 4% CHAPS), and incubated at 50°C for 2 h.

**Table 1.** Quantification of proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* obtained by four different methods of extraction.

Method	Concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Centrifugation	9.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.17
Trizol <sup>®</sup>	8.6 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17
Lysis	7.8 <sup>c</sup> $\pm$ 0.17
Phenol	7.2 <sup>d</sup> $\pm$ 0.15

Values are means  $\pm$  standard deviation (SD) of three technical replicates. Low case letters a, b, c, d indicate significant differences using Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### Lysis method

Bacterial pellet was resuspended in 0.5 ml rehydration buffer (7 M urea; 2 M thiourea; 4% CHAPS), homogenized in a vortex for 5 min and centrifuged at 10 000 x g at 4°C for 30 min. The supernatant was then transferred to a new 1.5 ml tube (Jangpromma et al., 2007).

### Quantification of proteins

The concentration of total cellular proteins obtained with each extraction method was determined by the 2-D Quant Kit, according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare<sup>®</sup>, Piscataway, NJ, USA). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard and the assay was performed by measuring the absorbance at 480 nm. This kit was selected as it does not interfere or interact with any chemicals used during the extractions and is therefore compatible with isoelectric focusing (IEF). The samples and the standards were read in triplicate.

### One-dimensional gels (SDS-PAGE)

For the preparation of the SDS-PAGE gel the methodology of Laemmli (Laemmli, 1970) was used, which involved a 15% polyacrylamide separation gel and a 4% concentration standard molecular weight marker (High-Range Amersham<sup>™</sup> Rainbow<sup>™</sup>) from GE Healthcare<sup>®</sup>. In each well, 30  $\mu\text{g}$  of protein were loaded. Electrophoresis ran at 40 mA for 15 min and then at 100 mA for 2 h, in a vertical Owl P10DS cube (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Hudson, New Hampshire, USA). The gels were stained using the reagent Coomassie brilliant blue (Coomassie Brilliant Blue G250) (Candiano et al., 2004) and bleached in a solution of 7.5% methanol and 5% glacial acetic acid until complete visualization of bands.

### Two-dimensional gel (2D-PAGE)

The two-dimensional electrophoresis was performed in two stages according to the 2-D Electrophoresis instructions of GE Healthcare<sup>®</sup>. In the first step, isoelectric focusing (IEF) was done, in which proteins were resuspended in rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS (w/v), 2 mM DTT, 1% IPG buffer (w/v) and 0.2% bromophenol blue).

The IEF was conducted using Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare<sup>®</sup>) in 7 cm strips of immobilized pH gradient (IPG) ranging from 3 to 10 (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden) which were loaded with 150  $\mu\text{g}$  of protein. Subsequently, the strips were balanced in reducing solutions of disulfide bridges containing DTT

(dithiothreitol) and iodoacetamide (Görg et al., 1995). In the second step, 2D-PAGE electrophoresis was performed using a 15% polyacrylamide gel in an initial run of 15 mA for 20 min per gel, increasing to 45 mA per gel for about 3 h. The gels were stained as in the SDS-PAGE until complete visualization of spots.

### Image analysis of gels

After staining, the gels were scanned using Image Scanner software (Amersham Biosciences) in transparency mode with a resolution of 300 dpi (dots per inch). The images of 2D-PAGE gels were analyzed using Image Master 2D-Platinum software, version 7.0 (Amersham Biosciences). The program provided the number of protein spots from each of the gels which was validated by visual inspection. For each biological replicate three technical replicates were made to confirm the reproducibility of the results.

The efficiency of the methodologies used in this study was evaluated by the qualitative parameters (resolution and intensity of bands) for SDS-PAGE and for both quantitative (amount of proteins and number of spots) and qualitative (resolution and intensity of spots, and reproducibility) parameters for 2D-PAGE.

### Statistical analysis

Statistical analysis was made using the Statistix<sup>®</sup> software (version 9.0, Analytical Software, Tallahassee, USA). Data were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. In all statistical analyses,  $p < 0.05$  was taken as the level of significance.

