



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DAS CEPAS 9a5c e Fb7
DE *Xylella fastidiosa***

Aluno: Jessica Brito de Souza

Orientador: Prof. Dr. Rafael Nascimento

**UBERLÂNDIA - MG
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

PROTEÔMICA COMPARATIVA DAS CEPAS 9a5c e Fb7

DE Xylella fastidiosa

Aluno: Jessica Brito de Souza

Orientador: Prof. Dr. Rafael Nascimento

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética).**

**UBERLÂNDIA - MG
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729p
2017 Souza, Jessica Brito de, 1993
Proteômica comparativa das cepas 9a5c e Fb7 de *Xylella fastidiosa*
[recurso eletrônico] / Jessica Brito de Souza. - 2017.

Orientador: Rafael Nascimento.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.808>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Fitopatologia. 3. Lipase. 4. Vírus de plantas. I.
Nascimento, Rafael, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROTEÔMICA COMPARATIVA DAS CEPAS 9a5c e Fb7

DE Xylella fastidiosa

ALUNO: Jessica Brito de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Rafael Nascimento

Examinadores:

Dr. Hebréia Oliveira Almeida Souza

Dr. Paulo Adriano Zaini

Data da Defesa: _____ / _____ / _____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

Prof. Dr. Rafael Nascimento

Dedico aos meus pais, Lúcia e Henrique,
e a minha irmã Clara.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por todas as benções alcançadas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Nascimento, pela oportunidade, atenção e por todo o conhecimento compartilhado.

A Prof. Dra. Hebréia Oliveira Almeida Souza, pela amizade e por não mensurar esforços em me ajudar. Além de contribuir enormemente com a minha formação acadêmica, me fez crescer como pessoa. Me mostrou que pelas adversidades, podemos batalhar e nos tornar mais fortes.

Ao Dr. Paulo Adriano Zaini, pela total disponibilidade e ajuda durante todo o planejamento e execução do trabalho.

Ao *Plant Team*, por me acolher desde o início e mostrar o quanto é bom trabalhar em equipe. A Mônica, pela parceria e por todo o auxílio com a *Xylella*. A Camila, pelo companheirismo e ensinamentos. Aos demais membros, Tâmara, Bárbara, Priscila, Lorraine, Raphael, Cássio, obrigada pela convivência diária.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart por me acolher no laboratório de Nanobiotecnologia e possibilitar a execução dos experimentos, e aos demais membros do laboratório por todo o apoio. Em especial a Tamiris, Emília, Victor e Izzabela.

À Aline Gomes que desde ao meu início no laboratório se demonstrou uma grande amiga. A toda a parceria, ajuda e conhecimento que nunca se hesitou em compartilhar.

À Universidade Federal de Uberlândia e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, por toda a estrutura e apoio financeiro fornecidos.

Agradecimentos especiais:

Aos meus pais Lúcia e Henrique, por todo o apoio e incentivo ao longo de toda a minha vida. Vocês são as minhas referências e minha maior motivação.

A minha irmã e melhor amiga Clara, pelo companheirismo e por toda a força, que mesmo à distância, esteve sempre me ajudando.

Aos meus familiares e amigos, em especial a Adriele, Lívia e Lorena, por toda a torcida e vibrações positivas.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Fitobactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	1
1.2. Principais doenças causadas por <i>X.fastidiosa</i> e impacto econômico.....	3
1.3. Tipos de secreção	7
1.4. Lipases/esterases	9
1.5. Fatores de virulência e patogenicidade de <i>X.fastidiosa</i>	11
1.6. Importância do biofilme bacteriano	16
1.7. Análise proteômica	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	21
3. Material e Métodos	21
3.1. Manutenção e condições de crescimento das cepas de <i>X.fastidiosa</i>	21
3.2. Obtenção das proteínas totais e secretadas de <i>X.fastidiosa</i>	22
3.3. Precipitação das proteínas totais e secretadas de <i>X.fastidiosa</i> ...	22
3.4. Quantificação das proteínas secretadas no sobrenadante após precipitação e das proteínas totais.....	23
3.5. Ensaio de atividade lipásica das amostras de proteínas secretadas no sobrenadante	24
3.6. Ensaio de atividade esterásica das amostras de proteínas secretadas e extratos totais	24
3.7. Análise proteômica de lisados celulares.....	24
3.8. Extração de RNA total	25
3.9. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	26
4. Resultados	28
4.1. Ensaio de atividade lipásica das amostras de proteínas secretadas.....	28
4.2. Ensaio de atividade esterásica das amostras de proteínas totais e secretadas.....	29
4.3. Análise proteômica comparativa das proteínas totais de <i>X.fastidiosa</i> 9a5c e Fb7	31
4.4. Análise da expressão de proteínas por PCR quantitativa em tempo real	38
5. Discussão	40
6. Conclusão	51
7. Referências	52

RESUMO

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa e não flagelada responsável por colonizar o xilema de várias plantas cultivadas e selvagens encontradas em todo o mundo. Nas últimas décadas, tem sido bem estudada devido à importância deste fitopatógeno como agente causador de duas principais doenças, a Clorose Variiegada dos Citros (CVC), no Brasil e na Argentina, e a Doença de Pierce (PD) nos Estados Unidos. Algumas cepas de *X.fastidiosa* têm seus genomas completamente ou parcialmente elucidados, como: 9a5c, isolado de laranja no estado de São Paulo e a cepa Fb7, isolada da laranja na região de Corrientes na Argentina. Baseando-se na análise genômica entre 9a5c e Fb7, e também na importância de uma lipase/esterase na patogenicidade de *X.fastidiosa*, o objetivo deste trabalho foi analisar e identificar os fatores associados à patogenicidade e virulência de *X.fastidiosa* 9a5c e Fb7. A fim de visualizar a presença de LesA nas amostras de proteínas totais e secretadas das cepas 9a5c e Fb7, testes esterásico e lipásico foram realizados. A atividade lipásica foi analisada cultivando a bactéria em meio de cultura suplementado com 1% de tributirina. Este teste demonstrou atividade sob os triacilgliceróis de cadeia curta presentes no meio e pode ser visualizado pela maior formação do halo na cepa Fb7. A atividade de esterase, determinada pelo substrato 4-metilumbelliferilbutirato (4-MUB), apresentou valores significativos e claramente expressos. Assim, a estirpe Fb7 apresentou atividade consideravelmente maior quando comparada com 9a5c. Em busca de outros fatores de virulência, foi realizado uma cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) das proteínas totais das culturas de *X.fastidiosa* de ambas as cepas. Nesta análise, foi possível identificar 119 proteínas diferencialmente expressas. Dentre elas, algumas proteínas com funções associadas a virulência da bactéria foram superexpressas na cepa Fb7, comparado a cepa 9a5c. A análise de RT-qPCR permitiu validar a expressão de algumas dessas proteínas. Os resultados demonstraram que a LesA e outras proteínas com níveis de expressão superior em Fb7, desempenham um importante papel de patogenicidade nesta cepa. Dessa forma, são fatores que podem explicar a maior virulência da cepa Fb7 quando comparado a cepa 9a5c.

Palavras-chave: Fitopatógeno; Virulência; Lipase

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a gram-negative and non-flagellate bacterium that colonizes the xylem of various cultivated and wild plants worldwide. In the last decades, it has been well studied due to the importance of this phytopathogen as the causing agent of two major diseases, Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in Brazil and Argentina, and Pierce Disease (PD) in the United States. Some strains of *X.fastidiosa* have their genomes completely or partially elucidated, such as 9a5c, isolated from orange in the state of São Paulo, and the strain Fb7, isolated from orange in the region of Corrientes in Argentina. Based on the genomic analysis between strains 9a5c and Fb7, and on the importance of a lipase/esterase in the pathogenicity of *X.fastidiosa*, the objective of this work was to analyze and identify the factors associated with the pathogenicity and virulence of *X.fastidiosa* strain 9a5c and Fb7. To visualize the presence of LesA in the total and secreted protein samples of strains 9a5c and Fb7, esterase and lipase tests were performed. Lipase activity was analyzed by culturing the bacteria in culture medium supplemented with 1% tributyrin. This test demonstrated activity under the short chain triacylglycerols present in the medium and can be visualized by the increased halo formation in the Fb7 strain. The esterase activity, determined by the substrate 4-methylumbelliferylbutyrate (4-MUB), showed significant and clearly expressed values. Hence, the Fb7 strain showed considerably higher activity when compared to 9a5c. In search for virulence factors, a liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS) of the total proteins of the *X.fastidiosa* cultures of both strains was performed. In this analysis, it was identified 119 differentially expressed proteins. Among them, some proteins with functions associated with bacterial virulence were overexpressed in Fb7 strain, compared to 9a5c strain. The RT-qPCR analysis allowed to validate the expression of some of these proteins. The results showed that LesA and other proteins with higher levels of expression in Fb7 play an important pathogenicity role in this strain. Thus, they are factors that may explain the greater virulence of Fb7 strain when compared to strain 9a5c.

Keywords: Phytopathogen; Virulence; Lipase

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Espécies dos vetores de <i>X. fastidiosa</i>	1
Figura 2. Microscopia eletrônica de <i>X.fastidiosa</i> no vaso de xilema dos citros	2
Figura 3. Sintomas da doença CVC	7
Figura 4. Ensaio de atividade lipásica	29
Figura 5. Atividade esterásica das proteínas totais de <i>X.fastidiosa</i>	30
Figura 6. Atividade esterásica das proteínas secretadas de <i>X.fastidiosa</i> 9a5c e <i>X.fastidiosa</i> Fb7	30
Figura 7: Classificação das proteínas identificadas na proteômica das amostras totais de <i>X.fastidiosa</i> 9a5c e <i>X. fastidiosa</i> Fb7	38
Figura 8: Comparação entre os valores de <i>fold-change</i> (FC) das proteínas de <i>X.fastidiosa</i> 9a5c e <i>X.fastidiosa</i> Fb7	39
Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR	27
Tabela 2. Lista das proteínas totais de <i>X.fastidiosa</i> 9a5c e <i>X.fastidiosa</i> Fb7 identificadas por LC-MS/MS	32
Tabela 3. Comparação entre valores de <i>fold change</i> das proteínas de <i>I. fastidiosa</i> 9a5c e <i>X. fastidiosa</i> Fb7 obtidos por RT-qPCR.....	39

1. Introdução

1.1. Fitobactéria *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria patogênica Gram-negativa, pertencente à classe das Gammaproteobacteria, família Xanthomonadaceae (Hopkins, 1989). Algumas das suas principais características são não possuir flagelo, apresentar forma de bastonete, são estritamente aeróbicas e vivem exclusivamente no xilema das plantas compatíveis e no aparelho bucal dos insetos vetores (Hopkins, 1989; Hopkins e Purcell, 2002). A temperatura para o crescimento ótimo desta bactéria está na faixa entre 26°C e 28°C, sendo que o crescimento em meio de cultivo *in vitro* ocorre de forma lenta (Janse e Obradovic, 2010). É responsável por infectar uma variedade de hospedeiros vegetais de grande relevância agrícola, tais como videiras, citros, amendoeiras e cafeeiros. Dessa forma, pode provocar perdas econômicas em todo o mundo (Janse e Obradovic, 2010; Wells *et al.*, 1987). A dispersão natural deste patógeno é mediada por insetos sugadores de seiva xilemática da Ordem Hemiptera, mais conhecidos como cigarrinhas (Figura 1). Eles podem pertencer às famílias Cicadellidae (*sharpshooter leafhoppers*), Cercopidae (*spittlebugs*), Cicadidae (*cicadas*) ou Aphrophoridae (meadow spittlebug) (Bhowmick *et al.*, 2016; Cornara *et al.*, 2016; Redak *et al.*, 2004).

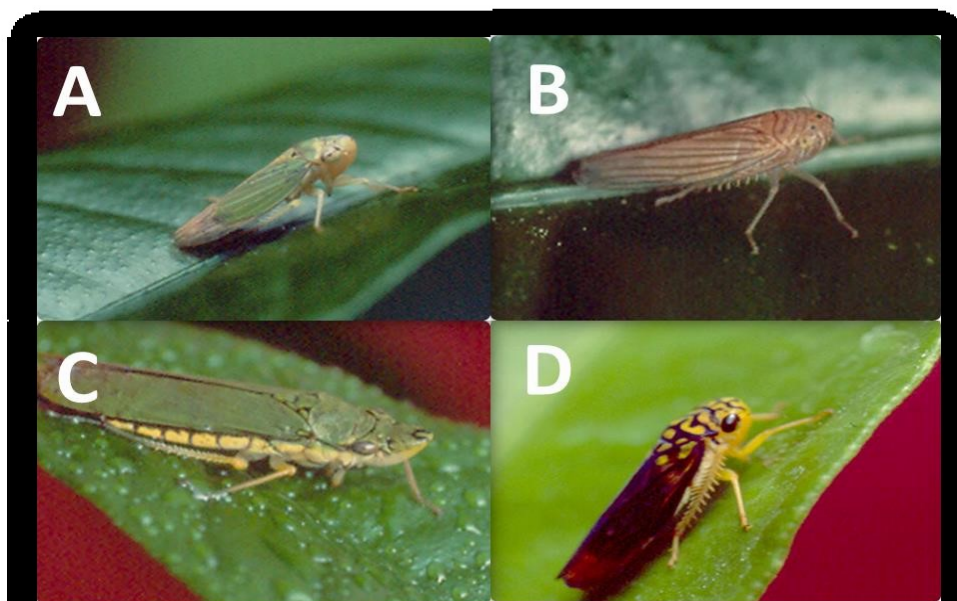


Figura 1: Espécies dos vetores de *Xylella fastidiosa*, sendo *Bucephalogonia xanthophis* mostrado em A, *Plesiommata corniculata* em B, *Acrogonia virescens* em C e *Dilobopterus costalimai* em D. As ilustrações foram obtidas do banco de imagens do Fundecitrus.

Os vetores de *X.fastidiosa* adquirem a bactéria quando se alimentam de plantas contaminadas, e posteriormente a transmite para novos hospedeiros durante o processo de infecção (Redak *et al.*, 2004). A formação de agregados bacterianos no vaso xilemático pode ser visualizada na Figura 2.

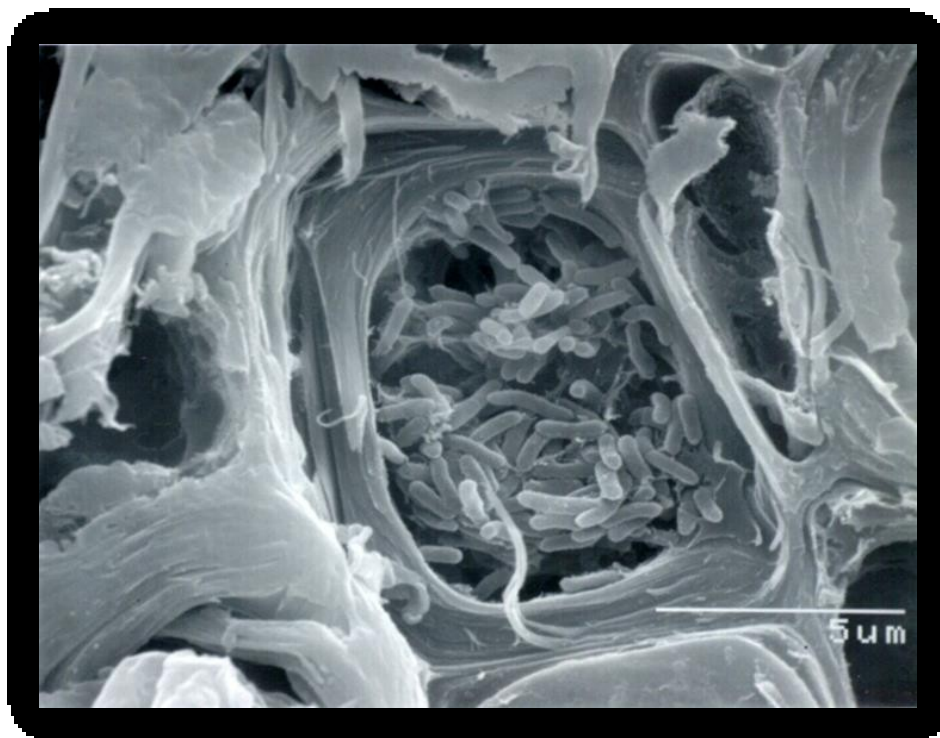


Figura 2: Microscopia eletrônica de *Xylella fastidiosa* no vaso de xilema dos citros. A imagem foi extraída do site http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xylella_cvc-strain/home/mmachado.html.

De forma a avaliar com mais detalhes o mecanismo de transmissão de *X.fastidiosa* pelos insetos, alguns pesquisadores foram em busca de identificar os locais de colonização desta bactéria. Purcell e colaboradores (1979) observaram células bacterianas presentes no cibário, que consiste na região distal do precibário e região anterior do esôfago. Por outro lado, Brlansky e colaboradores (1983) demonstraram que o precibário também havia sido colonizado por *X.fastidiosa*. O estudo de Almeida e Purcell (2006) levantou a hipótese de que a colonização do patógeno no esôfago e no cibário não estava diretamente relacionada com os processos de inoculação. Eles apontam que uma característica própria desta fitobactéria em relação as demais transmitidas por vetores, é a ausência do período de latência durante a transmissão persistente, além de não aglomerar na hemolinfa do inseto transmissor. Apesar

destas descobertas, o processo de colonização de vetores por *X.fastidiosa* envolve vários sistemas reguladores. Sendo assim, Killiny e Almeida (2009) propuseram um modelo conceitual demonstrando que inicialmente, as células bacterianas associam lateralmente a cutícula de insetos e, em seguida, há o estabelecimento das microcolônias. Logo após, ocorrem alterações na morfologia com a finalidade de aumentar a área de superfície exposta e, conseqüentemente, ocasionam a formação de biofilme.

Tendo em vista a biologia e o comportamento da *X.fastidiosa*, há três hipóteses principais que buscam elucidar o seu mecanismo de ação, são elas: (1) a proliferação sistêmica da bactéria e posterior acúmulo nos vasos do xilema, levando a diminuição do fluxo de água e ao estresse hídrico da planta (McElrone, Sherald e Forseth, 2001; McElrone, Sherald e Forseth, 2003); (2) a reação sistêmica do hospedeiro em decorrência da infecção bacteriana, resultando na instabilidade dos níveis dos reguladores de crescimento (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008); e (3) as fitotoxinas produzidas pela fitobactéria estão associadas com o seu processo de virulência e patogênese (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008).

Atualmente, a terceira hipótese vem sendo bastante discutida devido a vários estudos que demonstram a importância das fitotoxinas como fatores essenciais à virulência e à patogênese de doenças causadas por esta bactéria (Gouran *et al.*, 2016; Merfa *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016).

1.2. Principais doenças causadas por *Xylella fastidiosa* e impacto econômico

O desenvolvimento das doenças causadas pela *X.fastidiosa* está intrinsecamente relacionado com a sua capacidade de multiplicação, a partir do ponto de inoculação, e disseminação de modo sistêmico na planta infectada (Purcell e Hopkins, 1996). As principais doenças ocasionadas por esta bactéria são a Doença de Pierce (PD, do inglês *Pierce's Disease*) da videira (*Vitis* spp.) e a Clorose Variegada dos Citros (CVC) em laranjeiras (*Citrus* spp.) nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008). No entanto, esta fitobactéria possui uma ampla gama de hospedeiros, infectando

pelo menos 28 famílias de plantas, como cafeeiros, amendoeiras, ameixeiras e árvores de floresta (Hopkins, 1989).

A *X.fastidiosa* é geneticamente diversificada e pode ser classificada em quatro subespécies: subespécie *pauca*, agente causador da CVC e CLS (*Coffe Leaf Scorch*) na América do Norte; subespécie *sandyi*, responsável pela OLS (*Oleander Leaf Scorch*); subespécie *multiplex*, causadora de várias doenças em plantas agrícolas e comerciais, tais como amendoeira, pessegueiro, entre outras; e subespécie *fastidiosa*, responsável por causar a PD em videira (Nunney *et al.*, 2010).

