

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**OSÉIAS RODRIGUES FEITOSA JUNIOR**

**CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE CEPAS DE *Xylella fastidiosa***

Versão original da Tese corrigida

São Paulo

Data de Depósito na SPG: **25/09/2017**

OSÉIAS RODRIGUES FEITOSA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE CEPAS DE *Xylella fastidiosa***

Tese apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências, área Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo  
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F311c Feitosa-Junior, Oséias Rodrigues  
Caracterização do secretoma de cepas de *Xylella fastidiosa* / Oséias Rodrigues Feitosa-Junior. - São Paulo, 2017.  
146 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: da Silva, Aline Maria

1. Fitopatógeno: *Xylella fastidiosa*. 2. Clorose Variegada dos Citros/Doença de Pierce. 3. Secretoma. 4. Vesículas de membrana externa. 5. Fator de Sinalização Difusível. I. T. II. da Silva, Aline Maria, orientador.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

# "Caracterização do secretoma de cepas de *Xylella fastidiosa*"

**OSÉIAS RODRIGUES FEITOSA JUNIOR**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

---

Profa. Dra. Aline Maria da Silva  
(Orientadora e Presidente)

---

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini  
IQ - USP

---

Profa. Dra. Flavia Vischi Winck  
IQ – USP

---

Profa. Dra. Andrea Balan Fernandes  
ICB – USP

---

Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro  
FCAV – UNESP - Jaboticabal

SÃO PAULO  
26 de outubro de 2017

*À minha família, à Natalie e aos meus amigos, sem os  
quais não haveria momentos felizes.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, excelso criador, que tem permitido, na sua infinita soberania, que eu alcance este momento.

À Professora Aline Maria da Silva por tantos anos de aprendizado, convívio, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por toda relação profissional e de caráter humano que desenvolvemos e incentivo durante meu período de doutorado.

Ao Doutor Paulo Zaini, pelo apoio e orientação no desenvolvimento de inúmeros experimentos e por grande auxílio no decorrer do doutorado.

Ao amigo Wesley Santana por ser influência e motivação nos primeiros anos de laboratório e, por consequência, neste doutorado. Ao amigo Paulo Pierry pela parceria neste trabalho, pela companhia durante esses cinco anos e pela especial ajuda em vários experimentos. Aos amigos Dr. Deibs Barbosa e Dr. Joaquim Martins Junior, pelo apoio nas análises *in silico*. Aos compadres Ana Paula Souza e João Batista do Nascimento pelo auxílio mútuo na vida no laboratório, pelo convívio no Instituto de Química, pelas horas de estudo em diversas disciplinas nos Institutos da Universidade de São Paulo, pelas muitas horas de almoços compartilhadas nos restaurantes universitários.

Aos demais colegas de laboratório Fernando Tria, Rodrigo Duarte, Gustavo Chaves, Luciana Principal, Roberta Verciano, Raquel Riyuzo, Deyvid Amgarten e Ítalo Sudré Pereira pela amizade e ajuda em alguns experimentos. Aos técnicos de laboratório Alexandre Sanchez, grande amigo, e Dóris Araújo, pelos imprescindíveis serviços prestados.

Ao Professor Steven Lindow por ter me recebido durante um ano no seu laboratório na Universidade da Califórnia em Berkeley e pelos valiosos ensinamentos que me dispensou por meio de sua experiência. Às doutoras Clelia Baccari, Elena Antonova e Cinzia Strano por me auxiliarem na adaptação a um novo laboratório, ajuda em diversos experimentos e por permitirem minha evolução como pesquisador. À técnica Renee Koustoukis, aos colegas Tyler Helmann, Monica Hernandez e à doutora Despoina Lymperopoulou por ajudas em experimentos, conversas e por momentos de descontração no Lindow Lab.

Ao Doutor Trent Northen pela sua co-supervisão na minha temporada na Califórnia, por ter me recebido durante um ano no seu laboratório no Joint Genome Institute (Walnut Creek, Califórnia), por ter tido acesso a técnicas extremamente avançadas e pelo estilo dinâmico com a qual realiza suas orientações. À doutora Andrea Lubbe pela constante atenção, orientação e participação em todos os experimentos de

metabolômica realizados no meu período sanduíche no Joint Genome Institute. Aos colegas Benjamin Bowen, Katherine Louie, Stefan Jenkins, Suzie Kosina, Markus de Raad, Jian Gao por auxílio em diferentes experimentos, cessão de materiais, ensino de técnicas e cooperação na análise de dados obtidos no Northern Lab no Joint Genome Institute.

Aos Professores Rafael Nascimento e Abhaya M. Dandekar pelo crucial auxílio nos experimentos e análises proteômicas na *facility* da Universidade da Califórnia em Davis.

À Professora Sayuri Miyamoto e à Dra. Priscilla Cruz Derogis pelo importante auxílio nas análises de DSF em HPLC e GCMS.

Ao Professor Pio Colepicolo e ao Doutor Eliezer Stefanello, pelo apoio e execução nos experimentos de metabolômica de vesículas.

À Dra. Vilma Martins do Centro do Câncer A. C. Camargo por disponibilizar o equipamento *Nanosight* para nossas análises de contagens de nanopartículas.

À Dra. Layla Farage, que com muita paciência me passou os primeiros ensinamentos no laboratório, pelo apoio no sequenciamento de transcritomas realizado no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG) do IQ-USP.

Aos demais colegas de pós-graduação do IQUSP pela troca de experiências e disposição e colaborações diversas. A todos os professores que pude ter contato em disciplinas e seminários, dentro e fora do IQ-USP, pelos valiosos ensinamentos. Aos demais funcionários do IQ-USP por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho e pelos serviços prestados.

Aos meus amigos de fora da USP, incluindo meu grande amigo Leonel Dias, por todo o apoio e interesse durante o período de meu doutorado. À comunidade da Igreja Presbiteriana do Butantã e às amigas feitas na Casa do Estudante por terem me concedido um ambiente familiar para morar durante boa parte do doutorado.

Às amigas conquistadas na fraternidade Alpha Gamma Omega, principalmente a Alejandro Rodrigues e Hizkia Harto, que me trataram sempre como um irmão durante meu período de doutorado sanduíche. Aos amigos da Reformed University Fellowship, incluindo minha grande amiga Shelly Johnson por me auxiliar na adaptação aos EUA.

Aos meus pais, Oséias Feitosa e Eunice Feitosa, à minha namorada Natalie e meus familiares por apoiarem toda a minha trajetória na realização deste sonho.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e NUBIC/USP pelo apoio financeiro ao nosso laboratório.

À CAPES pela bolsa de Doutorado Direto e Dourado Sanduíche.

No deserto, o Rei Lear pergunta a Gloucester: "Como você vê o mundo?".  
E Gloucester, que é cego, responde: "Eu o vejo com todo o meu sentimento".

Shakespeare

## RESUMO

Feitosa-Junior, Oséias Rodrigues. Caracterização do secretoma de cepas de *Xylella fastidiosa*. 2017. 143 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As doenças causadas pelo fitopatógeno *Xylella fastidiosa*, uma bactéria Gram-negativa, devem-se aos seus múltiplos fatores de virulência, tais como formação de biofilme, secreção de enzimas de degradação da parede celular do xilema (CWDE), expressão de proteínas de adesão e produção de vesículas de membrana externa (OMVs). Esses fatores de virulência são controlados por uma via de sinalização mediada por DSF (fatores de sinalização difusíveis de natureza lipídica) e relacionada com percepção de quórum. Nesse trabalho, tivemos como objetivo ampliar a caracterização do secretoma de cepas selvagens e mutantes de *X. fastidiosa* para evidenciar proteínas e metabólitos potencialmente associados à adaptação ao hospedeiro, virulência e patogenicidade. Desenvolvemos, paralelamente, três estudos empregando como abordagens metodológicas a proteômica, a metabolômica e a transcritômica. No primeiro estudo, comparamos o secretoma (exoproteoma) da cepa Temecula1 selvagem (WT) e do mutante no gene da sintase de DSF ( $\Delta rpfF$ ), o qual exibe fenótipo de hipervirulência em videiras. A este estudo associamos a comparação dos transcritomas dessas cepas. Os resultados mostraram que, mesmo no cultivo *in vitro*, *X. fastidiosa* expressa e secreta fatores de virulência previamente conhecidos (lipases-esterases e proteases), além de toxinas (microcinas) que, supostamente, teriam papel de controlar bactérias competidoras pelo mesmo nicho. No segundo estudo caracterizamos a composição de OMVs secretadas no cultivo *in vitro* por *X. fastidiosa* Fb7 e 9a5c (cepas isoladas de laranjeiras) e Temecula1 (cepa isolada de videira). Demonstramos que Fb7 produz até 57% mais OMVs que 9a5c e Temecula1 e identificamos um total de 202 proteínas distintas nas OMVs produzidas pelas 3 cepas, ampliando consideravelmente o número de proteínas secretadas por meio de OMVs descrito, até então, para *X. fastidiosa*. Entre as proteínas enriquecidas, citamos adesinas afimbriais, porinas, lipoproteínas, hidrolases (lipases/esterases, proteases e peptidases) e uma pectina-liase putativa. Destacamos a detecção da enzima L-ascorbato oxidase nas OMVs e sugerimos que esta enzima poderia atuar na depleção do ascorbato produzido pelo hospedeiro vegetal. Além disso, demonstramos, pela primeira vez, que OMVs de *X. fastidiosa* transportam ácidos graxos da família DSF, sugerindo um papel adicional para OMVs nesse fitopatógeno. Finalmente, no terceiro estudo verificamos alterações relevantes no perfil de metabólitos secretados por *X. fastidiosa* em resposta a sua interação com metabólitos secretados por *Burkholderia phytofirmans*, proposta como uma cepa para o biocontrole da doença de Pierce de videiras. Confirmamos que o sobrenadante de *B. phytofirmans* possui um composto de natureza apolar que induz a formação de biofilme em *X. fastidiosa*, contudo ainda não foi possível decifrar a natureza química deste composto.

**Palavras chave:** fitopatógeno; *Xylella fastidiosa*; Clorose Variegada dos Citros; Doença de Pierce; Vesículas de membrana externa; Secretoma; Fator de sinalização difusível

## ABSTRACT

Feitosa-Junior, Oséias Rodrigues. Characterization of the secretome *Xylella fastidiosa* strains. 2017. 143 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo.

The diseases caused by the phytopathogen *Xylella fastidiosa*, a Gram-negative bacterium, are due to multiple virulence factors, such as biofilm formation, secretion of xylem cell wall degradation enzymes (CWDE), expression of adhesion proteins and production of outer membrane vesicles (OMVs). These virulence factors are controlled by a DSF (diffusible signaling factors of a lipidic nature) mediating signaling pathway and related to quorum sensing perception. In this work, we aimed to extend the characterization of the secretoma of wild type and mutants strains of *X. fastidiosa* to uncover proteins and metabolites potentially associated to host adaptation, virulence and pathogenicity. We developed three studies in parallel using proteomics, metabolomics and transcriptomics as methodological approaches. In the first study, we compared the secretome (exoproteome) of the wild type strain Temecula1 (WT) and of DSF synthase mutant ( $\Delta rpfF$ ) which exhibits hypervirulence phenotype in grapevines. We also compared the transcriptomes of these strains. Our results showed that, even in *in vitro* culture, *X. fastidiosa* expresses and secretes previously known virulence factors (lipases-esterases and proteases), as well as toxins (microcins) that might play a role in controlling competing bacteria in the same niche. In the second study, we characterized the composition of OMVs secreted by *in vitro* cultures of *X. fastidiosa* Fb7 and 9a5c (strains isolated from orange trees) and Temecula1 (strain isolated from grapevine). We have shown that Fb7 produces up to 57% more OMVs than the 9a5c and Temecula1. Moreover we identified a total of 202 distinct proteins in the OMVs produced by these three strains, increasing considerably the number of OMVs secreted proteins so far described for *X. fastidiosa*. Among the proteins enriched in OMVs, we point out afimbrial adhesins, porins, lipoproteins, hydrolases (lipases/esterases, proteases and peptidases) and a putative pectin-lyase. We highlight the detection of the enzyme L-ascorbate oxidase in the OMVs and we suggest that this enzyme could act in the depletion of ascorbate produced by the plant host. In addition, we have demonstrated, for the first time, that *X. fastidiosa* OMVs transport fatty acids from the DSF family, suggesting an additional role for OMVs in this phytopathogen. Finally, in the third study we verified relevant changes in the profile of metabolites secreted by *X. fastidiosa* in response to the interaction with metabolites secreted by *Burkholderia phytofirmans* that has been suggested as a biocontrol strain for Pierce's disease in grapevines. We confirm that the *B. phytofirmans* supernatant has a non-polar compound that induces biofilm formation in *X. fastidiosa*, but it has not yet been possible to elucidate the chemical nature of this compound.

