

MECANISMOS DE ADESÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS ÀS PLANTAS HOSPEDEIRAS

Breno Leite

Sérgio Florentino Pascholati

Elliot Watanabe Kitajima¹

Maria Lucia Ishida

ESALQ/USP, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola,¹ NAP/MEPA – Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica

Aplicada à Pesquisa Agropecuária. Caixa Postal 9

13418-900 Piracicaba, SP, Brasil

bleite@carpa.ciagri.usp.br

RESUMO

Os mecanismos de adesão de fitopatógenos aos hospedeiros representam a primeira etapa da conexão física entre o parasita e o parasitado. Dessa maneira, a adesão tem sido considerada, muitas vezes, decisiva e essencial para que a doença possa progredir. Aparentemente simples, o sucesso da adesão traz em si um conjunto de fatores evolutivos que determinam a atração entre as superfícies envolvidas. Esta atração de bactérias e fungos pelos tecidos do hospedeiro pode envolver forças químicas, bioquímicas e físico-químicas, que por sua vez estão sob a influência dos fatores fisiológicos e ambientais. O entendimento de como a adesão se processa pode abrir as portas para o controle de algumas doenças de vegetais de importância econômica. Sem perder de vista o escopo da RAPP, cujo interesse são patógenos de vegetais, discutir-se-ão alguns mecanismos e exemplos de experimentos com adesão em bactérias e fungos realizados por profissionais de outras áreas do conhecimento, visto estarem em estágios mais avançados de investigação. Nessa revisão, também serão comentados aspectos do significado de adesinas e de proteínas relacionadas à manutenção da capacidade adesiva para a bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da clorose variegada do citros (CVC), e as características da adesão do fungo fitopatogênico *Colletotrichum graminicola*, causador da antracnose em milho, em função da participação dos autores nestes programas de pesquisa.

SUMMARY

BACTERIAL AND FUNGAL MECHANISMS OF ADHESION TO THE HOST PLANTS

The mechanisms of plant pathogen adhesion to the host represent the first stage of the physical connection between the parasite and the plant. Adhesion has been, many times, considered decisive and essential for the progress of the disease. Seemingly simple, the success of the adhesion brings in itself a group of evolutionary factors that determine the attraction among the surfaces of the involved parts. This attraction of bacteria and fungal plant pathogens to the host surface may involve distinct types of forces, such as chemical, biochemical and physico-chemical, which are in turn influenced by physiological and environmental factors. The understanding how adhesion is processed, may open the doors for the control of some economically important diseases. Without losing the focus of RAPP, devoted to plant pathogens, some mechanisms and examples of experiments in other areas with adhesion of bacteria and fungi will be discussed, simply because these studies are in more advanced stages of investigation. In the present review, comments will also be made on the importance of adhesins and proteins involved in the maintenance of the adhesive activity for the bacterium *Xylella fastidiosa*, causal agent of the citrus variegated chlorosis (CVC), as well as the characteristics of the adhesion of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*, causal agent of corn anthracnose, based on the researches of the authors.

INTRODUÇÃO

O termo **adesão**, sob o ponto de vista físico, define a capacidade de uma partícula ou molécula manifestar a atração por outros corpos. Em fitopatologia, analogamente, estamos falando da atração de propágulos pela superfície da planta-alvo ou tecido hospedeiro. Assim, podemos dizer que a adesão, em fitopatologia, define “a capacidade de um propágulo manifestar atração específica por porções (tecidos) do hospedeiro”. A atração específica deve ser enfatizada porque a adesão resulta do encaixe perfeito entre o ligante e o receptor, que se encontram na superfície das estruturas envolvidas. A complementaridade entre **ligantes** (adesinas) e **receptores** é tão específica quanto à interação enzima-substrato ou a interação antígeno-anticorpo. O produto dessa interação ativa uma complexa cascata de transdução de sinais que é mobilizada no processo de reconhecimento entre patógeno e hospedeiro (Leite et al., 1997; Soto & Hultgren, 1999). Em alguns casos, o termo

aderência também pode ser encontrado na literatura com o mesmo significado (Romantschuk & Bamford, 1986), entretanto esse termo vem sendo gradualmente substituído pelo vocábulo **adesão**. Outro fenômeno que será discutido é a **agregação celular**, particularmente quando tratamos da patogenicidade de bactérias. O termo agregação refere-se à atração entre células da mesma espécie e descreve a capacidade de formarem massas celulares que possam proporcionar vantagens na luta pela sobrevivência (Watnick & Kolter, 2000). A atração entre células pode levar à **ligação** física entre as mesmas (do termo original em inglês “**attachment**”). Essa ligação inicial pode ou não evoluir para o estabelecimento de um contacto mais íntimo. A rigor consideramos que a aproximação entre patógeno e hospedeiro se dá em duas etapas: a **ligação** (não específica) seguida de **adesão** (específica). Contudo, ainda há controvérsia sobre a utilização dos termos. Matthysse & McMahan (1998) dividem a interação da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* com o tecido da planta hospedeira em dois eventos: a) ligação fraca (“loose binding”) e ligação propriamente dita (“attachment”). Os termos **ligação** e **adesão** serão adotados nesse trabalho, pois parecem definir mais apropriadamente, na língua portuguesa, essas importantes etapas do processo. Assim, quando a ligação (inespecífica) ocorre não necessariamente significa que a fase de adesão (específica) será atingida. Para fungos fitopatogênicos, em função, das características bem definidas das etapas do processo, há uma tendência natural em dividir-se a infecção em ligação e adesão. Em *Colletotrichum graminicola*, por exemplo, a ligação reversível sem adesão de conídios pode acontecer em função da existência de material mucilaginoso que envolve cada um deles (Nicholson & Moraes, 1980; Ramadoss et al., 1985; Mercure et al., 1994b). A adesão propriamente dita, com a produção de material adesivo em pontos e estruturas específicas só acontece após a formação de estruturas de infecção, os apressórios. Dessa maneira, no caso de fungos, a maioria dos autores trata a ligação como sendo a primeira etapa do processo de adesão (Sequeira, 1985; Hughes et al., 1999; Perfect et al., 1999). A mucilagem que envolve os conídios de *C. graminicola* parece ser responsável primariamente pela sobrevivência dos conídios (Leite & Nicholson, 1992; Leite, 1993).

Normalmente, a adesão de fungos é tratada como sendo essencial para a patogenicidade (Nicholson & Epstein, 1991) e o título original do presente trabalho fazia menção a essa necessidade, até agora irrefutável quando se trata de estudos com fungos. Contudo, a ligação e/ou adesão de bactérias apresenta outras peculiaridades. Sequeira (1985) relata a existência de dois grupos de bactérias patogênicas, de um lado o grupo representado por *A. tumefaciens*, cuja característica é a ligação das bactérias à superfície do hospedeiro durante o processo normal de patogênese. No outro grupo, representado pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, ao contrário de *A. tumefaciens*, somente as estirpes que não estabelecem ligação física com o

hospedeiro são capazes de multiplicarem-se nos espaços intercelulares e causar doença. A ligação das bactérias, agentes de murcha, às células hospedeiras pode resultar em reação de hipersensibilidade, reduzindo consideravelmente a multiplicação e capacidade patogênica. O autor acredita que essas diferenças estejam relacionadas com o **reconhecimento** entre as moléculas da superfície do hospedeiro e do patógeno durante a adesão. A idéia do envolvimento da adesão no processo reconhecimento, e também no estabelecimento de condições para que a infecção ocorra, é compartilhada por outros autores (Nicholson & Epstein, 1991; Nicholson & Kunoh, 1995; Weiergang et al., 1996).

As moléculas de reconhecimento e adesão são na maior parte dos casos, de natureza protéica ou glicoprotéica para fungos fitopatogênicos (Xiao et al., 1994; Pain et al., 1996; Sugui, 1998; Sugui et al., 1998). Em bactérias fitopatogênicas, parece haver o envolvimento de lipopolissacarídeos e glicoproteínas de superfície durante ligação e adesão das mesmas (Sequeira, 1985). As camadas superficiais denominadas **camadas S** (“**S-layers**”) parecem estar envolvidas no reconhecimento entre bactérias e tecidos hospedeiros. Essas camadas seriam formadas por moléculas dispostas de maneira organizada (cristalina) tanto na superfície da bactéria patogênica quanto no tecido hospedeiro-alvo. As funções dessas camadas ainda permanecem enigmáticas, porém já foram apontadas em alguns casos como sendo fatores de virulência de patógenos (Beveridge et al., 1997).

Nosso objetivo enfocando a **adesão** e **agregação** é avaliar o potencial de controle de doenças baseado no conhecimento desses fenômenos. Uma maneira de intervir seria evitar a adesão de propágulos através do uso de **antiadesivos**. Os experimentos com antiadesivos ainda são escassos na área de fitopatologia e, mesmo no caso de sucesso desses ensaios, tem-se que fazer um levantamento profundo sobre o impacto e os custos da adoção de uma nova estratégia de controle. Um exemplo típico é o bloqueio da adesão de *C. graminicola* pela lectina concanavalina A (Con A) demonstrada por Mercure et al. (1994b). Apesar da inviabilidade da utilização da Con A em testes de campo, pois o custo por grama dessa lectina está em torno de 300 dólares americanos, o experimento mostrou que é possível interferir na adesão de um fitopatógeno. O uso de antiadesivos para o controle de patógenos de animais e seres humanos já está em estágio bastante adiantado e alguns exemplos serão discutidos subseqüentemente.

Um dos grandes desafios dos fitopatologistas nesse novo século será entender a química, a bioquímica e a físico-química da adesão e procurar substâncias mais baratas que possam fazer o bloqueio da adesão em condições de campo, levando ao controle do patógeno, sem que seja preciso eliminar o organismo em questão ou contaminar o ambiente com fungicidas de largo espectro.

Finalmente, o trabalho foi dividido em dois blocos para facilitar a

discussão: a adesão de bactérias fitopatogênicas constitui o primeiro e a adesão de fungos fitopatogênicos o segundo. Paralelamente, serão discutidos alguns dos exemplos disponíveis em outras áreas, procurando extrair informações importantes que poderiam ser utilizadas em doenças de plantas.

MECANISMOS DE ADESÃO DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

A fase inicial da invasão de tecidos por bactérias é um processo altamente dependente do acaso. Apesar de a motilidade de algumas espécies de bactérias estar garantida pela presença de **flagelos** (Goodman et al., 1986), estas usualmente dependem de ferimentos e/ou aberturas naturais para ganhar o interior dos tecidos da planta hospedeira. A colonização (multiplicação inicial) tem início tão logo condições favoráveis sejam encontradas aliadas à ausência de reações por parte dos tecidos da planta. Algumas bactérias apresentam genes *hrp* (do inglês “hypersensitive reaction-pathogenesis”) que elicitam reação de hipersensibilidade em determinados hospedeiros (Minardi, 1995). A adesão da bactéria a uma região interessante, sob o ponto de vista de sobrevivência, se dá por meio de macromoléculas de superfície, bastante conhecidas e caracterizadas em bactérias que causam doenças em seres humanos (Soto & Hultgren, 1999). Infelizmente, essas macromoléculas ainda são pouco estudadas ou citadas em patógenos de vegetais (Alfano & Collmer, 1997); O’Callaghan et al., 1999; Simpson et al., 2000). De qualquer maneira, em ambos os casos, as bactérias parecem poder ligar-se aos hospedeiros primeiramente de maneira reversível e depois de maneira permanente (Matthysse & McMahan, 1998). Alguns autores usam os termos “**docking**” e “**anchoring**”, para ligação e adesão respectivamente, de acordo com os termos adotados nesta revisão para separar funcionalmente estas duas etapas da interação das bactérias com substratos-alvo.