A Doença de Pierce foi descrita pela primeira vez em 1882, nos Estados Unidos, pelo fitopatologista Newton Pierce. Este fato ocorreu após a infecção de aproximadamente 40 mil hectares de videira durante a década de 80, na região do Condado de Orange (CA) nos Estados Unidos (Nunney *et al.*, 2010). Além desse enorme prejuízo, Stoner (1952) também associou o declínio da indústria de uva ocorrido na década de 1890 na Flórida, nos Estados Unidos, a esta mesma doença. Em 1978, a bactéria *X.fastidiosa* foi relatada como sendo o agente responsável por ocasionar a PD e, conseqüentemente, gerar perdas significativas na produção comercial de uva (Davis *et al.*, 1978). Esta patologia se tornou ainda mais grave após a introdução de uma nova espécie de inseto transmissor, o *glassy-winged sharpshooter*. Este transmissor apresenta eficácia superior na transmissão quando comparado aos vetores nativos (Nunney *et al.*, 2010; Redak *et al.*, 2004).

Os sinais típicos da PD são resultantes da queima de porções da lâmina foliar e da colonização extensiva dos vasos do xilema pelo biofilme bacteriano. Tais aspectos podem ser visualizados nas folhas sintomáticas de videiras infectadas com esta doença. Elas apresentam condutância estomática e taxa fotossintética reduzidas, sendo que esses fatores corroboram com a resposta comum de plantas que tem uma disponibilidade de água restrita (Mcelrone, Sherald e Forseth, 2001; Raju e Wells, 1986).

O Brasil é responsável por metade da produção de suco de laranja no mundo, exportando 98% do que produz para outros países. Este panorama lhe confere participação majoritária no mercado mundial, tornando a indústria cítrica umas das maiores economias do país. O valor econômico gerado por meio das

exportações é cerca de US\$ 1,5 bilhão a US\$ 2,5 bilhões por ano. Na safra de 2015/2016, a produção brasileira foi de aproximadamente 240 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg. Entre 1994 e 2010, pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores, gerando um prejuízo econômico de cerca de 80 milhões de caixas por ano (CitrusBR, 2016).

A CVC é considerada uma das doenças mais importantes que afeta a indústria cítrica brasileira (Azevedo, Araújo e Lacava, 2016). Em 1987, no município de Macaúbal do Estado de São Paulo, foi observada pela primeira vez a incidência da *X.fastidiosa* cepa 9a5c como agente causador desta doença (He *et al.*, 2000). Após a descrição dessa primeira infecção, várias outras foram relatadas em plantações de citros, ocasionando prejuízos em diversos estados do Brasil (Miranda *et al.*, 2007). A grande consequência advinda desta doença ocorreu em 2004, quando atingiu 43,8% das laranjeiras, provocando um prejuízo econômico superior a US\$ 300 Milhões entre 2000-2005 (Fundecitrus, 2016).

As principais medidas de controle da CVC consistem em alterações na produção de plantas de viveiro, na plantação de árvores saudáveis, na poda de ramos sintomáticos, no controle dos vetores com inseticidas e no monitoramento por parte dos produtores. Todos estes fatores são responsáveis pelo declínio da incidência da doença, a qual teve uma queda superior a 50% entre os anos de 2015 e 2016. Um levantamento realizado em 2016 pela Fundecitrus relatou que apenas 3,02% dos pomares de laranja, referente as áreas de 349 municípios de São Paulo e Minas Gerais, são acometidos pela doença (Fundecitrus, 2016).

O sintoma característico da CVC é a formação de pequenas manchas amarelas internervais na parte superior das folhas, que correspondem a lesões de coloração marrom avermelhadas na parte inferior. Os sintomas mais tardios e que reduzem significativamente a produção são o amadurecimento precoce, a diminuição e o endurecimento dos frutos (Figura 3). Estas características podem levar a inviabilização de lotes inteiros de frutas (Janse e Obradovic, 2010). Atualmente, apesar da redução e certo controle da doença, ainda é necessário a realização de pesquisas que auxiliem na compreensão detalhada do mecanismo de ação desta bactéria, cuja disseminação ocorre com facilidade. As pesquisas também contribuem com a incorporação de ações alternativas de

controle, substituindo a utilização de inseticidas que prejudicam o ecossistema local (Fundecitrus, 2016).

Em decorrência da significativa perda econômica provocada pela CVC nas plantações de laranja doce e da importância dessa cultura para a economia nacional, a *X.fastidiosa* cepa 9a5c foi o primeiro fitopatógeno a ter o seu genoma totalmente sequenciado. A sequência desta cepa cítrica foi determinada no Brasil e publicada em 2000 (Simpson *et al.*, 2000). Logo em seguida o genoma da *X.fastidiosa* cepa Temecula 1, agente responsável pela PD, foi sequenciado pelo mesmo grupo de pesquisadores. Tais informações possibilitaram e ainda contribuem fortemente para uma melhor compreensão do metabolismo bacteriano (Koide *et al.*, 2004; Lambais *et al.*, 2000; Van Sluys *et al.*, 2003).

Outra doença que apresenta sintomas muito semelhantes a CVC e tem como agente causador a *X.fastidiosa* cepa Fb7 é a *Pecosita* ou também denominada *falsa mancha grasieta* (de Coll *et al.*, 2000). Ela surgiu em 1984 e foi identificada no município de Montecarlo na Argentina. A partir da análise de folhas de laranjeiras com sintomas desta doença, foi detectado pela técnica de ELISA que a *Pecosita* e a CVC eram a mesma doença (Chang *et al.*, 1993). No primeiro estudo genômico envolvendo a cepa Fb7 (isolada em 2000), foi possível compará-la com diferentes cepas de *X.fastidiosa* e detectar uma maior semelhança desta cepa com a cepa 9a5c (isolada em 1987). As únicas divergências encontradas foram apenas em alguns elementos geneticamente móveis (Silva *et al.*, 2007). Entretanto, posteriormente, uma análise genômica completa e detalhada entre várias cepas patogênicas de *X.fastidiosa* identificou diferenças fenotípicas significantes, principalmente em relação a Fb7. Além disso, alterações na expressão de genes relacionados ao fenótipo também foram detectadas (Santana, 2012).

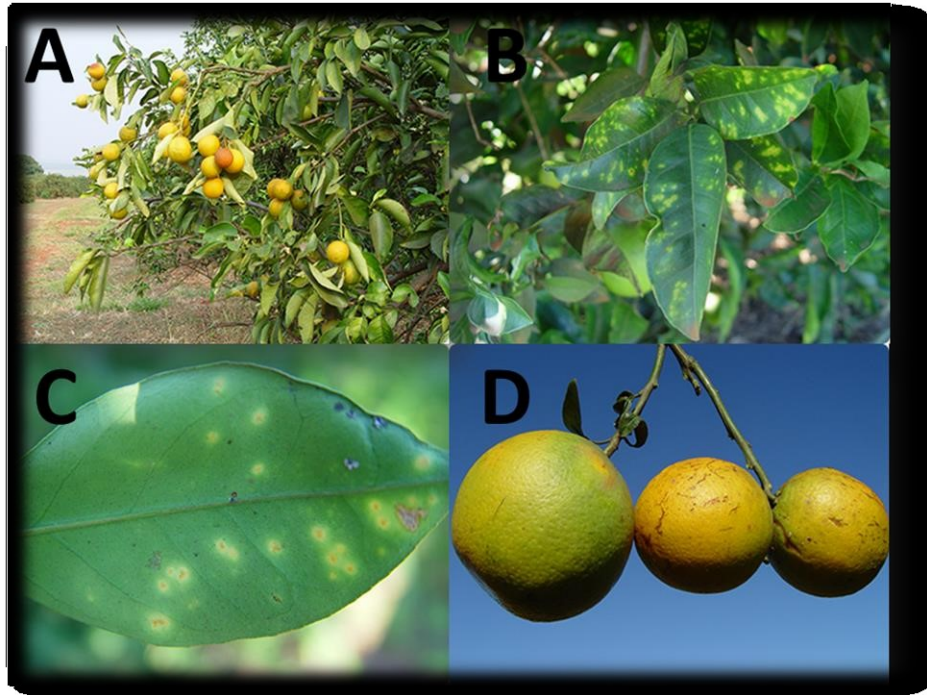


Figura 3: Sintomas da doença CVC. Ilustração evidenciando os sintomas nas plantas e nos frutos (A), destacando a parte superior da folha (B), e destacando a parte inferior da folha (C). Imagem evidenciando a redução no tamanho do fruto (D). Ilustrações obtidas do banco de imagens da Fundecitrus.

1.3. Tipos de sistemas de secreção

A comunicação da célula bacteriana com o ambiente externo é realizada por meio de moléculas que são secretadas por diversos mecanismos. Nas bactérias Gram-negativas, como a *X.fastidiosa*, este processo se torna mais complicado devido a presença da membrana externa que dificulta a internalização e secreção de solutos e polipeptídeos. Com base nisso, as bactérias necessitam desenvolver estratégias alternativas, sendo algumas exclusivas das cepas patogênicas, para possibilitar o direcionamento dessas moléculas ao ambiente extracelular (Costa *et al.*, 2015; Neyen e Lemaitre, 2016).

A secreção de macromoléculas é parte integrante de vários processos do ciclo de vida bacteriano, tais como a formação de organelas e obtenção de nutrientes. Em especial, as proteínas extracelulares de bactérias patogênicas são, em sua grande maioria, fatores determinantes para a virulência bacteriana. A maioria das proteínas secretadas correspondem a enzimas, toxinas ou “efetoras”. As moléculas efetoras são responsáveis por conduzirem os mecanismos das células hospedeira, de forma a facilitar a patogenicidade

bacteriana. Vários sistemas de secreção vêm sendo identificados nas bactérias, e atualmente os mais estudados são os tipos I ao VI. A compreensão do funcionamento é importante em decorrência da interferência nas interações das bactérias com as células hospedeiras, estabelecendo os resultados da infecção (An *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2015; Thanassi e Hultgren, 2000). Além disso, no caso da *X.fastidiosa* a identificação desses sistemas auxilia na descoberta da função, do mecanismo e da influência das moléculas secretadas (Li *et al.*, 2007).

Nos sistemas de secreção do tipo I, II e IV ocorre o transporte direto para o espaço externo ou para o interior da célula do hospedeiro. Já nos sistemas do tipo II e V há um transporte inicial para o espaço periplasmático, por meio da membrana interna (*inner membrane*) e, posteriormente, as moléculas são destinadas ao espaço extracelular pela membrana externa (*outer membrane*).

O sistema de secreção do tipo I é formado por três componentes estruturais principais: os transportadores do tipo ABC, uma proteína de fusão de membrana e um fator de membrana externa. Este sistema transporta vários tipos de substratos, tais como enzimas digestivas, adesinas e proteínas de ligação ao grupo heme. Nos fitopatógenos *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *X. fastidiosa* foram identificados fatores de virulência secretados utilizando este sistema (Delepelaire, 2004; Green e Meccas, 2016).

O sistema de secreção do tipo II é constituído por 15 proteínas diferentes, responsáveis por transportar as proteínas ao espaço periplasmático por meio da membrana interna e posteriormente, conduzi-las ao espaço extracelular via membrana externa. Além disso, está envolvido na degradação da parede celular do hospedeiro, tornando-o fundamental para a virulência de fitopatógenos (Pérez-Donoso *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2017).

No sistema de secreção do tipo III as proteínas efetoras são destinadas ao citosol de células hospedeiras, por meio das membranas bacterianas. Dessa forma, uma variedade de funções das células hospedeiras podem ser modeladas, incluindo respostas imunológicas e de defesa que é desenvolvida pela planta em virtude da presença dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) (Alfano e Collmer, 2004; Cascales, 2017; Tseng, Tyler e Setubal, 2009).

Comparado com os outros tipos, o sistema de secreção do tipo IV é o único que apresenta a capacidade de transportar ácidos nucleicos. Além disso, pode segregar vários substratos, tais como proteínas simples, proteína-proteína e complexos DNA-proteína. Este sistema contribui para a propagação de genes de resistência a antibióticos que são transmitidos por plasmídeos (Christie, 2016; Green e Meccas, 2016). A maioria dos substratos que utilizam o sistema de secreção do tipo V são proteínas de virulência, as quais servem como toxinas e proteínas de ligação a receptores (Green e Meccas, 2016).

Dentre estes sistemas de secreção bacteriano, o mais recentemente descrito é o do tipo VI, sendo que ainda há inúmeras funções e estruturas a serem elucidadas. Este mecanismo molecular é capaz de incorporar toxinas letais diretamente nas células bacterianas alvo, promovendo uma evasão imunitária (Hachani, Wood e Filloux, 2016).

A partir da importância dos sistemas de secreção no mecanismo das bactérias, estudos apontam que os principais sistemas presentes em *X.fastidiosa* e que estão associados com a virulência bacteriana, são o sistema do tipo II (relacionado com a secreção de enzimas hidrolíticas) e o sistema do tipo VI (realizado pelas vesículas de membrana externa) (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008; Matsumoto *et al.*, 2012). Várias moléculas são secretadas por estes diferentes tipos de sistemas e exercem influências distintas na sobrevivência e colonização das bactérias. Um estudo recente demonstrou a importância de uma lipase/esterase secretada pelo sistema do tipo II como fator chave para a virulência de *X.fastidiosa* (Nascimento *et al.*, 2016).

1.4. Lipases/Esterases

As lipases consistem em hidrolases capazes de degradar as ligações de éster carboxílico que estão presentes nas moléculas de triacilgliceróis, gerando como produtos ácidos graxos e glicerol (Gupta, Gupta e Rathi, 2004). Estas hidrolases são produzidas livremente por vários microrganismos ou podem estar associadas com esterases (hidrolases de éster carboxílico) (Kouker e Jaeger, 1987). As moléculas de ácidos graxos que apresentam 10 ou mais átomos de carbono são considerados substratos da lipase. Em contrapartida, as que possuem menor tamanho (inferior a 10), geralmente, são produtos de esterases.

Além disso, as lipases correspondem a enzimas extracelulares, tornando-se necessária a sua migração por meio de membranas bacterianas, a fim de atingir o seu destino final (Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999).

Uma das principais funções da lipase é proporcionar a transferência de lipídeos de um organismo para outro. O seu papel no metabolismo intracelular de lipídeos é bastante conhecido, uma vez que está intrinsecamente relacionado com o funcionamento das membranas biológicas (Villeneuve *et al.*, 2000). O estudo destas moléculas vem aumentando em decorrência da sua maior caracterização bioquímica e das suas propriedades fisiológicas. Elas apresentam várias aplicações biotecnológicas, dentre elas as de catalisadores em química orgânica sintética e a utilização como técnicas de imobilização. Atualmente, estudos que vem sendo extensivamente realizados é pela busca de aplicações industriais (Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999; Villeneu *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas, o avanço progressivo das metodologias de caracterização e identificação, além da sua relação com mecanismos de virulência, tem tornado as lipases/esterases importantes alvo de estudo. Várias pesquisas relatam essa associação, tais como: LipA secretada de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) como importantes fatores de patogenicidade, sendo que nesta última a enzima atua na degradação da parede celular no arroz (Aparna *et al.*, 2009; Tamir-Ariel *et al.*, 2012); FLG1 de *Fusarium graminearum* como fator de virulência necessário para infecção de cereais (Voigt, Schafer e Salomon, 2005) e Lip1 secretada por *Blumeria graminis* sendo fundamental para a adesão e desenvolvimento do fungo (FENG *et al.*, 2009).

A ausência da lipase LesA (PD1703) no sequenciamento do genoma de *X. fastidiosa* cepa EB92-1 (não patogênica) e, posteriormente, a inserção deste gene na cepa ocasionando maiores sintomas de PD em videiras, reforça a sua importância como um dos principais efetores de patogenicidade (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Uma análise detalhada do secretoma de *X. fastidiosa* Temecula 1 demonstrou a presença abundante da proteína LesA (PD1703) em extratos das proteínas solúveis do sobrenadante (PSS) e em vesículas de membrana externa (OMVs). É importante ressaltar que esta proteína é considerada ortóloga a uma enzima degradadora da parede celular (LipA)

encontrada em algumas cepas de *Xanthomonas*. A partir desse estudo, observou que a LesA desencadeava uma reação de hipersensibilidade em videiras, e que bactérias contendo mutações no gene codificador desta proteína apresentavam menor virulência. Além disso, foi possível analisar que o seu acúmulo em regiões com necrose foliar está diretamente relacionado aos sintomas de PD e inversamente com a concentração bacteriana (Nascimento *et al.*, 2016).

1.5. Fatores de virulência e patogenicidade de *X.fastidiosa*

O sequenciamento da cepa 9a5c de *X.fastidiosa*, juntamente com as de demais localidades e hospedeiros, integrado com estudos bioquímicos, genéticos e fitopatológicos propiciam informações extremamente relevantes para a compreensão do mecanismo e dos principais fatores de virulência e patogenicidade destas fitobactérias (Simpson *et al.*, 2000). A partir do genoma sequenciado, a principal característica evidenciada na *X.fastidiosa* foi o fato de ser uma bactéria muito adesiva, tendo em vista a identificação de vários genes codificadores de adesinas fimbriais e afimbriais que estão relacionadas com a formação de biofilme (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008). As adesinas fimbriais são capazes de formarem estruturas filamentosas, incluindo pili de vários tipos, enquanto que as adesinas afimbriais produzem projeções na membrana externa. No entanto, os dois tipos são responsáveis pelo processo de aderência das células (Caserta *et al.*, 2010; Feil, Feil e Lindow, 2007).

Os pili identificados na *X.fastidiosa* estão localizados em apenas um dos polos da célula e são classificados de acordo com os seus tamanhos e funções, podendo ser de dois tipos: longo (1.0 a 5.8 μm) ou curto (0.4 a 1.0 μm) (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008; Meng *et al.*, 2005). O pilus longo, também denominado de *pilus do tipo IV*, consiste em uma estrutura de motilidade alternativa já que a bactéria não possui flagelos. Ele está associado com a motilidade do tipo *twitching*, a qual corresponde a um movimento bacteriano que ocorre a partir dos movimentos de extensão, ligação e retração destas estruturas. Estudos demonstraram que a bactéria migra preferencialmente contra uma corrente de fluido, sugerindo que este tipo de motilidade possibilita a

movimentação da bactéria a longas distâncias no interior da planta. Além disso, o pilus longo também está envolvido na formação de biofilme (Fuente *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2005). Em relação ao pilus curto ou *pilus do tipo I*, os estudos demonstram o seu envolvimento na adesão a substratos e superfícies, como também no processo de formação de biofilme e agregação (Caserta *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2000).

Além das adesinas fimbriais, vêm sendo demonstrada a importância das adesinas afimbriais na maturação do biofilme e na agregação célula-célula. Os principais exemplos são os genes codificadores de adesinas similares à hemaglutininas (Hxf) e de adesinas autotransportadoras triméricas (Xad) (Caserta *et al.*, 2010; Guilhabert e Kirkpatrick, 2005; Voegel *et al.*, 2010). Os tipos de Hxf identificadas em *X. fastidiosa* são a HxfA e a HxfB. A versão mutante destas proteínas (*hxfA* e *hxfB*) demonstrou que as suas principais funções citadas anteriormente sofreram alterações *in vitro* e *in planta*. Tal fato, fortalece a hipótese de que elas têm papel fundamental para garantir a adesão superficial (Guilhabert e Kirkpatrick, 2005). Em relação as Xad e com o auxílio da microscopia, foi possível demonstrar que XadA1 é componente de OMV. Estas partículas esféricas são formadas a partir de um segmento da membrana externa, que está associado com um conteúdo periplásmico. Uma das suas principais características é a capacidade de bloquear o processo de formação de biofilme, limitando estritamente a colonização da bactéria na planta e, conseqüentemente, influenciando no mecanismo de patogênese (Ellis e Kuehn, 2010; Ionescu *et al.*, 2014).