**Keywords:** phytopathogen; *Xylella fastidiosa*; Citrus Variegated Chlorosis; Pierce's Disease, Outer membrane vesicles; Secretome; Diffusible signaling factor

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: <i>ATP binding protein</i>	GO: <i>gene ontology</i>
Abs: absorvância	IMG/M ER: <i>Integrated Microbial Genomes-Expert Review</i>
AcEt/EtAc: acetato de etila	IAA: iodoacetoamida
ACN: acetonitrila	IM/MI: <i>inner membrane</i>
AIB: ácido $\alpha$ -amino-isobutírico	I-OMV: <i>outer-inner membrane vesicle</i>
ALS: escaldadura da folha de amendoeira	KEGG: <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
ATP: adenosina trifosfato	LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
BCYE: <i>buffered charcoal yeast extract</i>	LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	LPS: lipopolissacarídeo
BSA: albumina de soro bovino	MeOH: Metanol
CATG: Centro Avançado de Tecnologias em Genômica, IQ-USP	MEV: microscopia eletrônica de varredura
c-di-GMP: monofosfato cíclico de di-guanosina	MPS: <i>multipurpose sampler</i>
cAMP: monofosfato cíclico de adenosina	mRNA: RNA mensageiro
CCD: <i>charge-coupled device</i>	MS: espectrometria de massas
cDNA: DNA complementar	NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
CDS: sequência codificadora	ncRNA: RNA não-codificador
Clp: <i>cAMP receptor-like protein</i>	NTA: <i>nanoparticle tracking analysis</i>
CLS: escaldadura da folha de cafeeiro	análise de rastreamento de nanopartículas
cRAP: <i>common Repository of Adventitious Proteins</i>	OM/ME: <i>outer membrane</i>
CVC: clorose variegada dos citros	OMP: <i>outer membrane protein</i>
CWDE: enzima degradadora de parede celular	OMV: <i>outer membrane vesicle</i> , vesícula de membrana externa
DEPC: dicarbonato de dietila	OQDS: síndrome do rápido declínio das oliveiras
DNA: ácido desoxirribonucleico	padj: Pvalor ajustado
DNase: desoxirribonuclease	pb: pares de base
dNTP: desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato	PBS: <i>phosphate-buffered saline</i>
DO: densidade ótica	PCoA: análise de coordenadas principais
DRS: <i>direct RNA sequencing</i>	PCR: reação em cadeia da polimerase
DSF: <i>diffusible signaling factor</i> , fator de sinalização difusível	PD: doença de Pierce
DEseq2: <i>Differential expression analysis for sequence count data 2</i>	PE: paired-end
DTT: Ditioneitol	Pp: Periplasma
DUF: <i>domain of unknown function</i>	PW: Periwinkle Wilt
EDTA: ácido etilendiaminotetracético	qPCR: PCR quantitativo
EFSA: European Food Safety Authority	RBS: <i>ribosome binding site</i>
EPS: exopolissacarídeo	RIN: <i>RNA Integrity Number</i>
ESTs: <i>expressed sequence tags</i>	RLK: quinases do tipo receptor
FDR: <i>False discovery rate</i>	RLP: proteínas do tipo receptor
FPKM: <i>fragments per kilobase transcript per million mapped reads</i>	RNA: ácido ribonucleico
FT: fração não adsorvida à coluna	RNAP: RNA polimerase
FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura	RNase: ribonuclease
GC: cromatografia gasosa	RNaseq: <i>RNA sequencing</i>
GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	Rpf: <i>regulation of pathogenicity factors</i>
	rpm: rotações por minuto
	rRNA: RNA ribossomal

RT-qPCR: PCR quantitativa em tempo real  
RTX: *repeats-in-toxin*  
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa  
SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*  
Sec: *general secretory pathway*  
Tat: *twin arginine translocation pathway*  
TCA: ácido tricloroacético  
TE: tampão Tris contendo EDTA  
TF: fator de transcrição  
Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano  
T0SS: *type 0 secretion system*

T1SS: *type 1 secretion system*  
T2SS: *type 2 secretion system*  
T3SS: *type 3 secretion system*  
T4SS: *type 4 secretion system*  
T5SS: *type 5 secretion system*  
T6SS: *type 6 secretion system*  
T7SS: *type 7 secretion system*  
T8SS: *type 8 secretion system*  
T9SS: *type 9 secretion system*  
UFC: unidades formadoras de colônia  
UFP: *unknown function protein*  
UV: ultravioleta  
WT: *wild type*, cepa selvagem

# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>14</b>
1.1. Secretoma de bactérias e seu papel na virulência e patogenicidade .....	14
1.1.1. Vesículas de Membrana Externa (OMV) .....	17
1.2. O fitopatógeno <i>Xylella fastidiosa</i> .....	20
1.2.1. Fatores de virulência e patogenicidade de <i>X. fastidiosa</i> .....	22
1.2.2. Sinalização celular mediada por DSF em <i>X. fastidiosa</i> .....	25
1.2.3. Proteoma e Secretoma de <i>X. fastidiosa</i> .....	31
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>34</b>
<b>3. Procedimentos Experimentais</b> .....	<b>35</b>
3.1. Manutenção e cultivo de bactérias .....	35
3.2. Contagem de unidades formadoras de colônia .....	36
3.3. Ensaio de viabilidade celular “live and dead” .....	36
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	37
3.5. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) .....	37
3.6. Isolamento de vesículas de membrana externa (OMVs) de <i>X. fastidiosa</i> .....	38
3.7. Preparação de extrato proteico de sobrenadantes de cultivos de <i>X. fastidiosa</i> .....	38
3.8. Dosagem de proteínas por Bradford .....	39
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) .....	39
3.10. Transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e imunodeteção de proteínas .....	40
3.9. Análise proteômica shotgun .....	40
3.10. Análise de metabólitos das OMVs por espectrometria de massas .....	42
3.11. Análise de ácidos graxos no sobrenadante de cultivos de <i>X. fastidiosa</i> por cromatografia gasosa (GC) .....	42
3.12. Análise de ácidos graxos no sobrenadante de cultivos de <i>X. fastidiosa</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) .....	43
3.13. Ensaio de formação de biofilme em <i>X. fastidiosa</i> com adição de extratos apolares do sobrenadante de cultivos de <i>B. phytofirmans</i> PsJN .....	44
3.14. Análise de metabólitos do sobrenadante de cultivos de <i>X. fastidiosa</i> por cromatografia líquida acoplada espectrometria de massa (LC-MS) .....	45
3.15. Análise do transcrito das cepas Temecula1 e $\Delta$ rpfF através de RNAseq .....	46
3.15.1. Purificação de RNA total .....	47
3.15.2. Preparação e quantificação de bibliotecas de cDNA para RNAseq .....	48
3.15.3. Sequenciamento de bibliotecas de cDNA no equipamento MiSeq .....	49

3.15.4. Análises dos dados de RNAseq.....	49
3.16. Análises bioinformáticas .....	50
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>51</b>
4.1. Análise do transcrito e do secretoma de <i>X. fastidiosa</i> , cepas Temecula selvagem (WT) e mutante $\Delta$ rpfF .....	51
4.1.1. Cultivo das cepas WT e $\Delta$ rpfF em meio PIM6.....	52
4.1.2. Obtenção dos transcritomas das cepas WT e $\Delta$ rpfF por RNAseq ..	55
4.1.3. Panorama dos transcritomas das cepas WT e $\Delta$ rpfF .....	58
4.1.4. Análise do secretoma de <i>Xylella fastidiosa</i> e sua integração com o transcrito .....	65
4.2. Caracterização da composição de OMVs secretadas por <i>X. fastidiosa</i> .....	70
4.2.1. Quantificação da secreção de OMVs .....	71
4.2.2. Análise de OMVs purificadas a partir do cultivo in vitro .....	73
4.2.3. Proteoma das OMVs.....	76
4.2.4. Perfil de metabólitos das OMVs .....	92
4.2.5. Modelo de sinalização mediado por OMVs em <i>X. fastidiosa</i> .....	100
4.3. Análise de metabólitos secretados por <i>X. fastidiosa</i> na interação com <i>Burkholderia phytofirmans</i> .....	105
4.3.1. Análise da produção de XfDSF em meio PD3.....	105
4.3.2. Efeito do sobrenadante de <i>B. phytofirmans</i> no biofilme de <i>X. fastidiosa</i> .....	108
4.3.3. Efeito do sobrenadante de <i>B. phytofirmans</i> no exometaboloma em <i>X. fastidiosa</i> .....	110
4.3.4. Efeito do sobrenadante de <i>B. phytofirmans</i> no perfil de abundância de metabólitos do exometaboloma de <i>X. fastidiosa</i> .....	115
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>121</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>124</b>
<b>Súmula curricular .....</b>	<b>145</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Secretoma de bactérias e seu papel na virulência e patogenicidade

Ao conjunto de proteínas que realizam funções em momentos e locais específicos na célula, e que podem estar associadas fisicamente ou funcionalmente, dá-se o nome de proteoma. A caracterização de proteomas em “escala genômica”, a proteômica, é uma abordagem cada vez mais difundida, refletindo tanto o extraordinário aumento de sequências genômicas disponíveis como a modernização dos métodos de detecção e quantificação de proteínas (Jungblut e Wittmann-Liebold, 1995; Aebersold e Mann, 2016).

Por sua vez, o repertório dos metabólitos (moléculas de massa molecular menor do que 1 kDa) de células, tecidos e organismos constitui o metaboloma. Metabólitos são os produtos finais da atividade de genes e proteínas, e podem ser substratos, produtos ou cofatores das reações bioquímicas além de poderem conectar diferentes vias metabólicas. Análises de metabolomas em “escala genômica”, a metabolômica, possibilitam a caracterização detalhada e precisa de fenótipos bem como a sua relação direta com os respectivos genótipos (Fiehn, 2002; Villas-Boas *et al.*, 2005a; Villas-Boas *et al.*, 2005b; Kell e Oliver, 2016a).

As proteínas secretadas de uma célula, tecido ou organismo compõem o exoproteoma, que é frequentemente referido como secretoma (Hathout, 2007; Mukherjee e Mani, 2013). Porém, em um conceito mais amplo, o secretoma também poderia englobar, além das proteínas, os metabólitos secretados pelas células (exometaboloma) (Lippmann *et al.*, 2009; Demuyser *et al.*, 2014). A elucidação do secretoma é particularmente importante na compreensão da interação dos microrganismos, em especial os patógenos, com seus hospedeiros e com demais microrganismos coexistentes num dado nicho (Lei *et al.*, 2000; Smolka *et al.*, 2003; Ghosh, 2004b; Gottig *et al.*, 2009; Perez-Llarena e Bou, 2016; Armengaud e Duport, 2017).