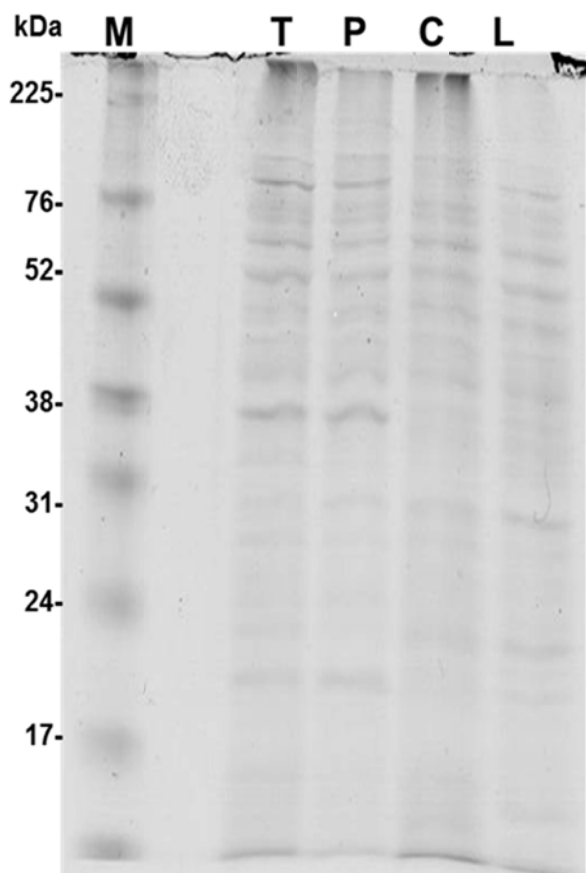
## RESULTS AND DISCUSSION

For both SDS-PAGE and 2D-PAGE, which are techniques commonly used in proteomics, thorough and careful sample preparation is very important for the quantification and high resolution of proteins. Due to the different physical and chemical properties of proteins, an appropriate and standardized bioassay of a given sample, including protein extraction with different methods, favors their identification (Mehmeti et al., 2011).

In this study, four different extraction methods (Trizol<sup>®</sup>, phenol, centrifugation and lysis) were compared to determine which of them increase the solubilization of proteins of the *X. campestris* pv. *viticola*. All methodologies tested proved to be efficient in detecting a large and different ( $p < 0.05$ ) amount of proteins (Table 1). According to Shi et al. (2013), complete solubilization of samples is the best way to achieve the goal of standardizing the recovery of proteins. The highest protein yield was obtained by the centrifugation method. The potential reasons for that may be the use of SDS in the centrifugation solution and the high temperature heating of 100°C, both recognized as critical in protein extraction (Shi et al., 2006). In the SDS-PAGE gel image analysis, the protein bands were sharp, well defined and without presenting characteristics of degradation (Figure 1).

The results of the two-dimensional gels were different





**Figure 1.** Representation of SDS-PAGE gel (15%) of proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* extracted by four extraction methodologies: Trizol<sup>®</sup> (T), Phenol (P), Centrifugation (C) and Lysis (L); M, kDa marker.

in relation to the quality of the sample and numbers of spots obtained from the four methods studied (Figure 2). In the Trizol<sup>®</sup> method (Figure 2A) most of the rare and sparse spots were distributed throughout the pH range of acid and were between 76 to 24 kDa. The phenol method (Figure 2 B) did not allow for a good quality sample, making focusing impossible; several horizontal stripes were observed in the gel, whose proteins were separated only by molecular weight. According to Saravanan and Rose (2004), the presence of non-protein impurities can critically affect the quality of 2D-PAGE separation, resulting in the formation of spots and/or horizontal and vertical striations, and a notable decrease in the number of spots. In the centrifugation and lysis methods (Figure 2 C; D), the spots were more concentrated in the range of 225 to 24 kDa. The three technical replicates showed similar results for the number of spots. The lysis method presented the largest number of spots and differs significantly ( $p < 0.05$ ) from the other extraction methods (Figure 3). Therefore, lysis method was defined