Muitas bactérias produzem polissacarídeos extracelulares (EPS) que são considerados importantes na virulência e na formação de biofilme de várias bactérias patogênicas. No grupo de plantas das *Xanthomonas*, tais como *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, os polissacarídeos extracelulares são identificados como genes *gum*. Este conjunto de 12 genes (*gumB* a *gumM*) é responsável por codificar enzimas que estão associadas com a formação da goma fastidiana (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008; Silva *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2000). Além disso, tais enzimas podem auxiliar no movimento da bactéria em tecidos não colonizados do hospedeiro e mobilizar

polímeros presentes na planta para facilitar a captação de nutrientes do meio (Danhorn e Fuqua, 2007; Torres *et al.*, 2007).

O lipopolissacarídeo (LPS) é considerado também um fator de virulência relevante em *Xylella*, e consiste em um componente presente na maior parte da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Clifford, Rapicavoli e Roper, 2013). Devido a sua localização, é fundamental no processo de adesão da célula bacteriana a superfície ou a célula hospedeira. Além disso, também atua como uma barreira protetora a substâncias antimicrobianas tóxicas. Esta macromolécula é formada por uma porção de oligossacarídeo com lipídeo A, altamente conservada, e outra porção variável de antígeno O. Esta estrutura do antígeno demonstrou-se favorável a algumas etapas, tais como: adesão a superfície, agregação célula-célula e maturação do biofilme. As etapas citadas são indispensáveis para a virulência, uma vez que está associada com o desenvolvimento da doença de Pierce nas videiras, e para o estabelecimento da infecção no xilema do hospedeiro. Tal fato foi comprovado pela deleção do segmento do antígeno O na estrutura, a qual teve como consequência o comprometimento da sua capacidade de colonizar o hospedeiro (Clifford, Rapicavoli e Roper, 2013). Tendo em vista a atuação do LPS na adesão aos vasos do xilema, questionou-se sobre a sua participação no procedimento de adesão da *Xylella* ao sistema digestório dos insetos considerados como vetores. Uma mutação no antígeno O, confirmou uma redução na capacidade da bactéria em aderir a parede do tubo digestório (Rapicavoli *et al.*, 2015). Um estudo recente demonstrou, a partir de análises funcionais, que a inativação do gene UDP-xylose synthase (Uxs) em *X.fastidiosa* afeta a estrutura do LPS em diferentes cepas de cafeeiro. A consequência advinda de tal alteração é capaz de interferir nas interações patógeno-hospedeiro e patógeno-vetor, ressaltando assim a importância deste componente na virulência de *X.fastidiosa* (Alencar *et al.*, 2017).

Há várias enzimas responsáveis pela degradação da parede celular de plantas (*Cell wall degrading enzymes*, CWDE) que são codificadas no genoma de *X.fastidiosa*, dentre elas as endoglucanases, xilanases, poligalacturonases e glicohidrolases (Simpson *et al.*, 2000). Estas enzimas são secretadas para o meio extracelular por meio do sistema de secreção do tipo II (Chatterjee, Almeida

e Lindow, 2008). A partir da presença de uma poligalacturonase e uma endoglucanase no hospedeiro, foi possível observar que as mesmas provocaram alterações na porosidade da membrana, facilitando o deslocamento e a movimentação da bactéria ao longo da planta (Pérez-Donoso *et al.*, 2010; Roper *et al.*, 2007). Além disso, a análise genômica demonstrou que tal fitobactéria pode utilizar os produtos resultantes da degradação da parede celular como uma fonte de carbono (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008).

Além da barreira física estabelecida pela parede celular, a disseminação do patógeno é também contida pelos mecanismos de defesa produzidos pelo hospedeiro. Neste caso, engloba a produção de tiloses e polissacarídeos que tem como finalidade bloquear as células do xilema após a infecção (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008). Outros elementos que também são produzidos e liberados pela planta são as espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido e peróxido de hidrogênio. Estes elementos são considerados tóxicos para as membranas celulares, podendo inibir o crescimento da bactéria e o desenvolvimento da doença (Wojtaszek, 1997). No entanto, alguns genes de defesa que buscam degrada-los foram identificados em *X.fastidiosa*. Entre eles estão genes codificadores da catalase, da superóxido dismutase, da glutathione peroxidase, da glutathione S-transferase, além de genes reguladores como *oxyR* e *Ohr* (Cussiol *et al.*, 2003; Lambais *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2011).

Um outro mecanismo de virulência da *X. fastidiosa* é a síntese de toxinas que pode interferir no processo de morte celular do hospedeiro, assim como na regulação de fatores de transcrição responsáveis por monitorar a sobrevivência celular (Weinrauch e Zychlinsky, 1999). As principais são as RTX (*repeats in toxin*), pertencentes a uma família de proteínas que incluem toxinas citolíticas, metaloproteases e lipases. Elas são classificadas em duas categorias com base na especificidade de sua célula-alvo: as hemolisinas, que afetam vários tipos de células de diferentes espécies e as leucotoxinas, as quais são tóxicas para grupos restritos de células de apenas algumas espécies. No entanto, ambas influenciam nos processos de segmentação, inserção e translocação de proteínas aquosas localizadas nas membranas lipídicas (Lally *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2000). De acordo com Merfa e colaboradores (2016), a superexpressão da toxina MqsR em *X.fastidiosa* foi responsável por regular

positivamente a formação de biofilmes e negativamente o movimento celular, indicando uma redução na sua patogenicidade. Além disso, esta fitobactéria apresenta certos genes, proteínas de imunidade e anti-toxinas que tem como principal função transportar as toxinas para o meio extracelular (Santiago *et al.*, 2016).

As proteases são enzimas consideradas indispensáveis para a colonização de *X.fastidiosa*. A partir da análise do banco de dados do proteoma e da anotação dos genomas desta bactéria, foi possível observar que 9% das proteínas totais extraídas são proteases. Dentre elas foram identificadas sete serina-proteases, quatro metalo-proteases (algumas dependentes de zinco) e uma cisteína-protease (Fedatto *et al.*, 2006; Simpson *et al.*, 2000; Smolka *et al.*, 2003). De acordo com Mendes e colaboradores (2016), 71 proteínas foram diferencialmente expressas quando comparado as cepas 9a5c e J1a12 de *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Dentre elas, várias proteases são identificadas e estão relacionadas ao crescimento e manutenção do biofilme no interior dos vasos xilemáticos. Além deste trabalho, há outro que também identificou a presença de proteases sendo secretadas pela mesma fitobactéria (Smolka *et al.*, 2003). As proteases podem desempenhar dois papéis principais, são eles: auxiliar as CWDEs na degradação da parede celular do hospedeiro, proporcionando um aumento da propagação bacteriana ou podem ser utilizadas para fins nutricionais. Sendo assim, a influência destas enzimas na patogenicidade bacteriana está diretamente relacionada com o sistema patógeno-hospedeiro e, conseqüentemente, influencia na virulência *in planta* (Dow *et al.*, 1990; Fedatto *et al.*, 2006; Fry, Huang e Milholland, 1994; Gouran *et al.*, 2016).

As OMVs consistem em partículas esferoidais que são secretadas pela maioria das bactérias Gram-negativas, inclusive pela *X.fastidiosa*. Elas integram o sistema de secreção do tipo II e são responsáveis por transportar fatores de virulência a longas distâncias. Além disso, a presença de proteínas confere a estas estruturas aderência a superfícies de contato com a bactéria. Dessa forma, essas vesículas contribuem para a disseminação bacteriana sistêmica, no interior do hospedeiro, como foi relatado em alguns estudos (Ionescu *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2016; Voegel *et al.*, 2010).

Outra molécula bastante relevante no mecanismo de virulência da *X.fastidiosa* e que confere a bactéria a capacidade de coordenar a expressão gênica por meio da liberação de pequenas moléculas de sinal é a DSF (*Diffusible signaling factor*). Esta molécula é sintetizada e secretada pelos genes *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*), os quais apesar de serem comuns a várias espécies de bactérias fitopatogênicas, regulam diferentes fenótipos (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008; Ryan e Dow, 2011; Seshasayee, Fraser e Luscombe, 2010). Os genes *rpfF* e *rpfB* são codificadores de uma enoil CoA-hidratase e de uma ligase de acil-CoA de cadeia longa, respectivamente. Entretanto, os dois influenciam na síntese e no processamento de diferentes moléculas de DSF. Além desses genes, há também o *rpfC* que é considerado um sensor de DSF formado por dois componentes híbridos. A sua função é perceber os diferentes níveis de concentração de DSF e gerar mecanismos de respostas que levam a alteração de vários genes nas células, incluindo aqueles associados a virulência. Outro gene relevante é o *rpfG* que consiste em um regulador de resposta, cuja atividade influencia positivamente a expressão de genes relacionados a virulência (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008). A variação dos níveis de DSF faz com que a população bacteriana de *Xylella* apresente duas fases distintas no interior dos vasos do xilema. A primeira é denominada como fase de colonização do hospedeiro vegetal, em que há uma colonização vascular extensiva, um pequeno número de células dentro dos vasos e ausência de sintomas das doenças. Em seguida, ocorre a chamada fase de aquisição pelo inseto, a qual é caracterizada pelos seguintes aspectos: aumento significativo de células nos vasos, surgimento dos sintomas das doenças e multiplicação celular retardada nos vasos devido a oclusão dos mesmos. Logo, a alternância entre essas duas fases fenotípicas é de fundamental importância para a sobrevivência da célula nos diferentes nichos e condições nos quais se encontra (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008).

1.6. Importância do biofilme bacteriano

O biofilme consiste em agregados bacterianos, em que as células estão envoltas por matrizes poliméricas produzidas por si mesmas (Marques *et al.*,

2002). O desenvolvimento do biofilme está relacionado com a presença de várias proteínas e estruturas de superfície celular bacteriana, tais como adesinas, proteínas de membrana externa e exopolímeros (Castiblanco e Sundin, 2016). Além disso, a sua formação consiste em um mecanismo de adaptação das bactérias contra condições ambientais adversas e é considerado um fator primordial no mecanismo de doenças dos patógenos bacterianos de plantas (Chatterjee, Almeida e Lindow, 2008; Gerlach e Hensel, 2007).

Tendo em vista que a formação do biofilme da bactéria *X.fastidiosa* está relacionada com a sua patogenicidade, análises para detectar e comparar a expressão de genes em células do biofilme e planctônicas são fundamentais para a melhor compreensão deste mecanismo (Marques *et al.*, 2002). Um estudo realizado com a *X.fastidiosa* cepa 9a5c demonstrou a expressão diferencial de genes no biofilme, quando comparado as células planctônicas. Estes genes estão envolvidos em alguns processos importantes, tais como funções metabólicas, adesão à superfície e colonização (Souza *et al.*, 2004).

O processo de adesão da bactéria a superfície envolve interações específicas e não específicas, as quais são fundamentais na capacidade da célula em fixar ou resistir ao desprendimento da superfície. A formação do biofilme apresenta as seguintes etapas principais: ligação reversível do microrganismo a superfície; associação irreversível estimulando a presença de componentes (tais como pili, exopolímeros e proteínas de adesão) que contribuem para uma forte aderência mediante interações moleculares específicas; proliferação e adesão célula-célula; maturação do biofilme com a presença de uma matriz polimérica, sendo um constituinte estabilizador. Os principais fatores que interferem nestas etapas são a hidrofobicidade/hidrofilicidade, além da estrutura e rugosidade do substrato (Katsikogianni e Missirlis, 2004; Shall, Stout e Mitchell, 1971). De acordo com Lorite e colaboradores (2011), a natureza química da superfície é um fator primordial para a adesão da *X.fastidiosa*, uma vez que demonstrou a importância da presença de grupos fosfato na superfície do substrato.

Outro estudo também mostrou a importância de adesinas, mais especificamente as hemaglutininas, na formação de colônias, maturação do

biofilme, e conseqüentemente, na virulência da fitobactéria *X.fastidiosa* (Guilhabert e Kirkpatrick, 2005).

A formação do biofilme é influenciada por vários estímulos que atuam por meio de sistemas regulatórios conservados. A sinalização interna mediada por *Quorum sensing*, tem como finalidade a modulação e coordenação da interação planta-hospedeiro (Bodman, Bauer e Coplin, 2003; Danhorn e Fuqua, 2007). Outros fatores a serem considerados são o monitoramento da agregação e adesão a superfícies de acordo com a disponibilidade de nutrientes chaves, e a variação fenotípica em busca de uma melhor adaptação. A liberação de exsudatos das plantas e a presença de estruturas bacterianas associadas a superfícies, contribuem para a motilidade e adesão da bactéria, respectivamente (Danhorn e Fuqua, 2007).

Em relação a formação do biofilme de *X.fastidiosa*, um estudo com mutantes da cepa Temecula para o gene *rpfF* (codificador de uma molécula sinalizadora), fez com que Newman e colaboradores (2004) observassem que esta molécula é fundamental para a formação do biofilme no vetor. A pesquisa demonstrou que a cepa modificada apresentou maior virulência do que a cepa selvagem quando foram inoculadas mecanicamente nas plantas. Além disso, curiosamente, mesmo esta cepa mutada foi capaz de formar biofilme nas plantas. Este fato sugere que a arquitetura do biofilme é determinada diretamente pela expressão gênica de *X.fastidiosa*.

Diferenças no aspecto do biofilme foram observadas entre as cepas 9a5c e Fb7 de *X.fastidiosa* em meio de cultura PW. A Fb7 apresentou crescimento predominantemente planctônico e ausência do biofilme aderido à superfície. Por outro lado, a cepa 9a5c é capaz de formar agregados mais compactos, e tem a presença do biofilme aderido à superfície do frasco de cultivo (Santana, 2012). Esta diferença no fenótipo de Fb7 em relação a outras cepas patogênicas, torna-se necessário a busca pela identificação de fatores que estejam relacionados a estas características fenotípicas, e conseqüentemente, com os processos de virulência e patogenicidade da bactéria *X.fastidiosa*.

1.7. Análise proteômica

O termo proteoma, derivado da expressão “produto proteico do genoma” consiste na caracterização molecular de um organismo a nível de proteínas expressas. Além de realizar a identidade proteica do alvo em questão, esta análise também é capaz de verificar modificações pós-traducionais, interações intermoleculares e localização celular. Para isso, a proteômica engloba várias tecnologias, sejam elas analíticas ou bioinformáticas, para analisar milhares de proteínas simultaneamente (Traini *et al.*, 1998).

O campo da proteômica vem crescendo nas áreas de pesquisa devido ao maior acesso de informações a respeito das sequências de genes e proteínas. Outro fator que também vem contribuindo é o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas e eficazes, que identificam de forma mais precisa as proteínas em amostras complexas (Martens *et al.*, 2005). A técnica mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) (Webb-Robertson *et al.*, 2015).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem como finalidade realizar uma análise quantitativa dos componentes presentes na amostra, principalmente daqueles em baixa concentração. Isso é possível devido a presença de detectores no equipamento, tais como índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz e fluorescência. Para a confirmação da identidade química do composto e validação da análise qualitativa, acopla-se esta técnica com a espectrometria de massa (LC-MS/MS). A espectrometria de massa é responsável por mensurar átomos e moléculas a fim de estabelecer suas massas moleculares. Ou seja, a associação destas duas técnicas gera uma ferramenta analítica versátil tanto para análises quantitativas, quanto para análises qualitativas (Lanças, 2009). Esta técnica ainda é capaz de analisar misturas de peptídeos complexas (Patterson e Aebersold, 2003).

A análise proteômica contribui de forma significativa para o avanço das pesquisas em diversos segmentos. Na área vegetal, este estudo é bastante relevante e vem colaborando com a descoberta de novos fatores que estão intrinsicamente relacionados com a biologia do patógeno, e seu mecanismo de virulência e patogenicidade. O conhecimento detalhado das estruturas e funções de determinados componentes, permitem a execução de medidas de controle e eliminação de bactérias fitopatogênicas que causam diversas doenças e,

consequentemente, ocasionam impacto ambiental e econômico. Alguns exemplos de pesquisas advindas da análise proteômica são: comportamento do arroz sob condições de estresse e após a recuperação da seca (Salekdeh *et al.*, 2002); mecanismos de estresse salino (Zhang *et al.*, 2012) e componentes relacionados ao estresse abiótico (Kosovaa *et al.*, 2011; Qureshi, Qadir e Zolla, 2007). Em relação a *X. fastidiosa*, há alguns estudos analisando o proteoma do biofilme (Silva *et al.*, 2011); a identificação de proteínas celulares e extracelulares relevantes (Smolka *et al.*, 2003); o estímulo de ferro (Zaini *et al.*, 2008); a análise do caule da videira após infecção (Yang *et al.*, 2011); a determinação de proteínas extracelulares *in vitro* (Mendes *et al.*, 2016) e uma proteína lipase/esterase como fator chave para a virulência em videiras (Nascimento *et al.*, 2016).

Todos os fatores de virulência citados anteriormente, enquadram na hipótese de que essas proteínas secretadas pelo patógeno influenciam no seu mecanismo de virulência e patogenicidade. Logo, é imprescindível a identificação dessas moléculas por meio da análise proteômica, assim como a realização de estudos mais profundos que busquem a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos. Com a descoberta de novos processos, é possível desenvolver medidas de controle da doença mais eficazes e menos prejudiciais ao meio ambiente.

Dessa forma, o presente estudo busca obter o perfil proteômico de duas cepas de *X. fastidiosa*, a fim de reduzir os impactos causados pela CVC. Esta é uma técnica indispensável para a identificação de moléculas presentes em grande quantidade, as quais são primordiais para o processo de virulência e patogenicidade desta fitobactéria. Tal conhecimento permite elucidar melhor as interações planta-patógeno, auxiliando no desenvolvimento de estratégias para combater e evitar os prejuízos causados por este patógeno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi prover uma análise quantitativa e detalhada das proteínas extracelulares das cepas 9a5c e Fb7 de *X.fastidiosa*, as quais são agentes causais da CVC. A identificação e a comparação dos níveis de expressão de diferentes proteínas, apresentam um papel fundamental para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e virulência do patógeno.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o cultivo *in vitro* das cepas 9a5c e Fb7 de *X.fastidiosa* em meio PW, e posterior segregação das proteínas totais e secretadas para análises comparativas;
- Avaliar a atividade lipásica e esterásica das proteínas totais e secretadas das duas cepas;
- Caracterizar por espectrometria de massa (LC-MS/MS) as proteínas totais e secretadas de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7;
- Validar e comparar por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) a expressão de diferentes proteínas presentes nas amostras totais e secretadas das cepas 9a5c e Fb7.

3. Material e Métodos

3.1. Manutenção e condições de crescimento das cepas de *X.fastidiosa*

A cepa de *X.fastidiosa* 9a5c utilizada no trabalho tem origem no município de Macaúbal no estado de São Paulo, e o local de origem da cepa Fb7 é a cidade de Bella Vista na província de Corrientes na Argentina. Os estoques em glicerol 50% das cepas 9a5c e Fb7 foram recuperados em placas de Petri, contendo meio PW (*Periwinkle Wilt*) sólido mantidas a 28°C por sete dias. O meio PW é constituído de água destilada deionizada, 0,4% de peptona de soja, 0,1% de

caseína, 6 mM de fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4), 7 mM de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), 1% de estoque de cloreto de hemin (0,1% de hemina bovina em 0,05 N NaOH), 0,4 mM de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1% de estoque de fenol vermelho (0,2% de *phenol red* em água destilada), 5% de estoque de glutamina (8,0% de glutamina em água destilada) e 3% de estoque de albumina de soro bovina (20% de BSA em água destilada). Para a preparação do meio sólido adicionou-se 1,5% de ágar. Todos os reagentes do meio, exceto o BSA e a glutamina, foram adicionados e homogeneizados. Em seguida, o material foi esterilizado em autoclave por 20 minutos. A solução de glutamina foi aquecida vagarosamente para a sua total dissolução, e tanto os estoques de glutamina quanto de BSA foram esterilizados utilizando filtros com membranas de 0,2 μm . Na capela de fluxo laminar, estas duas soluções filtradas foram adicionadas ao meio basal autoclavado após resfriamento (Davis, French e Schaad, 1981).