São diversas as funções desempenhadas pelas proteínas secretadas, tais como provisão de nutrientes, comunicação célula-célula, destoxificação do meio e a inibição de potenciais organismos competidores. Além disso, várias proteínas extracelulares de bactérias patogênicas têm papel crítico na virulência e patogenicidade (Jungblut e Wittmann-Liebold, 1995; Lei *et al.*, 2000; Rosenkrands *et al.*, 2000; Smolka *et al.*, 2003; Ghosh, 2004a; Gottig *et al.*, 2009; Perez-Llarena e Bou, 2016; Armengaud e Duport, 2017). Além disso, metabólitos secretados por patógenos – por exemplo, sideróforos para aquisição de ferro – são essenciais para garantir sua sobrevivência além de interferirem diretamente na resposta ao hospedeiro (Goetz *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2014). O sucesso da infecção e colonização eficiente do

hospedeiro, tanto de patógenos de animais como de fitopatógenos, depende de um repertório de fatores de virulência, que incluem efetores proteicos, adesinas, polissacarídeos, sideróforos, toxinas, antibióticos e enzimas de degradação da parede celular, que são secretados para fora da célula ou translocados diretamente para o citoplasma de uma célula alvo eucariótica ou procariótica (Chen, 2014; Green e Meccas, 2016).

São conhecidos sistemas de secreção tanto gerais como especializados, pelos quais as bactérias translocam, transportam, exportam ou secretam proteínas. Estes sistemas de secreção são melhor compreendidos em bactérias Gram-negativas (Dalbey e Kuhn, 2000; Muller e Klosgen, 2005; Preston *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Saier, 2006; De Buck *et al.*, 2008; Green e Meccas, 2016; Lasica *et al.*, 2017).

A via de secreção geral (*Sec, general secretory pathway*) e a via de translocação dependente de dupla argininas (*Tat, twin arginine translocation pathway*) são sistemas muito conservados evolutivamente e amplamente utilizados para a translocação de proteínas através da membrana citoplasmática de células procarióticas (Natale *et al.*, 2008). De modo geral, as proteínas translocadas pelas vias Sec e Tat podem permanecer associadas às células, no periplasma ou na membrana interna, ou exportadas para fora da célula com o auxílio de outros sistemas de secreção (Green e Meccas, 2016). As proteínas alvo do sistema Sec, possuem uma sequência N-terminal de aproximadamente 20 aminoácidos com caráter hidrofóbico que é denominada peptídeo sinal, o qual é vizinho a um sítio de clivagem proteolítica. O peptídeo sinal é reconhecido por uma das proteínas do sistema Sec, em seguida a proteína é encaminhada para o complexo Sec localizado na membrana citoplasmática, o peptídeo sinal é clivado por uma peptidase e a proteína processada e desnaturada é translocada para o periplasma, onde retoma seu dobramento original (Economou, 1999; Green e Meccas, 2016). As proteínas secretadas pelo sistema Tat possuem uma sequência sinal que contém um par de argininas no N-terminal e, diferentemente da via Sec, são translocadas mantendo seu dobramento original. Tanto o sistema Sec como o sistema Tat são importantes para a fisiologia e sobrevivência de bactérias patogênicas e não-patogênicas, além de serem responsáveis pela secreção de fatores de virulência em diferentes patógenos bacterianos (Green e Meccas, 2016).

As bactérias Gram-negativas dispõem de diferentes sistemas de secreção especializados, os quais são numerados de I a IX (Abby *et al.*, 2016; de Diego *et al.*, 2016; Green e Meccas, 2016; Lasica *et al.*, 2017). Sistemas de secreção como os dos tipos II, V, VII e VIII, respectivamente, T2SS, T5SS, T7SS e T8SS, funcionam por meio de um mecanismo de dois passos: primeiramente as proteínas são translocadas para o espaço periplasmático através da membrana interna (IM) pelo sistema Sec ou Tat e, em seguida, são secretadas para meio externo através da membrana externa (OM), por meio de um desses sistemas,

cujos complexos proteicos formam canais que atravessam a OM (Henderson *et al.*, 2004; Korotkov *et al.*, 2012; de Diego *et al.*, 2016).

Há vasta literatura apontando a relevância do T2SS para patógenos bacterianos, uma vez que mutações em genes de componentes desse sistema resultam na diminuição da virulência (Rossier *et al.*, 2004; Paranjpye e Strom, 2005; Jha *et al.*, 2007; Chen, 2014; Green e Meccas, 2016). Substratos do T2SS, que via de regra possuem ação hidrolítica e promovem a degradação das células e de tecidos dos hospedeiros, estão presentes em patógenos de animais e de plantas (Riekki *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001; da Silva *et al.*, 2002; Tauschek *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003; Iwobi *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Rossier *et al.*, 2004; Sole *et al.*, 2015; Green e Meccas, 2016; Nascimento *et al.*, 2016).

Os substratos do T5SS diferem de outras proteínas secretadas, uma vez que independem de sistemas dedicados de secreção. Estes substratos são proteínas autotransportadoras, e, portanto, realizam sua própria secreção. Elas possuem em sua estrutura um domínio de barril- $\beta$ , o qual insere-se na OM e possibilita a secreção do restante da molécula. Autotransportadores do tipo T5SS, são primeiramente transportados para o periplasma via sistema Sec e, portanto, contém um peptídeo sinal característico (Leyton *et al.*, 2012; Green e Meccas, 2016).

Sistemas de secreção como os dos tipos I, III, IV e VI, respectivamente, T1SS, T3SS, T4SS e T6SS, são independentes dos sistemas Sec e Tat, sendo seus substratos proteicos secretados em uma única etapa diretamente no meio extracelular ou injetados na célula hospedeira. O T1SS assemelha-se aos transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*), que exportam pequenas moléculas, antibióticos e toxinas para fora da célula (Lubelski *et al.*, 2007) e são constituídos pelo transportador ABC localizado na IM, por uma proteína de fusão que atravessa a IM e conecta-se ao terceiro componente do sistema (ToIC), que é uma proteína localizada na OM. Os substratos do T1SS (por exemplo: proteases, lipases, adesinas e toxinas do tipo RTX) geralmente contém uma sequência C-terminal sinal que não é clivada (Thomas *et al.*, 2014; Green e Meccas, 2016).

T3SS, T4SS e T6SS são sistemas que possibilitam a translocação do substrato proteico intracelular diretamente para o citoplasma de uma célula alvo, eucariótica ou procariótica, dependendo do sistema de secreção (Chen, 2014; Green e Meccas, 2016). O T3SS é também referido como "*injectisome*" em razão da sua estrutura semelhante a uma seringa e agulha. A maior parte dos T3SSs transportam seus substratos, genericamente denominados de proteínas efetoras, através da membrana da célula eucariótica em uma única etapa. Os sinais de secreção via T3SS estão presentes na porção amino-terminal do substrato e não são clivados. Alguns patógenos podem secretar apenas alguns poucos efetores, como é o caso de *Pseudomonas* e *Yersinia*, ou dezenas como é o caso de *Shigella*, mas em todos

os casos a translocação de efetores do T3SS é essencial para virulência. Esse sistema é também muito frequente em fitopatógenos, onde é essencial para a virulência e na determinação de especificidade do hospedeiro vegetal. Muitos dos efetores do T3SS remodelam as funções celulares normais do hospedeiro, para melhor adaptação do patógeno ao nicho que ocupa (Ghosh, 2004a; McCann e Guttman, 2007; Kay e Bonas, 2009; Loquet *et al.*, 2012).

O T4SS é utilizado para translocação de DNA ou proteínas de bactérias para células receptoras. Esse sistema também tem papel central na patogenicidade de diversas bactérias, como *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* e *Legionella pneumophila* (Burns, 1999; Odenbreit *et al.*, 2000; Green e Mecsas, 2016). Em *Xanthomonas citri*, foi demonstrado que o T4SS tem a capacidade de secretar fatores que resultam na morte de espécies de bactérias Gram-negativas em uma maneira dependente de contato, e postula-se que tem um papel importante nas interações entre bactérias (Souza *et al.*, 2015).

O T9SS foi caracterizado apenas recentemente em algumas espécies do filo Bacteroidetes. As proteínas destinadas a secreção via T9SS possuem um domínio C-terminal conservado que as dirigem para o aparato de translocação localizado na OM. Após a translocação através da OM, o domínio C-terminal é clivado por uma protease e um lipopolissacarídeo (LPS) aniônico é ligado ao novo C-terminal, e dessa forma a proteína pode ser mantida associada à superfície celular ou secretada para o meio extracelular (de Diego *et al.*, 2016; Lasica *et al.*, 2017).

Entre os sistemas de secreção há que se incluir também as vesículas de membrana externa, um mecanismo amplamente difundido entre Gram-negativas e recentemente nomeado sistema de secreção do tipo zero (T0SS) (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017).

### **1.1.1. Vesículas de Membrana Externa (OMV)**

Vesículas de membrana externa (OMVs, *outer membrane vesicles*) de bactérias Gram-negativas são conhecidas desde 1967, quando foram descritas como “sacos de membrana” produzidos por *Vibrio cholerae*. Assim, por muitos anos essa ainda seria a visão majoritária deste sistema de secreção (Chatterjee e Das, 1967). Atualmente, as OMVs são descritas como nanopartículas com tamanho entre 30-300 nm que possuem alguma função característica e são produzidas por quase todas espécies de Gram-negativas.

O conteúdo das OMVs é bastante diverso e inclui proteínas periplasmáticas e citoplasmáticas, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS), DNA, RNA, enzimas e alguns metabólitos (Schwechheimer e Kuehn, 2015). As OMVs são consideradas como um tipo de sistema de secreção — T0SS (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017) — que contornaria a árdua

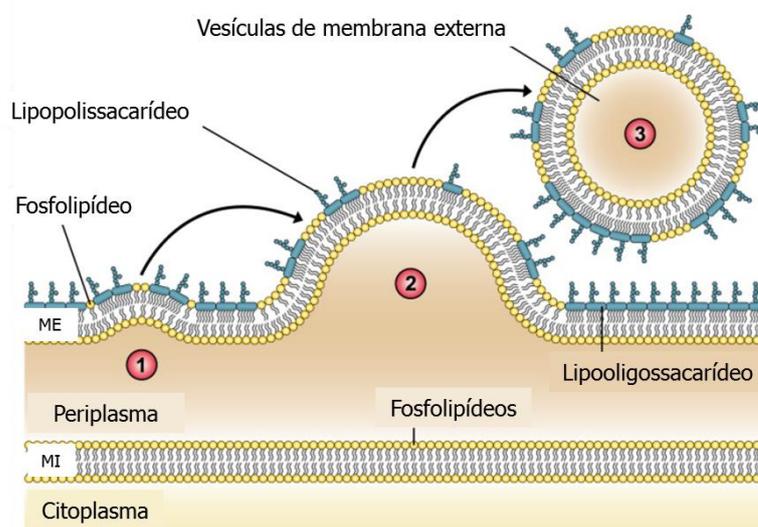
tarefa de secretar fatores de virulência através do envelope bacteriano que é composto por duas membranas lipídicas separadas por uma camada de peptidoglicano (Bos *et al.*, 2007). A composição da camada externa da OM, em boa parte das bactérias Gram-negativas, é basicamente de lipopolissacarídeos (LPS), por outro lado, ambas as camadas da membrana interna são formadas por fosfolipídeos. Entre as membranas interna e externa está o espaço periplasmático (de aproximadamente 13 nm de largura), que pode ocupar de 7 a 40% do volume celular e é composto por um conteúdo proteico viscoso (Koch *et al.*, 1998). Desta forma, as bactérias Gram-negativas desenvolveram um mecanismo para superar todas essas barreiras por meio de um sistema de secreção no qual parte do conteúdo periplasmático têm moléculas com atividade biológica envolvidas pela membrana externa bacteriana e estas, por sua vez, são liberadas como OMVs, que são nanopartículas esféricas (com diâmetro médio de ~50-250 nm) compostas pela membrana lipídica e um conteúdo luminal eletrodense, de acordo com a espécie bacteriana (Beveridge, 1999).

Por serem veículos de conteúdo encapsulado, diferente de outros sistemas de secreção, as OMVs podem carregar moléculas insolúveis. As OMVs podem também carrear proteínas solúveis juntamente com o conteúdo periplasmático ou aderidas a sua face externa. OMVs secretadas podem se disseminar longe das células produtoras e desempenhar funções importantes no ambiente e/ou para células mais distantes. Podem modular o início de doenças e atuar na comunicação célula-célula, na aquisição de nutrientes e na transferência horizontal de genes (Grenier e Mayrand, 1987; Mayrand e Grenier, 1989; Kolling e Matthews, 1999; Renelli *et al.*, 2004; Mashburn e Whiteley, 2005).