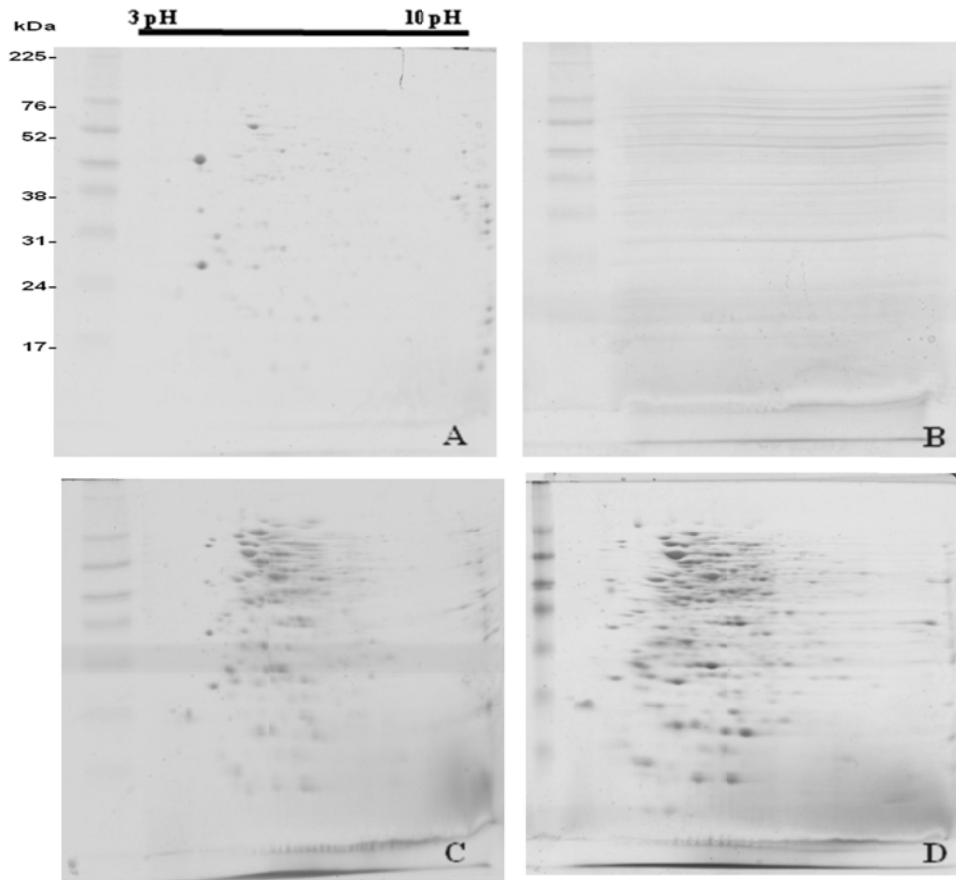
as the best among the tested methods, since it allowed obtaining the highest number of spots with the best definition in 2D-PAGE gel.

Despite the lysis method did not provide the greatest concentration of proteins, as verified for centrifugation (Table 1), a high quality profile of proteins was observed in terms of resolution, number and intensity of the spots (Figure 2D). This result indicates that proteins with low abundance and high molecular weight were clearly revealed and detected in the 2D-PAGE gel by this method. Furthermore, it was observed that different sets of proteins were detected by the presence of bright spots with good resolution. The lysis method stands out not only for its greater representativeness of spots, but also for being a fast (about 1 h) and practical method, accessible to any laboratory. The most interfering materials (non-protein components) are effectively removed; the proteins are protected against degradation by proteases, thus not requiring the use of protease inhibitors. In addition, reagents used are of low cost and toxicity, when compared with other methodologies (Tan et al., 2011). This method greatly reduces the extraction time, which in turn, improves the quality of the sample.

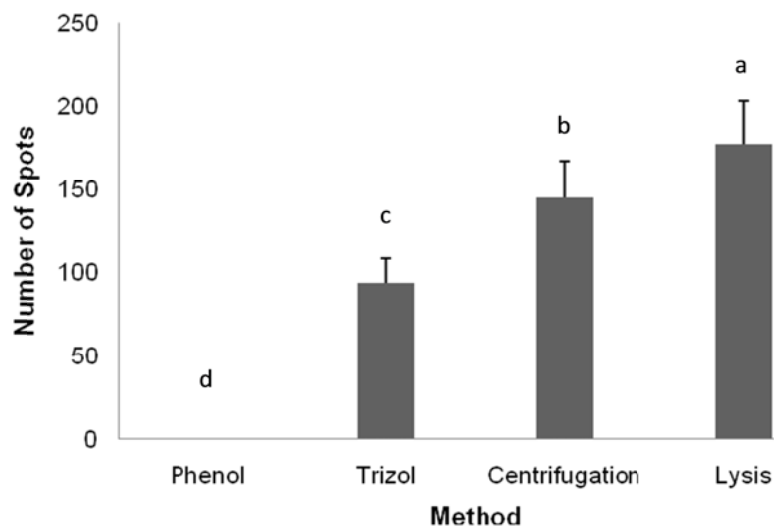
A large amount of proteins of *X. campestris* pv. *viticola* was extracted by the phenol method (Table 1), however, the unsatisfactory results obtained from the analysis of 2D-PAGE (Figure 2B) indicated absence of different protein concentrations or inefficiency of the staining method. These two aspects are cited by Görg et al. (2004) as being more important than the concentration of protein for the success of 2D-PAGE analysis. Phenol is an effective solvent of proteins that can greatly reduce molecular interactions between proteins and other compounds that inhibit electrophoresis (Wang et al., 2007). This method has been successfully employed for protein extraction of *X. citri* subsp. *citri* (Mehta and Rosato, 2003; Soares et al., 2010), but its effectiveness was not proven under the extraction conditions of *X. campestris* pv. *viticola*. Many techniques including physical methods and those based on detergents are available for cell disruption and protein extraction (Grabskia, 2009). These techniques can vary widely in reproducibility and in representation of the proteome and, thus, need to be adapted to the phyto-bacteria. Using various extraction methods, proteomic studies have been conducted with *Xanthomonas* spp. like *X. campestris* pv. *campestris* (Villett et al., 2009), *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Zhao et al., 2011), *X. oryzae* pv. *oryzae* (González et al., 2012), *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Tahara et al., 2003), *X. axonopodis* pv. *citri* (Zimaro et al., 2013) and *X. citri* subsp. *malvacearum* (Razaghi et al., 2012).