Para a manutenção das culturas, as mesmas foram submetidas a repiques semanais em placas de meio PW-ágar com incubação a 28°C. No momento em que o número de passagens era superior a 20, um novo cultivo era iniciado a partir de estoques congelados a -80°C.

Após 7 a 10 dias de cultivo das bactérias em meio sólido PW-ágar, estas foram transferidas para o erlenmeyer contendo 50 mL de meio PW e incubadas a 28°C com 200 rpm de agitação por até 10 dias. O cultivo em meio líquido, foi iniciado com DO_{600nm} 0,05.

3.2. Obtenção das proteínas totais e secretadas de *X.fastidiosa*

Após os 7 dias de crescimento, em triplicata biológica, as culturas de *X.fastidiosa* 9a5c e Fb7 em 50 mL de meio PW foram centrifugadas a 8.000 x rpm por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes, contendo as proteínas secretadas, foram concentrados 50x usando o AMICON ULTRA-15 com filtros 3 kDa. Para a obtenção das amostras concentradas, as mesmas foram submetidas a centrifugações a 5.000 x g até atingir um volume final de 1 mL. Além dos sobrenadantes, os pellets formados foram submetidos a extração de proteínas utilizando o reagente BugBuster® de acordo com as instruções do fabricante.

Cada pellet foi lisado com 1,5 mL da seguinte solução: 10 mL de BugBuster®, 100 µl de PMSF 5 µM, 100 µl de Benzamidina 5 µM e 200 µl de EDTA 0,5 mM. Após a adição da solução, vortexou-se por 10 minutos a temperatura ambiente e por mais 10 minutos no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante obtido após a centrifugação, constitui a fração das proteínas totais, e foi armazenado em um tubo a -20 °C para posterior utilização na análise proteômica e no teste de atividade esterásica.

3.3. Precipitação das proteínas totais e secretadas de *X.fastidiosa*

As amostras de sobrenadante concentradas e as lisadas foram precipitadas a fim de reduzir o número de compostos não proteicos das amostras, para posterior utilização na quantificação e análise por espectrometria de massa. O protocolo de precipitação foi feito com Ácido Tricloroacético (TCA)/Acetona, em que após a adição da amostra acrescentou a acetona gelada, seguido pelo TCA (100%, m/v em água destilada) na proporção de 1:8:1 (amostra/acetona/TCA).

A precipitação das amostras foi realizada a -20°C ao longo de uma hora, seguido pela centrifugação a 5.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos em tampão de solubilização (Tiouréia 2 M, Tris 40 mM, CHAPS 2%, DTT 18 mM) para posterior quantificação.

3.4. Quantificação das proteínas secretadas no sobrenadante após precipitação e das proteínas totais

As amostras concentradas e precipitadas foram quantificadas, em triplicata técnica e biológica, utilizando o método colorimétrico de Bradford com leitura da absorbância feita a 595 nm. Esta técnica consiste em uma alteração na absorbância em decorrência da ligação do azul de Coomassie a alguns aminoácidos (Bradford, 1976). As amostras de sobrenadante precipitadas foram diluídas 10x para realizar a quantificação com os volumes diluídos de 7 µl e 10 µl, completados com 233 µl e 230 µl de água Mili-Q, respectivamente. Logo após,

adicionou-se 60 µl do reagente de Bradford (5x). Como branco foi utilizado os volumes de 7 µl e 10 µl do tampão de solubilização (Tiouréia 2 M, Tris 40 mM, CHAPS 2%, DTT 18 mM) diluído 10x. Para a quantificação das amostras de proteínas totais utilizou-se a mesma metodologia. Neste caso, foi adicionado 2 µl de amostra a 238 µl de água Milli-Q e 60 µl do reagente de Bradford; 5 µl de amostra foi adicionado a 235 µl de água Milli-Q e 60 µl do reagente de Bradford; 10 µl de amostra foi adicionado a 230 µl de água Milli-Q e 60 µl do reagente de Bradford. Foi utilizado como branco a solução de BugBuster nesses mesmos volumes.

3.5. Ensaio de atividade lipásica das amostras de proteínas secretadas no sobrenadante

As amostras concentradas das proteínas secretadas, referentes as cepas de *X. fastidiosa* 9a5c e Fb7 com 6 e 10 dias de crescimento, foram submetidas ao ensaio de atividade lipásica. Para isso utilizou placas de Petri contendo 2% de agarose, 1% de tributirina, 100 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 25 mM de CaCl₂. Após a preparação do substrato, foi feito 5 perfurações circulares de 1 cm de diâmetro no mesmo. Posteriormente, adicionou-se 100 µl das amostras em cada orifício. O meio de cultura PW concentrado foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada a 28°C e observada após 5 dias para verificar a formação de um halo de hidrólise, o qual é resultante da degradação da tributirina.

3.6. Ensaio de atividade esterásica das amostras de proteínas secretadas e extratos totais

A fim de avaliar a atividade esterásica das proteínas secretadas e dos extratos totais, mensurou-se a quantidade de 4-metilumbeliferone (4-MU) gerada a partir do substrato 4-metilumbeliferil butirato (4-MUB). Para essa análise foi usado o kit *4-Methylumbelliferyl acetate substrate* (Sigma), sendo que o ensaio foi realizado em triplicata técnica com 80 µl da solução 4-MUB 5 mM (1,25 mg 4-MUB; 125 µl de DMSO; 1,25 µl de triton X-100) em tampão citrato

(0,1 M ácido cítrico e 0,05 M NaH₂PO₄.12H₂O em pH 5,0). Para cada amostra, a quantidade de proteínas utilizada foi de 8,4 µg de proteínas em um volume final de 20 µl completados com tampão PBS 1x pH 7,4. O branco das proteínas secretadas foi o meio de cultura PW concentrado e o das proteínas totais foi o reagente BugBuster. Após o preparo das amostras na placa, a leitura foi realizada no fluorímetro Multimode (EnSpire®). A atividade foi quantificada por meio da fluorescência, a 365 nm de excitação e 455 nm de emissão, emitida após 30 minutos de reação.

3.7. Análise proteômica de lisados celulares

Após a precipitação das amostras lisadas, as mesmas foram submetidas à procedimentos de preparo para a análise no espectrômetro de massas em triplicata biológica. Amostras de extrato celular, após precipitação por TCA/acetona, foram reconstituídas em PBS e quantificadas utilizando fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) nas condições padrão. A quantidade de 300 µg foram precipitados com 4x volumes do reagente de precipitação (CalBiochem) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras precipitadas foram reconstituídas em 100 µL de uréia 6 M acrescido de DTT 5 Mm e incubadas a 37°C por 30 min. Adicionou-se iodoacetoamida (IAA) 15 Mm e incubou em temperatura ambiente por 30 min. O IAA foi então inativado com DTT 30 mM e incubado por 10 min. A enzima Lys-C/tripsina foi adicionada para uma proporção 1:25 enzima:proteína e incubada a 37°C por 4 horas. Adicionou-se bicarbonato de amônio 50 Mm e a digestão prosseguiu *overnight* a 37°C. Os peptídeos digeridos foram então desalinizados usando ponteiras Aspire RP30 Desalting Tips (Thermo-Fisher Scientific) e ressuspensas em tampão de carregamento (Thermo-Fisher Scientific).

Os peptídeos digeridos foram analisados em um espectrômetro de massas QExactive (Thermo-Fisher Scientific) acoplado com uma fonte de ionização por nanospray Easy-LC (Thermo-Fisher Scientific). Os peptídeos foram carregados em uma coluna (100 micron, C18 100Å 5U) e desalinizados em linha antes de serem separados em coluna de fase reversa (75 micron, C18 200Å 3U). A duração do gradiente para separação dos peptídeos foi de 60 minutos usando 0,1% de ácido fórmico e 100% de acetonitrila como solventes A

e B, respectivamente. Os dados foram adquiridos usando método MS/MS, com uma amplitude de varredura de 300-1600 Da, resolução de 70.000, largura de isolamento 2 m/z e energia de colisão normalizada para 27.

A fonte de nanospray foi operada usando voltagem de 2,2 KV e temperatura capilar de transferência de calor de 250°C. Os dados brutos foram analisados com o programa X!Tandem e visualizados usando o programa Scaffold (versão 3.01). Os peptídeos identificados foram buscados no banco UniProt e cRAP, que contém contaminantes comuns em amostras laboratoriais.

3.8. Extração de RNA total

Os cultivos das cepas 9a5c e Fb7 de *X.fastidiosa* foram iniciados, a partir de inóculos advindos do cultivo em meio PW-ágar ao longo de 10 dias na DO600nm 0,05. Foram obtidas três réplicas biológicas do cultivo destas cepas. Estas foram submetidas a crescimento a 28°C, com agitação de 200 rpm por 7 dias. Em sequência, os cultivos foram centrifugados (8000 x rpm, 20 minutos) e os *pellets* obtidos foram utilizados imediatamente para a extração do RNA total.

Para a extração de RNA total foi utilizado o kit *PureLink RNA Mini Kit (Ambion)*. Nesse caso, seguiu-se as instruções do protocolo específico para células bacterianas como sugere o fabricante. Após várias lavagens com tampões, foi feita a eluição final com água livre de RNase. A quantificação destas amostras foi realizada com volume de 1 µl, em espectrofotômetro *NanoDrop TM 1000 (Thermo Scientific)*. A eficácia da extração foi verificada pelos valores das razões 260/280 e 260/230. A fim de obter melhor razão 260/230, e consequente redução do excesso de reagentes do kit, submeteu-se as amostras de RNA ao protocolo de precipitação. Para o volume de 40 µl de RNA, adicionou-se acetato de amônio 7,5M e etanol 100% gelado nas proporções de 0,25: 3, respectivamente. Após a adição das soluções, as amostras foram armazenadas no freezer -20°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13 000 x rpm, 30 min, 4°C) e o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado. Após uma nova centrifugação (13 000 x rpm, 10 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado após a evaporação do etanol. A ressuspensão das amostras foi realizada com água

livre de RNase. As amostras foram quantificadas novamente pelo *NanoDrop* e armazenadas no ultrafreezer a -80°C .

3.9. PCR Quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Um conjunto de genes codificadores das proteínas anteriormente identificadas na análise proteômica que foram consideradas relevantes, foi selecionado para ser validado por RT-qPCR.

Os iniciadores foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest do site da IDT. O algoritmo blastn foi aplicado para alinhar os pares de iniciadores contra o banco de dados de sequências de nucleotídeos do NCBI, a fim de excluir as regiões não alinhadas com a sequência das duas cepas utilizadas de *X.fastidiosa*. No total, foram sintetizados 16 pares de iniciadores, como pode ser visualizado na Tabela 1.

As sínteses dos cDNAs referentes ao RNA total das culturas de *X.fastidiosa* cepa 9a5c e *X.fastidiosa* cepa Fb7 (500 ng) foram realizadas utilizando o kit de Transcriptase reversa M-MLV, de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

As reações de transcrição reversa foram realizadas a 37°C durante 60 minutos no termociclador Mycycler (Thermo Fisher Scientific). No presente estudo, a PCR em tempo real foi feita utilizando placas de 96 poços e SYBR Green em 7300 (Applied Biosystems) para avaliar os níveis de expressão dos 16 genes selecionados. A condição da reação universal do equipamento foi a utilizada nesta análise. O gene endógeno 16S de *X. fastidiosa* foi usado como gene de referência. O nível de fluorescência limiar foi ajustado manualmente para cada placa usando o software SDS (Applied Biosystems). Após a exportação dos dados do Limite do Ciclo (Ct), as análises de dados foram realizadas no Software DataAssist™ v3.01 (Applied Biosystems).

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na RT-qPCR.

Primer	Sequência dos Primers (5'-3')
XF0999 F	CCTCACGGTGGCTATCAAAT
XF0999 R	GGCGAAGAGTTTGTGAGTTTC
XF1742 F	CCTGCAGACGATCATCCC
XF1742 R	CCTTGAAGTCGGTGAAGTAGAA

XF2677	F	GAAGTGGAGCGTTGGAGATT
XF2677	R	TCCCGCATCCTCTCTCTTTA
XF0343	F	GTGGTGACCATGACAAGGATAG
XF0343	R	GGATCACGACACCAACTGAA
XF2586	F	AGCGTCTTGATCGGGATTG
XF2586	R	GAAGGTCTGTAATGGGTGATAGG
XF0028	F	ATCAGGGTAAACGATGCGATAC
XF0028	R	CCATCCGGGCTGAATACAAT
XF0872	F	GCGTCAGTCTTTGCGGTATAA
XF0872	R	CAACGCTTAGTGTCACCTACTAC
XF0156	F	CTCCCAGTTAGAATCCCATTACC
XF0156	R	TCTTCTCCGACGTTGTTTCC
XF1516	F	GGGAGTAACAGCCTCGTATTG
XF1516	R	CACCACTACCCACAGAAACTAC
XF0290	F	AGCAGATCAACCCACACATC
XF0290	R	GTTGCCGTTGCGTTCTAATG
XF0287	F	ACCGTCTGCATCTAACACTTC
XF0287	R	GACACTAACACCGCATTACCT
XF1114	F	CAACCACAGATCCGCAATAAAG
XF1114	R	AACACCTGACGGACATAACC
XF1115	F	GCCTCGGACAACAAGGTATT
XF1115	R	CGGCAGGCATAGTCCAATAA
XF2370	F	CAAGTGATTGCTCAGGCTAAAG
XF2370	R	CTCGATACGTGCCAAATCAAAG
XF0539	F	CCATTTCCCATACAGAGACTCG
XF0539	R	CCGAAGTAGATGGCAGGTTTAT
XF0083	F	AGTGCGGCAACCAATGTA
XF0083	R	GCTACCCATTGTGAGTTGTCT

4. Resultados

4.1. Ensaio de atividade lipásica das amostras de proteínas secretadas

Tendo em vista a importância das proteínas lipases/esterases no processo de virulência e patogenicidade de bactérias, realizou-se o ensaio para avaliar a existência de atividade lipásica nas proteínas secretadas de *X. fastidiosa* 9a5c e *X. fastidiosa* Fb7. Para permitir a visualização foi utilizado como substrato a tributirina (1%) incorporada ao gel de agarose. Os resultados

demonstraram a formação do halo de degradação nas duas cepas de *X.fastidiosa*. No entanto, é possível visualizar na Figura 4 que a cepa Fb7 apresentou um maior halo quando comparado ao da cepa 9a5c.

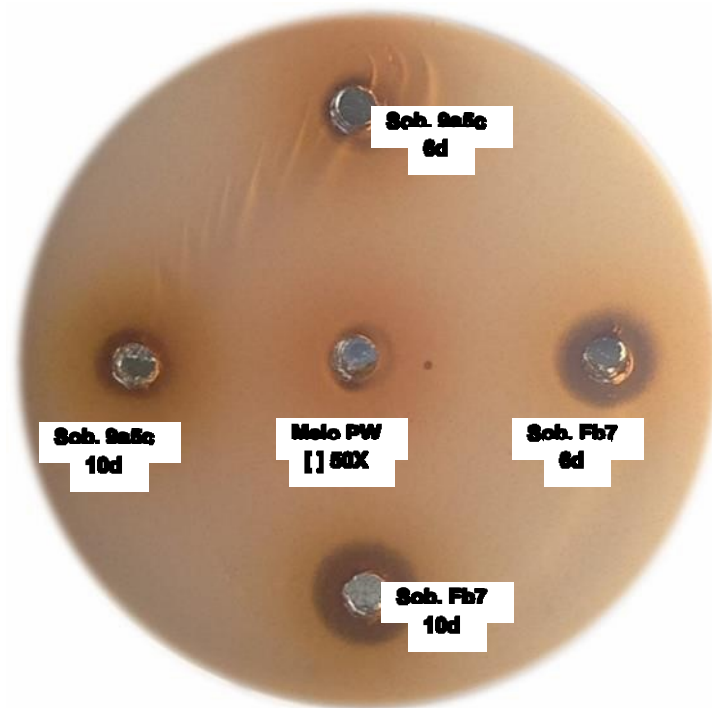


Figura 4: Ensaio de atividade lipásica. A presença do halo hidrolítico indica a atividade lipásica das amostras de proteínas secretadas de *X.fastidiosa* 9a5c e Fb7 em triacilglicerídeos de cadeia curta. O meio de cultura PW foi usado como controle negativo.

4.2. Ensaio de atividade esterásica das amostras de proteínas totais e secretadas

A presença de atividade esterásica foi avaliada nas proteínas totais e secretadas de *X.fastidiosa* cepa 9a5c e *X.fastidiosa* cepa Fb7. A quantificação foi realizada por meio da mensuração da quantidade de 4-metilumbeliferone (4-MU). A partir dos gráficos obtidos das proteínas totais e secretadas, é possível visualizar uma maior atividade nas proteínas totais em relação às secretadas. Além disso, foi possível observar também uma capacidade maior das proteínas

totais e secretadas da cepa Fb7 em degradar ésteres de cadeia curta quando comparada a cepa 9a5c (Figuras 5 e 6).

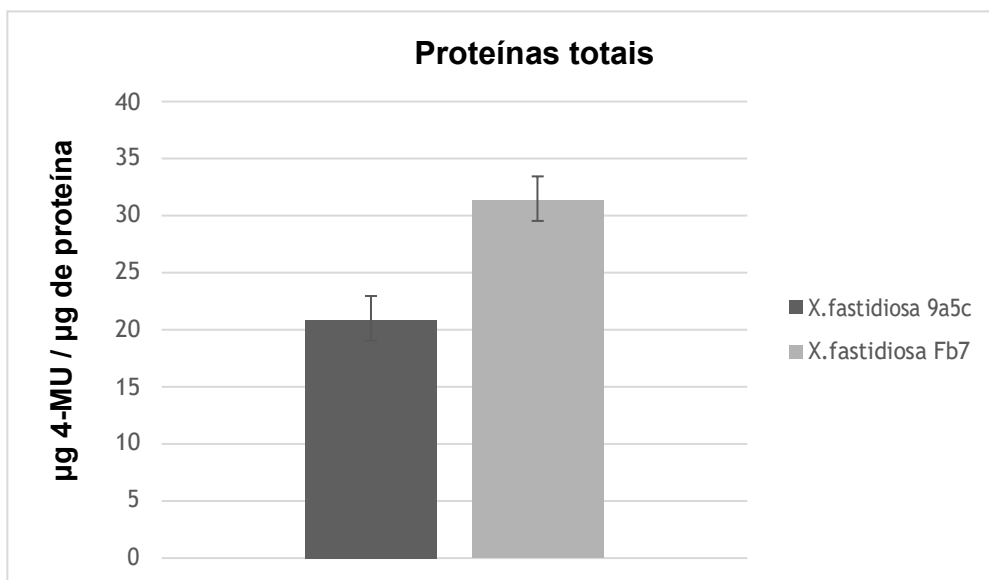


Figura 5: Atividade esterásica das proteínas totais de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7. A fluorescência teve emissão a 365 nm de excitação e 455 nm de emissão. A curva padrão utilizada foi $Y = (X - 5552,9) / 402,05$ sendo, X a fluorescência obtida e Y µg 4-MU/ µg de proteína.