Além das OMVs, vesículas de membrana externa-e-interna (O-IMVs) foram recentemente descritas como um novo tipo de vesícula de membrana secretada. A primeira bactéria identificada produzindo este tipo de vesícula foi *Shewanella vesiculosa* M7T, isolada na Antártida. Contudo, demonstrou-se posteriormente que várias outras Gram-negativas patogênicas também produzem O-IMVs. Assim, essa descoberta é uma explicação para a presença de DNA, proteínas de membrana citoplasmática e do conteúdo citoplasmático em vesículas de membrana (Perez-Cruz *et al.*, 2015).

A busca por mecanismos de biogênese de OMVs, bem como novas funções para estas partículas têm se intensificado nos últimos anos. Em *E. coli*, a deleção do gene *ompT*, que codifica uma protease de membrana externa, desencadeia uma diminuição acentuada da biogênese de OMVs (e também um aumento do seu diâmetro). Inversamente, neste mesmo estudo constatou-se que a superexpressão de *ompT* aumenta de modo importante a biogênese das OMVs (com diminuição do seu teor lipídico e de proteínas e manutenção do seu diâmetro vesicular) (Premjani *et al.*, 2014). Em *Klebsiella pneumoniae*, Cahill *et al.* (2015) apontaram que os lipopolissacarídeos (LPS) na OM são responsáveis pela alteração do

empacotamento seletivo de proteínas das OMVs (Premjani *et al.*, 2014). Contudo, o mecanismo mais recente de biogênese de OMVs bacteriana é o descrito por Roier *et al.* (2016a), conforme ilustrado na Figura 1. Esse modelo, aparentemente conservado em bactérias Gram-negativas, é baseado no efeito do acúmulo de fosfolipídeos na face exterior da membrana externa. Especificamente, a diminuição da expressão dos genes *vacJ* e/ou *yrb* (relacionados ao transporte de fosfolipídeos para OM) teria como consequência o acúmulo de fosfolipídeos na face exterior da OM, com a formação de um abaulamento externo (Figura 1, etapas 1 e 2). Processos posteriores são responsáveis pela maturação e formação final das OMVs, que contariam com uma face exterior da membrana das OMVs enriquecidas por fosfolipídeos (Figura 1, etapa 3) (Roier *et al.*, 2016b).



**Figura 1. Gênese de OMVs em bactérias Gram-negativas.** (1) A diminuição da expressão ou deleção dos genes *vacJ* e/ou *yrb* resulta em acumulação de fosfolipídeos na camada exterior da membrana externa (ME). Esta expansão assimétrica na camada exterior inicia um abaulamento para fora da ME. (2) O enriquecimento com fosfolipídeos induzem a curvatura de ambas camadas com o brotamento na ME, que finalmente se comprime para formar uma OMV e (3) A OMV liberada é enriquecida em fosfolipídeos incorporados na camada externa da membrana da vesícula. MI: membrana interna. Esquema adaptado de (Roier *et al.*, 2016a; Roier *et al.*, 2016b).

Muitas bactérias patogênicas e não patogênicas já foram descritas como secretoras de OMVs, tais como *Escherichia coli* (Wai *et al.*, 1995; Balsalobre *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2011; Premjani *et al.*, 2014), *Shigella* (Camacho *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2012), *Neisseria* (Mirlashari *et al.*, 2002; Vida *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Bomberger *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 2010b; Choi *et al.*, 2011; Macdonald e Kuehn, 2013), *Helicobacter pylori* (Mullaney *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2010; Parker e Keenan, 2012; Turkina *et al.*, 2015), *Xanthomonas campestris* (Sidhu *et al.*, 2008; Sole *et al.*, 2015), além de outras (Ellis *et al.*, 2010b; Kulp e Kuehn, 2010; Beltran-Garcia *et*

*al.*, 2014; Ionescu *et al.*, 2014; Cahill *et al.*, 2015; Devos *et al.*, 2015; Rompikuntal *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Entre as diversas funções já descritas para as OMVs, destacam-se as funções de veículo de secreção, de transporte, disseminação e entrega de biomoléculas a longas distâncias, incluindo moléculas de sinalização (Schwechheimer e Kuehn, 2015; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017). Em *Xylella fastidiosa* as OMVs parecem desempenhar a função de nanopartículas antiadesivas, facilitando a disseminação sistêmica do fitopatógeno, além de transportarem lipases que atuam na degradação de parede celular vegetal (Ionescu *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2016).

## **1.2. O fitopatógeno *Xylella fastidiosa***

*X. fastidiosa* é uma fitobactéria pertencente a classe Gammaproteobacteria, família Xanthomonadaceae, que é encontrada, exclusivamente, no lúmen dos vasos do xilema de seus hospedeiros vegetais. É uma bactéria Gram-negativa, aflagelada e que tem forma de bastonete com diâmetro entre 0,25 e 0,50 µm e comprimento entre 1,0 e 4,0 µm. Apresenta crescimento lento no cultivo *in vitro*, com tempos de duplicação de 9 a 55 horas dependendo do meio de cultura. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 26 a 28 °C (Davis *et al.*, 1981; Wells *et al.*, 1987; Hopkins, 1989; Hopkins e Purcell, 2002). É classificada como aeróbia obrigatória, porém, se comporta como anaeróbia facultativa dependendo do meio de cultivo (Shriner e Andersen, 2014).

Além do lúmen dos vasos do xilema de seus hospedeiros vegetais, *X. fastidiosa* também coloniza o aparelho bucal de insetos sugadores de seiva do xilema, popularmente conhecidos como cigarrinhas, que são responsáveis pela transmissão da bactéria. São insetos das famílias Cicadellidae (*sharpshooters*) e Cercopidae (*spittlebugs*) que ocasionalmente adquirem as bactérias ao se alimentarem de plantas contaminadas, e, em uma próxima alimentação, transmitiram a bactéria para outra planta pela inoculação diretamente no xilema (Redak *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2008a; Backus *et al.*, 2015). Os insetos vetores são a principal forma de transmissão de *X. fastidiosa*. Entretanto, a disseminação da bactéria também ocorre através de mudas de plantas ou porta-enxertos contaminados (Janse e Obradovic, 2010).

*X. fastidiosa* é considerada um fitopatógeno generalista por colonizar uma enorme variedade de hospedeiros. A EFSA (*European Food Safety Authority*) relaciona 359 espécies de plantas de 240 gêneros e 75 famílias botânicas como hospedeiros naturais e/ou experimentais de *X. fastidiosa* (<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160209>). Muitos destes hospedeiros vegetais não exibem sintomas quando colonizados por *X. fastidiosa*, e

são ditos resistentes à infecção; nesses casos, *X. fastidiosa* pode ser considerada um endofítico (Chatterjee *et al.*, 2008a).

Por outro lado, várias espécies de plantas são suscetíveis à infecção por *X. fastidiosa*, nas quais causa doenças de extrema gravidade, como a Clorose Variegada dos Citros (CVC) (Rossetti *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993), Doença de Pierce das videiras (PD) (Hopkins, 1989; Hopkins e Purcell, 2002) e a Síndrome do Rápido Declínio das Oliveiras (OQDS) (Cariddi *et al.*, 2014). Exemplos de outras doenças associadas à infecção por *X. fastidiosa* são as escaldaduras de folha de ameixeira, amendoeira, cafeeiro, pessegueiro, oleandro ou espirradeira, amoreira, cerejeira, carvalho, sabugueiro e hibisco (Hopkins e Purcell, 2002; Janse e Obradovic, 2010).

A doença de Pierce está presente no Estado da Califórnia, nos Estados Unidos, desde 1884 e ocorre também em videiras em outros estados do sul dos EUA, como a Flórida e Texas, além do México e países da América Central. A partir de 1990, a doença agravou-se em razão do aumento de uma espécie de cigarrinhas oriunda do extremo sul dos EUA e do México. Em 1999, mais de 300 acres de videiras da região de Temecula<sup>1</sup> na Califórnia foram destruídos pela PD (Hopkins, 1989; Hopkins e Purcell, 2002). Segundo dados do *California Department of Food and Agriculture*, esta doença ameaça negócios diretamente derivados da viticultura estimados em mais de 57,6 bilhões de dólares (<https://www.cdfa.ca.gov/statistics/PDFs/2016Report.pdf>).

A CVC foi identificada pela primeira vez, em 1987, em laranjais do Estado de São Paulo (Rossetti *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993), e desde então já foi detectada em pomares citrícolas de outras regiões do Brasil (<http://www.embrapa.gov.br>). Em 2004, 43,8% das plantas do parque citrícola do Estado de São Paulo estavam contaminadas com *X. fastidiosa*, mas nos últimos anos vem sendo observada uma extraordinária queda na incidência da doença, possivelmente, em consequência do uso de mudas sadias, aumento do uso de inseticidas para o controle do inseto vetor e a erradicação de plantas velhas e doentes. O levantamento disponibilizado em julho de 2016 pelo Fundo de Defesa da Citricultura indica que a CVC atinge, atualmente, apenas 3% das plantas da citricultura paulista (<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/cvc-atinge-apenas-3-da-citricultura/418>).

Até meados dos anos 90, os registros de doenças causada por *X. fastidiosa* ocorriam apenas no continente americano. Entretanto, relatos de casos deste fitopatógeno tem sido crescentes nos continentes europeu e asiático, entre estes a disseminação da Síndrome do Rápido Declínio das Oliveiras (OQDS) no sul da Itália, uma região que está se tornando um reservatório para *X. fastidiosa* (Saponari *et al.*, 2013; Cariddi *et al.*, 2014; Strona *et al.*, 2017).

A hipótese corrente é que existe especificidade entre cepas (ou grupo de cepas) de *X. fastidiosa* e espécies do hospedeiro vegetal que colonizam e de onde tais cepas foram isoladas (Almeida *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2008; Killiny e Almeida, 2011). Por outro lado, há relatos de uma mesma cepa ter colonizado com sucesso plantas de espécies distintas em infecções artificiais (Lopes *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2015). Ainda não são conhecidas as bases moleculares da especificidade de *X. fastidiosa* ao hospedeiro vegetal, mas seguramente não envolvem o sistema de secreção tipo 3 (T3SS), conhecido por desempenhar um papel central na virulência e especificidade ao hospedeiro em patógenos de plantas e de animais pela injeção de efetores de virulência diretamente na célula vegetal (McCann e Guttman, 2007; Loquet *et al.*, 2012). O genoma de *X. fastidiosa* não contém os genes relacionados à maquinaria do T3SS e tampouco os genes dos respectivos efetores de virulência (Lambais *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Meidanis *et al.*, 2002; Van Sluys *et al.*, 2003; Killiny e Almeida, 2011), o que reflete o estilo de vida deste fitopatógeno que coloniza vasos xilema cujo tecido é constituído, predominantemente, de células mortas lignificadas.

### **1.2.1. Fatores de virulência e patogenicidade de *X. fastidiosa***

Desde a identificação de *X. fastidiosa* como fitopatógeno, busca-se identificar seus fatores e mecanismos de virulência e patogenicidade e também os determinantes de especificidade ao hospedeiro vegetal. As análises de genomas, transcritomas e proteomas de diversas cepas de *X. fastidiosa* e a avaliação de fenótipos de mutantes da cepa Temecula1 que causa doença de Pierce em videiras já possibilitaram a elucidação de alguns dos mecanismos de virulência e patogenicidade de *X. fastidiosa* e a proposição de outros, como discutiremos adiante.