## Conclusion

The results obtained in this work were satisfactory taking



**Figure 2.** Representation of the 2D-PAGE gel of total proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, focused on strips of 7 cm pH 3-10, extracted by four methodologies: Trizol<sup>®</sup> (A), Phenol (B), Centrifugation (C) and Lysis (D).



**Figure 3.** Number of spots identified by the Image Master 2D Platinum program in four different protein extraction methodologies of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Values are means  $\pm$  standard deviation (SD) of three technical replicates. Low case letters a, b, c, d indicate significant differences using Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



into consideration that, in the literature consulted, no results were found of a single or a combination of methods developed for protein extraction of *X. campestris* pv. *viticola*, making this study probably the first. Therefore, considering the excellent profile of proteins obtained in 2D-PAGE analysis by the lysis method, this is recommended as the best option for total protein extraction of *X. campestris* pv. *viticola*. This extraction method can be used in proteomic research with this phyto bacterium in order to study population diversity based on protein profile, detection of pathogenesis-related proteins, and biofilm formation, among others. This is an excellent opportunity to make great progresses in the understanding of plant-pathogen interaction, aiming at establishing efficient management measures of bacterial canker of grapevine.

## Conflict of Interests

The author(s) have not declared any conflict of interests.

## REFERENCES

- Beranova-Giorgianni S (2003). Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TRAC* 22(5): 273-281.
- Buensanteai MN (2004). Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand. Ds. Dissertation, Suranaree University of Technology, Muang District.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333.
- Chan LL, Hodgkiss IJ, Lo SC (2004a). Use of two-dimensional gel electrophoresis proteome reference maps of dinoflagellates for species recognition of causative agents of harmful algal blooms. *Proteomics* 4(1): 180-192.
- Chan LL, Hodgkiss IJ, Wan JM, Lum JH, Mak AS, Sit WH, Lo SC (2004b). Proteomic study of a model causative agent of harmful algal blooms, *Prorocentrum triestinum* II: the use of differentially expressed protein profiles under different growth phases and growth conditions for bloom prediction. *Proteomics* 4(10): 3214-3226.
- Chan LL, Lo SC, Hodgkiss IJ (2002). Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2(9): 1169-1186.
- Dierick JF, Dieu M, Remacle J, Raes M, Roepstorff P, Toussaint O (2002). Proteomics in experimental gerontology. *Exp. Gerontol.* 37(5): 721-734.
- Galdos-Riveros AC, Piza ART, Resende LC, Maria DA, Miglino MA (2010). *Proteômica: Novas fronteiras na pesquisa clínica*. Encicl. Biosf. 6(11): 1-24.
- Giard JC, Rince LJM, Rince A, Pichereau V, Benachour A, Leboeuf C, Flahaut S, Auffray Y, Hartke A (2001). The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22(14): 2947-2954.
- González JF, Degrassi G, Devescovi G, De Vleeschauwer D, Höfte M, Myers MP, Venturi V (2012). A proteomic study of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice xylem sap. *J. Proteom.* 75(18): 5911-5919.
- Görg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W (1995). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 16(1): 1079-1086.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4(12): 3665-3685.
- Grabskia AC (2009). *Advances in preparation of biological extracts for protein purification*. Academic Press, San Diego. pp. 285-303.
- Jambenal S, Ravikumar MR, Hiremani N (2011). Evaluation of different chemicals and bioagents against bacterial leaf spot of grapevine and their effect on yield and yield parameters. *Int. J. Plant Prot.* 4(2): 377-380.
- Jangpromma N, Kitthaisong S, Daduang S, Jaisil P, Thammasirirak S (2007). 18 kDa protein accumulation in sugarcane leaves under drought stress conditions. *KMITL Sci. Technol.* 7(S1): 44-54.