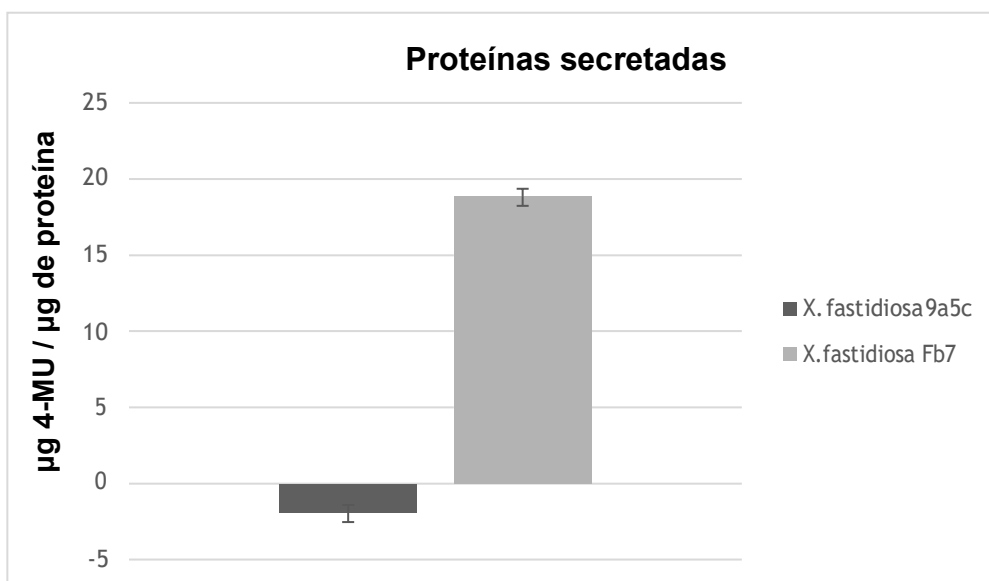


Figura 6: Atividade esterásica das proteínas secretadas de *X. fastidiosa* 9a5c e *X. fastidiosa* Fb7. A fluorescência teve emissão a 365 nm de excitação e 455 nm de emissão. A curva padrão utilizada foi $Y = (X - 5552,9) / 402,05$ sendo, X a fluorescência obtida e Y µg 4-MU / µg de proteína.

4.3. Análise proteômica comparativa das proteínas totais de *X. fastidiosa* 9a5c e Fb7

A análise proteômica realizada neste trabalho tem como finalidade fornecer uma análise *in vitro* detalhada das proteínas totais de duas cepas patogênicas de *X. fastidiosa*. Para esta análise, foram utilizadas as amostras lisadas das cepas 9a5c e Fb7, sendo que ambas são agentes causais da CVC em árvores cítricas.

As amostras de proteínas totais de *X. fastidiosa* cepa 9a5c e *X. fastidiosa* cepa Fb7, obtidas após 7 dias de crescimento, foram submetidas a técnica de espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS/MS). A Tabela 2 representa a análise dos resultados obtidos das 119 proteínas que foram identificadas nestas amostras. A fim de avaliar e comparar o nível de expressão das proteínas entre as duas cepas, foi calculado e utilizado como base os valores de *Fold Change* (FC) que indicam a diferença entre os níveis de expressão proteica das duas cepas avaliadas. Assim, os valores de FC positivos superiores a 1 indicam proteínas superexpressas na cepa Fb7 e os valores de

FC negativos correspondem as proteínas subexpressas na Fb7 quando comparado a cepa 9a5c. É possível visualizar também na Tabela 2 outras informações relevantes, tais como: localização das proteínas, valor do P-value e presença de peptídeo sinal.

Tabela 2. Lista das proteínas totais de *X. fastidiosa* 9a5c e *X. fastidiosa* Fb7 identificadas por LC-MSMS

Número de acesso ¹	Descrição	Fold Change FB7/9a5c	P-value	LBI-ID	Local. Prot ²	Peso mol. Teórico (kDa) ³	Nº pept.	% Cobertura	Pept. Sinal ⁴
Q9PF06	Proteína de membrana externa W	3,11	3,87E-06	XF_0872	ME	19,90	7	59	-
Q9PCN6	Proteína hipotética conservada	2,52	1,54E-06	XF_1742	D	37,32	4	6	35 36
Q9PA43	L-ascorbato oxidase	2,36	1,40E-05	XF_2677	D	80,88	8	27	29 30
Q9PAV3	Lisozima autolítica	2,34	7,58E-07	XF_2392	D	23,34	5	29	-
Q9PGZ0	Protease de cisteína	1,94	3,59E-05	XF_0156	C	30,77	11	42	-
Q9PD63	Proteína de membrana externa exposta à superfície	1,85	2,53E-05	XF_1516	D	98,28	7	10	-
Q9PEM9	Argininosucinato sintase	1,71	1,52E-06	XF_0999	C	44,02	10	31	-
Q9PEA5	Proteína de membrana externa	1,59	0,016834813	XF_1123	P	26,21	3	44	24 25
Q9PCN4	Oxidoreductase	1,55	3,74E-06	XF_1744	C	26,60	6	34	-
Q9PFN8	Proteína de tolerância ao cátion divalente periplasmático	1,50	0,009684938	XF_0619	C	12,47	2	7	-
Q9PDU7	Proteína relacionada com carboxipeptidase	1,45	3,02E-06	XF_1282	D	55,84	3	8	23 24
Q9PGG3	Proteína não caracterizada	1,44	9,91E-06	XF_0339	ME	97,83	9	9	34 35
Q9PE69	50S proteína ribossomal L16	1,41	0,011668742	XF_1159	C	15,49	3	12	-
Q9PCN3	Proteína não caracterizada	1,40	0,000173891	XF_1745	D	37,31	8	14	19 20
Q9PCN7	Daunorrubicina C-13 quetoreductase	1,37	0,0001329	XF_1741	D	27,19	3	9	-
Q9PE63	30S proteína ribossomal S14	1,33	0,004852555	XF_1165	C	11,55	2	27	-
Q9PAG7	Proteína não caracterizada	1,28	6,41E-05	XF_2551	D	92,29	18	35	-
Q9PD42	50S proteína ribossomal L13	1,21	0,002540811	XF_1537	C	15,98	2	18	-
Q9PEH0	Uridilato quinase	1,12	1,80E-05	XF_1058	C	24,27	2	12	-
Q9PGB3	Sistema de dois componentes, proteína reguladora	1,11	5,88E-05	XF_0389	C	25,32	2	37	-
Q9PGC5	Citocromo putativo P450 133B1	1,10	2,09E-05	XF_0377	MC	44,99	4	14	-

Q9PGE4	Proteína não caracterizada	1,07	3,70E-05	XF_0358	D	46,56	4	2	-
Q9PCH2	Proteína associada aos nucleóides	1,03	0,000990817	XF_1808	D	11,64	2	18	-
Q9PE62	30S proteína ribossomal S8	1,03	6,88E-05	XF_1166	C	14,34	5	12	-
Q9PE57	50S proteína ribossomal L15	1,03	0,007286373	XF_1171	C	15,51	4	20	-
Q9PFE2	Treonina--tRNA ligase	1,03	0,010201543	XF_0736	C	72,72	4	12	-
Q9PEP0	Dihidroorotase	1,02	0,000102041	XF_0988	C	49,14	7	22	-
Q9PH08	Provável citosol aminopeptidase	1,02	0,000499499	XF_0138	C	51,72	9	32	-
Q9PE73	50S proteína ribossomal L2	1,02	0,00610929	XF_1155	C	30,03	5	39	-
Q9PE18	Glutathiona S-transferase	1,01	0,002502488	XF_1210	C	22,69	4	48	-
Q9PAH9	Proteína Fimbrial	1,01	0,003438226	XF_2539	E	15,36	6	21	-
Q9PC85	Proteína de membrana externa P6	1,01	0,000311546	XF_1896	ME	19,64	6	48	19 20
Q9PEG3	Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase	0,99	0,007014728	XF_1065	C	53,25	2	6	-
Q9PEQ1	Malato oxidoreductase	0,98	0,000316363	XF_0977	C	82,99	4	15	-
Q9PFN3	Chiquimato desidrogenase	0,98	0,00037085	XF_0624	C	30,22	5	21	-
Q9PEM8	Acetilornitina desacetilase	0,90	6,93E-05	XF_1000	C	38,89	4	37	-
Q9PGR0	30S proteína ribossomal S15	0,87	0,003206156	XF_0238	C	10,19	3	51	-
Q9PEH8	Ditrans,policis-undecaprenil-difosfato sintase	0,87	0,000163567	XF_1050	C	28,93	2	7	-
Q9PE76	50S proteína ribossomal L3	0,86	0,003175803	XF_1152	C	22,89	4	27	-
Q9PEN0	N-acetilornitina carbamoiltransferase	0,85	3,84E-05	XF_0998	C	37,62	7	27	-
Q9PAX3	3-isopropilmalato desidrogenase	0,85	0,000599674	XF_2372	C	38,30	7	35	-
Q9PDX2	Oligoribonuclease	0,83	0,003473607	XF_1257	C	21,90	2	9	-
Q9PDX9	Arginina deaminase	0,82	0,006474025	XF_1250	C	34,16	3	48	-
Q9PEK7	Proteína não caracterizada	0,82	0,011473101	XF_1021	C	32,18	3	17	-
Q9PGU3	Fosforibosilaminoimidazola-sucinocarboxamida sintase	0,81	0,000402566	XF_0205	C	34,53	8	8	-
Q9PC25	Glicina--tRNA ligase subunidade alfa	0,78	0,004188728	XF_1960	C	35,06	2	7	-
Q9PD25	Fumarato hidratase classe II	0,77	0,000949124	XF_1554	C	49,99	3	16	-

Q9PA83	50S proteína ribossomal L1	0,76	0,004510309	XF_2636	C	24,30	6	32	-
Q9PH27	Proteína não caracterizada	0,75	0,000677307	XF_0119	D	38,23	3	20	24 25
Q9PA81	Terminação da transcrição / proteína antiterminação NusG	0,74	0,000449273	XF_2638	C	21,18	3	59	-
Q9PGZ6	Deoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase	0,74	0,00093282	XF_0150	C	16,25	2	9	-
Q9PGQ7	Proteína não caracterizada	0,74	0,000116255	XF_0241	D	31,01	5	30	-
Q9PB46	3-desoxi-mano-octulosonato citidililtransferase	0,74	0,000326462	XF_2299	C	27,88	3	27	-
Q9PHB8	Fosfo-2-desidro-3-deoxiheptonato aldolase	0,73	0,008446598	XF_0026	C	39,70	8	38	-
Q9PGX4	Fator de liberação da cadeia de peptídeos 3	0,72	0,000416202	XF_0174	C	60,85	3	9	-
Q9PEN7	Fator de transcrição de ligação da RNA polimerase DksA	0,72	0,003829667	XF_0991	C	34,54	4	20	-
Q9PBQ8	Oxidoreductase	0,70	0,000253974	XF_2082	C	28,98	6	22	-
Q9PGM4	Pirofosfato--frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase	0,68	0,001008266	XF_0274	C	45,26	7	12	-
Q9PGR3	Fator de iniciação da conversão IF-2	0,65	0,006414419	XF_0235	C	97,01	7	17	-
Q9PAR5	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase	0,64	0,000767437	XF_2430	C	52,19	2	5	-
Q9PGT5	Indole-3-glicerol fosfato sintase	0,63	0,018023875	XF_0213	C	28,70	5	15	-
Q9PFS0	Fosforibosilformilglicinamidina ciclo-ligase	0,62	0,000426469	XF_0587	C	39,44	2	23	-
Q9PGE6	Citocromo P450 putativo	0,61	0,000167138	XF_0356	MC	44,66	4	20	-
Q9PDK0	Luciferase	0,61	0,012406302	XF_1379	C	35,58	4	12	-
Q9PAZ1	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase	0,61	0,004830778	XF_2354	C	20,37	4	28	-
Q9PEG5	6-fosfogluconolactonase	0,61	0,000245281	XF_1063	D	26,28	9	48	-

Q9PEI5	Acil-[proteína-transportadora-acil]--UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferase	0,61	0,010333185	XF_1043	C	28,36	2	8	-
Q9PFX5	Proteína não caracterizada	0,59	0,006870849	XF_0531	D	37,31	2	15	-
Q9PDM9	RNA polimerase fator sigma RpoD	0,59	0,004184995	XF_1350	C	69,91	2	5	-
Q9PE53	30S proteína ribossomal S4	0,58	0,0072234	XF_1175	C	23,54	2	30	-
Q9PAC4	Protease de reforço de montagem beta-barril putativo	-0,59	0,000561711	XF_2594	D	62,36	9	32	-
Q9PC95	Fosfoglicerato mutase	-0,60	0,001054422	XF_1886	C	23,77	4	39	-
Q9PCQ2	2,5-dicloro-2,5-ciclohexadano-1,4-diol desidrogenase	-0,61	0,009429308	XF_1726	D	26,00	6	42	-
Q9PE00	Proteína não caracterizada	-0,61	0,011841998	XF_1228	D	14,18	4	15	-
Q9PF47	Cisteína sintase	-0,64	0,011810624	XF_0831	C	34,19	3	35	-
Q9PDT1	Transferência de elétrons flavoproteína ubiquinona oxidoreductase	-0,64	0,004955452	XF_1298	C	60,01	4	10	-
Q9PDZ6	Proteína não caracterizada	-0,65	0,014021016	XF_1232	D	137,88	6	9	-
Q9PGD1	Proteína de membrana de montagem Fimbrial	-0,66	0,00143692	XF_0371	MC	25,13	5	11	-
Q9PH65	Proteína de membrana externa Usher	-0,67	0,000531348	XF_0081	ME	98,17	13	21	-
Q9PBT9	Proteína de transferência conjugal	-0,68	0,003802939	XF_2049	E	49,55	2	2	-
P63773	10 kDa chaperonina	-0,69	0,012683315	XF_0616	C	10,09	4	77	-
Q9PD44	Citrato sintase	-0,69	0,002264217	XF_1535	C	47,87	6	39	-
Q9PCQ4	Desidrogenase de açúcar-fosfato	-0,70	0,009637182	XF_1724	C	36,34	2	7	-
Q9PBA3	Protease periplasmática	-0,71	0,00052622	XF_2241	P	54,14	10	30	20 21
Q9PGN8	Fosfoglucomutase / fosfomanomutase	-0,72	0,000115242	XF_0260	C	49,40	10	37	-
Q9PDZ7	Proteína não caracterizada	-0,76	0,000526272	XF_1231	ME	67,60	9	12	30 31
Q9PDJ7	Proteína não caracterizada	-0,76	0,0149202	XF_1382	C	20,59	3	38	-
Q9PBH0	Tioredoxina	-0,77	0,007822897	XF_2174	C	31,70	5	34	-
Q9PDI9	Ubiquinol oxidase subunidade 2	-0,79	0,000113795	XF_1390	MC	35,76	2	29	-
Q9PG84	Proteína de tolerância ao tolueno	-0,80	0,005566461	XF_0418	D	24,47	8	35	26 27

Q9PBB2	Catalase-peroxidase	-0,80	0,000729562	XF_2232	C	83,45	5	8	-
Q9PB37	Proteína não caracterizada	-0,80	0,001520549	XF_2308	D	14,64	2	6	-
Q9PEU0	Fator de montagem da proteína de membrana externa Band	-0,80	0,000613832	XF_0938	ME	33,32	9	50	-
Q9PGK6	Aconitato hidratase B	-0,82	0,000409003	XF_0292	C	93,98	28	58	-
Q9PFU2	Proteína não caracterizada	-0,86	0,005244322	XF_0565	D	32,43	12	59	22 23
Q9PE95	Proteína de ligação ao repressor de triptofano	-0,90	3,61E-05	XF_1133	D	20,47	2	48	-
Q9PER4	Proteína não caracterizada	-0,91	0,010349637	XF_0964	D	17,86	3	65	-
Q9PAZ6	Proteína não caracterizada	-0,97	0,008320307	XF_2349	ME	79,20	6	27	27 28
Q9PEL8	Proteína não caracterizada	-0,99	0,000199884	XF_1010	C	19,88	2	28	-
Q9PBP7	Precursor da proteína de resistência a fármacos	-1,01	0,00694467	XF_2093	D	42,30	9	38	22 23
Q9PF62	Protease de zinco	-1,02	0,000741904	XF_0816	D	104,98	27	60	26 27
Q9PFK0	Fosfatase alcalina	-1,07	0,01769	XF_0657	P	60,49	2	8	26 27
Q9PH68	Adesina fimbrial	-1,10	0,001289843	XF_0078	E	36,86	6	3	37 38
Q9PFP6	dTDP-glicose 4-6-desidratada	-1,17	1,50E-05	XF_0611	C	35,40	11	37	-
Q9PGD0	Proteína de montagem fimbrial	-1,18	0,002301302	XF_0372	MC	19,43	2	42	-
Q9PET6	Provável malato:quinona oxidoreductase	-1,19	0,000139852	XF_0942	C	62,71	6	30	-
Q9PCD8	Proteína reguladora de nitrogênio P-II	-1,20	0,000296316	XF_1843	MC	12,41	2	29	-
Q9PDT2	Gluconolactonase	-1,36	1,04E-05	XF_1297	D	37,26	3	7	-
Q9PH64	Proteína Chaperona	-1,42	0,001643355	XF_0082	P	28,75	10	49	25 26
Q9PB38	Proteína não caracterizada	-1,42	2,99E-05	XF_2307	D	17,62	2	8	-
Q9PB61	Proteína não caracterizada	-1,50	0,000284373	XF_2283	D	34,30	9	55	23 24
Q9PC04	Proteína de superfície	-1,54	0,000542691	XF_1981	ME	118,45	14	24	-
Q9PEK2	Serina protease	-1,66	0,000254917	XF_1026	ME	91,57	5	8	-
Q9PFV7	Proteína não caracterizada	-1,69	0,00048226	XF_0550	ME	113,87	15	34	34 35
Q9PAH6	Proteína fimbrial	-1,80	0,000447187	XF_2542	E	15,03	2	9	-

Q9PBU4	Proteína não caracterizada	-2,20	1,08E-06	XF_2041	C	29,16	4	32	-
Q9PB04	Proteína GrpE	-2,33	0,000386259	XF_2341	C	19,30	2	35	-
Q9PBE4	Proteína não caracterizada	-2,42	0,000662209	XF_2200	C	14,96	4	19	-
Q9PAT8	Bacteriocina	-2,89	4,87E-06	XF_2407	E	218,65	4	4	-

1: Número de acesso da proteína na plataforma *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB; <http://www.uniprot.org/>);

2: Localização das proteínas predita pelo PSORTb v 3.0. Subcellular Localization Prediction Tool (YU et al.,2010); (<http://www.psорт.org/psортb/>); C: Citoplasma; ME: Membrana externa; D:

Desconhecido; E: Extracelular; MC: Membrana citoplasmática; P: Periplasmática; F: Fimbrial.

3: Peso molecular teórico da proteína em kDa;

4: Posição do peptídeo sinal de clivagem como predito por SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);

As proteínas identificadas podem ser agrupadas de acordo com suas funções (Figura 7). As enzimas correspondem a classe de proteínas em maior predominância, sendo seguida pelo grupo de proteínas não caracterizadas. Aquelas que foram agrupadas como outras, incluem adesinas, toxinas, chaperonas, proteínas de superfície, reguladoras, fatores de transcrição, dentre outras.

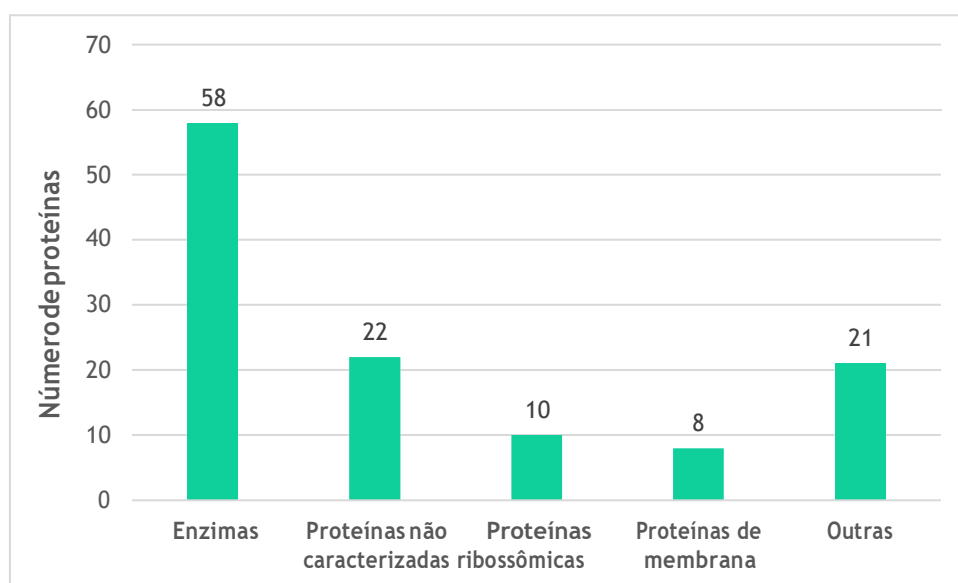


Figura 7: Classificação das proteínas identificadas na proteômica das amostras totais de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7.