A adesão célula-célula ou a uma superfície se dá através de macromoléculas de superfície. Estas macromoléculas denominadas **adesinas** são divididas em dois grupos : o primeiro composto por proteínas de natureza fibrilar, as **fimbrias**, e um segundo por proteínas de constituição não fibrilar. Os eventos iniciais do processo infeccioso são interações moleculares entre a célula do hospedeiro e a célula do patógeno. Essa “comunicação molecular” depende, em grande parte, dos **ligantes** caracterizados como proteínas de superfície da bactéria e dos **receptores**, que constituem os sítios de interação na superfície do tecido hospedeiro (Soto & Hultgren, 1999).

Na área de fitopatologia, uma das interações mais estudadas é a relação do *A. tumefaciens* com vários hospedeiros. O *A. tumefaciens* é considerado como um microrganismo “engenheiro genético natural”, pois é

capaz de transferir um segmento de DNA (um plasmídeo que induz a formação de tumores) para células vegetais hospedeiras. Todo esse processo é dependente das proteínas Vir (de virulência). Os pêlos, “pili”, dessa bactéria têm função dupla, tanto auxiliando na adesão quanto atuando no contacto célula-célula para mediar a transferência de DNA (Hultgren et al., 1993; Schmidt-Eisenlohr et al., 1999). Na década de 80, já havia sido demonstrada a complexidade da adesão por essa bactéria. Em trabalho pioneiro, Matthyse e colaboradores (1982) mostraram o envolvimento de microfibrilas de celulose no processo de adesão de *A. tumefaciens*. O trabalho sugeriu que a etapa inicial de ligação era seguida por um período de síntese de microfibrilas de celulose pela bactéria, uma estratégia que acabava fortalecendo a intimidade desse patógeno com a superfície das células de cenoura em cultura. A massa bacteriana com as microfibrilas formadas pode atrair mais bactérias que, por sua vez, passam também a produzir fibrilas completando, segundo os autores, as etapas 4 e 5 do processo como um todo, ou seja, ligação, adesão, produção de fibrilas de celulose e atração de mais bactérias.

Duas décadas depois, as pesquisas com esse microrganismo avançaram consideravelmente no campo da biologia molecular. Recentemente, foi demonstrada que a colonização de raízes de tomate e de *Arabidopsis thaliana* por *A. tumefaciens* é reduzida em mutantes deficientes nos genes da fase de ligação, *attB*, *attD* e *attR*, e mutantes deficientes na produção de fibrilas de celulose, *cel* (Matthyse & McMahan, 1998). Os avanços na utilização de técnicas de biologia molecular vêm garantindo maior rapidez na interpretação e montagem de modelos para explicar a adesão. O modelo *A. tumefaciens* será discutido com mais detalhes nas próximas páginas.

BACTÉRIAS: PRÉ-REQUISITOS PARA A ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME

O sucesso da adesão, como parte do processo que leva à patogênese de uma bactéria, depende de uma série de eventos. Após o contacto inicial com o hospedeiro há uma multiplicação de células e posteriormente tem início à formação de um biofilme cuja principal característica é a produção de exopolissacarídeos. O termo **biofilme** é empregado para designar comunidades de microrganismos (bactérias ou fungos) mobilizadas sobre uma superfície, que abriga, estabiliza e otimiza a vida do organismo. A **placa bacteriana** formada entre os dentes é um tipo de biofilme extensivamente estudado (Kolenbrander, 2000). A situação oposta é caracterizada pela vida livre dos microrganismos que podem nadar sem restrições no meio onde estão. Muitos microrganismos de vida livre, também chamados de

planctônicos, podem “optar” pela vida em comunidade durante um determinado período do ciclo de vida e retornar à vida livre posteriormente. O ciclo de desenvolvimento de um biofilme pode ser resumido em quatro fases: a **iniciação**, a **maturação**, a **manutenção** e a **dissolução**. Esta liberdade fenotípica permite que bactérias se adaptem às alterações impostas pelo meio ambiente ao qual estão submetidas. A transição entre um estado e outro é feita de maneira controlada e é altamente complexa sob o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular (O’ Toole et al., 2000).

Os biofilmes podem ser formados por uma única espécie de bactéria ou por diferentes espécies. Para melhor entender o processo de formação dos biofilmes, vamos analisar um tipo de interação que mais comumente ocorre na natureza e também passível de se verificar durante as interações patógeno-hospedeiro, ou seja, uma comunidade microbiana multi-espécie. Assim, essa comunidade pode ter um tipo predominante, o patógeno, mas divide o espaço e recursos disponíveis com outros organismos (oportunistas). Alguns autores preferem chamar uma comunidade multi-espécie, naturalmente formadas, de “cidade dos micróbios” (Watnick & Kolter, 2000). Assim, assumimos que novas bactérias que vão “migrar” para a “cidade” procurariam uma vizinhança que poderia atender as necessidades básicas de sobrevivência e que apresentasse perspectivas para a expansão da nova colônia. Na Figura 1 tem-se a esquematização das etapas que culminam com a formação de um biofilme bacteriano. Nos primeiros quadros, as células estabelecem uma associação reversível com organismos já instalados na superfície-alvo até que uma porção seja escolhida para ser o ponto de ligação. Em seguida, as células dão início à formação de microcolônias. O processo segue com a produção de uma matriz extracelular, em grande parte formada por polissacarídeos extracelulares, que caracteriza e organiza tridimensionalmente o biofilme. O último quadro mostra que algumas bactérias podem eventualmente se desalojar e procurar outras superfícies para colonizar. A interação inicial das bactérias com a superfície é mediada por estruturas como flagelos e pêlos (ou fimbrias) do tipo IV (“type IV pili” ou “type IV fimbriae”) (Soto & Hultgren, 1999). Essa interação inicial (contacto temporário) é normalmente seguida, como já foi visto, de multiplicação celular e produção de polissacarídeos. Particularmente, admite-se que os pêlos do tipo IV participam decisivamente nas interações célula-célula (fenômeno de agregação), formação do biofilme e da patogênese. O biofilme facilita muito a vida das bactérias, uma vez que garante a vida da colônia em ambientes não estáveis e com fluxo constante de líquidos. Pode-se atribuir ao biofilme uma série de vantagens para a colônia, como a melhor comunicação entre células, em função da solução de continuidade entre elas, facilitando as atividades bioquímicas. As vantagens podem ser: a) uma melhor proliferação resultante da melhor comunicação entre elas, por exemplo, há casos de aumento de atividade biodegradativa por colônias mistas, b) a melhoria do

8 – *Breno Leite et al.*

acesso a nichos e recursos que não poderiam ser utilizados por células

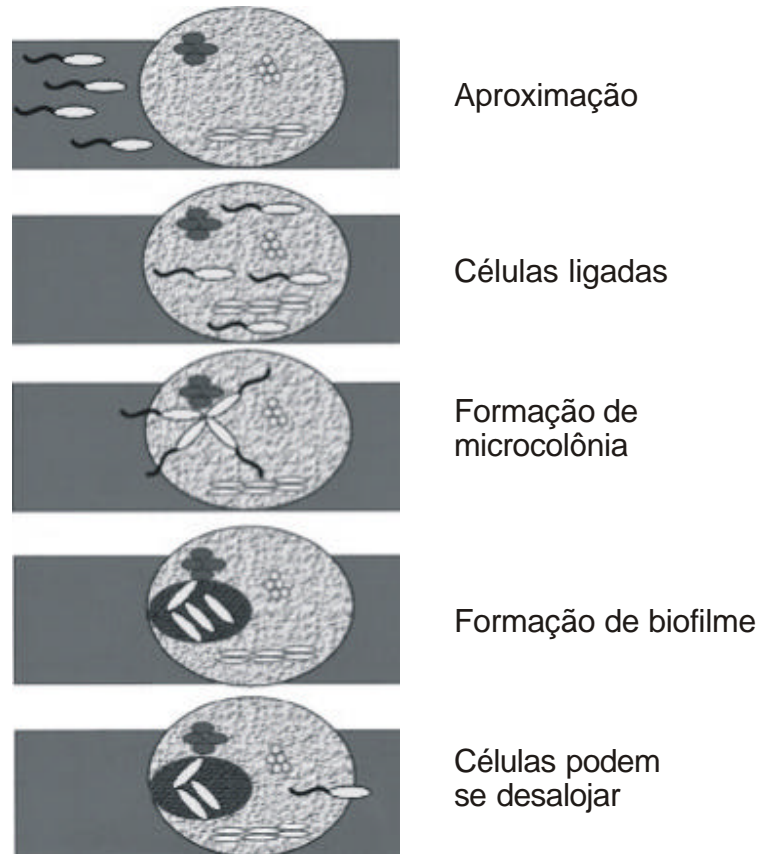


Figura 1. Representação esquemática da aproximação de bactérias flageladas à superfície de uma rocha. As bactérias usam os flagelos polares para ligarem-se reversivelmente enquanto migram por sobre a superfície das células já aderidas. Em momento apropriado vão formar microcolônias. Finalmente, ocorre a produção de polissacarídeos extracelulares que gera e, ao mesmo tempo, estabiliza o biofilme. Quando as condições no biofilme tornam-se desfavoráveis, algumas bactérias podem se desalojar e procurar outras superfícies mais favoráveis. Adaptado de Watnick & Kolter (2000).

isoladas, por exemplo, cita-se a capacidade de bactérias formarem colônias esféricas no interior das quais a atividade de enzimas hidrolíticas é otimizada, c) a defesa coletiva contra fatores antagônicos, por exemplo temos a maior resistência de colônias aos agentes oxidativos e aos antibióticos, em situações em que células individuais seriam dizimadas, e d) o aumento da sobrevivência da colônia pela diferenciação em tipos distintos de células, por exemplo, as colônias podem formar células distintas mais resistentes ao ataque por fagos, ao efeito de antibióticos e à dessecação. A idéia de que devemos tratar as populações de bactérias como organismos multicelulares vem ganhando mais adeptos desde de que foram descobertas moléculas sinalizadoras que são produzidas a partir do momento em que a população atinge um determinado número de indivíduos associados. As moléculas sinalizadoras “quorum-sensing molecules” regulam a expressão de uma grande variedade de características fenotípicas (Shapiro, 1998).

A dinâmica de formação e dissolução (ou remodelagem) do biofilme parece ser dependente de sinais específicos trocados pelas células envolvidas. Existem produtos extracelulares que podem atuar como mediadores dessa dinâmica, ora atuando como fatores de construção do biofilme, ora promovendo o desmonte da arquitetura do mesmo. A exploração do meio de cultivo é o objetivo que impulsiona a consolidação do biofilme, enquanto a escassez de nutrientes e condições ambientais adversas o que determina o rearranjo. Em *P. fluorescens* B52, verificou-se que a formação máxima de biofilme se deu entre 20 e 50 horas após a repicagem em meio líquido. Durante esse período, observou-se, ao microscópio de varredura ambiental, que um grande número de células estavam ligadas à matriz de exopolissacarídeos. Em períodos superiores a 50 horas não foram observados incrementos na estrutura do biofilme, mas sim reduções (Allison et al. 1998). Os autores acabaram por demonstrar que culturas velhas de *P. fluorescens* produzem liases de exopolissacarídeos que são especificamente direcionadas para a degradação (digestão) do biofilme e que homoserinas lactonas poderiam estar envolvidas na sinalização para a formação de biofilmes. Essa linha de investigação poderá fornecer as bases para a utilização de sinalizadores para o controle da formação de biofilme, e quando for o caso, do controle de doenças. Nos próximos parágrafos vamos discutir alguns fatores que contribuem para o estabelecimento e desenvolvimento do biofilme.