Os fatores de virulência que *X. fastidiosa*, aparentemente, utiliza para causar doenças diferem daqueles de outros patógenos vasculares que interagem diretamente com tecidos vegetais vivos. Presumivelmente é a diferença da habilidade de *X. fastidiosa* em se disseminar amplamente pelo xilema de hospedeiros vegetais suscetíveis que os distingue de plantas nas quais a disseminação é mínima e o patógeno existe como um endofítico relativamente inofensivo (Chatterjee *et al.*, 2008a). Postula-se que se a colonização se tornar excessiva em certos hospedeiros, a interação se torne patogênica. Para um patógeno realizar uma interação compatível e bem-sucedida com o hospedeiro, ele deve ultrapassar barreiras constitutivas, evitar ou suprimir as respostas imunes, e reprogramar a célula do hospedeiro para o estabelecimento de estruturas de infecção durante penetração, invasão e reprodução (Hok *et al.*, 2010).

As plantas infectadas por *X. fastidiosa* apresentam os vasos do xilema bloqueados por agregados celulares bacterianos, os quais são adensados pela presença do exopolissacarídeo (goma) secretado pela bactéria (Alves *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Roper *et al.*, 2007a). Este processo é desencadeado pela adesão bacteriana à superfície dos vasos do xilema e a consequente formação de biofilme, da qual participam adesinas fimbriais e afimbriais, além de outros componentes como o exopolissacarídeo (de Souza *et al.*, 2004; Roper *et al.*, 2007a; Caserta *et al.*, 2010). Assim, os sintomas das plantas infectadas por *X. fastidiosa* parecem estar relacionados aos estresses hídrico e/ou nutricional decorrentes da oclusão do xilema (Hopkins e Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008a). Por outro lado, os sintomas da doença também parecem ter associação com a resposta sistêmica do hospedeiro suscetível à interação com o patógeno (Gambetta *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Purcino *et al.*, 2007; Silva-Stenico *et al.*, 2009).

Tanto no hospedeiro vegetal como no inseto-vetor, *X. fastidiosa* está exposta a alta turbulência, derivada do fluxo da seiva do xilema ou da ingestão da seiva pelo inseto em um ambiente pobre em nutrientes e sujeita a respostas de defesa dos hospedeiros. Nestas condições, a formação do biofilme é estratégica para sobrevivência e multiplicação de *X. fastidiosa* (de Souza *et al.*, 2003; Guilhabert e Kirkpatrick, 2005; Caserta *et al.*, 2010; Voegel *et al.*, 2010). No inseto-vetor, *X. fastidiosa* parece utilizar quitina como fonte de carbono, o que pode contribuir para sua sobrevivência neste ambiente (Killiny *et al.*, 2010). Na planta, *X. fastidiosa* degrada membranas das pontoações do xilema (regiões de comunicação entre vasos e, possivelmente, utiliza os produtos de degradação como nutrientes para o crescimento bacteriano no xilema (Lambais *et al.*, 2000; Roper *et al.*, 2007b; Chatterjee *et al.*, 2008a; Killiny e Almeida, 2009a; Perez-Donoso *et al.*, 2010).

A disseminação sistêmica de *X. fastidiosa* é limitada pelas membranas das pontoações e talvez pela produção de tiloses e de géis ricos em polissacarídeo pelas plantas em resposta à infecção por patógenos. Considerando que a dimensão da célula bacteriana impede sua passagem através da maioria dos poros descritos em angiospermas, postula-se que a degradação enzimática das membranas das pontoações do xilema é um fator relevante na disseminação sistêmica de *X. fastidiosa* (Perez-Donoso *et al.*, 2010). Esta hipótese é corroborada por imagens de microscopia eletrônica de transmissão que mostram a dissolução e rompimento das membranas de pontoações de videiras infectadas por *X. fastidiosa* evidenciando a passagem da bactéria entre vasos do xilema (Ellis *et al.*, 2010a).

De fato, enzimas de degradação da parede celular vegetal (*Cell wall degrading enzymes*, CWDE) como celulases, xilosidases, pectinases, poligalacturonases, lipases, esterases e proteases estão codificadas no genoma de *X. fastidiosa*, as quais seriam secretadas pelo sistema de secreção do tipo II (T2SS) (Simpson *et al.*, 2000; Newman *et al.*,

2003; Scarpari *et al.*, 2003; Van Sluys *et al.*, 2003; Koide *et al.*, 2006; Maria Fedatto *et al.*, 2006; Nogaroto *et al.*, 2006; Wulff *et al.*, 2006; Roper *et al.*, 2007b; Chatterjee *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2008; Killiny e Almeida, 2009a; Zhang *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2016). A importância de algumas dessas CDWE para a virulência de *X. fastidiosa* já foi comprovada, sendo observada redução da virulência no caso de mutantes nocaute da poligalacturonase (Roper *et al.*, 2007b) e da lipase LesA (Nascimento *et al.*, 2016) e hipervirulência no mutante da protease secretada PrtA (Gouran *et al.*, 2016). Para muitos fitopatógenos, incluindo os do gênero *Xanthomonas*, as CDWE e T2SS já foram demonstrados como essenciais no estabelecimento da virulência (Jha *et al.*, 2005; Tayi *et al.*, 2016). O T2SS de *X. fastidiosa* é predito como muito similar ao T2SS de *Xanthomonas* (Simpson *et al.*, 2000).

*X. fastidiosa* não possui flagelo, e o pilus longo (pilus do tipo IV) desempenha importante função para sua motilidade dentro dos vasos do xilema, principalmente a motilidade contra o fluxo da seiva do xilema, e colonização sistêmica da planta, sendo responsável pelo movimento celular conhecido como *twitching motility*, caracterizado por ciclos de prolongamento, adesão e retração do pilus, puxando a célula bacteriana em direção à extremidade do pilus (Meng *et al.*, 2005; Capitani *et al.*, 2006). Tal motilidade parece ser controlada por quimiotaxia, uma vez que ortólogos de genes relacionados a um sistema quimiossensorial foram identificados no genoma de *X. fastidiosa* (Cursino *et al.*, 2011).

A resistência à infecção por *X. fastidiosa* pode estar relacionada às características da composição das membranas de pontoações que as tornariam menos suscetíveis a ação de enzimas de degradação de parede celular vegetal eventualmente produzidas pelo patógeno, o que comprometeria sua disseminação. Já foi mostrado que genótipos de videiras menos suscetíveis à doença de Pierce exibem diferenças na composição e estruturas de polissacarídeos de suas respectivas membranas de pontoações (Sun *et al.*, 2011).

Durante a infecção por *X. fastidiosa*, elicitores de respostas de defesa da planta sintetizados pela bactéria e/ou liberados pela degradação parcial da parede celular podem induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, tais como superóxido e peróxido de hidrogênio. Vários genes envolvidos em destoxificação de espécies reativas de oxigênio estão codificados no genoma de *X. fastidiosa*, incluindo genes que codificam para catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e enzima de resistência a hidroperóxidos (Cussiol *et al.*, 2003; Smolka *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006; Zaini *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 2011), evidenciando que *X. fastidiosa* dispõe de mecanismos para “contratacar” uma das mais rápidas respostas da planta à infecção por patógenos (Nanda *et al.*, 2010; Leonard *et al.*, 2017). A inativação do gene que codifica o regulador transcricional de resposta a estresse oxidativo, OxyR, em *X. fastidiosa* resulta em um fenótipo de maior

sensibilidade a peróxido de hidrogênio e menor taxa de sobrevivência quando inoculado em videiras (Wang *et al.*, 2017).

É importante também mencionar que o genoma de *X. fastidiosa* codifica microcinas e bacteriocinas (Lambais *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Hopkins e Purcell, 2002; Smolka *et al.*, 2003; Pashalidis *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008; Duarte, 2012; Mendes *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2016). As bacteriocinas e microcinas são proteínas com atividade antibiótica importantes na competição entre cepas bacterianas por determinados nichos (Riley, 2011; Subramanian e Smith, 2015), e que, assim, podem ter papel relevante na sobrevivência e eficiência de colonização de *X. fastidiosa* frente a cepas ou espécies competidoras existentes no xilema ou no inseto-vetor. Estas toxinas são geralmente secretadas por transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*) especializados no seu processamento e exportação (Dirix *et al.*, 2004), pertencentes ao grupo dos sistemas de secreção do tipo I (T1SS). Assim como outras bactérias Gram-negativas, *X. fastidiosa* possui diversos transportadores do tipo ABC (Simpson *et al.*, 2000; Meidanis *et al.*, 2002). O único homólogo TolC (proteína de membrana externa componente do T1SS) demonstrou ser essencial à patogenicidade de *X. fastidiosa*, em videiras, e também para sobrevivência do fitopatógeno no interior dos vasos do xilema (Reddy *et al.*, 2007).

Interações de *X. fastidiosa* com bactérias endofíticas também devem interferir com a capacidade da bactéria de crescer e de se desenvolver dentro da planta, uma vez que endofíticos que parecem favorecer (por exemplo, *Methylobacterium mesophilicum*) ou desfavorecer (por exemplo, *Curtobacterium flaccumfaciens*) a colonização de *X. fastidiosa* já foram isolados laranjeiras, respectivamente, com e sem sintomas de CVC (Araujo *et al.*, 2002; Lacava *et al.*, 2004; Lacava *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2016). Vale ressaltar que o uso de endofíticos bacterianos no biocontrole de doenças causadas por patógenos vasculares tem sido avaliado em vários estudos (Eljounaidi *et al.*, 2016) e, assim, poderia ser uma estratégia também válida para o controle de *X. fastidiosa* (Hopkins, 2005).

Além de práticas adequadas de manejo, uso de mudas saudáveis e controle do inseto-vetor, a geração de plantas transgênicas resistentes a *X. fastidiosa* estão entre as estratégias promissoras para o controle das doenças causadas por esta bactéria (Gray *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2015; Lindow *et al.*, 2016; Caserta *et al.*, 2017).

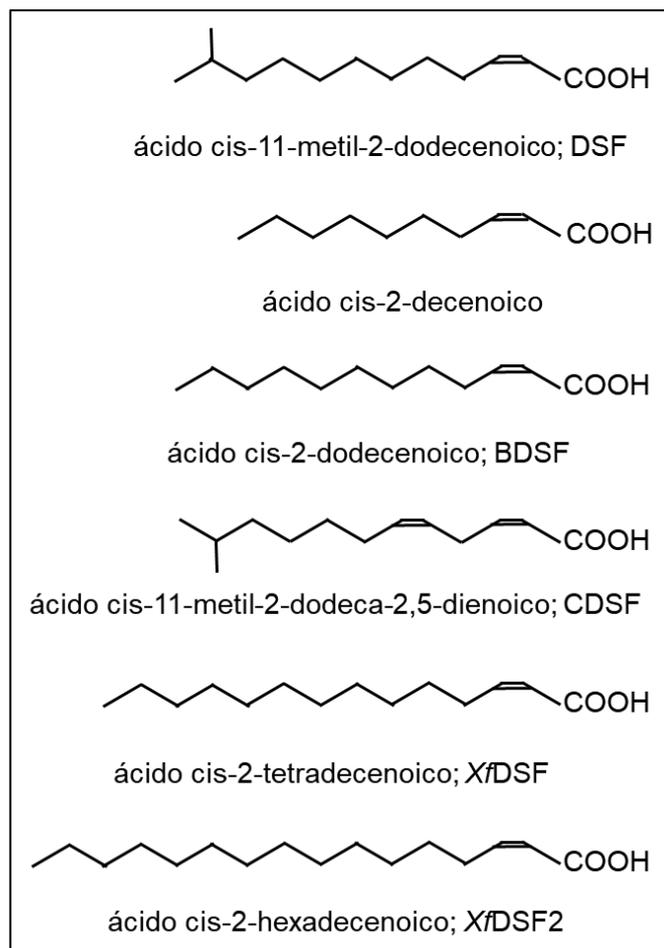
### **1.2.2. Sinalização celular mediada por DSF em *X. fastidiosa***

A expressão de genes associados à disseminação sistêmica e colonização do hospedeiro vegetal é modulada por DSF (*Difusible Signaling Factor*), uma família de moléculas de natureza lipídica envolvida na percepção de quórum de *X. fastidiosa* (Newman

*et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2008a; Newman *et al.*, 2008; Beaulieu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2013; Baccari *et al.*, 2014; Lindow *et al.*, 2014; Ionescu *et al.*, 2016). A sincronização da expressão de genes de virulência mediada pelo acúmulo de DSF decorrente do aumento da densidade celular é um mecanismo também verificado em outras bactérias patogênicas (Wang *et al.*, 2004; Jayaraman e Wood, 2008; Guo *et al.*, 2012; Pollumaa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Dow *et al.*, 2016; Dow, 2017).