4.4. Análise da expressão de proteínas por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A fim de obter uma validação da análise quantitativa das principais proteínas identificadas nas cepas de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7 por LC-MS/MS, foi realizada a qRT-PCR. Essa análise foi realizada com 16 *primers*, sendo que, a princípio, as proteínas alvo foram selecionadas com base nos valores significativos de FC na tabela proteômica. Além destas, algumas proteínas foram escolhidas de acordo com a importância das suas funções relatadas na literatura. A Tabela 3 lista as 16 proteínas avaliadas, com as suas respectivas funções.

Tabela 3: Proteínas de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7 analisadas por qRT-PCR.

Gene ID	Descrição	Função
XF0156	Protease de cisteína (cpr6)	Evasão imune; ativação enzimática; invasão celular (Nogaroto <i>et al.</i> , 2006)
XF1742	Proteína hipotética conservada	Biossíntese de açúcares (Souza <i>et al.</i> , 2004)
XF2586	Proteína de membrana externa TolC	Participa do sistema de secreção de fitobactérias (Reddy <i>et al.</i> , 2007)
XF2677	L-ascorbato oxidase	Biossíntese de pequenas moléculas (Neto <i>et al.</i> , 2010)
XF0028	fimT	Formação do pili do tipo I e IV (Shi <i>et al.</i> , 2010)
XF0343	mopB	Colonização e sobrevivência bacteriana (Dandekar <i>et al.</i> , 2012)
XF0872	ompW	Associação com as vesículas de membrana externa (OMVs) (Sidhu <i>et al.</i> , 2008)
XF0999	Argininosucinato sintase	Interferência no metabolismo bacteriano (Ardales <i>et al.</i> , 2009)
XF1516	XadA1	Adesão; agregação celular; formação do biofilme (Caserta <i>et al.</i> , 2010)
XF0290	rpfA	Produção e detecção de DSF (Wang <i>et al.</i> , 2012)
XF0287	rpfB	Processamento da molécula de sinal DSF (Almeida <i>et al.</i> , 2012).
XF1114	rpfC	Codifica uma proteína reguladora que contém sensor de quinase (Meinhardt <i>et al.</i> , 2003)
XF1115	rpfF	Síntese do fator de sinal difusível (DSF) (Lindow <i>et al.</i> , 2014)
XF2370	gumb	Produção de polissacarídeo extracelular e formação do biofilme (Souza <i>et al.</i> , 2006)
XF0539	pilA	Formação do pili do tipo IV (Shi <i>et al.</i> , 2009)
XF0083	fimA	Aderência aos vasos de xilema (Feil <i>et al.</i> , 2003)

A partir do resultado obtido (Figura 8), é possível observar que praticamente todas as proteínas avaliadas foram mais expressas na cepa Fb7 de *X.fastidiosa*. Dessas, 8 delas apresentaram níveis de expressão estatisticamente significativos na *X.fastidiosa* cepa Fb7 quando comparados com a *X.fastidiosa* 9a5c. Estes resultados corroboram com os valores de FC obtidos pela análise proteômica, como apresentado na Tabela 2.

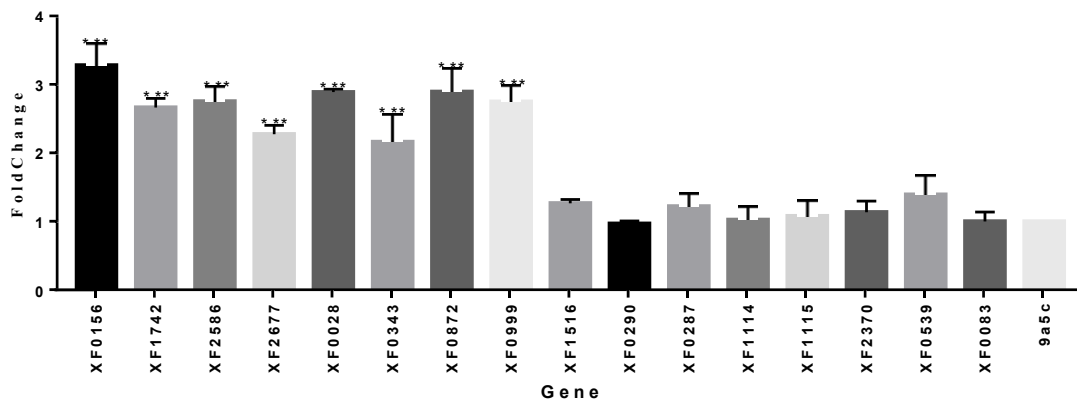


Figura 8: Comparação entre os valores de *fold-change* (FC) das proteínas de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7 obtidos por RT-qPCR ($p < 0,001$).

5. Discussão

Vários estudos recentes vêm demonstrando a importância da realização de análises proteômicas. A partir delas, é possível identificar a expressão diferencial de proteínas que estejam associadas aos mecanismos de patogenicidade e virulência da *X.fastidiosa*. Além disso, esta análise ainda possibilita o surgimento de hipóteses a cerca destes mecanismos, devido a comparação do perfil proteico entre cepas patogênicas e não patogênicas (Chakraborty *et al.*, 2016; Gouran *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016). Ao longo do trabalho, as proteínas foram identificadas de acordo com a nomenclatura do Projeto do Genoma de *X. fastidiosa* que foi realizado pelo Laboratório de Bioinformática da Unicamp (LBI-ID).

A *X.fastidiosa* cepa 9a5c e a *X.fastidiosa* cepa Fb7 afetam laranjeiras e são agentes causais da mesma doença (CVC), mesmo sendo isoladas em áreas geográficas diferentes. Com base nisso, análises moleculares demonstraram uma grande similaridade entre elas. Apesar destas semelhanças, diferenças genômicas relevantes são observadas quando comparadas com outras cepas de *X.fastidiosa* (Santana, 2007). Tendo em vista a importância do perfil proteico na influência de mecanismos de patogenicidade e virulência em fitobactérias, o trabalho tem como finalidade comparar as proteínas expressas entre as cepas virulentas 9a5c e Fb7.

A realização de ensaios bioquímicos é fundamental para avaliar as propriedades das proteínas secretadas e totais de *X.fastidiosa* 9a5c e Fb7. Dessa forma, estes ensaios tem como finalidade comparar os níveis das proteínas que apresentam características de lipase/esterase. A importância de avaliar este tipo de proteína surgiu a partir da identificação da LesA (PD1703), como fator principal responsável pela virulência da bactéria *X.fastidiosa* Temécula 1 (Nascimento *et al.*, 2016).

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes a classe das hidrolases, responsáveis por catalisar a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol (Joseph, Ramteke e Thomas, 2008). A fim de verificar a atividade lipásica das amostras de proteínas secretadas de *X.fastidiosa* 9a5c e Fb7, foi utilizado um meio sólido suplementado com 1% de tributirina em emulsão. A tributirina

consiste em uma molécula de triacilglicerídeo de cadeia curta (C4). Esta quando é hidrolisada pela lipase, libera uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido butírico (Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999). A escolha deste substrato deve-se a alguns fatores, dentre eles: boa visualização do halo hidrolítico; exige um período curto de incubação; facilidade na dispersão em água quando comparado a outros substratos, tal como a trioleína que necessita de um estabilizador para garantir uma emulsão uniforme (Shelley, Deeth e Macrae, 1987).

Posterior ao preparo do teste, a atividade lipásica foi confirmada após 5 dias por meio da formação do halo ao redor dos oríficos onde foram depositadas as amostras. O resultado comprova a degradação da molécula de tributirina presente no meio de cultura. Esta metodologia é considerada uma seleção qualitativa, a qual é bastante utilizada para a identificação de microrganismos produtores de lipase.

O controle negativo usado para a análise foi o meio de cultura PW, reagente o qual estavam inseridas as amostras. Ao comparar as duas cepas de *X.fastidiosa*, observa-se uma maior formação do halo na cepa Fb7 do que na cepa 9a5c (Figura 4). Esta diferença na intensidade do halo entre as cepas, é em virtude do nível de secreção de lipases extracelulares pelo patógeno (Cardenas *et al.*, 2001). Sendo assim, tal fato levanta a hipótese da presença mais abundante da proteína LesA na cepa Fb7, e conseqüentemente, da sua maior virulência. Quanto a diferença nos dias de crescimento (6 e 10 dias) entre a mesma cepa, não houve diferença perceptível no tamanho do halo de degradação.

Em relação a avaliação da atividade esterásica, o princípio da mensuração consiste na presença de esterases que catalisam a hidrólise da ligação éster da molécula de ácido graxo, a qual está contida no composto 4-MUB (4-metilumbeliferil butirato) (Gilham e Lehner, 2005). Esta reação é responsável por gerar um composto altamente fluorescente, 4-MU (4-metilumbeliferone) e uma molécula de ácido butírico (Roberts, 1985). A partir deste produto fluorescente obtido, realiza-se a mensuração por meio da leitura no fluorímetro e posterior análise quantitativa das amostras. Os resultados gerados aos 30 minutos de reação, demonstram que a *X.fastidiosa* Fb7 apresentou maior atividade esterásica tanto nas amostras de proteínas totais,

quanto nas de proteínas secretadas (Figuras 5 e 6). Sendo que, em relação as proteínas secretadas, a cepa Fb7 apresentou aproximadamente 20x maior quantidade do composto 4-MU, comparado a cepa 9a5c (Figura 6). Este resultado corrobora com os resultados da atividade lipásica, indicando a presença superior de LesA na cepa Fb7.

Além da importância das análises bioquímicas, uma técnica bastante eficiente e sensível para analisar o perfil proteico é a espectrometria de massa acoplada à cromatografia (LC-MS/MS). É importante ressaltar que este estudo foi feito de modo comparativo, a fim de avaliar o nível de expressão proteica entre as duas cepas.

A partir da Tabela 2, é possível visualizar as proteínas identificadas pela LC-MS/MS nas amostras de proteínas totais de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7. Esta listagem permite análises mais detalhadas e uma possível inferência sobre a função da maioria delas, buscando a importância das mesmas nos mecanismos de virulência e patogenicidade da *X.fastidiosa*.

As enzimas foram a classe de proteínas detectadas de forma mais abundante nesta análise (Figura 7). Estas moléculas são alvos relevantes, devido a sua prevalência e associação com a virulência em bactérias patogênicas. Dentre as 58 identificadas, algumas apresentaram maiores valores de FC (>1), demonstrando uma maior presença em *X.fastidiosa* Fb7. Dentre elas estão a XF2677, XF2392, XF0156, XF0999, XF1744, XF1282, XF1741, XF1058, XF0377, XF0736, XF0988, XF0138 e XF1210. A descrição das proteínas consideradas mais relevantes e com maiores valores de FC, são realizadas a seguir.

A enzima ascorbato oxidase foi identificada com expressão 2,6 vezes superior na *X.fastidiosa* cepa Fb7. Ela pertence a família das oxidoredutases e é responsável por catalisar a reação química do ácido ascórbico e oxigênio. Os produtos dessa reação são moléculas de dehidroascorbato e moléculas de água (Tullio, Liso e Arrigoni, 2004). De acordo com um estudo, a atividade dessa enzima pode estar envolvida na sinalização celular, por meio da alteração do estado redox apoplástico (Pignocchi e Foyer, 2003). Esta variação da oxirredução é capaz de modificar as respostas de crescimento e defesa do hospedeiro, por meio das moléculas envolvidas na cascata de sinalização e pelos padrões de expressão gênica (Pignocchi *et al.*, 2006). Pignocchi e colaboradores (2003) observaram

uma relação entre a atividade dessa enzima com a altura e a biomassa em plantas de tabaco. Além disso, a ascorbato oxidase pode estar envolvida no processo de fotossíntese, de amadurecimento de frutos e na recuperação de feridas (Tullio, Liso e Arrigoni, 2004). Em relação a *X.fastidiosa*, a XF2677 foi identificada em uma categoria funcional associada com a biossíntese de biomoléculas (Neto *et al.*, 2010). Uma análise global de genes em diferentes variedades de plantas, demonstrou também uma expressão diferenciada desta proteína. Tal fato pode contribuir para a melhor compreensão das diferentes estratégias bacterianas que são executadas para a sua sobrevivência no xilema (Federici *et al.*, 2012).

A protease de cisteína foi identificada com expressão 1,94 vezes maior na cepa Fb7. Alguns exemplos deste tipo de proteína são XopD, AvrXv4, AvrPphB e AvrRpt2 que possuem atuação em substratos de plantas específicas. Estes efetores integram os mecanismos que as bactérias patogênicas utilizam para infectar as células das plantas. Eles atuam por meio da proteólise de substratos que são reconhecidos indiretamente por proteínas R, alterando a fisiologia do hospedeiro. A descoberta destas proteases e seus possíveis alvos fornecem informações que identificam um possível mecanismo de virulência e uma consequente ativação da imunidade do hospedeiro (Hotson e Mudgett, 2004). A análise de uma cisteína protease de *X.fastidiosa*, denominada *Xylellain*, permitiu identificar uma expressão diferencial entre a cepa patogênica 9a5c e a cepa não patogênica J1a12. A ausência do reconhecimento desta protease pelos anticorpos na cepa não patogênica, sugere a sua inexistência ou uma baixa expressão. Sendo assim, este fato pode ser um indicativo da importância desta molécula no mecanismo de doença da CVC causado pela *X.fastidiosa* 9a5c (Nogaroto *et al.*, 2006).

A argininosucinato sintase foi identificada com expressão 1,71 vezes superior na cepa Fb7. Ardales e colaboradores (2009) analisaram o comportamento do gene *argG*, responsável por codificar uma argininosucinato sintase, na patogenicidade de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Esta bactéria é responsável por causar praga no arroz, e consequentemente afeta a sua produção em diferentes regiões do mundo. A partir da mutação feita no gene *argG* por meio de transposon, observou-se que esta provocou alteração metabólica, assim como comprometeu o crescimento e a virulência da bactéria

patogênica no arroz. Dessa forma, o estudo demonstra a importância deste gene no crescimento e no mecanismo de patogenicidade da fitobactéria (Ardales *et al.*, 2009).

A enzima oxidoreductase foi identificada com expressão 1,55 vezes maior na cepa Fb7. A DsbA (dissulfureto oxidoreductase) é um catalisador de formação de ligação de dissulfureto a medida que as proteínas emergem no periplasma na célula (Rinaldi, Meza e Guimarães, 2009). Algumas bactérias, tais como *E.coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis* e *Vibrio cholerae* apresentaram redução na virulência. Tal fato está associado com o processo de dobramento dessa proteína (Vivian *et al.*, 2009). O patógeno *X. fastidiosa* apresenta duas oxidoreductases pertencentes à família DsbA. A XF1744 está possivelmente associada com a capacidade invasiva da bactéria (Nunes *et al.*, 2003). Além disso, o secretoma do oomiceto *Phytophthora infestans* identificou algumas oxidoreductases como potenciais candidatos a fatores de virulência (Raffaele *et al.*, 2010).

A proteína XF0377 corresponde ao citocromo P450, e foi identificada com expressão 1,10 vezes superior na cepa Fb7. O citocromo P450 consiste em uma família de proteínas que está envolvida em uma variedade de reações, tais como: produção de produtos secundários (alcalóides, terpenos, lipídeos); vias biossintéticas de substâncias reguladoras de crescimento (giberelinas, ácido jasmônico) e mecanismos de desintoxicação (Paquette, Bak e Feyereisen, 2000; Souza *et al.*, 2007).

A enzima dihidroorotase (XF0988) foi identificada com expressão 1,02 superior na cepa Fb7. Ela é responsável por converter o ácido carbamoil aspártico em ácido 4,5-dihidroortico em busca da síntese de pirimidinas (Zrenner *et al.*, 2006).

O gene XF0138 codifica uma citosol aminopeptidase que foi identificada com expressão 1,02 vezes maior na cepa Fb7. É responsável por catalisar a remoção de resíduos de aminoácidos, interferindo no processo de degradação da proteína e no metabolismo de peptídeos que possuem propriedades biológicas ativas (Silva *et al.*, 2011).

A Glutathione S-transferase foi identificada com expressão 1,01 vezes superior na cepa Fb7. Esta enzima integra o grupo das moléculas antioxidantes e catalisa o ataque nucleofílico entre a glutathione e moléculas biológicas que

possuem um centro eletrofílico. Esta característica lhe confere importância no processo de desintoxicação celular (Arca *et al.*, 1990). Na bactéria *X.fastidiosa*, a XF1210 interfere no metabolismo biodegradativo, na desintoxicação e na excreção de substratos xenobióticos (Garcia *et al.*, 2008). Ou seja, esta molécula tem a capacidade de reduzir a concentração de ROS, produzidos como resposta de defesa pelas plantas, e impedir a inibição do crescimento bacteriano (Lambais *et al.*, 2000; Travensolo *et al.*, 2008). Essa molécula também foi encontrada no genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Qian *et al.*, 2005).

Chiquimato desidrogenase foi identificada com expressão 0,98 vezes maior na cepa 9a5c. A sua função é catalisar a quarta reação da via chiquimato, convertendo a molécula de desidrochiquimato em ácido chiquimico (Arcuri *et al.*, 2004). Em *X.fastidiosa*, a XF0624 demonstrou estar diretamente associada com a biossíntese de aminoácidos (Ciraulo *et al.*, 2010). Foi observado também que tal enzima é responsável pelos índices normais de pigmento (*xanthomonadin*) e virulência em *X.oryzae* pv. *oryzae* (Goel, Rajagopal e Sonti, 2001).

O gene XF1000 codifica uma acetilornitina desacetilase que foi identificada com expressão 0,90 vezes superior na cepa 9a5c. Esta enzima catalisa umas das etapas do metabolismo de arginina, assim como a proteína codificada pelo gene XF0998 que consiste na acetilornitina carbamoiltransferase (expressão 0,85 vezes maior na cepa 9a5c). A enzima acetilornitina desacetilase também participa da síntese de poliaminas (Javid-Majd e Blanchard, 2000; Naumoff *et al.*, 2004). A arginina é de extrema relevância na biologia vegetal, tendo em vista que é indispensável para a síntese proteica e também por influenciar na presença de vários alcalóides que são importantes para a planta (Slocum, 2005).

O gene XF1050 codifica a enzima ditrans policis-undecaprenil-difosfato sintase que foi identificada com expressão 0,87 vezes superior na cepa 9a5c. Esta molécula integra o sistema de biossíntese dos terpenoides (Spyropoulou, Haring e Schuurink, 2014).

O gene XF2372 codifica a enzima 3-isopropilmalato desidrogenase que foi identificada com expressão 0,85 vezes superior na cepa 9a5c. Em *Arabidopsis thaliana*, esta enzima está envolvida na biossíntese das moléculas de glucosinolato e leucina (He *et al.*, 2009).

A enzima oligoribonuclease foi identificada com expressão 0,83 vezes maior na cepa 9a5c. Ela consiste em uma exoribonuclease que degrada pequenas moléculas de oligoribonucleotídeos em mononucleotídeos. Estas moléculas correspondem a componentes fundamentais no metabolismo de RNA e DNA (Wu *et al.*, 2005). Um estudo demonstrou que sob choque térmico, houve a expressão diferencial da proteína XF1257 nas cepas *ropE* e J1a12. Este resultado indicou uma provável alteração nos mecanismos regulatórios da bactéria (Neto *et al.*, 2007).

A proteína arginina deaminase foi identificada com expressão 0,82 vezes superior na cepa 9a5c e está envolvida no catabolismo de aminoácidos. Esta molécula também está relacionada com a concentração de óxido nítrico, uma vez que a arginina pode ser substrato para a óxido nítrico sintase. Sendo assim, tal enzima pode colaborar com o estabelecimento da infecção pelo hospedeiro. A ausência da proteína XF1250 na cepa não patogênica J1a12 de *X.fastidiosa*, levanta a hipótese da importância desta proteína nos aspectos de crescimento e colonização da bactéria (Koide *et al.*, 2004).