Produção e a importância de polissacarídeos extracelulares: A produção de polissacarídeos extracelulares e proteínas extracelulares tem sido associada à capacidade de causar doenças em plantas (Denny et al., 1996; Katzen et al., 1998; Dow & Daniels, 2000; Simpson et al., 2000). A atuação direta dos polissacarídeos como agentes promotores de adesão ainda é controversa. Contudo, é indiscutível a participação dos mesmos em fases distintas da patogênese (Hayward & Mariano, 1997). Aparentemente, a

formação do biofilme bacteriano é altamente dependente da produção de exopolissacarídeos, mas a adesão em si pode não ser. Em trabalho recente com a bactéria *Escherichia coli* K-12 (Danese et al., 2000), os autores, estudando a ligação de bactérias às superfícies e a dinâmica da formação do biofilme, não encontraram uma relação direta entre a ligação da bactéria ao substrato plástico testado e a produção de biofilme. A ligação inicial das bactérias parece não depender da produção de polissacarídeos extracelulares. Os autores afirmaram: “surpreendentemente, nós demonstramos que a produção do exopolissacarídeo ácido colânico não é requerida para a ligação da *E. coli* às superfícies do plástico PVC (polivinilclorado). Por outro lado, o ácido colânico é crítico para a formação do complexo tridimensional (estrutura e espessura) dos biofilmes”. Os autores compararam mutantes de *E. coli* deficientes para a produção do ácido colânico com a estirpe selvagem durante o processo de formação do biofilme. A Figura 2 mostra o resultado do experimento onde se nota claramente que a produção do ácido afetada não compromete demasiadamente a ligação de células de *E. coli* K-12 ao PVC.

Na estrutura química do ácido colânico encontram-se: fucose, galactose, ácido glucurônico, glucose, grupos acetil e piruvato; já na goma xantana produzida pelo fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a composição varia um pouco, sendo constituída por uma seqüência repetitiva de pentassacarídeos apresentando unidades de manose, ácido glucurônico e celobiose. A goma fastidiana, produzida por *Xylella fastidiosa* (Figura 3), apresenta algumas características comuns com a *X. campestris* pv. *campestris* (Dow & Daniels, 2000). Em função de outras similaridades na capacidade patogênica dessas bactérias que atacam citrus, acredita-se que a patogenicidade da *X. fastidiosa* também dependa da regulação da produção da goma fastidiana, uma vez que mutações em qualquer um dos genes reguladores da produção da goma xantana afetam a patogenicidade da *X. campestris* pv. *campestris* (Tang et al., 1991). Em trabalho recente foi demonstrado que mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* que apresentam alterações nas últimas etapas da síntese de goma xantana também exibem redução de agressividade contra plantas utilizadas nos testes de virulência. Apesar das evidências, os autores alertam para o fato de que a correlação com agressividade foi conseguida com mutantes pleiotrópicos (de múltiplos efeitos). Assim, a interpretação tem que ser feita com cautela (Katzen et al., 1998). Essas possibilidades serão alvo de estudos em *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000).

O papel de polissacarídeos extracelulares no gênero *Xanthomonas* também tem sido estudado de outras maneiras. Em *X. campestris* pv. *vesicatoria*, por exemplo, exopolissacarídeos purificados foram testados em plantas de pimenta, tanto na forma pura como em combinação com as

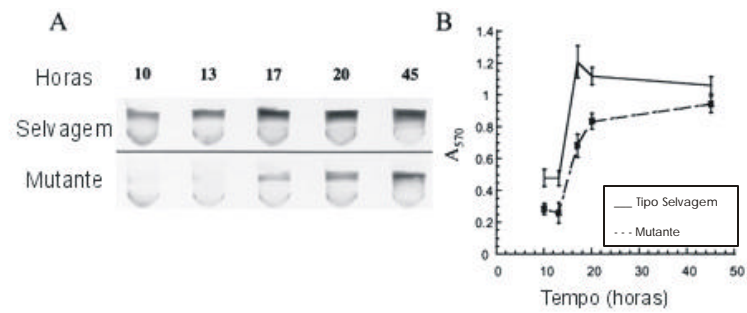


Figura 2. Importância do polissacarídeo extracelular ácido colânico, no processo de formação do biofilme de *Escherichia coli* K12. (A) Discos de PVC lavados e corados com cristal violeta. Maior coloração indica maior quantidade de bactérias aderidas. (B) O gráfico mostra a quantificação da coloração com o cristal violeta em cada ponto avaliado. Notar que no mutante incapaz de produzir o polissacarídeo a adesão foi pouco afetada. Adaptado de Danese et al. (2000).

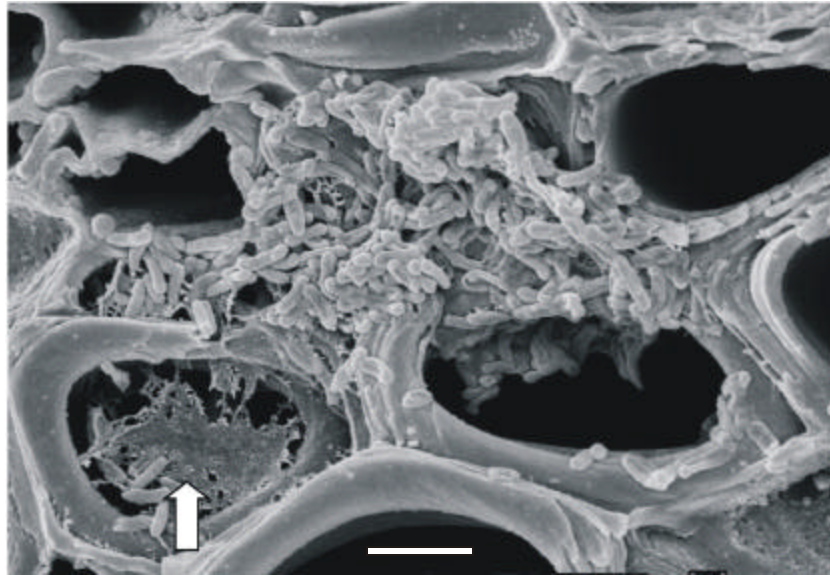


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de vasos do xilema de folha de citros parcialmente bloqueados pela bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa*, causadora da Clorose Variegada do Citros. Notar a presença de polissacarídeos extracelulares (goma fastidiana) no lúmen do vaso (seta). Barra = 5 μ m. Foto de E. W. Kitajima.

bactérias. Os pesquisadores acompanharam, basicamente, as respostas de encharcamento, perda de eletrólitos, descoloração e colapso das folhas. Com certeza, ainda há muito a ser estudado com relação às funções dos polissacarídeos na patogenicidade de bactérias.

Hidrofobicidade: O caráter hidrofóbico não é facilmente compreendido como fator envolvido na adesão, mas vem sendo cada vez mais investigado. Para iniciar, deve-se ter em mente que a hidrofobicidade é considerada inespecífica sob o ponto de vista de atração. Considera-se que a ligação hidrofóbica seja mais uma “tendência” de as moléculas apolares associarem-se com outras moléculas apolares em lugar da associação com a água. Entre os complexos apolares que podem estar envolvidos na adesão, podemos citar: antígeno-anticorpo, adesinas-receptores, lectinas-carboidratos, etc. A adesão via porções hidrofóbicas das superfícies de bactérias e outros organismos, incluindo partículas virais, parece ser regra nos processos de adesão e colonização por patógenos, tanto que alguns autores consideram o caráter hidrofóbico decisivo durante a adesão (Duncan-Hewitt, 1990).

Doyle (2000) lista 40 espécies de patógenos bacterianos em que a hidrofobicidade foi associada à virulência ou capacidade infectiva. Apesar disso, o autor considera que a hidrofobicidade pode ser dispensável por alguns patógenos. É preciso ainda aprofundar os estudos sobre o assunto para garantir o desenvolvimento de antiadesivos quando for aplicável. Esses antiadesivos poderiam, por exemplo, afetar a interação entre ligantes e receptores impedindo a adesão (Sharon & Lis, 1995).

Acredita-se que as evidências a favor da importância da hidrofobicidade são suficientes para que se justifique a avaliação do caráter hidrofóbico de um patógeno nas fases iniciais de investigação seja qual for o patógeno de interesse. A hidrofobicidade da superfície de uma bactéria ajusta-se ao quadro geral que prevê a produção de polissacarídeos para a fase inicial de maturação do biofilme (Allison et al., 1998), uma vez que os polissacarídeos são substâncias reconhecidamente hidrofóbicas para facilitar a ligação com receptores hidrofóbicos na superfície do hospedeiro. Doyle (2000) ressalta que o pouco interesse pela hidrofobicidade se deve ao fato de a mesma ser considerada inespecífica. Contudo, o autor acredita que a biologia molecular vai acrescentar muitas informações novas sobre as hidrofobinas na próxima década.

Todas as informações apresentadas anteriormente são importantes para a discussão sobre a patogenicidade de bactérias fitopatogênicas, particularmente a *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* **pv.** *citri*, explorando diferenças e similaridades.

OUTROS FATORES IMPORTANTES PARA ADESÃO E INFEÇÃO

Motilidade: Alguns outros acontecimentos contribuíram para a racionalização do processo de infecção que admite a existência de etapas que antecedem a ligação e adesão do fitopatógeno. A **motilidade** do patógeno na direção do hospedeiro potencial. Estudos pioneiros mostraram que diferenças na capacidade de produzir flagelos (tamanho normal e móveis) podem separar estirpes virulentas das avirulentas de *Erwinia amylovora* (Huang, 1974). Na mesma linha, pesquisadores trabalhando com isolados de *P. phaseolicola* que apresentavam flagelos funcionais e isolados com flagelos não funcionais (paralisados), mostraram que aqueles com flagelos ativos causavam 12 vezes mais infecção do que os isolados com flagelos inativos (Panopoulos & Schroth, 1974). Por outro lado, foi demonstrado que na infecção por *Ralstonia solanacearum* nem sempre a presença de flagelos é o fator determinante de patogenicidade. Trabalhos com microscopia eletrônica revelaram que a estirpe virulenta de *R. solanacearum* apresentava apenas 2-5 % de células flageladas, enquanto que as avirulentas exibiam 80-90 % (Kelman & Hruschka, 1973). Esse resultado acabou levando à descoberta de um outro fenômeno interessante hoje conhecido como **aerotatismo**. As estirpes virulentas e avirulentas de *R. solanacearum* quando misturadas e expostas a um gradiente de oxigênio apresentavam comportamento diferenciado, as avirulentas dirigiam-se às concentrações mais altas de oxigênio, enquanto que as virulentas movimentavam-se na direção contrária (Schmidt, 1978).