A família DSF de moléculas de sinalização é composta por ácidos graxos cis-2-insaturados de diferentes tamanhos e ramificações como exemplificado na Figura 2. A primeira molécula descrita foi o ácido cis-11-metil-dodecenoico, denominado como DSF, identificado em *Xanthomonas campestris*. Desde então outras moléculas têm sido descobertas em outras bactérias tais como: ácido cis-2-decenoico em *Pseudomonas aeruginosa*; ácido cis-2-dodecenoico (BDSF) em *Burkholderia cenocepacia*; ácido cis-11-metil-2-dodeca-2,5-dienoico (CDSF) em *Xanthomonas oryzae*, ácido cis-2-tetradecenoico (XfDSF1), ácido cis-2-hexadecenoico (XfDSF2) e ácido 12-metil-tetradecenoico (CVC-DSF) em *X. fastidiosa*. Sabe-se que várias dessas bactérias produzem diferentes tipos de DSF, ainda que um dos tipos seja predominante (Wang *et al.*, 2004; Colnaghi Simionato *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008a; Dow, 2008; Newman *et al.*, 2008; Beaulieu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2015; Ionescu *et al.*, 2016).

O primeiro DSF de *X. fastidiosa* foi isolado da cepa 9a5c e identificado como ácido 12-metiltetradecenoico (CVC-DSF) (Colnaghi Simionato *et al.*, 2007), e que foi posteriormente sugerido como sendo um antagonista na sinalização mediada por DSF (Beaulieu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2016). O ácido cis-2-tetradecenoico (XfDSF ou XfDSF1) foi isolado da cepa Temecula1 e sua atividade biológica na sinalização por percepção de quórum foi demonstrada nessa mesma cepa (Beaulieu *et al.*, 2013). Contudo, os estudos de Almeida *et al.* (2012) já indicavam que, assim como verificado em outras bactérias patogênicas, *X. fastidiosa* também produziria diferentes compostos da família DSF. Estas suposições foram confirmadas e foi demonstrado que *X. fastidiosa* produz uma variedade de ácidos 2-enóicos semelhantes, de cadeia relativamente longa os quais são ativos na modulação da expressão gênica (Ionescu *et al.*, 2016). Estes autores também verificaram que *X. fastidiosa* é capaz de produzir uma variedade de ácidos graxos saturados e insaturados, porém, não parecem ter atividade na sinalização mediada por DSF.



**Figura 2. Moléculas de sinalização bacteriana da família DSF.** Ácido cis-11-metil-dodecenoico (DSF) identificado em *X. campestris*; ácido cis-2-decenoico de *P. aeruginosa*; ácido cis-2-dodecenoico (BDSF) de *B. cenocepacia*; ácido cis-11-metil-2-dodeca-2,5-dienoico (CDSF) de *Xanthomonas oryzae*; ácido cis-2-tetradecenoico (XfDSF ou XfDSF1) e ácido cis-2-hexadecenoico (XfDSF2) de *X. fastidiosa*.

Além de XfDSF1, *X. fastidiosa* produz, e é particularmente sensível ao ácido 2-cis-hexadecanóico, denominado como XfDSF2 (Ionescu *et al.*, 2016). *X. fastidiosa* também responde a outros ácidos 2-enóicos ainda mais longos aos quais outras bactérias, como *X. campestris* não respondem. Outra observação interessante é que a síntese de moléculas da família DSF por *X. fastidiosa* é influenciada pelo meio de cultivo, uma vez que XfDSF2 e XfDSF1 não são detectados simultaneamente nas mesmas condições de cultivo. Além disso, *X. fastidiosa* responde a concentrações muito mais baixas de XfDSF2 em comparação a XfDSF1. Postula-se que possam ocorrer interações competitivas entre vários ácidos graxos saturados e insaturados que bloqueiam a função dos ácidos graxos 2-enóicos agonistas. Desta forma, ao alterar os ácidos 2-enóicos produzidos e o equilíbrio relativo dos ácidos graxos enóicos e saturados, *X. fastidiosa* poderia modular a extensão da percepção do

quórum mediada por DSF e coordenar comportamentos no hospedeiro vegetal, até mesmo sua aquisição pelo inseto (Almeida *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2016).

O mecanismo de síntese de DSF em *X. campestris*, *B. cenocepacia*, *P. aeruginosa*, *X. oryzae* e *X. fastidiosa* está associado a um conjunto de genes denominados *rpf* (Ryan *et al.*, 2015; Dow *et al.*, 2016; Dow, 2017). Dentre estes genes, sabe-se que *rpfF* codifica uma enoil-CoA-hidratase, que é a principal responsável pela síntese de DSF, o qual em *X. campestris* foi estruturalmente caracterizado como ácido cis-11-metil-2-dodecenóico (Barber *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2015). O gene *rpfB* codifica uma ligase de acil-CoA de cadeia longa (*fatty acyl-CoA ligase*), anteriormente associada síntese e processamento de DSF, mas que atualmente tem sido implicada na mobilização de ácidos graxos para degradação de DSF (Almeida *et al.*, 2012; Bi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015).

Em baixa densidade celular são produzidos níveis basais de DSF, enquanto que em alta densidade celular, DSF acumula-se no meio extracelular, levando a ativação de um sistema de dois componentes constituído pela proteína sensora RpfC, uma histidina quinase transmembranar, e pela proteína reguladora de resposta RpfG, uma fosfodiesterase de c-di-GMP. Alguns estudos mostram que RpfC liga-se a RpfF na ausência de DSF, mas, com o acúmulo de DSF no meio extracelular ocorre indução da autofosforilação de RpfC e a consequente liberação de RpfF, resultando em sua ativação (Slater *et al.*, 2000; He *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2008c; Guo *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2017).

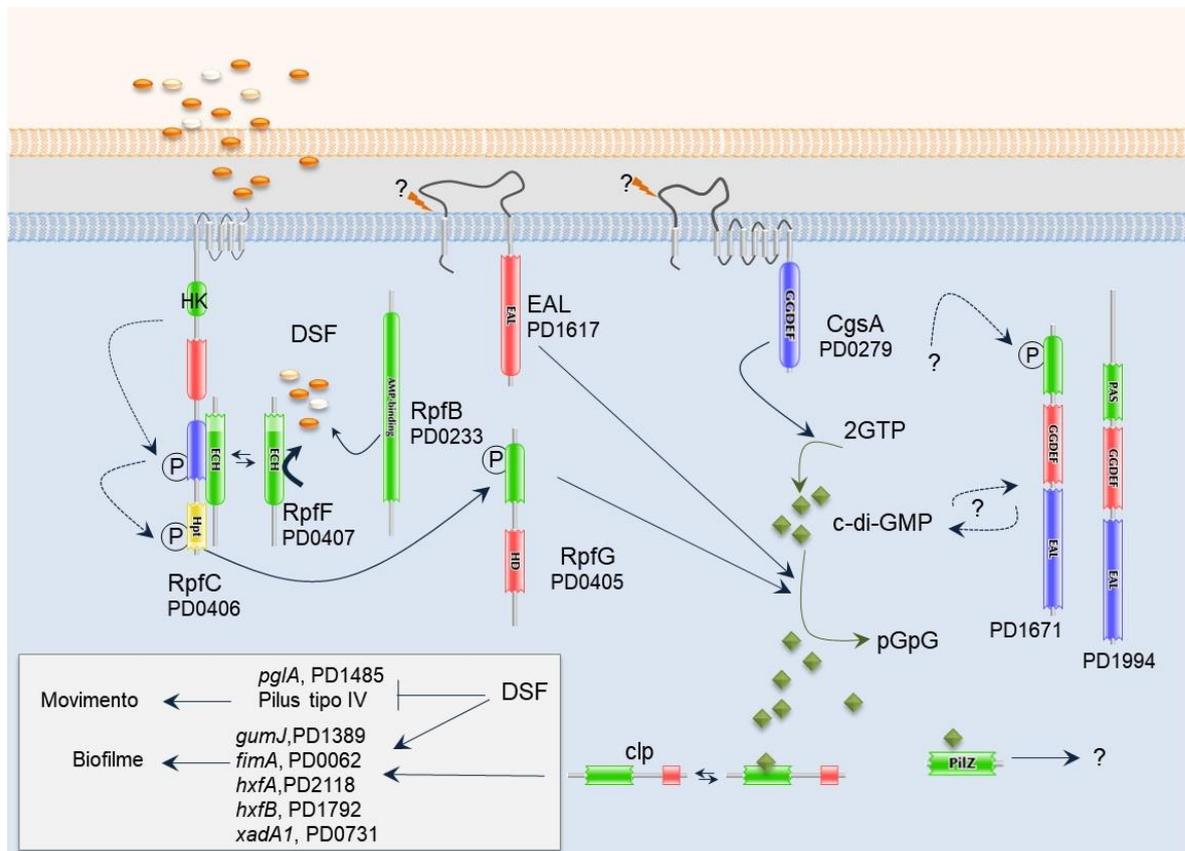
Em *X. campestris*, DSF modula positivamente a expressão de genes de virulência através da ativação de RpfG (fosfodiesterase de di-cGMP) que resulta na diminuição dos níveis de c-di-GMP e ativação de regulador transcricional Clp (*cAMP receptor-like protein*), cujo *regulon* tem mais de 300 genes de virulência. Por outro lado, altos níveis de c-di-GMP promovem a dissociação de Clp da região promotora com consequente modulação negativa do *regulon* de Clp, abolindo, assim, a virulência. Além disso, aumento do nível de c-di-GMP, inibe a própria expressão de *clp* e a atividade de diguanilato ciclase por inibição alostérica (Ryan *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Leduc e Roberts, 2009; Zhang, 2010; Ryan *et al.*, 2011).

A sinalização mediada por DSF em *X. fastidiosa* (Figura 3) tem algumas diferenças em relação a *X. campestris*. Uma das diferenças está na organização do *cluster* de genes *rpf*. Diferentemente de *X. campestris*, em *X. fastidiosa* os genes *rpfB* e *rpfA* (aconitase) estão fora do *cluster rpf* que, nessa bactéria, inclui *rpfF*, *rpfC* e *rpfG* (Dow e Daniels, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Slater *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2012). Outra diferença está na observação, que em *X. fastidiosa*, a percepção do sinal DSF por RpfC é dependente de RpfF, que além de ser responsável pela síntese de DSF, é um requerimento para ativação da via de sinalização (Ionescu *et al.*, 2013). Além disso, postula-se que em *X. fastidiosa*, DSF além de ativar a quinase sensora RpfC, poderia acumular-se dentro da célula e ser detectado

por outro sistema de dois componentes, ainda por ser descoberto (Chou *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2012; Beaulieu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2016).

Além disso, embora o sistema de sinalização celular mediado por DSF de *X. campestris* e *X. fastidiosa* (Figura 3) compartilhem o segundo mensageiro c-di-GMP, suas respostas finais são distintas. A deleção de *rpfF* em *X. campestris* resulta em diminuição da virulência, aumento da produção de exopolissacarídeo e da formação de biofilme. De modo oposto, em *X. fastidiosa*, a deleção de *rpfF* resulta em um fenótipo de hipervirulência e diminuição da formação do biofilme. A deleção de *rpfC* em *X. campestris* resulta na diminuição na formação de agregados celulares e de biofilme, enquanto que em *X. fastidiosa*, a deleção de *rpfC* resulta em um aumento do biofilme e da agregação celular. Em *X. fastidiosa*, a deleção de *cgsA* (codifica diguanilato ciclase) também resulta no aumento da produção de biofilme e de exopolissacarídeo, possivelmente pela diminuição dos níveis de di-cGMP. Já em *X. campestris*, a formação de biofilme e o fenótipo hiperagregativo é consequência do aumento nos níveis de di-cGMP, por exemplo pela deleção de *rpfG*. Desta forma, o papel de c-di-GMP na regulação final dos fatores de virulência e patogenicidade são, aparentemente, opostos para *X. fastidiosa* e *X. campestris* (Barber *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 2000; Dow *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008a; Ryan *et al.*, 2011; Sondermann *et al.*, 2012).