A proteína fumarato hidratase foi identificada com expressão 0,77 vezes maior na cepa 9a5c. É uma das proteínas responsáveis pelas principais etapas da via metabólica central (Ciraulo *et al.*, 2010). A energia proveniente delas é necessária para manter o perfil de interação, mesmo que a bactéria não esteja no estágio de crescimento (Dourado *et al.*, 2015). Durante o co-cultivo de *X.fastidiosa* com *M. mesophilicum*, a qual consiste em uma bactéria endofítica de citros, observou a expressão elevada de genes relacionados a geração de energia, sendo que um deles era codificador da proteína XF1554 (Dourado *et al.*, 2015).

A enzima fosfofrutoquinase foi identificada com expressão 0,68 vezes superior na cepa 9a5c e é reponsável por converter a molécula de 6 fosfato de frutose em frutose 1,6- bisfosfato. Esta conversão é considerada uma das reações de glicólise mais relevante (Groenewald e Botha, 2008). Na análise de expressão gênica em *X.fastidiosa*, é possível visualizar a presença da proteína XF0274, a qual está envolvida no metabolismo energético bacteriano (Travensolo *et al.*, 2009).

A enzima inosina-5-monofosfato desidrogenase foi identificada com expressão 0,64 vezes maior na cepa 9a5c e tem um papel significativo na síntese

de nucleotídeos de purina. Dessa forma, participa da formação do precursor de DNA e de RNA. Além disso, também interfere nos processos de replicação, transcrição e sinalização celular (Kiliç *et al.*, 2010). Esta enzima foi identificada no proteoma extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* (Nouwens *et al.*, 2002) e na *X.fastidiosa* cepa 9a5c (XF2430) (Smolka *et al.*, 2003).

O gene XF0587 codifica a proteína fosforibosilformilglicinamida ciclo-ligase que foi identificada com expressão 0,62 vezes maior na cepa 9a5c. Ela está associada a biossíntese de aminoácidos, mais especificamente de ribonucleotídeos (Travensolo *et al.*, 2009; Zhang e Zheng, 2015). A atividade desta enzima foi significativa no transcriptoma dos tecidos vegetais de diferentes espécies de citros (Terol *et al.*, 2016).

O gene XF1379 codifica a luciferase que foi identificada com expressão 0,61 vezes maior na cepa 9a5c. Esta enzima de adenilação é responsável por catalisar a ativação de um substrato de carboxilato integrado com o ATP, a fim de formar uma molécula intermediária de acil adenilato (Gulick, 2009).

A enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase foi identificada com expressão 0,61 vezes superior na cepa 9a5c. Ela é integrante da biossíntese de nucleotídeos. A expressão significativa desta enzima (XF2354) em *X.fastidiosa* sob cultivo em um meio de cultura que mimetiza as propriedades da seiva da uva, levanta a possibilidade do seu envolvimento em algum processos, tais como: colonização de plantas, virulência e competição ambiental (Ciraulo *et al.*, 2010).

A análise da expressão de proteínas nos vários estágios de desenvolvimento do biofilme de *X.fastidiosa* cepa 9a5c, identificou a presença constante de uma serina protease (XF1026). Esta enzima apresentou expressão 1,66 vezes maior na cepa 9a5c, do que na cepa Fb7. A presença desta enzima pode ser associada com a dispersão de células dentro do hospedeiro da planta (Mendes *et al.*, 2016).

A classe de proteínas que ainda não foram caracterizadas incluem as seguintes moléculas: XF0339; XF1745; XF2551; XF0358; XF1021; XF0119; XF0241; XF0531; XF1228; XF1232; XF1231; XF1382; XF2308; XF0565; XF0964; XF2349; XF1010; XF2307; XF2283; XF0550; XF2041 e XF2200. Dessa forma, tais proteínas exigem análises funcionais detalhadas para a melhor compreensão das suas funções na bactéria *X.fastidiosa*.

As 10 proteínas ribossômicas identificadas nas proteínas totais de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7 são: XF1159; XF1165; XF1537; XF1166; XF1171; XF1155; XF0238; XF1152; XF2636 e XF1175. Estas moléculas são constituintes estruturais dos ribossomos e possuem funções indispensáveis para o processo de biogênese dos ribossomos e tradução das proteínas.

Em relação a classe de proteínas de membrana, foram identificadas 8 nas amostras, sendo elas: 6 proteínas de membrana externa (XF0872; XF1516; XF1123; XF1896; XF0081; XF0938); 1 proteína de transferência conjugal (XF2049) e 1 proteína de tolerância ao tolueno (XF0418).

As proteínas de membrana codificadas pelos genes XF0872, XF1516, XF1123 e XF1896 foram identificadas com razões de expressão superiores a 1 na cepa Fb7. Elas são significativas nas bactérias Gram-negativas, uma vez que as mesmas são cercadas por uma membrana externa. A principal função desta estrutura é o estabelecimento de uma barreira protetora e seletiva. O seu constituinte dominante é o lipopolissacarídeo (LPS), sendo esse o componente responsável por dificultar a passagem de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas. Dessa forma, existem mecanismos de transporte alternativos no interior da membrana que buscam facilitar a absorção dessas moléculas (Nikaido, 2003; Hong *et al.*, 2006). As OMVs correspondem a pequenas estruturas esféricas, que são oriundas do afastamento e da dissociação de pequenos segmentos de membrana externa. Estas vesículas são componentes importantes, pois são capazes de transmitir funções biológicas, tais como: sinalização por *quorum*; obtenção de nutrientes; transferência de genes e envolvimento no mecanismo de patogênese (Kulp e Kuehn, 2010). Tendo em vista o objetivo do trabalho, o principal enfoque da atividade destas vesículas é no transporte e na transferência de fatores de virulência nas células hospedeiras. Uma vez que esta atividade é capaz de interferir diretamente na resposta e na defesa do hospedeiro (Kuehn e Kesty, 2005).

O gene XF0872 que codifica a proteína de membrana externa W, foi identificada com expressão 3,11 vezes superior na cepa Fb7. Esta molécula foi a que apresentou o maior valor de FC. Em um estudo prévio, analisou-se o papel do gene regulador *algU* em *X.fastidiosa* quanto a agregação, formação de biofilme e virulência. O mutante gerado para este gene reduzia todos estes fatores, sendo

que este permitiu analisar a expressão diferencial obtida do gene *OmpW* entre a cepa mutante e a selvagem. Dessa forma, os fatos indicaram que esta molécula pode ser regulada positivamente pela *algU* e, conseqüentemente, está relacionada com a agregação celular e com a virulência bacteriana (Shi *et al.*, 2007). De acordo com os resultados obtidos do proteoma das OMVs de *Xanthomonas campestris*, observou-se também a presença da *OmpW*. Este fato confirma a associação desta proteína com as estruturas das OMVs (Sidhu *et al.*, 2008). Essa proteína foi identificada no secretoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), a qual é o agente causal da podridão negra em crucíferas (Watt *et al.*, 2005). Outro local que a proteína *OmpW* (XF0872) também pôde ser identificada foi nas proteínas extracelulares de *X.fastidiosa* 9a5c e *X.fastidiosa* Fb7 (Mendes *et al.*, 2016).

A proteína de membrana externa exposta à superfície foi identificada com expressão 1,85 vezes maior na cepa Fb7. A partir da análise da expressão diferencial de genes em *X.fastidiosa* 9a5c, é possível observar que o gene XF1516 foi diferencialmente expresso e apresentou maior razão quando comparado aos demais. Dessa forma, é capaz de associar esta proteína com a patogenicidade, virulência e adaptação da *X.fastidiosa* (SOUZA *et al.*, 2003).

A proteína de membrana externa *Usher* (XF0081) foi identificada com expressão 0,67 vezes superior na cepa 9a5c. Ela é responsável por exportar estruturas fimbriais, as quais são fundamentais para a realização da colonização bacteriana. Sendo assim, este fator é significativo para a sobrevivência da bactéria, pois auxiliam na sua aderência a diferentes tipos de estruturas (Meidanis, Braga e Verjovski-Almeida, 2002).

Em relação a outras classes de proteínas identificadas, há uma proteína associada a nucleóides que foi identificada com expressão 1,03 vezes superior na cepa Fb7. Um exemplo desta proteína é a H-NS (*Histone-like nucleoid structuring protein*), a qual é encontrada em *X.fastidiosa* e interfere no perfil transcricional da célula. Isto ocorre devido a regulação pleiotrópica da estabilidade do genoma, e também pela recombinação e expressão gênica (Paula *et al.*, 2003). A mesma enzima também foi identificada no estágio inicial de formação do biofilme em *Escherichia coli* (PRUß *et al.*, 2006).

O gene XF2539 codifica a proteína fimbrial que foi identificada com expressão 1,01 vezes superior na cepa Fb7. Esta proteína é integrante da formação da estrutura do pili do tipo IV. É importante ressaltar que este tipo de pili está envolvido no processo de adesão das bactérias ao hospedeiro, na motilidade celular e é considerado um fator de virulência (Meng *et al.*, 2005). Alguns trabalhos mostraram que esta proteína é expressa e interfere na condição do biofilme de *X. fastidiosa* (Souza *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005; Caserta *et al.*, 2010).

A fim de validar os níveis de expressão das proteínas, obtidas a partir da espectrometria de massa das cepas de 9a5c e Fb7 de *X. fastidiosa*, realizou-se a RT-qPCR. Esta análise em conjunto com os resultados da proteômica são considerados estudos chave para compreender a capacidade da *X. fastidiosa* de colonizar e infectar diferentes hospedeiros, assim como de sobreviver a várias condições adversas.

Os resultados da técnica RT-qPCR, a qual compara os valores de FC das proteínas em *X. fastidiosa* 9a5c e Fb7, demonstraram maiores níveis de expressão na cepa Fb7 em quase todas as proteínas analisadas. Este fato foi observado a partir da obtenção de valores de FC superiores a 1, o qual é referente a cepa 9a5c de *X. fastidiosa* utilizada como controle. No entanto, tendo em vista a análise estatística, apenas 8 proteínas foram significativamente expressas na *X. fastidiosa* cepa Fb7 (Figura 8).

Diante das informações apresentadas na Tabela 3, observa-se que a maioria das proteínas analisadas são fatores que interferem diretamente na capacidade de adesão, colonização e sobrevivência da *X. fastidiosa*. Ou seja, consistem em fatores relevantes no processo de patogenicidade e virulência da mesma. Dessa forma, a ausência ou baixa expressão pode indicar a não patogenicidade e/ou a redução da virulência entre as cepas. No caso das duas cepas analisadas (*X. fastidiosa* 9a5c e Fb7), os resultados apontam para uma maior virulência da cepa Fb7.

A realização da proteômica comparativa e as análises de características bioquímicas entre duas cepas patogênicas, auxiliam na identificação de mecanismos moleculares que são utilizados pela *X. fastidiosa* para uma maior virulência e patogenicidade no hospedeiro. Dessa forma é possível compreender

melhor os mecanismos de interação planta-patógeno, além de propiciar soluções mais efetivas para combater o impacto econômico e ambiental gerado pela presença e controle do fitopatógeno.

6. Conclusão

A compreensão dos mecanismos de virulência e patogenicidade da bactéria *X.fastidiosa* é bastante complexo, tendo em vista a presença de inúmeros fatores que podem estar relacionados. A interação planta-patógeno influencia bastante na variação destes componentes, uma vez que os mecanismos de colonização e defesa envolvem a presença de várias proteínas diferentes. Dessa forma, o estudo teve como objetivo identificar fatores de virulência por meio da realização de testes bioquímicos e da análise proteômica comparativa entre as cepas patogênicas 9a5c e Fb7 de *X.fastidiosa* cultivadas em meio de cultura PW. A partir deste estudo, foi possível identificar o perfil proteico e comparar o nível de expressão das proteínas entre as cepas.

A maior atividade lipásica (comprovada pela maior formação do halo) e esterásica (comprovada pela maior quantidade de 4-MU) identificadas na cepa Fb7 indicam um papel importante da proteína LesA nesta cepa. Além disso, os resultados obtidos por LC-MS/MS destacam a importância de várias enzimas que estão relacionadas com a degradação da parede celular e com o metabolismo bacteriano. As proteínas de membrana também são ressaltadas, devido a sua associação com a formação do biofilme. A grande quantidade de proteínas não caracterizadas obtidas, exige uma análise funcional detalhada para a melhor compreensão das suas funções. Em relação ao nível de expressão destas moléculas, o estudo demonstrou maior presença de algumas proteínas relevantes na *X.fastidiosa* Fb7, sendo algumas validadas pela RT-qPCR. Todos estes resultados obtidos indicam a maior virulência da cepa Fb7, quando comparada a cepa 9a5c.

7. Referências

ALENCAR, V. C. et al. Functional and Evolutionary Characterization of a UDP-Xylose Synthase Gene from the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*, Involved in the Synthesis of Bacterial Lipopolysaccharide. **Biochemistry**, v. 56, p. 779-792, 2017.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00886>

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type iii secretion system effector proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 42, p. 385–414, 2004.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731>

ALMEIDA, R. P. P. *Xylella fastidiosa* Vector Transmission Biology. In: BROWN, J. K. **Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens**. [S.l.]: [s.n.], 2016. Cap. 12, p. 165-173.

ALMEIDA, R. P. P.; PURCELL, A. H. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization on the precibarium of sharpshooter vectors relative to transmission to plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, p. 884-890, 2006.

[https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)99\[884:POXFCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)99[884:POXFCO]2.0.CO;2)

AN, Y. et al. SecretEPDB: a comprehensive webbased resource for secreted effector proteins of the bacterial types III, IV and VI secretion systems. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.

APARNA, G. et al. A Cell Wall–Degrading Esterase of *Xanthomonas oryzae* Requires a Unique Substrate Recognition Module for Pathogenesis on Rice. **The Plant Cell**, v. 21, p. 1860–1873, 2009.

<https://doi.org/10.1105/tpc.109.066886>

ARCA, P. et al. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase. **FEBS Letters**, v. 263, p. 77–79, 1990.

[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80709-R](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80709-R)

ARCURI, H. A. et al. Molecular models for shikimate pathway enzymes of *Xylella fastidiosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 979–991, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.220>

ARDALES, E. Y. et al. Inactivation of *argG*, encoding argininosuccinate synthetase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, is involved in bacterial growth and virulence in planta. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 31, p. 368-374, 2009.

<https://doi.org/10.1080/07060660909507611>

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T. The diversity of citrus endophytic bacteria and their interactions with *Xylella fastidiosa* and host plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, p. 476-491, 2016.

<https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0056>

BHOWMICK, T. S. et al. Transmission of phage by glassy-winged sharpshooters, a vector of *Xylella fastidiosa*. **Bacteriophage**, v. 6, p. e1218411, 2016.

<https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1218411>

BODMAN, S. B. V.; BAUER, W. D.; COPLIN, D. L. QUORUM SENSING IN PLANT-PATHOGENIC BACTERIA. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 41, p. 455–482, 2003.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095652>

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254 , 1976.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRLANSKY, R. H. et al. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v. 73, p. 530-535, 1983.

<https://doi.org/10.1094/Phyto-73-530>

CARDENAS, F. et al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, p. 111–123, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00244-7)

CASCALES, E. Inside the Chamber of Secrets of the Type III Secretion System. **Cell**, v. 168, p. 949-951, March 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.028>

CASERTA, R. et al. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4250–4259, July 2010.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02114-09>

CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, p. 362–372 , 2016.

<https://doi.org/10.1111/jipb.12428>

CHAKRABORTY, S. et al. Sequence/structural analysis of xylem proteome

emphasizes pathogenesis related proteins, chitinases and β -1, 3-glucanases as key players in grapevine defense against *Xylella fastidiosa*. **PeerJ** , v. 4, p. 1-25, 2016.

<https://doi.org/10.7717/peerj.2007>

CHANG, C. J. et al. Culture and Serological Detection of the Xylem-Limited Bacterium Causing Citrus Variegated Chlorosis and Its Identification as a Strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology** , v. 27, p. 137-142 , 1993.

<https://doi.org/10.1007/BF01576010>

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. P.; LINDOW, S. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 243-71, 2008.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094342>

CHRISTIE, P. J. The Mosaic Type IV Secretion Systems. **EcoSal Plus**, v. 7, p. 1-34, October 2016.

<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0020-2015>

CIRAULO, M. B. et al. Transcriptome Analysis of the Phytobacterium *Xylella fastidiosa* Growing under Xylem-Based Chemical Conditions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-18, 2010.

<https://doi.org/10.1155/2010/781365>

CITRUSBR. O retrato da citricultura brasileira. **CitrusBR**, 2016. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com.br/safras/>>. Acesso em: 24 Junho 2017.

CLIFFORD, J. C.; RAPICAVOLI, J. N.; ROPER, M. C. A Rhamnose-Rich O-Antigen Mediates Adhesion, Virulence, and Host Colonization for the Xylem-Limited Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, p. 676–685, 2013.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0283-R>

CONTRERAS, J. D. V. Pecosita ou falsa mancha grasieta na Argentina. **Laranja Cia**, v. 31, 1992.

CORNARA, D. et al. Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy. **J Pest Sci**, v. 90, p. 521-530, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s10340-016-0793-0>

COSTA R.D, T. et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 343-359, June 2015.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>

CUSSIOL, J. R. R. et al. Organic Hydroperoxide Resistance Gene Encodes a Thiol-dependent Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.

11570–11578, 2003.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M300252200>

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** , v. 61, p. 401-422, 2007.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>

DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic Culture of the Bacteria Associated with Phony Disease of Peach and Plum Leaf Scald. **Current Microbiology** , v. 6, p. 309-314 , 1981.

<https://doi.org/10.1007/BF01566883>

DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H.; THOMSON, S. V. Pierce's Disease of Grapevines: Isolation of the Causal Bacterium. **Science**, v. 199, p. 75-77, 1978.

<https://doi.org/10.1126/science.199.4324.75>

DE COLL, O. R. et al. Detection of *Xylella fastidiosa* in weeds and sharpshooters in orange groves affected with citrus variegated chlorosis in Misiones, Argentina, 2000.

DELEPELAIRE, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 149–161, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.001>

DOURADO, M. N. et al. Differential gene expression in *Xylella fastidiosa* 9a5c during co-cultivation with the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 1357–1366, 2015.

<https://doi.org/10.1002/jobm.201400916>

DOW, J. M. et al. Extracellular Proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, the Black Rot Pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2994-2998, 1990.

ELLIS, T. N.; KUEHN, M. J. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 81-94, 2010.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09>

FEDATTO, L. M. et al. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 263—272, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.10.001>

FEDERICI, M. T. et al. *Xylella fastidiosa*: An in vivo system to study possible survival strategies within citrus xylem vessels based on global gene expression

analysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, 2012.

FEIL, H.; FEIL, W. S.; LINDOW, S. E. Contribution of Fimbrial and Afimbrial Adhesins of *Xylella fastidiosa* to Attachment to Surfaces and Virulence to Grape. **Phytopathology**, v. 97, p. 318-324, March 2007.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-3-0318>

FENG, J. et al. Analysis of a *Blumeria graminis*-Secreted Lipase Reveals the Importance of Host Epicuticular Wax Components for Fungal Adhesion and Development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p. 1601–1610, 2009.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1601>

FRY, S. M.; HUANG, J.-S.; MILHOLLAND, R. D. Isolation and Preliminary Characterization of Extracellular Proteases Produced by Strains of *Xylella fastidiosa* from Grapevines. **Phytopathology**, v. 84, p. 357-363, 1994.

<https://doi.org/10.1094/Phyto-84-357>

FUENTE, L. D. L. et al. Assessing Adhesion Forces of Type I and Type IV Pili of *Xylella fastidiosa* Bacteria by Use of a Microfluidic Flow Chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2690–2696, April 2007.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02649-06>

FUNDECITRUS. The tools to make the best citriculture of the world. **Citricultor**, p. 3, Setembro 2016.