Há ainda um segundo tipo de motilidade a ser discutido. Normalmente pensamos primeiramente em flagelos quando falamos em motilidade de bactérias. Contudo, as fimbrias são as estruturas responsáveis pela movimentação das unidades bacterianas na superfície do biofilme em formação. Trata-se de um tipo de movimentação diferenciada caracterizada pela independência da atividade flagelar e por conferir às bactérias um movimento suave, como se estivesse planando bem próxima da superfície (Wall & Kaiser, 1999). Esse tipo de movimentação é bastante importante nas fases iniciais da formação do biofilme, permitindo que as bactérias se liguem ao substrato somente quando estejam realizando movimentação exploratória onde a bactéria “liga-se”, “move-se” com igual intensidade. Nessas condições, as bactérias podem “sentir” a densidade de células abaixo e a disponibilidade de nutrientes. Posteriormente, com a consolidação do biofilme, esses deslocamentos serão dificultados e somente plenamente ativos com a dissolução e/ou digestão do biofilme (O’ Toole et al., 2000).

Busca por energia (tatismo): Recentemente, a aerotatismo foi

incluído entre os tatismos pela busca por energia. Assim, o aerotatismo (tatismo por oxigênio), o fototatismo (tatismo pela luz), o redoxatismo (tatismo por potenciais de óxido-redução), quimiotatismo (tatismo por fontes de carbono) e o tatismo por aceptores alternativos de elétrons que compartilham vias de transdução de sinais comuns. A **taxia energética** tem um significado ecológico no que diz respeito ao posicionamento do organismo no meio ambiente, a chamada **estratificação vertical**. Por razões óbvias vem sendo considerada bastante importante nas interações planta-micróbios (Taylor et al., 1999).

Os trabalhos têm se tornado cada vez mais detalhados sob o ponto de vista químico. Em publicação sobre a bactéria *Bacillus megaterium*, que é uma colonizadora de raízes e potencial agente de controle da podridão de raízes de soja causada por *Rhizoctonia*, os resultados mostraram, com o auxílio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), que o extrato que atrai as bactérias é composto de alanina, asparagina, glutamina, malato, serina e treonina (Zheng & Sinclair, 1996). A conclusão foi de que a mistura é indispensável para o sucesso da colonização de raízes e sementes de soja. Nesse caso, estamos discutindo um exemplo onde há um interesse em favorecer a adesão e colonização para fins de controle biológico. Normalmente, procura-se o controle direto do fitopatógeno através do desfavorecimento desses processos.

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS: A ADESÃO ENVOLVE FIBRILAS DE CELULOSE

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é um microrganismo fitopatogênico flagelado, Gram negativo e em forma de bastonete. A capacidade patogênica é conferida pela presença de um plasmídeo (DNA extracromossômico) que contém, entre outros genes, um gene responsável pela indução de tumores (galhas) em plantas herbáceas e lenhosas, especialmente roseiras, macieiras e pereiras. A doença, conhecida como galha da coroa, é mais comumente verificada em casas de vegetação e viveiros, porém pode ser detectada em pomares com problemas de drenagem. *A. tumefaciens* é encontrado no solo normalmente vivendo de maneira saprofítica e pode ganhar o interior do hospedeiro através de ferimentos. Em função das características especiais com relação à capacidade de inserir genes estranhos ao genoma de um vegetal, esta bactéria tem sido utilizada como ferramenta de engenharia genética em programas de melhoramento vegetal (Li et al., 1996).

O processo patogênico de *A. tumefaciens* tem início com a ligação das células à superfície da planta. Essa ligação é considerada essencial para que a doença ocorra. Mutantes com deficiência na capacidade de ligarem-se

ao tecido hospedeiro apresentam redução na virulência (Tomashow et al., 1987). A ligação (“attachment”) é fraca e pode ser revertida por agitação ou por ação da água em fluxo contínuo. Vários genes, denominados *att*, são mobilizados para que essa etapa seja coroada de sucesso. A segunda etapa, envolve a síntese de fibrilas de celulose por parte da bactéria (Figura 4). As fibrilas geradas acabam garantindo uma ligação forte à planta hospedeira. Nesse caso, os genes envolvidos são denominados genes *cel*. Mutações nos genes envolvidos em cada uma das etapas acabaram comprometendo a colonização de raízes de *A. thaliana* e tomate (Figura 5) (Matthysse & McMahan, 1998). Os autores concluíram que tanto os genes envolvidos na síntese de polissacarídeos de superfície (*cel* e *attR*), quanto aqueles responsáveis pela sinalização entre a planta e as bactérias (*attB* e *attD*) reduziram, após mutagênese, a capacidade de colonizar raízes intactas. Avanços consideráveis têm sido realizados sob o ponto de vista bioquímico e de biologia molecular do modelo em questão. A pesquisa da interação *Agrobacterium*-hospedeiros é, sem dúvida, uma das mais adiantadas na área fitopatológica em todos os aspectos, e maiores progressos são esperados para a próxima década.

***XYLELLA FASTIDIOSA*, A ADESÃO AO XILEMA COMO FATOR DE PATOGENICIDADE**

A bactéria *X. fastidiosa*, agente causal da CVC - Clorose Variegada do Citros, é habitante do xilema, transmitida por cigarrinhas e por enxertia (Purcell & Hopkins, 1996). Esse fitopatógeno representa hoje um problema internacional., principalmente, em função do grande número de plantas hospedeiras que pode afetar (Rosseti et al., 1990; Beretta et al., 1996; Paradella Filho et al., 1997). Nos Estados Unidos o principal alvo da bactéria é a videira tendo sido descrita pela primeira vez por Pierce (1892). Por esse motivo a doença é conhecida no hemisfério norte como “Pierce’s disease”. No Brasil, além do citros, há referências de que a bactéria está relacionada à queima do cafeeiro (Lima et al., 1996) e outras doenças.

Apesar do recente sequenciamento do genoma desse patógeno (Simpson et al., 2000) e do esforço de centenas de pesquisadores no mundo inteiro, não há medidas de controle ou medidas preventivas que possam ser recomendadas para este patossistema. Há um consenso que é necessário congregarmos uma equipe multidisciplinar de investigadores para procurar o entendimento dos mecanismos que determinam o sucesso na colonização dos tecidos da planta hospedeira. Espera-se que, enquanto este trabalho seja escrito, que muitos aspectos do ciclo de vida da bactéria estejam sendo desvendados. Com o auxílio das áreas de fisiologia, bioquímica, entomologia,

18 – Breno Leite et al.

fitopatologia e técnicas de biologia molecular espera-se que uma solução para a clorose variegada do citros seja encontrada em futuro não distante.

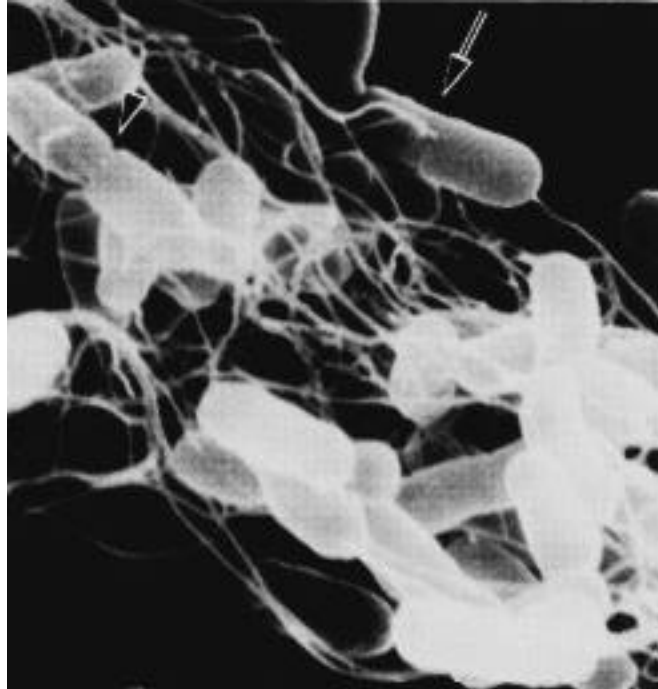


Figura 4. Ligação de células de *Agrobacterium tumefaciens*, oriundas de culturas de tecidos de cenoura. As fibrilas de celulose são produzidas pelas células bacterianas (setas). Nos estágios finais do processo de adesão, as fibrilas asseguram o íntimo contato da bactéria com o tecido hospedeiro (Adaptado de Matthyse et al., 1982).

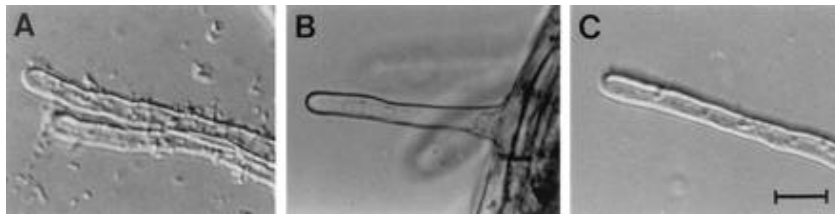


Figura 5. Ligação da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* aos pêlos das raízes de *Arabidopsis thaliana*. Os tipos selvagem e mutante de *A. tumefaciens* foram incubados com as raízes por 2 dias em presença de solução de sacarose 0.4 %. (A) foto mostra numerosas bactérias do tipo selvagem ligadas as estruturas das raízes; (B) raízes incubadas com mutante incapaz de sintetizar fibrilas de celulose; (C) Note que não são vistas células sobre os pêlos, mutantes para ligação (“attachment”). Note que as bactérias exibem atividade de ligação reduzida em relação ao tipo selvagem (Adaptado de Matthyse & McMahan, 1998). Barra = 5 μ m.

A adesão às paredes do xilema coloca esse patógeno no grupo especial das bactérias de vida limitada ao xilema. O termo “bactérias limitadas ao xilema” tem sido utilizado para descrever fitopatógenos procarióticos que são difíceis de serem isolados por métodos bacteriológicos convencionais. Esses patógenos também se caracterizam pela dificuldade para o estabelecimento de medidas de controle (Raju & Wells, 1986; Hill & Purcell, 1997). A bactéria depois de instalada (aderida) passa a se multiplicar e produz substâncias extracelulares. Entre estas substância, uma grande quantidade de polissacarídeos extracelulares é secretada (goma fastidiana), que contribuem para a formação de um biofilme na superfície dos vasos do xilema. Sobre esse material depositam-se mais bactérias que resultam em grandes agregados que podem interromper o fluxo regular de água e nutrientes através dos vasos. Esses agregados celulares podem, em tese, contribuir para concentrar atividade de exoenzimas bacterianas, auxiliar na captura de nutrientes, acumular substâncias detoxificantes, manter a agregação de células e proteger contra as flutuações ambientais, como já foi discutido anteriormente. Nos parágrafos seguintes será discutida a importância da goma fastidiana e adesinas na patogenicidade da *X. fastidiosa*. Um modelo hipotético está sendo proposto para racionalizar as etapas de adesão, formação e consolidação do biofilme gerado. Claramente, a adesão e subsequente formação de biofilme tem um papel decisivo na evolução do quadro patogênico originado pela *X. fastidiosa*. A proposta de um modelo é consequência da nova realidade da pesquisa genômica mundial. Atualmente, a observação empírica é seguida de experimentação prática imediata, enquanto a modernização metodológica vem permitindo a chamada análise e simulação “in silico” (Michelmores, 2000). O trabalho de levantamento de dados a partir dos genomas sequenciados é acompanhado de comparações e simulações, muitas vezes longe das bancadas dos laboratórios.

A ADESÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*: UM MODELO EM DISCUSSÃO

A ADESÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*: UM MODELO EM DISCUSSÃO

Durante o desenrolar dos trabalhos de investigação, foi desenvolvido um modelo hipotético para explicar, pelo menos em parte, a adesão de *X. fastidiosa*. Para fundamentar o modelo remete-se aos conhecimentos expostos anteriormente nessa revisão e também aos resultados obtidos pelos autores. Apesar das investigações experimentais estarem em fase inicial, foram encontradas fortes evidências de que o mecanismo proposto esteja realmente ativo nessa bactéria patogênica. O modelo está

amparado nos dados disponíveis do sequenciamento do genoma da bactéria (Simpson et al., 2000) e também no levantamento bibliográfico realizado.

O modelo de adesão proposto para a *X. fastidiosa* tem como objetivo primário facilitar o delineamento experimental que permita compreender a relação de atração entre célula-célula e a atração das bactérias pelo tecido hospedeiro. O modelo parte do princípio de que a adesão desta bactéria fitopatogênica possa estar sendo mediada por grupos tióis (SH) localizados na superfície das unidades celulares. A presença desses grupos SH seria uma consequência da existência de proteínas transmembranas de superfície exibindo resíduos de metionina na porção extracelular. Estudos estão sendo concentrados no sentido de confirmar a existência desses grupos através da utilização de marcadores de grupos tiol (Ohmura et al., 1996). Resultados preliminares, obtidos através da análise da composição de elementos químicos da superfície de bactérias por meio de microanálise de raio X, indicam a presença de enxofre (S) na superfície de células de *X. fastidiosa*. O resíduo na forma reduzida (SH) seria a forma adesiva, sendo a forma oxidada não adesiva (S). A adesão, logicamente, não seria inteiramente realizada através desse único mecanismo, uma vez que forças hidrofóbicas e cargas devem estar igualmente envolvidas (Doyle, 2000) Além das evidências experimentais, alguns fatos reforçam esse modelo: 1) o sequenciamento do genoma da *X. fastidiosa* mostra uma ORF (**O**pen **R**eading **F**rame) com homologia para a da enzima **metionina sulfóxido-redutase** que pode estar ativa no patógeno; 2) a existência de bactérias cuja adesão é mediada por grupos tióis (Ohmura et al., 1996) e 3) a influência de grupos SH na adesividade de patógenos que atacam seres humanos. A relação entre os grupos SH e adesão foi investigada nas as bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *E. coli*. Mutantes desses patógenos (Wizemann et al., 1996) tiveram a capacidade adesiva reduzida após a mutagênese sítio dirigida para o gene *msr* cujo produto é a enzima metionina sulfóxido redutase (**MSR**).

Resumindo, a bactéria pode possuir grupos tióis em sua superfície, cujo estado reduzido (adesivo) é mantido pela enzima MSR. O mecanismo detalhado de como ocorre a conversão entre grupos (S) e (SH), por ação da MSR, foi proposto recentemente (Lowther et al., 2000). Por outro lado, o modelo ora proposto assume que a adesão pode ocorrer independentemente da produção da goma fastiana. De fato, observando atentamente a Figura 3, dessa revisão, nota-se que muitas células estão aderidas umas às outras ou à superfície dos vasos e não se nota, muitas vezes, a presença da goma fastidiana. Esses grupos SH estariam localizados em pontos da superfície celular ou nas estruturas das fimbrias. A possibilidade de que a adesão de bactérias aconteça sem a produção de exopolissacarídeos, discutida

anteriormente (ver Figura 2), foi demonstrada por Danese et al. (2000). Dessa maneira, a goma fastidiana, analogamente, poderia ter uma função de consolidar o biofilme promovendo o crescimento arquitetônico-estrutural do mesmo, tendo um papel secundário no processo de adesão.

A presença de enxofre foi investigada em tecidos vasculares de cacau (*Theobroma cacao*) em genótipos resistentes ao fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae*. Os autores relataram o acúmulo de enxofre elementar somente em células ou estruturas que se encontravam em contato íntimo com o patógeno vascular (parede celular dos vasos do xilema, nos géis que bloqueavam os vasos, etc.) (Cooper et al, 1996). A presença de enxofre foi correlacionada com resistência e afirmaram “*Nossos dados fornecem um raro exemplo de localização celular de uma substância antimicrobiana e evidencia, pela primeira vez, o acúmulo de enxofre elementar ligado à resposta de resistência em uma planta; esta descoberta vem séculos depois do homem ter utilizado pela primeira vez o enxofre como um potente fungicida*”. Apesar da realização de trabalhos subsequentes para assegurar que a resposta era do tecido vegetal e não do patógeno (Resende, M.L.V., comunicação pessoal), ainda existem dados conclusivos a esse respeito. Assumindo que o enxofre esteja na constituição das paredes do patógeno, poderíamos admitir que o acúmulo desse elemento em tecidos resistentes poderia ser resultante de alguma peculiaridade da resposta do vegetal, restringindo a movimentação do patógeno. Recentemente, o acúmulo de enxofre elementar foi demonstrado em plantas de tomate em resposta ao desafio com *V. dahliae* e em folhas de fumo que sofriam a resposta de hipersensibilidade pós-inoculação com a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. Os autores sugeriram que o enxofre elementar pode ter uma grande significância como fitoprotetor (Morrissey & Osbourn, 1999). Nesse caso, a dúvida sobre a origem do sinal de enxofre detetado permanece.

Um outro aspecto importante a ser considerado na adesão de *X. fastidiosa* é a presença de íons de cálcio em material supostamente envolvidos na adesão (Leite et al., dados não publicados). A presença de cristais contendo cálcio foi demonstrada nos vasos do xilema de citros (Tyson et al., 1985) e na superfície de culturas de *X. fastidiosa* (Alves et al., 2000). Analogamente, o material adesivo do fungo *Colletotrichum graminicola* também apresenta esse íon divalente (Leite et al., 2000). O envolvimento de adesinas dependentes de cálcio já foi relatado em bactérias fixadoras de nitrogênio que precisam estabelecer ligação física com as raízes das plantas (Smit et al., 1989). A hipótese de trabalho é que o cálcio ou outro íon divalente estabelecem pontes entre superfícies negativamente carregadas, tanto do patógeno quanto da planta hospedeira. Mecanismo semelhante já foi sugerido para *Candida albicans*, um patógeno humano (McCourtie & Douglas, 1981).

FUTURO: O DESENVOLVIMENTO DE ANTIADESIVOS

Nas referências bibliográficas sobre o desenvolvimento e teste de antiadesivos, há um número grande de trabalhos voltados para o entendimento das bases que podem levar ao desenvolvimento de antiadesivos. Em muitos casos, os autores procuram aliar duas propriedades importantes para o controle de uma população bacteriana, as atividades **antimicrobiana** e **antiadesiva**. Um exemplo claro desse esforço é o teste de “purificadores” dentais (denture cleansers) no controle de *Streptococcus mutans* (Morgan & Wilson, 2000). Os resultados são animadores e mostraram que o agente purificador foi capaz de matar as bactérias que aderiram ao material acrílico que o continha e houve redução da adesão de novas células. Além disso, o purificador afetou a capacidade da bactéria em formar o biofilme, que era removido com facilidade após uma mudança de fluxo de líquidos.

Coincidentemente, há um grupo de pesquisadores mexicanos testando o efeito de **exopolissacarídeos sulfatados** de microalgas no controle de infecções bacterianas de animais que estão obtendo resultados satisfatórios (Guzman-Murillo & Ascencio, 2000). Em função da suspeita de que a superfície de *X. fastidiosa* apresenta grupos sulfatados (tióis), iniciaram-se estudos para verificar os efeitos de dextrana sulfatada na adesão e agregação da *X. fastidiosa*.

Infelizmente, não foram encontrados relatos de trabalhos utilizando antiadesivos para o controle de fitopatógenos bacterianos. Contudo, um grupo da Universidade de Wisconsin nos Estados Unidos vem estudando a adesão e a colonização de folhas de cevada pela levedura *Rhodosporidium toruloides*. O objetivo é maximizar o efeito antagônico da levedura contra patógenos da planta. Ao contrário do que se verifica normalmente em bactérias, os autores demonstraram que a adesão de *R. toruloides* é mediada por cargas positivas localizadas na superfície da levedura (Buck & Andrews, 1999). Para finalizar, é conveniente lembrar que as plantas contam com uma camada de ceras naturais que confere a capacidade hidrofóbica à superfície e funciona como uma imensa placa anti-adesiva, evitando contaminação na forma particulada (Neinhuis, 1997). O estudo de antiadesivos em fitopatologia, é certamente uma área aberta para investigação.

MECANISMOS DE ADESÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

A adesão é considerada pré-requisito essencial durante a patogênese de fungos (Nicholson & Epstein, 1991). As etapas de atração e contato entre patógeno e o hospedeiro fazem parte das fases de reconhecimento da interação (Leite et al., 1997). Durante a pré-penetração, ocorre a adesão através da liberação de materiais adesivos produzidos pelo patógeno. Considerando-se os subprocessos de pré-penetração e penetração, torna-se evidente que a penetração e infecção somente serão atingidas se houver adesão adequada para assim estabelecer as relações parasitárias estáveis entre fungo e planta (Amorim, 1995). Dessa maneira, a penetração e infecção somente serão atingidas se houver adesão adequada.

A infecção por fungos fitopatogênicos ocorre através de hifas especializadas que invadem os tecidos do hospedeiro. A primeira etapa consiste na adesão à barreira representada, por exemplo, pela cutícula e o crescimento do tubo germinativo sobre essa superfície. Em seguida, as pontas das hifas se modificam em apressórios, onde a pressão de turgor aumenta e impulsiona a estrutura de penetração, o “peg”. Além disso, a ponta da hifa libera enzimas degradadoras de parede celular para facilitar a penetração. Caso não promovessem a digestão de muitas camadas, essas seriam perfuradas por força mecânica (Mendgen et al., 1996). Um exemplo bastante claro da necessidade de adesão para que se dê o exercício pleno da patogenicidade e virulência de um patógeno é o estudo realizado com *Nectria haematococca* que ataca muitas espécies de cucurbitáceas. Mutantes deficientes na capacidade de aderir foram gerados e, a partir desses, dois mutantes independentes foram selecionados por apresentarem redução de cerca de aproximadamente 50 % na capacidade de aderir às superfícies de poliestireno e à superfície de abobrinhas. Os mutantes apresentaram redução de virulência quando inoculados em tecidos intactos, entretanto, a inoculação em tecidos feridos gerou níveis de virulência comparáveis ao isolado selvagem (Jones & Epstein, 1990). Portanto, a capacidade de aderir nesse caso parece ser, antes de tudo, um fator de virulência. Patogenicidade e virulência se confundem porque a capacidade alterada no mutante foi a de aderir ao substrato hospedeiro.