- Kim IS, Yun HS, Jin IN (2007). Comparative proteomic analyses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 strain against menadione-induced oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(2): 207-217.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mehmeti I, Kiran F, Osmanagaoglu O (2011). Comparison of three methods for determination of protein concentration in lactic acid bacteria for proteomics studies. *Afr. J. Biotechnol.* 10(11): 2178-2185.
- Mehta A, Rosato YB (2003). A simple method for *in vivo* expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Curr. Microbiol.* 47(5): 400-404.
- Natarajan S, Xu C, Carpena TJ, Garrett WM (2005). Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal Biochem.* 342(2): 214-220.
- Nayudu MV (1972). *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. *J. Phytopathol.* 73(2): 183-186.
- Norbeck AD, Callister SJ, Monroe ME, Jaitly N, Elias DA, Lipton MS, Smith RD (2006). Proteomic approaches to bacterial differentiation. *J. Microbiol. Methods* 67(3): 473-486.
- Razaghi A, Hasanzadeh N, Ghasemi A (2012). Characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* strains in Iran. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(6): 1165-1170.
- Rodrigues Neto J, Destéfano SAL, Rodrigues LMR, Pelloso DS, Oliveira Júnior LC (2011). Grapevine bacterial canker in the state of São Paulo, Brazil: detection and eradication. *Trop. Plant Pathol.* 36(1): 42-44.
- Saravanan RS, Rose JK (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4(9): 2522-2532.
- Shi S-R, Liu C, Balgley BM, Lee C, Taylor CR (2006). Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *J. Histochem. Cytochem.* 54(6): 739-743.
- Shi S-R, Taylor CR, Fowler CB, Mason JT (2013). Complete solubilization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue may improve proteomic studies. *Proteom. Clin. Appl.* 7(3-4): 264-272.
- Silva AMF, Menezes EF, Souza EB, Melo NF, Mariano RLM (2012). Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. *Rev. Bras. Frutic.* 34(3): 757-765.
- Soares MR, Facincani AP, Ferreira RM, Moreira LM, Oliveira JCF, Ferro JA, Ferro MIT, Meneghini R, Gozzo FC (2010). Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. *Prot. Sci.* 8(1): 55-65.
- Tahara ST, Mehta A, Rosato YB (2003). Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in the interaction with leaf extract of the host plant (*Passiflora edulis*). *Proteomics* 3(1): 95-102.
- Tan AA, Azman SN, Abdul-Rani NR, Kua BC, Sasidharan S, Kiew LV, Othman N, Noordin R, Chen Y (2011). Optimal protein extraction methods from diverse sample types for protein profiling by using Two-Dimensional Electrophoresis (2DE). *Trop. Biomed.* 28(3): 620-629.
- Tostes GO, Araujo JSP, Farias ARG, Frade DAR, Olivares FL (2014). Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. *Trop. Plant Pathol.* 39(2): 134-140.

- Trindade LC, Marques E, Lopes DB, Ferreira MASV (2007). Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathol.* 33(1): 16-23.
- Villeth GR, Reis Júnior FB, Tonietto A, Huergo L, Souza EM, Pedrosa FO, Franco OL, Mehta A (2009). Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 298: 260-266.
- Wang X, Li X, Deng X, Han H, Shi W, Li Y (2007). A protein extraction method compatible with proteomic analysis for the eukaryote *Salicornia europaea*. *Electrophoresis* 28(21): 3976-3987.
- Zhao YC, Qian GL, Yin FQ, Fan JQ, Zhai ZW, Liu CH, Hu BS, Liu FQ (2011). Proteomic analysis of the regulatory function of DSF-dependent quorum sensing in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Microbiol. Pathogenesis* 50(1): 48-55.
- Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Garavaglia BS, Gehring C, Ottado J, Gottig N (2013). Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiol.* 13: 186-200.

## CONCLUSÕES GERAIS

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- Os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcv*) testados formam biofilmes nos meios de cultura líquidos caldo nutriente-dextrose-extrato de levedura, extrato de levedura-dextrose-carbonato de cálcio, KADO 523 e Luria-Bertani, porém em diferentes níveis (fraco, moderado e forte);
- O isolado *Xcv*229 é um forte produtor de biofilme;
- O método de placa de microtitulação é um método eficiente para detecção de biofilme de *Xcv*;
- A formação de biofilme por *Xcv*, de acordo com a metodologia testada, não é dependente da motilidade swarming;
- O método de lise é recomendado como a melhor opção para extração de proteínas totais de *Xcv*.