GARCIA, W. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a glutathione S-transferase from *Xylella fastidiosa*. **Acta Crystallographica**, v. 64, p. 85–87, 2008.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 401–415, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.017>

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, v. 36, p. 139-147, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.11.003>

GOEL, A. K.; RAJAGOPAL, L.; SONTI, R. V. Pigment and Virulence Deficiencies Associated with Mutations in the *aroE* Gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 245–250, 2001.

<https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.245-250.2001>

GOURAN, H. et al. The Secreted Protease PrtA Controls Cell Growth, Biofilm Formation and Pathogenicity in *Xylella fastidiosa*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 31098, 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep31098>

GOURIEROUX, A. M. et al. The amino acid distribution in rachis xylem sap and phloem exudate of *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' bunches. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 45-54, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.010>

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems – An overview. **Microbiol Spectr**, v. 4, p. 1-32, February 2016.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>

GROENEWALD, J.-H.; BOTHA, F. C. Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Res**, v. 17, p. 85–92, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s11248-007-9079-x>

GUILHABERT, M. R.; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xylella fastidiosa* Antivirulence Genes: Hemagglutinin Adhesins Contribute to *X. fastidiosa* Biofilm Maturation and Colonization and Attenuate Virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 856–868, 2005.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0856>

GULICK, A. M. Conformational Dynamics in the Acyl-CoA Synthetases, Adenylation Domains of Nonribosomal Peptide Synthetases, and Firefly Luciferase. **ACS Chemical Biology**, v. 4, p. 811-827, 2009.

<https://doi.org/10.1021/cb900156h>

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 763–781, 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>

HACHANI, A.; WOOD, T. E.; FILLOUX, A. Type VI secretion and anti-host effectors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 29, p. 81–93, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.11.006>

HE, C. X. et al. Distribution of *Xylella fastidiosa* in Citrus Rootstocks and Transmission of Citrus Variegated Chlorosis Between Sweet Orange Plants Through Natural Root Grafts. **Plant Disease**, v. 84, p. 622-626, 2000.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.622>

HE, Y. et al. A redox-active isopropylmalate dehydrogenase functions in the biosynthesis of glucosinolates and leucine in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 60, p. 679–690, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03990.x>

HONG, H. et al. The Outer Membrane Protein OmpW Forms an Eight-stranded β -Barrel with a Hydrophobic Channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 7568–7577, 2006.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M512365200>

HOPKINS, D. L. XYLELLA F ASTIDIOSA: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Ann. Rev. Phytopathology**, v. 27, p. 271-90, 1989.

<https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001415>

HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. Xylella fastidiosa: Cause of Pierce's Disease of Grapevine and Other Emergent Diseases. **Plant Disease**, v. 86, p. 1056-1066, 2002.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.10.1056>

HOTSON, A.; MUDGETT, M. B. Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 384–390, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.003>

IONESCU, M. et al. Xylella fastidiosa outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. **Proc Natl Acad Sci**, v. 111, p. 3910-3918, September 2014.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1414944111>

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315–351, 1999.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>

JANSE, J. D.; OBRADOVIC, A. XYLELLA FASTIDIOSA: Its biology, diagnosis, control and risks. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, p. 35-48, 2010.

JAVID-MAJD, F.; BLANCHARD, J. S. Mechanistic Analysis of the argE-Encoded N-Acetylornithine Deacetylase. **Biochemistry**, v. 39, p. 1285-1293, 2000.

<https://doi.org/10.1021/bi992177f>

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457–470, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.003>

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **M. Katsikogianni and Y.F. Mis**, v. 8, p. 37-57, 2004.

<https://doi.org/10.22203/eCM.v008a05>

KILİÇ, N. K. et al. Proteomic changes in response to chromium(VI) toxicity in Pseudomonas aeruginosa. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2134–2140,

2010.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.008>

KILLINY, N.; ALMEIDA, R. P. P. Xylella fastidiosa Afimbrial Adhesins Mediate Cell Transmission to Plants by Leafhopper Vectors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 521-528, January 2009.

<https://doi.org/10.1128/AEM.01921-08>

KOIDE, T. et al. DNA Microarray-Based Genome Comparison of a Pathogenic and a Nonpathogenic Strain of Xylella fastidiosa Delineates Genes Important for Bacterial Virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5442–5449, August 2004.

<https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5442-5449.2004>

KOSOVÁA, K. et al. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1301–1322, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>

KOUKER, G.; JAEGER, K.-E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 211-213, 1987.

KUEHN, M. J.; KESTY, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host–pathogen interaction. **Genes & Development**, v. 19, p. 2645–2655, 2005.

<https://doi.org/10.1101/gad.1299905>

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 163–184, 2010.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>

LALLY, E. T. et al. The interaction between RTX toxins and target cells. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 356-361, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01530-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01530-9)

LAMBAIS, M. R. et al. A genomic approach to the understanding of Xylella fastidiosa pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 459–462, October 2000.

[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00121-1)

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61,

2009.

LI, Y. et al. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell aggregation. **Microbiology**, v. 153, p. 719–726, 2007.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002311-0>

LORITE, G. S. et al. The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 359, p. 289-295, March 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.066>

LUCAS, W. J. et al. The plant vascular system: evolution, development and functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 55, p. 294-388, March 2013.

<https://doi.org/10.1111/jipb.12041>

MARQUES, L. L. R. et al. Characterization of Biofilm Formation by *Xylella fastidiosa* In Vitro. **Plant Disease**, v. 86, p. 633-638, 2002.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.633>

MARTENS, L. et al. PRIDE: The proteomics identifications database. **Proteomics**, v. 5, p. 3537–3545, 2005.

<https://doi.org/10.1002/pmic.200401303>

MATSUMOTO, A. et al. XatA, an AT-1 autotransporter important for the virulence of *Xylella fastidiosa* Temecula1. **MicrobiologyOpen**, v. 1, p. 33–45, 2012.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.6>

MCELTRONE, A. J.; SHERALD, J. L.; FORSETH, I. N. Effects of Water Stress on Symptomatology and Growth of *Parthenocissus quinquefolia* Infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v. 85, p. 1160-1164, 2001.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1160>

MCELTRONE, A. J.; SHERALD, J. L.; FORSETH, I. N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 419-430, January 2003.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erg046>

MEIDANIS, J.; BRAGA, M. D. V.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Whole-Genome Analysis of Transporters in the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 272–299, 2002.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.272-299.2002>

MENDES, J. S. et al. In vitro Determination of Extracellular Proteins from *Xylella fastidiosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-15, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02090>

MENG, Y. et al. Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven

Twitching Motility. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 5560–5567, August 2005.

<https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5560-5567.2005>

MERFA, M. V. et al. The MqsRA Toxin-Antitoxin System from *Xylella fastidiosa* Plays a Key Role in Bacterial Fitness, Pathogenicity, and Persister Cell Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00904>

MIRANDA, V. S. et al. Genetic characterization of *xylella fastidiosa* isolated from citrus and coffee plants. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 482-485, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0103-90162007000500005>

NASCIMENTO, R. et al. The Type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. **Scientific Reports**, v. 6, p. 18598, 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep18598>

NAUMOFF, D. G. et al. Retrieving sequences of enzymes experimentally characterized but erroneously annotated : the case of the putrescine carbamoyltransferase. **BMC Genomics**, v. 5, p. 52, 2004.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-52>

NETO, J. F. D. S. et al. The Single Extracytoplasmic-Function Sigma Factor of *Xylella fastidiosa* Is Involved in the Heat Shock Response and Presents an Unusual Regulatory Mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 551–560, 2007.

<https://doi.org/10.1128/JB.00986-06>

NETO, J. F. D. S. et al. Global gene expression under nitrogen starvation in *Xylella fastidiosa*: contribution of the σ_{54} regulon. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 231, 2010.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-231>

NEWMAN, K. L. et al. Cell–cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **PNAS**, v. 101, p. 1737–1742, 2004.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0308399100>

NEYEN, C.; LEMAITRE, B. Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. **Current Opinion in Immunology**, v. 38, p. 8–17, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.007>

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 593–656, 2003.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>

NOGAROTO, V. et al. Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, p. 187-193, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00348.x>

NOINAJ, N. et al. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 64, p. 43–60, 2010.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>

NOUWENS, A. S. et al. Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proteomics**, v. 2, p. 1325–1346, 2002.

[https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200209\)2:9<1325::AID-PROT1325>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200209)2:9<1325::AID-PROT1325>3.0.CO;2-4)

NUNES, L. R. et al. Microarray Analyses of *Xylella fastidiosa* Provide Evidence of Coordinated Transcription Control of Laterally Transferred Elements. **Genome Research**, v. 13, p. 570–578, 2003.

<https://doi.org/10.1101/gr.930803>

NUNNEY, L. et al. Population Genomic Analysis of a Bacterial Plant Pathogen: Novel Insight into the Origin of Pierce's Disease of Grapevine in the U.S. **Plos One**, v. 5, p. 1-9, November 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015488>

NUNNEY, L. et al. Population Genomic Analysis of a Bacterial Plant Pathogen: Novel Insight into the Origin of Pierce's Disease of Grapevine in the U.S. **Plos One**, v. 5, p. e15488, November 2010.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015488>

PAQUETTE, S. M.; BAK, S.; FEYEREISEN, R. Intron–Exon Organization and Phylogeny in a Large Superfamily, the Paralogous Cytochrome P450 Genes of *Arabidopsis thaliana*. **Dna and Cell Biology**, v. 19, p. 307–317, 2000.

<https://doi.org/10.1089/10445490050021221>

PATTERSON, S.; AEBERSOLD, R. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics Supplement**, v. 33, p. 311-323, 2003.

<https://doi.org/10.1038/ng1106>

PAULA, D. P. et al. Expression and purification of a putative H-NS nucleoid-associated protein from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 61–67, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00193-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00193-1)

PÉREZ-DONOSO, A. G. et al. Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and *Xylella fastidiosa*-Infected Grapevines. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1748–1759, March 2010.

<https://doi.org/10.1104/pp.109.148791>

PIGNOCCHI, C. et al. The Function of Ascorbate Oxidase in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1631–1641, 2003.

<https://doi.org/10.1104/pp.103.022798>

PIGNOCCHI, C.; FOYER, C. H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 379–389, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00069-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00069-4)

PIGNOCCHI, C. et al. Ascorbate Oxidase-Dependent Changes in the Redox State of the Apoplast Modulate Gene Transcript Accumulation Leading to Modified Hormone Signaling and Orchestration of Defense Processes in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 141, p. 423–435, June 2006.

<https://doi.org/10.1104/pp.106.078469>

PRUß, B. M. et al. A Complex Transcription Network Controls the Early Stages of Biofilm Development by Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 3731–3739, 2006.

<https://doi.org/10.1128/JB.01780-05>

PURCELL, A. H.; FINLAY, A. H.; MCLEAN, D. L. Pierce's Disease Bacterium: Mechanism of Transmission by Leafhopper Vectors. **Science**, v. 206, p. 839–841, November 1979.

<https://doi.org/10.1126/science.206.4420.839>

PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. FASTIDIOUS XYLEM-LIMITED BACTERIAL PLANT PATHOGENS. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 34, p. 131–151, 1996.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.131>

QIAN, W. et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen Xanthomonas campestris pv. campestris. **Genome Research**, v. 15, p. 757–767, 2005.

<https://doi.org/10.1101/gr.3378705>

QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1239–1260, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.013>

RAFFAELE, S. et al. Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of Phytophthora infestans. **BMC Genomics**, v. 11, p. 637, 2010.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-637>

RAJU, B. C.; WELLS, J. M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. **Plant Disease**, v. 70, p. 182-186, 1986.

<https://doi.org/10.1094/PD-70-182>

RAPICAVOLI, J. N. et al. O Antigen Modulates Insect Vector Acquisition of the Bacterial Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 8145-8154, 2015.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02383-15>

REDAK, R. A. et al. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Reviews Entomology**, v. 49, p. 243-270, 2004.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123403>

RINALDI, F. C.; MEZA, A. N.; GUIMARÃES, B. G. Structural and Biochemical Characterization of *Xylella fastidiosa* DsbA Family Members: New Insights into the Enzyme-Substrate Interaction. **Biochemistry**, v. 48, p. 3508–3518, 2009.

<https://doi.org/10.1021/bi801899x>

ROBERTS, I. M. Hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl Butyrate: A Convenient and Sensitive Fluorescent Assay for Lipase Activity. **Lipids**, v. 20, p. 243–247, 1985.

<https://doi.org/10.1007/BF02534195>

ROPER, M. C. et al. *Xylella fastidiosa* Requires Polygalacturonase for Colonization and Pathogenicity in *Vitis vinifera* Grapevines. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 411–419, 2007.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0411>

RYAN, R. P.; DOW, J. M. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 145-152, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.12.003>

SALEKDEH, G. H. et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, v. 2, p. 1131–1145, 2002.

[https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200209\)2:9<1131::AID-PROT1131>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200209)2:9<1131::AID-PROT1131>3.0.CO;2-1)

SANTANA, Wesley Oliveira de. **Genômica comparativa de *Xylella fastidiosa*: diversidade do pangenoma e análise de genes de patogenicidade**. 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/T.46.2013.tde-10062013-105859. Acesso em: 2017-06-26.

<https://doi.org/10.11606/T.46.2013.tde-10062013-105859>

SANTIAGO, A. D. S. et al. The Antitoxin Protein of a Toxin-Antitoxin System from *Xylella fastidiosa* Is Secreted via Outer Membrane Vesicles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02030>

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1140–1154, February 2002.

<https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>

SESHASAYEE, A. S. N.; FRASER, G. M.; LUSCOMBE, N. M. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 5970–5981, 2010.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkq382>

SHALL, K. C. M.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the Initial Events in the Sorption. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

<https://doi.org/10.1099/00221287-68-3-337>

SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, p. 123-137, 1987.

[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90008-X)

SHI, X. Y. et al. Characterization of Regulatory Pathways in *Xylella fastidiosa*: Genes and Phenotypes Controlled by algU. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6748–6756, 2007.

<https://doi.org/10.1128/AEM.01232-07>

SIDHU, V. K. et al. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1-16, 2008.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-87>

SILVA, F. R. D. et al. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 165-171, 2001.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10836.x>

SILVA, M. S. et al. Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. **Proteome Science**, v. 9, p. 1-10, 2011.

<https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-58>

SILVA, V. S. D. et al. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. **BMC Genomics**, v. 8, p. 474, 2007.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-474>

SIMPSON, J. G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella*

fastidiosa. **Nature**, v. 406, p. 151-157, July 2000.

<https://doi.org/10.1038/35018003>

SLOCUM, R. D. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 729–745, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.06.007>

SMOLKA, M. B. et al. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics**, v. 3, p. 224–237, 2003.

<https://doi.org/10.1002/pmic.200390031>

SOUZA, A. A. D. et al. Analysis of Gene Expression in Two Growth States of *Xylella fastidiosa* and Its Relationship with Pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 867–875, 2003.

<https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.867>

SOUZA, A. A. D. et al. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 341–353, 2004.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09716.x>

SOUZA, A. A. D. et al. Expression of Pathogenicity-Related Genes of *Xylella fastidiosa* In Vitro and In Planta. **Current Microbiology**, v. 50, p. 223–228, 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00284-004-4447-8>

SOUZA, A. A. D. et al. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 965-971, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000500024>

SPYROPOULOU, E. A.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters. **BMC Genomics**, v. 15, p. 402, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-402>

STONER, W. N. A Comparison between Grape Degeneration in Florida and Pierce's Disease in California. **The Florida Entomologist**, v. 35, p. 62-68, 1952.

<https://doi.org/10.2307/3492278>

TAMIR-ARIEL, D. et al. A secreted lipolytic enzyme from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is expressed in planta and contributes to its virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 556-567, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00771.x>

TEROL, J. et al. An RNA-Seq-based reference transcriptome for Citrus. **Plant**

Biotechnology Journal, v. 14, p. 938–950, 2016.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12447>

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 420–430, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00111-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00111-3)

TOLEDO, M. A. S. et al. Characterization of an oxidative stress response regulator, homologous to Escherichia coli OxyR, from the phytopathogen Xylella fastidiosa. **Protein Expression and Purification**, v. 75, p. 204–210, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.004>

TORRES, P. S. et al. Controlled synthesis of the DSF cell–cell signal is required for biofilm formation and virulence in Xanthomonas campestris. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 2101–2109, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01332.x>

TRAINI, M. et al. Towards an automated approach for protein identification in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 19, p. 1941–1949, 1998.

<https://doi.org/10.1002/elps.1150191112>

TRAVENSOLO, R. F. et al. Cloning, expression, purification and characterization of recombinant glutathione-S-transferase from Xylella fastidiosa. **Protein Expression and Purification**, v. 59, p. 153–160, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.01.017>

TRAVENSOLO, R. F. et al. Xylella fastidiosa gene expression analysis by DNA microarrays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 340–353, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000038>

TSENG, T.-T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–9, 2009.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-S1-S2>

TULLIO, M. C. D.; LISO, R.; ARRIGONI, O. Ascorbic acid oxidase: an enzyme in search of a role. **BIOLOGIA PLANTARUM**, v. 48, p. 161–166, 2004.

<https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033439.34635.a6>

VAN SLUYS, M. A. et al. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of Xylella fastidiosa. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 1018–1026, February 2003.

<https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1018-1026.2003>

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis**,

v. 9, p. 113–148, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00107-1)

VIVIAN, J. P. et al. Structure and Function of the Oxidoreductase DsbA1 from *Neisseria meningitidis*. **J. Mol. Biol.**, v. 394, p. 931–943, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.065>

VOEGEL, T. M. et al. Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* haemagglutinin adhesins. **Microbiology**, v. 156, p. 2172–2179, 2010.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.037564-0>

VOIGT, C. A.; SCHAFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **The Plant Journal**, v. 42, p. 364–375, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02377.x>

WATT, S. A. et al. Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. **Proteomics**, v. 5, p. 153–167, 2005.

<https://doi.org/10.1002/pmic.200400905>

WEBB-ROBERTSON, B. et al. A Review, Evaluation, and Discussion of the Challenges of Missing Value Imputation for Mass Spectrometry-based Label-free Global Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 14, p. 1993–2001, 2015.

<https://doi.org/10.1021/pr501138h>

WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 53, p. 155–187, 1999.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.155>

WELLS, J. M. et al. *Xylella fastidiosa* gen. nov. , sp. nov: Gram-Negative, Xylem Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 136–143 , April 1987.

<https://doi.org/10.1099/00207713-37-2-136>

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem J**, v. 322, p. 681–692, 1997.

<https://doi.org/10.1042/bj3220681>

WU, Y.-Y. et al. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of XC847, a 3'-5' oligoribonuclease from *Xanthomonas campestris*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 61, p. 902–905, 2005.

<https://doi.org/10.1107/S1744309105027132>

YAN, Z. et al. Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system. **Nature structural & molecular biology**, v. 2, p. 177–183,

February 2017.

<https://doi.org/10.1038/nsmb.3350>

YANG, L. et al. Proteomic analysis of grapevine stem in response to *Xylella fastidiosa* inoculation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, p. 90-99, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.11.002>

ZAINI, P. A. et al. The Iron Stimulon of *Xylella fastidiosa* Includes Genes for Type IV Pilus and Colicin V-Like Bacteriocins. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2368–2378, 2008.

<https://doi.org/10.1128/JB.01495-07>

ZHANG, H. et al. Mechanisms of Plant Salt Response: Insights from Proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 49–67, 2012.

<https://doi.org/10.1021/pr200861w>

ZHANG, S. et al. The *Xylella fastidiosa* Biocontrol Strain EB92-1 Genome Is Very Similar and Syntenic to Pierce's Disease Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 5576–5577, 2011.

<https://doi.org/10.1128/JB.05430-11>

ZHANG, S. et al. Three New Pierce's Disease Pathogenicity Effectors Identified Using *Xylella fastidiosa* Biocontrol Strain EB92-1. **PLOS ONE**, v. 10, p. e0133796, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133796>

ZRENNER, R. et al. Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 805–36, 2006.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105421>