De maneira semelhante ao que se verifica com bactérias, a adesão de fungos também parece ser dependente do caráter hidrofóbico dos propágulos. Em experimento para avaliação da capacidade adesiva de *Botrytis cinerea*, observou-se que os conídios do fungo eram capazes de aderir à superfície de tomates ou outros substratos imediatamente após a etapa de hidratação, estando os conídios vivos ou mortos, apesar de ser comparativamente maior entre os conídios viáveis. Nesse caso, como a adesão não envolve estruturas ou ligações específicas, os autores creditaram a capacidade adesiva à **hidrofobicidade** existente entre os conídios e os substratos (Doss et al., 1993). Parece não haver um mecanismo padrão de

adesão de fungos às plantas, embora possa ser considerado que o processo ocorre com maior facilidade em superfícies hidrofóbicas tanto artificiais como naturais. Essa característica estaria ligada ao fato de que as superfícies do hospedeiro são freqüentemente recobertas com ceras (Pascholati, 1995). Apesar da ampla aceitação dessa característica, a adesão em superfícies hidrofílicas também tem sido relatada (Nicholson & Epstein, 1991). De fato, as características da superfície não são imutáveis. Investigações sobre os mecanismos de germinação de *Erysiphe graminis*, mostraram que a superfície do hospedeiro é alterada por material secretado pelos conídios antes da germinação ocorrer. Esse material é constituído por um filme fluído, rico em esterases, que cobre as áreas de infecção (Kunoh et al., 1988; Nicholson et al., 1989; Pascholati et al., 1993).

Outra peculiaridade da adesão em fungos é a formação da chamada **placa de adesão**. O estudo do fungo *Uromyces viciae-fabae* que tem como hospedeiro o feijoeiro, mostrou que há liberação localizada de materiais envolvidos na adesão, os quais garantem a fixação dos urediniósporos à superfície do hospedeiro (Beckett et al., 1990). Em ambiente aquoso, os urediniósporos depositam material em área adjacente, que é denominada de placa de adesão. A placa de adesão é formada a partir de esporos vivos e também de esporos autoclavados, porém apenas aquelas placas originárias de esporos vivos são capazes de aderir efetivamente à cutícula do hospedeiro (Deising et al., 1992). Os autores afirmam que a formação de placas de adesão, apesar de assemelhar-se a um processo passivo, é dependente da presença de água e de intensa troca de sinais entre patógeno e hospedeiro.

Finalmente, as características dos materiais adesivos vêm sendo estudadas. Sabe-se que esses materiais na maior parte das vezes são constituídos de proteínas e glicoproteínas. Essas informações começaram a surgir de dados acumulados com a utilização de várias técnicas de identificação e caracterização de compostos, como por exemplo a espectroscopia de infra-vermelho (Tunlid et al., 1991; Moloshok et al., 1994; Kwon & Epstein, 1997; Sugui et al., 1998). Apesar disso, a caracterização de alguns materiais adesivos e o detalhamento completo dos mecanismos de adesão dos propágulos fúngicos ainda não foram conseguidos.

A constituição química dos materiais adesivos vem sendo sistematicamente estudada por diferentes grupos de pesquisadores em todo o mundo. Sugui (1998) apresentou em forma de tabela (Tabela 1) as principais características dos materiais adesivos de fungos fitopatogênicos já estudados. Pode-se notar que, na maior parte das vezes, são constituídos de proteínas e/ou glicoproteínas, o que revela que os mecanismos devem guardar semelhanças. Cabe ressaltar que muitos desses materiais adesivos são apenas parte de uma massa que é colocada para fora do propágulo, a chamada matriz extracelular que será discutida a seguir.

Tabela 1. Composição de material adesivo de fungos fitopatogênicos

Fungo	Composição Química	Estrutura	Referência
<i>Botrytis cinerea</i>	Proteínas, glucose e galactosamina	Conídios não germinados	Doss et al., 1995
<i>Catenaria anguillulae</i>	Proteínas contendo grupos amina	Zoósporos	Tunlid et al., 1991
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Glicoproteínas	Conídios não germinados	Mercure et al. 1994a,b, 1995 e Sugui et al., 1998
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Proteínas, α -D-manose e α -D-galactose	Tubos germinativos e apressórios	Pain et al., 1996
<i>Discula umbrinella</i>	Glicoproteínas	Conídios não germinados	Toti et al., 1992
<i>Lemoniera aquatica</i>	β -1,3-glucana, N-acetil glucosamina e ácido N-acetilneuramínico	Hifas, apressórios e tubos germinativos	Au et al., 1996
<i>Magnaporthe grisea</i>	Glicoproteínas	Tubos germinativos e apressórios	Xiao et al., 1994
<i>Nectria haematococca</i>	Glicoprotéina de 90 kDa contendo manose	Macroconídios	Kwon & Epstein, 1997
<i>Puccinia sorghi</i>	Glicoproteínas contendo aminoácidos acídicos e β -1,3 glucanas	Tubos germinativos	Chaubal et al., 1991
<i>Saprolegnia ferax</i>	N-acetil glucosamina	Tubos germinativos	Durso et al., 1993
<i>Uromyces appendiculatus</i>	Proteínas de 23, 24 e 82 kDa	Urediniósporos germinados	Moloshok et al., 1994

Adaptado de levantamento realizado por Sugui (1998).

MATRIZES CELULARES E ADESÃO

Os fungos são capazes de produzir substâncias com características mucilaginosas que podem acumular do lado externo da célula, constituindo o

que chamamos de **matriz extracelular**. Como já foi apontada, a adesão de alguns fungos pode ou não depender desse material (Moore-Landecker, 1996). A relação de adesão e matriz extracelular é, portanto, uma relação que é verdadeira somente para algumas interações planta-patógeno. A mucilagem pode estar envolvida em um número enorme de outras funções relativas a vida dos fungos, entre as quais podemos citar: proteção contra dessecação (Nicholson & Moraes, 1980), proteção contra compostos fenólicos tóxicos (Nicholson et al., 1986 e 1989) armazenamento de enzimas importantes durante a penetração (Ramadoss et al., 1985; Snyder et al., 1991), auto-inibidores de germinação (Leite & Nicholson, 1992). Assim, torna-se evidente que, em alguns exemplos, a matriz não tem qualquer relação com adesão.

Vários trabalhos mostram que é comum a associação de materiais extracelulares de consistência fluída ou mucilagínosa, muitas vezes com caráter adesivo, às estruturas de esporos não germinados, germinados e em processo de formação de estruturas de infecção (Nicholson & Moraes, 1980; Hau & Rush, 1982; Kunoh et al., 1988; Leite et al., 1997). No presente texto explorar-se-á principalmente os casos onde a matriz extracelular está associada à atividade patogênica. Dentre esses casos, separaremos as espécies de fungos que as produzem em dois grupos: 1) espécies de fungos cuja matriz extracelular adesiva está presente nas estruturas do fungo antes da germinação, ou seja, como **material adesivo pré-formado**; 2) espécies de fungos que produzem material mucilagínoso adesivo somente após a germinação sobre o tecido da planta hospedeira ou sobre superfícies artificiais, ou seja, há síntese *de novo* de material adesivo.

Um exemplo do primeiro caso é o fungo *Magnaporthe grisea* causador da brusone em arroz e trigo. Este fungo acumula material extracelular adesivo em porções na extremidade do conídio e, uma vez em contato com uma superfície adequada, o material é liberado. Este patógeno é considerado um modelo importante para a fitopatologia. Os conídios, quando maduros, apresentam uma estrutura repleta de mucilagem adesiva em uma das extremidades (Figura 6). Esse material adesivo estabelece uma firme ligação, porém não específica, com superfícies cobertas com cera. Tentativas vigorosas para desalojar os conídios nessa fase geralmente não tem sucesso. A composição química do material adesivo ainda não foi determinada, mas acredita-se que exista o envolvimento de resíduos de glucose e manose (Hamer et al., 1988; Howard & Valent, 1996). No segundo caso, a síntese *de novo* pode ser verificada em vários exemplos na natureza, entre esses

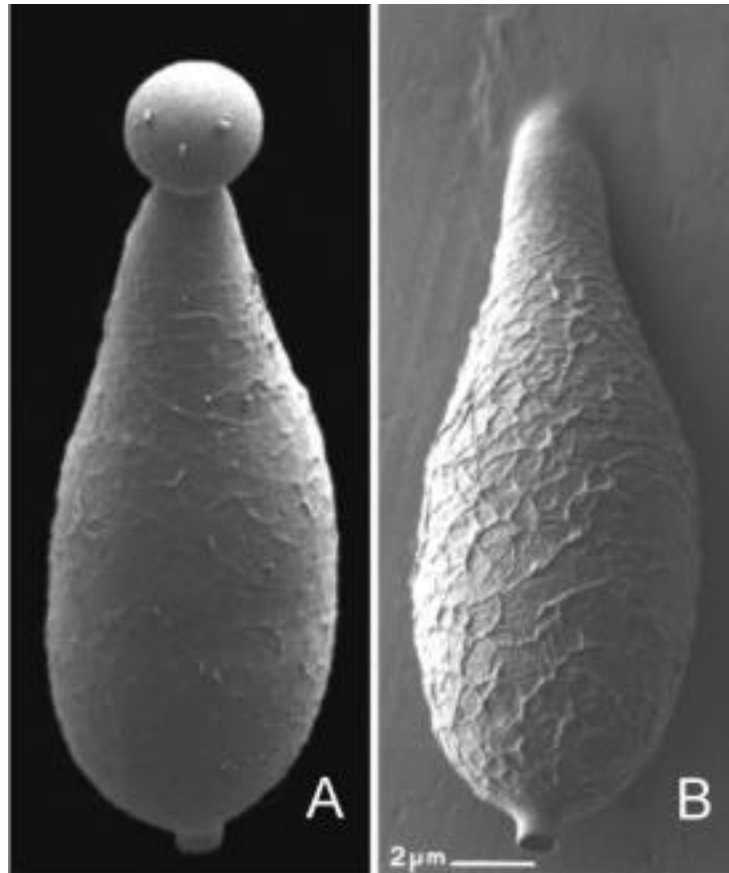


Figura 6. Conídios de *Magnaporthe grisea*. A) Conídio exibindo gota de mucilagem adesiva (topo); B) Detalhe da área onde o material adesivo foi liberado (Cortesia de Howard & Valent, 1996).

destacamos o patógeno *Nectria haematococca* (Kwon & Epstein, 1993) que, no Brasil, pode causar podridões do colo e raízes do maracujazeiro e o *C. graminicola* (Bergstrom & Nicholson, 1999), agente causal da antracnose do milho. Em ambos os casos são necessárias condições especiais para que o material adesivo seja sintetizado *de novo* e desempenhe o papel na adesão.

A ADESÃO DE *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*

O estudo e a extração do material adesivo de *C. graminicola* envolveu várias etapas e metodologias. Na fase inicial, a formação de apressórios foi acompanhada através de microscopia de varredura para que fosse possível se ter uma visão geral do processo. Em *C. graminicola*, o material adesivo somente é produzido após a germinação e o desenvolvimento do apressório. Antes disso, a mucilagem que já se encontra no conídio tem apenas papel protetor e adesão fraca. Nessa fase, o conídio é facilmente desalojado da posição onde se localiza. O processo anterior à penetração envolve: a) germinação, b) formação de apressório e c) adesão e maturação (com melanização) do apressório (Leite, 1992; Leite & Nicholson, 1992). Na Figura 7, pode-se ver um conídio germinado com apressório formado. O apressório adere-se firmemente à superfície e assegura que as demais etapas do processo de penetração ocorram.