Como esquematizado na Figura 3, a formação de biofilme em *X. fastidiosa* decorre da ativação de RpfC/RpfG que resulta na diminuição dos níveis de di-cGMP, ativação de Clp e aumento da expressão de genes relacionados a adesão celular como *hxfA* e *hxfB* (hemaglutininas), *xadA1* (adesina não-fimbrial), *fimA* (pilus curto) e *gumJ* (transportador de exopolissacarídeo). Por outro lado, DSF modula negativamente o fenótipo de motilidade celular e disseminação sistêmica, influenciando a expressão de genes associados ao pilus do tipo IV e produção de poligalacturonase (*plgA*). A formação de biofilme poderia ser também influenciada pelo aumento da produção de c-di-GMP catalisada pela di-guanilato ciclase, CgsA. A deleção de *cgsA* em *X. fastidiosa*, na cepa Temecula1, resultou em aumento transcrição de adesinas fimbriais e afimbriais e do operon *gum* (produção de exopolissacarídeo) com consequente maior adesividade celular e aumento do biofilme. Em resumo, o modelo de sinalização celular mediada por DSF em *X. fastidiosa* (Figura 3) considera que baixos níveis de c-di-GMP estão positivamente ligados ao comportamento sésil e de agregação celular e negativamente a sua disseminação na planta e, assim, à virulência no hospedeiro vegetal (Chatterjee *et al.*, 2008a; Chatterjee *et al.*, 2010; Cursino *et al.*, 2015).



**Figura 3. Modelo de sinalização celular mediada por DSF em *X. fastidiosa*.** No modelo de sinalização proposto, DSF, sintetizado por RpfF, é reconhecido pela histidina quinase sensora RpfC. RpfG, uma fosfodiesterase de di-cGMP, é ativada, modulando positivamente a expressão de genes de virulência e patogenicidade relacionados a formação de biofilme (*gumJ*, *fimA*, *hxfA* e *hxfB*) através do regulador transcricional Clp. RpfC interage com RpfF, e a percepção do sinal (DSF) depende dessa interação. O esquema indica os domínios proteicos identificados pelo PFAM e os números das CDS no genoma da cepa Temecula1. As CDS PD1617, PD1671 e PD1994 que apresentam domínios GGDEF-EAL não tem função esclarecida. O modelo baseia-se em dados da literatura (Chatterjee *et al.*, 2008a; Chatterjee *et al.*, 2010; de Souza *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2013).

Como já mencionado o gene *rpfB* (*fatty acyl-CoA ligase*), associado à síntese e processamento de DSF ou à degradação de DSF, não parece ser necessário para a sobrevivência de *X. fastidiosa* no hospedeiro vegetal, visto que o mutante com deleção de *rpfB* não apresentou alteração na colonização de videiras comparativamente à linhagem selvagem. Entretanto, esse mutante exibiu uma redução na colonização e transmissão pelo inseto vetor, o que sugere que variações nas proporções dos diferentes tipos de DSF mediadas por RpfB, influencie diferentemente a colonização no inseto e na planta (Almeida *et al.*, 2012).

A percepção de quórum mediada por DSF em bactérias Gram-negativas é responsável pela mudança de comportamento da população bacteriana de acordo com o hospedeiro ou com o ciclo de infecção. Como já mencionado, algumas das moléculas da família DSF são sintetizadas exclusivamente por certas bactérias, embora uma mesma bactéria possa produzir diferentes tipos de DSF (Ryan *et al.*, 2015). Assim, é plausível supor que DSF produzidos por bactérias que compartilham o mesmo nicho possam ter outros alvos na comunidade microbiana, além das próprias célula produtoras. Por exemplo, ainda que *P. aeruginosa* não sintetize DSF ou BDSF, essa bactéria é capaz de detectar essas moléculas desencadeando mudanças fenotípicas. Também já foi demonstrado que o fungo *Candida albicans* responde a BDSF modulando sua transição de levedura a hifa (Deng *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2015). Assim, uma hipótese é a de que a produção de DSF constitua uma estratégia importante para a sobrevivência de *X. fastidiosa* no hospedeiro vegetal ou no inseto, permitindo a colonização e sua interação com bactérias que compartilham o mesmo nicho. Outros patógenos e endofíticos como as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* e *Curtobacterium*, já foram detectadas juntamente com *X. fastidiosa* coabitando tanto o xilema de citros como o aparelho bucal dos insetos vetores, contudo o grau e os mecanismos de interação destes microrganismos com *X. fastidiosa* não são claros (Araujo *et al.*, 2002; Lacava *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2015).

Bacteriocinas produzidas por *X. fastidiosa* poderiam atuar como agente antimicrobiano, proporcionando maior competitividade dessa bactéria para colonização de vasos de xilema e o intestino anterior de inseto, frente a bactérias endofíticas ou da microbiota do inseto. Interessantemente, como efeito do aumento de DSF observa-se modulação negativa de genes de bacteriocinas similares a colicina V. Assim, sugere-se que as bacteriocinas desempenhem papel quando as populações de *X. fastidiosa* são baixas, sendo que com o aumento da densidade populacional a produção de colicinas é reduzida, uma vez que a competição com outras espécies torna-se menos relevante (Araujo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012). Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a resposta de *X. fastidiosa* na interação com outros microrganismos.

### **1.2.3. Proteoma e Secretoma de *X. fastidiosa***

Até o momento, já foram sequenciados 39 genomas de cepas de *X. fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros em diversas regiões de vários países (Simpson *et al.*, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2002; Van Sluys *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Schreiber *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Pierry, 2012; Chen *et al.*, 2013; Santana, 2013; Alencar *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2014a; Guan *et al.*, 2014b; Su *et al.*, 2014; Giampetruzzi *et al.*, 2015a; Giampetruzzi *et*

*al.*, 2015b; Chen *et al.*, 2016a; Niza *et al.*, 2016; Van Horn *et al.*, 2017). A análise destes genomas aliada a estudos de transcritomas de *X. fastidiosa* têm fornecido informações relevantes para ampliar o conhecimento de diferentes aspectos da biologia desta fitobactéria, incluindo a identificação de genes potencialmente associados à virulência e patogenicidade (de Souza *et al.*, 2005; da Silva Neto *et al.*, 2007; da Silva Neto *et al.*, 2008; Zaini *et al.*, 2008; Ciraulo *et al.*, 2010; Giampetruzzi *et al.*, 2016; Parker *et al.*, 2016; Pierry, 2017). Estes estudos vêm sendo complementados com a descrição do proteoma e do secretoma de *X. fastidiosa* (Smolka *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2016).

A descrição do secretoma (exoproteoma) de patógenos é considerada uma abordagem poderosa para elucidar fatores e mecanismos envolvidos na interação com seus hospedeiros (Gupta *et al.*, 2015; Armengaud e Duport, 2017). Como exemplos dessa abordagem, citamos os estudos que descreveram o repertório de fatores de virulência de *Bacillus cereus* (Clair *et al.*, 2010) e de efetores do T3SS de *Aeromonas salmonicida* (Vanden Bergh *et al.*, 2013). A análise do secretoma de fitopatógenos, como *Xanthomonas oryzae* (Wang *et al.*, 2013) ou *Xanthomonas citri* (Ferreira *et al.*, 2016) revelou potenciais proteínas relacionadas à virulência e à interação com o hospedeiro.

O primeiro estudo visando a caracterização do proteoma de *X. fastidiosa* foi publicado em 2003 (Smolka *et al.*, 2003). Nesse estudo, os autores identificaram 142 proteínas no extrato celular total e na fração extracelular de *X. fastidiosa* cepa 9a5c cultivada em meio sólido BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) por 21 dias. As proteínas foram previamente separadas em eletroforese uni ou bidimensional em gel de poliacrilamida/SDS, seguindo-se a identificação por espectrometria de massas. A análise identificou 35 proteínas na fração extracelular, entre estas proteases (XF0816, XF1026 e XF1851), lipase (XF1253), adesinas fimbriais (XF0077, XF0078 e XF0032) e bacteriocina (XF2407). A porina de membrana externa XF0343 estava entre as 3 proteínas mais abundantes identificadas neste proteoma.

Após 8 anos, foi publicado o segundo trabalho sobre proteoma de *X. fastidiosa*, também realizado com a cepa 9a5c e eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida/SDS, seguindo-se a identificação por espectrometria de massas (Silva *et al.*, 2011). Foram identificadas 456 proteínas expressas no proteoma de células de biofilme maduro sendo que 144 dessas eram distintas do proteoma de células planctônicas. Nesse estudo os autores verificaram, entre outras proteínas, a porina de membrana externa (XF0343) e uma polinucleotídeo fosforilase (XF0239) como mais abundantes no biofilme.

A análise do secretoma da cepa Temecula1 publicada em 2016 (Nascimento *et al.*, 2016), também empregando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida/SDS e identificação dos polipeptídeos por MS, demonstrou que lipases são um componente muito abundante do secretoma de *X. fastidiosa*. A lipase mais abundante, LesA (PD1703) parece

atuar na degradação do tecido vegetal e, seu acúmulo nas regiões foliares, foi associado com os sintomas da doença de Pierce de videiras. Os autores identificaram 24 proteínas de membrana na fração extracelular solúvel de *X. fastidiosa* e 11 proteínas nas OMVs, incluindo, além da LesA, a lipase-esterase LesB (PD1702), protease (PD0313), toxina do tipo RTX (PD1506) e adesina não-fimbrial XadA1 (PD0731).

Por fim, num trabalho também publicado em 2016 (Mendes *et al.*, 2016) foi descrito o secretoma de *X. fastidiosa* no cultivo *in vitro* das cepas 9a5c (virulenta em laranjeiras) e da cepa J1a12 (não-virulenta) determinado através de eletroforese unidimensional seguida de identificação por espectrometria de massas. O trabalho revelou um perfil distinto de proteínas extracelulares de ambas as cepas, totalizando 71 proteínas diferentes, incluindo, além da lipase-esterase LesA (XF0781), proteases, proteínas de membrana externa, proteínas associadas a bacteriófagos, chaperonas moleculares e proteínas citosólicas. Uma das proteínas do secretoma foi a antitoxina XfYgiT (XF2491), que na cepa 9a5c, está segregada em OMVs (Santiago *et al.*, 2016). A superexpressão da toxina cognata intracelular, XfMqsR, está associada com formação de biofilme, geração de células persistentes e diminuição da patogenicidade (Merfa *et al.*, 2016).

Complementar aos estudos de exoproteomas, está a análise do exometaboloma, isto é o perfil de metabólitos secretados. Os avanços dos estudos do campo de metabolômica tem auxiliado a compreensão da relação de patógenos com seus hospedeiros (Frag *et al.*, 2006; Allwood *et al.*, 2009; de Bruijn *et al.*, 2015) e também com microrganismos que compartilham um mesmo nicho (Scherling *et al.*, 2009; Wilmes *et al.*, 2010). Todavia, além dos estudos de caracterização de moléculas da família DSF, nada se conhece sobre o perfil de metabólitos que compõe o secretoma de *X. fastidiosa* em monocultura ou em co-cultura com outros microrganismos.

## 2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi investigar proteínas e metabólitos potencialmente associados à adaptação ao hospedeiro, virulência e patogenicidade de *X. fastidiosa* através do estudo do secretoma de cepas selvagens e mutantes dessa fitobactéria.