Subseqüentemente, o material adesivo de *C. graminicola* foi isolado e caracterizado a partir de conídios que se desenvolveram e aderiram sobre superfícies de poliestireno. Após exaustivo de trabalho de raspagem e utilização de detergentes, o material adesivo pode ser coletado para análise (Sugui et al., 1998). Primeiramente, verificou-se que o material adesivo era constituído basicamente de glicoproteínas, e a manose era o carboidrato predominante. Em seguida, uma quantidade muito pequena de material (aproximadamente 5 mg) foi submetida à microanálise de raio X para que se pudesse traçar o perfil de íons associados ao material adesivo e também das características morfológicas do material isolado. Ao final das análises, ficou demonstrado que: a) o material apresentava componentes amorfos, fibrilares e particulados; b) a presença de cálcio, sódio, cloro, fósforo e enxofre antes da diálise do material e c) após diálise, somente os picos de cálcio e enxofre permaneceram inalterados. Estes resultados acabaram indicando que o material adesivo de *C. graminicola* apresenta cálcio e enxofre em sua constituição (Leite et al., 2000). Uma vez que o cálcio é um íon divalente amplamente difundido entre os sistemas animais e vegetais como um agente de reforço estrutural, podemos assumir que possivelmente o cálcio seja utilizado para reforçar a matriz extracelular adesiva e garantir a adesão segura do apressório com a superfície da planta hospedeira. O envolvimento de íons divalentes, incluindo cálcio, já foi apontado como um possível mecanismo ativado durante o processo de adesão de *Candida albicans*, um patógeno

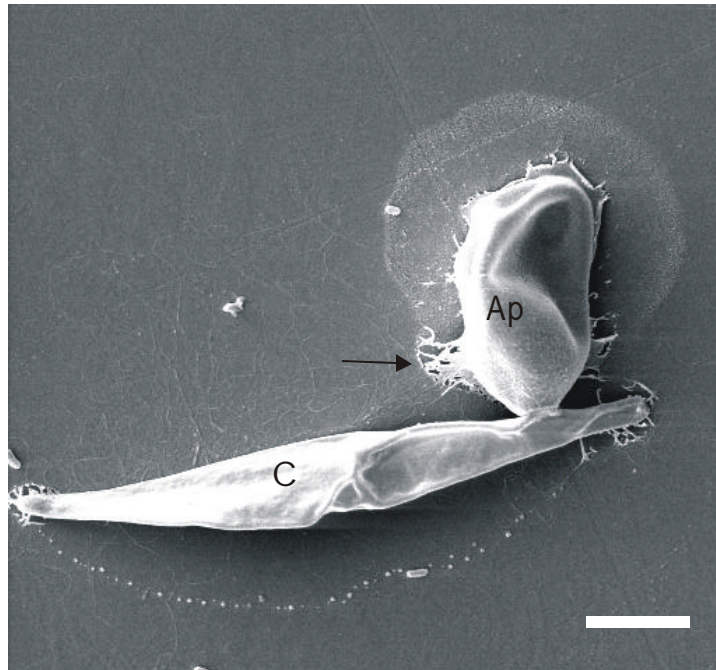


Figura 7. Conídio germinado do fungo *Colletotrichum graminicola*. O corpo alongado do conídio (C) está vazio, uma vez que conteúdo interno foi transferido para o apressório (Ap). Notar o material adesivo (seta) fixando o apressório ao substrato. Barra = 5 μ m. (Adaptado de Leite & Kitajima, 1999).

humano. O cálcio faria a ponte entre superfícies negativamente carregadas do patógeno e do tecido hospedeiro (McCourtie & Douglas, 1981). Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio, o simbiote *Rhizobium leguminosarum* também é dependente cálcio (Smit et al., 1989). Em fitopatologia, a adesão dependente de Ca^{2+} foi descrita para o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* (Donaldson & Deacon, 1992). Muitos detalhes sobre os mecanismos de adesão de fungos ainda estão por ser investigados. O *C. graminicola*, em função do que foi aqui exposto, apresenta-se como um excelente modelo para testes com potenciais antiadesivos.

COMENTÁRIOS FINAIS

Procurou-se nesta revisão oferecer uma visão ampla da importância da adesão na patogenicidade de bactérias e fungos causadores de doenças em plantas. Como mensagem final, convida-se a compartilhar da impressão, baseada nas experiências e leituras decorrentes desse trabalho, de que o melhor da adesão de fitopatógenos ainda está por vir. Não há, em português, revisão similar e as revisões em inglês também são escassas, exatamente, porque está-se avançando rumo ao encontro de estratégias de ação, antes inimagináveis, em função de novos conhecimentos adquiridos. No controle de doenças, vai-se conviver com uma agricultura altamente biotecnológica e dependente de informações precisas sobre mecanismos envolvidos na patogenicidade. Essa nova tendência já pode ser sentida no planejamento e novos investimentos da ciência brasileira. O maior exemplo disso é a atuação conjunta de laboratórios paulistas no sequenciamento da bactéria *Xylella fastidiosa*, projeto discutido no presente texto. Com o genoma sequenciado, pode-se procurar as peças do quebra-cabeça sobre o ciclo de vida e atividade patogênica da bactéria. Este conhecimento aliado ao monitoramento do ambiente deve alterar, nos próximos anos, a maneira como as medidas de controle serão implementadas. Estamos certamente vivendo uma revolução de conceitos em fitopatologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Nelson A. Wulff e Lis R. Uliana pelo suporte durante a revisão do texto final do manuscrito e a Fapesp e CNPq pelo apoio financeiro.

LITERATURA CITADA

- ALFANO, J. R. & COLLMER, A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol.* 179:5655-62.
- ALLISON, D.G.; RUIZ, B.; SANJOSE, C.; JASPE, A. & GILBERT, P. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167:179-84.
- ALVES, E.; MARUCCI, R.C.; PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. 2000. Microscopia de varredura, com microanálise de raio X, como ferramenta para estudo de cristais sobre a superfície de colônias de *Xylella fastidiosa*: relação com Adesão. *Fitopatol. Bras.* 25:318.
- AMORIM, L. 1995. Ciclos primário e secundário. In: Bergamin F^o, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Ed.). Manual de fitopatologia - princípios e conceitos. São Paulo, Ceres, p.234-45.
- AU, D.W.T.; MOSS, S.T.; JONES, E.B.G. & HODKISS, I.J. 1996. Characterization of the mucilage sheaths of *Lemniera aquatica* by lectin-gold labeling. *Mycoscience* 37:187-200.
- BECKETT, A.; TATNELL, J.A. & NICOLA, T. 1990. Adhesion and pre-invasion behavior of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* during germination on host and synthetic surfaces. *Mycol. Res.* 94:865-75.
- BERETTA, M.J.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M.; DERRICK, K.S.; BARTHE, G.A.; CECARDI, T.L.; LEE, R.F.; PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H. & RIBEIRO, I.J.A. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Dis.* 80:821.
- BEVERIDGE, T.J.; POWWELS, P.H.; SARA, M.; KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; KARI, K.; KEROSUO, E.; HAAPASALO, M.; EGELSEER, E.M.; SCHOCHER, I.; SLEYTR, U.B.; MORELLI, L.; CALLEGARI, M.L.; NOMELLINI, J.F.; BINGLE, W.H.; SMIT, J.; LEIBOVITZ, E.; LEMAIRE, M.; MIRAS, I.; SALAMITOU, S.; BÉGUIN, P.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MATUSCHEK, M. & KOVAL, S.F. 1997. Functions of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:99-149.
- BERGSTROM, G.C. & NICHOLSON, R.L. 1999. The Biology of Corn Anthracnose: Knowledge to Exploit for Improved Management. *Plant Dis.* 83:596-608.
- BUCK, J.W. & ANDREWS, J.H. 1999. Localized positive charge mediates adhesion of *Rhodosporium toruloides* to barley leaves and polystyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2179-83.
- CHAUBAL., R.; WILMOT, V.A. & WINN, W.K. 1991. Visualization, adhesiveness, an cytochemistry of the extracellular matrix produced by urediospore germ tubes of *Puccinia sorghi*. *Can. J. Bot.* 69:2044-54.
- COOPER, R.M.; RESENDE, M. L.; FLOOD, J.; ROWAN, M.G.; BEALE, M. H. & POTTER, U. 1996. Detection and cellular localization of

- elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. Nature. 379:159-62.
- DANESE, P.N.; PRATT, L.A. & KOLTER, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for the development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. J. Bacteriol. 182:3593-6.
- DEISING, H.; NICHOLSON, R.L.; HUAG, M.; HOWARD, R.J. & MENDGEN, K. 1992. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. Plant Cell 4:1101-11.
- DENNY, T.P.; GANOVA-RAEVA, L.M.; HUANG, J. & SCHELL, M.A. 1996. Cloning and characterization of *tek* encoding the major extracellular protein of *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Micr. Interact. 9:272-81.
- DONALDSON, S.P. & DEACON, J.W. 1992. Role of calcium in adhesion and germination of zoospore cysts of *Pythium*: a model to explain infection of host plants. J. Gen. Microbiol. 138:2051-9.
- DOSS, R.P.; POTTER, S.W.; CHASTAGNER, G.A. & CRHISTIAN, J.K. 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol. 56:1786-1791.
- DOSS, R.P.; POTTER, S.W.; SOELDNER, A.H.; CRHISTIAN, J.K. & FUKUNAGA, L.E. 1995. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol. 61:260-5.
- DOW, J.M. & DANIELS, M.J. 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. Yeast 17:263-71.
- DOYLE, R.J. 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. Micr. Infection 2:391-400.
- DUNCAN-HEWITT, W.C. 1990. Nature of the hydrophobic effect. In: Doyle, R.J. & Rosemberg, M. (Eds.). Microbial cell surface hydrophobicity ASM Publications, Washington, p.39-73.
- DURSO, L.; LEHNEN, L. JR. & POWELL, M. 1993. Characteristics of extracellular adhesion produced during *Saprolegnia ferax* secondary zoospores encystment and cytospore germination. Mycologia 85:744-55.
- GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, A. & WOOD, K.R. 1986. The Biochemistry and Physiology of Plant Disease. Columbia, University of Missouri Press, 433p.
- GUZMAN-MURILLO, M.A. & ASCENCIO, F. 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolisaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. Lett. Appl. Microbiol. 30:473-8.
- HAMER, J.E.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G. & VALENT, B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. Science 229:288-90.
- HAU, F.C. & RUSH, M.C. 1982. Preinfectious interaction between

- Helminthosporium oryzae* and resistant and susceptible rice plants. *Phytopathology* 72:285-92.
- HAYWARD, A.C. & MARIANO, R.L.R. 1997. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. *Rev. Anu. Patol. Plant.* 5:199-234.
- HILL, B.L. & PURCELL, A.H. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by efficient vector. *Phytopathology* 87:1197-201.
- HOWARD, R.J. & VALENT, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:491-512.
- HUANG, P. -Y. 1974. Ultrastructural modification by and pathogenicity of *Erwnia amylovora* in apple tissues. PhD thesis. Dept. Plant Pathology, Univ. Missouri-Columbia.
- HUGHES, H.B.; CARZANIGA, R.; RWLINGS, S.L.; GREEN, J.R. & O'CONNELL, R.J. 1999. Spore surface glycoproteins of *Colletotrichum lindemuthianum* are recognized by a monoclonal antibody which inhibits adhesion to polystyrene. *Microbiology* 145:1927-36.
- HULTGREN S.J.; ABRAHAM, S.; CAPARON, M.; FALK, P.; ST GEME, J.W. & NORMARK, S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73:887-901.
- JONES, M.J. & EPSTEIN, L. 1990. Adhesion of macroconidia to the plant surface and virulence of *Nectria haematococca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3772-8.
- KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; ELMINI, V.; BECKER, A.; PUHLER, A. & IELPI, L. 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J. Bacteriol.* 180:1607-17.
- KELMAN, A. & HRUSCHKA, H. 1973. The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* 76:177-83.
- KOLENBRANDER, P.E. 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:413-37.
- KUNOH, H.; YAMAOKA, N.; YOSHIOKA, H. & NICHOLSON, R.L. 1988. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*. I. Contact-mediated changes in morphology of the conidium surface. *Exp. Mycol.* 12:325-35.
- KWON, Y.H. & EPSTEIN, L. 1993. A 90-kDa glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia to substrata. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:481-7.
- KWON, Y.H. & EPSTEIN, L. 1997. Isolation and composition of the 90 kDa glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 51:63-74.

- LEITE, B. & KITAJIMA, E.W. 1999. Plant pathogenic fungi. *Leo Microscopy Magazine*. 4p. (www.leo.co.uk).
- LEITE, B. 1992. Production of Mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development. Purdue University - Tese de Doutorado.
- LEITE, B. & NICHOLSON, R.L. 1992. Mycosporine-alanine, a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Ex. Mycology* 16: 76-86.
- LEITE, B. 1993. Controle de germinação em *Colletotrichum graminicola*: mecanismos e perspectivas. *Summa Phytopathol.* 19:55-9.
- LEITE, B.; RONCATO, L.D.B.; PASCHOLATI, S.F. & LAMBAIS, M.R. 1997. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. *Rev. Anu. Patol. Plant.* 5:235-80.
- LEITE, B.; ISHIDA, M.L.; ALVES, E.; PASCHOLATI, S.F. & SUGUI, J.A. 2000. Detection of calcium in the adhesive material obtained from the plant pathogen *Colletotrichum graminicola*: X ray microanalysis (EDS) evidences. *Proc. Microscoc. Microanal.* 6:698-9.
- LI, H.Q.; SAUTER, C.; POTRYKUS, I. & PUONTI-KAERLAS, J. 1996. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nat. Biotechnol.* 14:736-40.
- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R. & CARLOS, E.F. 1996. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*. *Fitopatol. Bras.* 21:392-3.
- LOWTHER, W.T.; BROT, N.; WEISSBACH, H.; HONEK, J.F. & MATTHEWS, B.W. 2000. Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:6463-8.
- MATTHYSSE, A.G. & MCMAHAN, S. 1998. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD*, and *attR* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2341-5.
- MATTHYSSE, A.G.; HOLMES, K.V. & GURLILTZ, A.G. 1982. Binding of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot protoplasts. *Physiol. Plant Path.* 20:27-33.
- McCOURTIE, J. & DOUGLAS, L.J. 1981. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun.* 32:1234-41.
- MENDGEN, H.; HAHN, M. & DEISING, H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:367-86.
- MERCURE, E.W.; KUNOH, H. & NICHOLSON, R.L. 1994a. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45:412-40.
- MERCURE, E.W.; KUNOH, H. & NICHOLSON, R.L. 1995. Visualization

- of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:121-35.
- MERCURE, E.W.; LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. 1994b. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia to artificial hydrophobic surfaces. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45:421-40.
- MICHELMORE, R. 2000. Genomic approaches to plant disease resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3: 125-31.
- MINARDI, P. 1995. Cloning of genes required for hypersensitivity and pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67:201-10.
- MOLOSHOK, T.D.; TERHUNE, B.T.; LAMBOY, J.S. & HOCH, H.C. 1994. Fractionation of extracellular matrix components from urediospore germings of *Uromyces*. *Mycologia* 86:787-94.
- MOORE-LANDECKER, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Prentice Hall, New Jersey. 574p.
- MORGAN, T.D. & WILSON, M. 2000. Anti-adhesive and antibacterial properties of a proprietary denture cleanser. *J. Appl. Microbiol.* 89:617-23.
- MORRISSEY, J.P., & OSBOURN, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63: 708-724.
- NEINHUIS, C. 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Ann. Bot.* 79:667-77.
- NICHOLSON, R.L. & EPSTEIN, L. 1991. Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: Cole, G.T. & Hoch, H.C. (Ed.). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York, Plenum Press, p.3-23.
- NICHOLSON, R.L. & MORAES, W.B.C. 1980. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. *Phytopathology* 70:255-61.
- NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. & ASQUITH, T.N. 1986. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: Implications for the survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* 72:1315-18.
- NICHOLSON, R.L.; HIPSKIND, J. & HANAU, R.M. 1989. Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:243-52.
- NICHOLSON, R.L. & KUNOH, H. 1995. Early interactions, adhesion and establishment of the infection court by *Erysiphe graminis*. *Can. J. Bot.* 73: S609-15.
- O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; BOSCHIROLI, M.L.; BOURG, G.; FOULONGNE, V.; FRUTOS, P.; KULAKOV, Y. & RAMUZ, M. 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV

- secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Molec. Microbiol. 33:1210-20.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B. & KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54:49-79.
- OHMURA, N.; TSUGITA, K.; KOIZUMI, J-I. & SAIKI, H. 1996. Sulfur binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 178:5776-80.
- PAIN, N.A.; GREEN, J.R.; JONES, G.L. & O'CONNELL, R.J. 1996. Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. Protoplasma 190:119-30.
- PANOPOULOS, N.J. & SCHROTH, M.N. 1974. Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves by *Pseudomonas phaseolicola*. Phytopathology 47:337-41.
- PARADELLA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; GARCIA JÚNIOR, A.; BERETTA, M.J.; HARAKAWA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; RODRIGUES NETO, J.R. & BERIAM, L.O.S. 1997. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. Summa Phytopathol. 23:46-9.
- PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D. & NICHOLSON, R.L. 1993. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 42:37-51.
- PASCHOLATI, S.F. 1995. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: Bergamin Fº, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Ed.). Manual de fitopatologia - princípios e conceitos. São Paulo, Ceres, v.1., p.343-64.
- PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J. & GREEN, J.O. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Gen. Biol. 27:186-98.
- PIERCE, N.B. 1892. *The California vine disease*, U.S. Dept. Agric., Div. of Veg. Pathol. Bull. No. 2.
- PURCELL, A.H. & HOPKINS, D.L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 34:131-51.
- RAJU, B.C. & WELLS, J.M. 1986. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. Plant Dis. 70:182-6.
- RAMADOSS, C.S.; UHLIG, J.; CARLSON, D.M.; BUTLER, L.G. & NICHOLSON, R.L. 1985. Composition of the mucilaginous spore matrix of *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of corn, sorghum and other grasses. J. Agri. Food. Chem. 33:728-32.
- ROMANTSCHUK, M. & BAMFORD, D.H. 1986. The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili. Microb. Pathog. 1:139-48.
- ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G. &

- TEIXEIRA, A.R.R. 1990. Présence de bacteries dans le xylème d'oranges atteints de chlorose veriegée, une nouvelle maladie de agrumes au Bresil. C. R. Acad. Sci. 30:345-49.
- SCHMIDT-EISENLOHR, H.; DOMKE, N.; ANGERER, C.; WANNER, G.; ZAMBRYSKI, P.C. & BARON, C. 1998. Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 181:7485-7492.
- SCHMIT, J. 1978. Microscopic study of early stages of infection by *Pseudomonas solanacearum* E.F.S. on "in vitro" grown tomato seedlings. Proc. 4th Int. Plant Path. Bact. Conf. 2:841-56.
- SEQUEIRA, L. 1985. Surface components involved in bacterial pathogen-plant host recognition. J. Cell Sci. Suppl. 2:301-16.
- SHAPIRO, J.A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Rev. Microbiol. 52:81-104.
- SHARON, N. & LIS, H. 1995. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. Essays Biochem. 30:59-75.
- SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVE, J.M.; BRIONES, M.R.; BUENO, M.R.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.; CARRARO, DM.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, F.F.; COSTA, M.C.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, V.C.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANCA, S.C.; FRANCO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISEL, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER E.L.; KITAJIMA, J.P. & MARINO, C.L. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Nature 406:151-57.
- SMIT, G.; LOGMAN, T.J.; BOERRIGTER, M.E.; KIJNE, J.W. & LUGTENBERG, B.J. 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca²⁺-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. J. Bacteriol. 171:4054-62.
- SNYDER, B.A.; LEITE, B.; HIPSKIND, J.; BUTLER, L.G. & NICHOLSON, R.L. 1991. Accumulation of sorghum phytoalexins induced by *Colletotrichum graminicola* at the infection site. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39:463-70.
- SOTO, G.E. & HULTGREN, S.J. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. J. Bacteriol. 181:1059-71.
- SUGUI, J.A. 1998. Estudo das matrizes extracelulares secretadas pelos fungos *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum graminicola* e *Pestalotia*

- malicola*. Universidade Federal do Paraná – Tese de Doutorado.
- SUGUI, J.A.; LEITE, B. & NICHOLSON, R.L. 1998. Characterization of the extracellular matrix released by *Colletotrichum graminicola* onto artificial hydrophobic surface. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:411-25.
- TANG, J.L.; LIU, Y.N.; BARBER, C.E.; DOW, J.M.; WOOTTON J.C. & DANIELS, M.J. 1991 Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 22:409-17.
- TAYLOR, B.L.; ZHULIN, I.B. & JOHNSON, M.S. 1999. Aerotaxis and other energy sensing behavior in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:103-28.
- TOMASHOW, M.F.; KARLINSKY, J.E.; MARKS, J.R. & HURLBURT, R.E. 1987. Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. *J. Bacteriol.* 169: 3209-16.
- TOTI, L.; VIRET, O.; CHAPELA, I.H. & PETRINI, O. 1992. Differential attachment by conidia of the endophyte, *Disculla umbriella* (berk & Br.) Morelet, to host and non host surfaces. *New Phytologist* 121:469-75.
- TUNLID, A.; NIVENS, D.E.; JANSSON, H.-B. & WHITE, D.C. 1991. Infrared monitoring of the adhesion of *Catenaria anguillulae* zoospores to solid surfaces. *Exp. Mycology* 15:206-14.
- TYSON, G.E.; STOJANOVIC, B.J. ; KUKLINSKI, R.F.; DIVITORIO, T.J. & SULLIVAN, M.L. 1985. Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. *Phytopathology* 75:264-9.
- WALL, D. & KAISER, D. 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* 32:1-10.
- WATNICK, P. & KOLTER, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182:2675-9.
- WEIERGANG, I.; DUNKLE, L.D.; WOOD, K.V. & NICHOLSON, R.L. 1996. Morphogenic regulation of pathotoxin synthesis in *Cochliobolus carbonum*. *Fungal Genet. Biol.* 20:74-8.
- WIZEMANN, T.M.; MOSKOVITZ, J.; PEARCE, B.J. CUNDELL, D.; ARVIDSON, C.G.; SO, M.; WEISSBACH, H.; BROT, N. & MASURE, H.R. 1996. Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93:7985-90.
- XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMKURA, T.; ISHIYAMA, T. & YAMAGUSHI, I. 1994. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 7:639-44.
- ZHENG, N.Y. & SINCLAIR, J.B. 1996. Chemostatic response of *Bacillus*

Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras – 41

megaterium strain B 153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:21-35.