Para tal, nossos objetivos específicos foram:

1. Analisar e comparar o transcrito e o secretoma (exoproteoma) da cepa Temecula1 selvagem e do mutante no gene *rpfF* o qual exibe fenótipo de hipervirulência em videiras, no cultivo em meio que mimetiza a composição da seiva do xilema.
2. Avaliar a produção de OMVs (vesículas de membrana externa) secretadas por *X. fastidiosa* no cultivo *in vitro* das cepas Fb7 e 9a5c (cepas isoladas de laranjeiras) e Temecula1 (cepa isolada de videira).
3. Caracterizar a composição proteica (proteoma) e determinar o perfil de metabólitos (metaboloma) das OMVs secretadas pelas cepas Fb7, 9a5c e Temecula1.
4. Avaliar a relação das OMVs produzidas pelas cepas Fb7, 9a5c e Temecula1 com virulência e patogenicidade a partir dos resultados das análises proteômicas e metabolômicas.
5. Determinar o perfil de metabólitos secretados por *X. fastidiosa*, em particular moléculas da família DSF, em resposta a sua interação com metabólitos secretados por *Burkholderia phytofirmans*, proposta como uma cepa para o biocontrole da doença de Pierce de videiras.

### 3. Procedimentos Experimentais

#### 3.1. Manutenção e cultivo de bactérias

As cepas bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Lista de bactérias e cepas utilizadas neste trabalho.

Bactéria	Cepa	Hospedeiro original	Localidade de origem	Referências
<i>Xylella fastidiosa</i>	9a5c	<i>Citrus sinensis</i> cv. Natal	Macaubal, São Paulo, Brasil	(Li <i>et al.</i> , 1999; Simpson <i>et al.</i> , 2000)
	Fb7	<i>Citrus sinensis</i> cv. Valencia	Bella Vista, Corrientes, Argentina	(da Silva <i>et al.</i> , 2007)
<i>Xylella fastidiosa</i> Temecula1	Wild Type (WT)	<i>Vitis vinifera</i>	Temecula, California, EUA	(Newman <i>et al.</i> , 2003; Van Sluys <i>et al.</i> , 2003)
	WTgfp	-	-	(Newman <i>et al.</i> , 2003)
	$\Delta rpfB$	-	-	(Almeida <i>et al.</i> , 2012)
	$\Delta rpfC$	-	-	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2008c)
	$\Delta rpfF$	-	-	(Newman <i>et al.</i> , 2004)
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	PsJN	<i>Allium cepa</i>	Ontario, Canada	(Frommel <i>et al.</i> , 1991; Sessitsch <i>et al.</i> , 2005)

Estoques de *X. fastidiosa* (diversas passagens) foram mantidos em meio PWG contendo 50 % de glicerol em freezer a - 80 °C. A manutenção das culturas foi feita em placas de meio PWG-ágar (PWG contendo ágar 1,5 %) com repiques semanais e incubação a 28 °C, sendo o número de passagens controlado. Após 20 passagens, novo cultivo foi iniciado a partir de estoques congelados a -80 °C. As cepas WTgfp,  $\Delta rpfB$   $\Delta rpfC$   $\Delta rpfF$  foram mantidas em meio PWG-ágar contendo canamicina 50 µg/mL.

Para o cultivo em meio líquido, as bactérias, após 7 dias de cultivo em PWG-ágar, são transferidas para 250 ou 400 mL de meio PWG, PIM6 ou PD3, dependendo do experimento, e mantidas a 28 °C a 100 rpm por até 7 dias. Geralmente os cultivos são iniciados com  $DO_{600nm} = 0,05 - 0,1$ .

Em alguns experimentos, as células após 7 dias de cultivo em meio PD3-ágar (PD3 contendo ágar 1,5 %) são transferidas para 100 ou 200 mL de PWG e mantidas a 28 °C a 100 rpm por até 7 dias.

O meio PW (Davis *et al.*, 1981) contendo glicose (PWG) é constituído de fitona peptona 4g/L; peptona de caseína com digestão tríptica 1 g/L; cloreto de hemina 0,001 %;  $K_2HPO_4$  1,2 g/L;  $KH_2PO_4$  1 g/L;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,4 g/L; glutamina 0,4 % e glicose 0,5 %.

O meio PIM6 é composto de HEPES 10 mM pH 6,5;  $MgSO_4$  1 mM;  $CaCl_2$  3 mM; D-glicose 0,1 mM; tartarato de sódio 0,1 mM, malato de sódio 0,2 mM; citrato de sódio 1 mM;

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,03 g/L; L-glutamina 5 mM; solução de micronutrientes ATCC 13061 0,025 %; *soytone* 0,02 % e *tryptone* 0,04 % (Michelle Igo, University of California, Davis, comunicação pessoal). Para o meio PIM6 sólido, acrescenta-se 4g/L de Gel-Rite.

O meio PD3 contém amido 2 g/L; *soytone* 2 g/L; *tryptone* 4 g/L; citrato de sódio 1 g/L; succinato 1 g/L; cloreto de hemina 10 mg/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g/L.

No caso de *B. phytofirmans*, após um dia de cultivo em meio PD3-ágar, as bactérias são transferidas para 100 ou 200 mL de PWG e mantidas a 28 °C a 100 rpm de agitação por mais um dia.

### 3.2. Contagem de unidades formadoras de colônia

Para contagem de unidades formadoras de colônias, a densidade celular da cultura em meio líquido PWG ou PIM6 foi estimada pela medida da DO<sub>600nm</sub> após vigorosa agitação para desfazer o biofilme. Em seguida, foram preparadas 4 diluições seriadas de 10 vezes e 5 µL das diluições foram gotejadas em placas de PWG-ágar. As colônias foram contadas após 7 dias e o número de UFC/mL foi estabelecido.

### 3.3. Ensaio de viabilidade celular “*live and dead*”

As culturas em meio líquido foram agitadas vigorosamente para que o biofilme fosse desfeito, em seguida a DO<sub>600nm</sub> foi medida (geralmente 0,1-0,2), e 1 mL de cada cultura foi transferido para tubos *ependorf*. Em seguida foi adicionado 1 µL de iodeto de propídeo (1,0 mg/mL) e SYTO® 9 (5 mM) e o tubo foi protegido da luz. Um volume de 10 µL de cada amostra foi aplicado sobre lâminas de vidro e cobertas com lamínulas de vidro. As lâminas foram armazenadas em estojos, protegidas da luz, até que fossem analisadas em microscópio de fluorescência.

As imagens foram capturadas em vários campos, com aumento de 100 vezes (com auxílio de óleo imersão) no microscópio de fluorescência Zeiss Axiomager M1, Hamamatsu Orca 03 e QIClick CCD, com a visualização de fluorescência com alta resolução espacial (1200 por 1300 pixels) e profundidade de bits (escala de cinza de 12 bits). Uma câmera adicional, QImaging 5MPix MicroPublisher, capturou imagens coloridas. Após a coleta de imagens, o número de células (viáveis e inviáveis) foi contado e os resultados, plotados no programa Microsoft Excel. As microscopias de fluorescência foram realizadas no *Plant and Microbial Biology Department* Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA.

### 3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Células bacterianas ou vesículas de membrana externa suspensas em 400 µL de tampão PBS pH 7,4 foram depositadas sobre lamínulas de vidro ou plástico, previamente colocadas em placas de 24 poços e fixadas com solução de glutaraldeído 10 % em PBS 7,4. Em seguida, as lamínulas foram gentilmente submersas em tampão de tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, lavadas 3 vezes com tampão cacodilato, tratadas com ácido tânico 1% por 30 minutos e lavadas 2 vezes com água deionizada. Em seguida, as amostras foram novamente impregnadas com tetróxido de ósmio por 30 minutos, lavadas novamente com água deionizada por 3 vezes e desidratadas gradualmente com concentrações de etanol iniciando a 50% por 10 minutos com incrementos de 10% a cada vez. Após secagem em ponto crítico as amostras foram recobertas com uma camada de ~50nm de ouro e mantidas desidratadas até serem analisadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo FEI Quanta FEG 250 em 20-30 KV. As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas no laboratório de microscopia eletrônica da Universidade Federal de São Paulo (CEME-UNIFESP) e o processamento das amostras foi realizado segundo protocolo do próprio CEME-UNIFESP.

### 3.5. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A fração extracelular para análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) foi obtida a partir de culturas das diferentes cepas de *X. fastidiosa* por três sucessivas centrifugações a 16.000 g (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). O volume inicial de 1,4 mL da cultura foi adicionado a um microtubo (1,5 mL) e após centrifugação, metade do volume do sobrenadante foi transferido para novo tudo. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para evitar qualquer contaminação do sobrenadante com o sedimento celular. Após a terceira centrifugação o volume final obtido foi de 350 µL. Foram realizadas 6 preparações para cada cultura totalizando ~2 mL de amostra de sobrenadante que foram reunidas e armazenadas em gelo até análise, realizada no mesmo dia, no equipamento *NanoSight LM10 system* (NanoSight Ltd, Amesbury, Reino Unido), gentilmente disponibilizado pela Dra. Vilma Martins, no Centro do Câncer A. C. Camargo, São Paulo.

A concentração de nanopartículas, supostamente correspondentes a vesículas de membrana externa (OMVs) e secretadas por *X. fastidiosa*, foi determinada pelo rastreamento de nanopartículas, utilizando o aparelho *NanoSight*, configurado com um laser de 405 nm e sob um sistema de câmera digital de alta sensibilidade. Vídeos foram coletados e analisados usando o *NTA-software* (versão 2.3), com o tamanho mínimo de partícula esperado,

comprimento mínimo de pista, e definição de desfoque, todos ajustados para o modo automático. A sensibilidade da câmara e o limiar de detecção foram ajustados para 14. A temperatura ambiente foi registada entre 20 e 22 °C. As amostras foram diluídas em PBS pH 7,4 (137 mM NaCl, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) filtrado em membrana 0,22 µm, de modo que a concentração estivesse entre 1x10<sup>8</sup> e 10x10<sup>8</sup> nanopartículas/mL. Para cada amostra, três vídeos de 30 s de duração foram registrados, com ressuspensão e reinjeção da amostra entre as gravações. Réplicas técnicas e biológicas foram realizadas e os dados foram calculados e plotados no programa Microsoft Excel.

Para estimar o número de OMVs por célula, no momento anterior a coleta do sobrenadante das culturas, foram recolhidas amostras para a medição de OD<sub>600nm</sub>.

### **3.6. Isolamento de vesículas de membrana externa (OMVs) de *X. fastidiosa***

Os sobrenadantes de culturas de *X. fastidiosa* das cepas Temecula1, 9a5c e Fb7 obtidas em PWG por 7 dias foram separados por centrifugação por 4.000 g por 30 min a 4 °C, com extremo cuidado para não contaminar a preparação com células intactas. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubos de 38,5 mL e centrifugado a 38000 g por 1 h a 4 °C (rotor P28S, Hitachi, Japão). O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos de 38,5 mL e centrifugado a 100.000 g por 5 h a 4 °C (rotor P28S, Hitachi, Japão). Nesta última etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido em 6-8 tubos e contendo as vesículas de membrana externa (OMVs) foi ressuspenso em diferentes tampões de acordo com a análise subsequente: 400 µL tampão de ureia (8 M + inibidor de proteases Roche©) para a análise proteômica *shotgun* ou 400 µL de PBS pH 7,4 (137 mM NaCl, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para Microscopia Eletrônica de Varredura, SDS-PAGE e análise metabolômica.

As preparações de OMVs de 3 réplicas biológicas (cultivos independentes de cada uma das cepas) foram reunidas perfazendo três amostras únicas que foram submetidas a liofilização para posterior análise proteômica.

### **3.7. Preparação de extrato proteico de sobrenadantes de cultivos de *X. fastidiosa***

Cultivos de Temecula1 WT ou  $\Delta rpfF$  foram realizados em PWG-ágar por 7 dias a 28°C e utilizados como inóculos para culturas em 100 mL de meio PIM6, sendo o cultivo iniciado com DO<sub>600nm</sub> = 0,1. Após 3 dias de cultivo a 28 °C e 100 rpm, o sobrenadante foi separado por centrifugação 4000 g por 30 min. A etapa de centrifugação foi repetida por uma vez. O

sobrenadante foi concentrado 100 vezes por ultrafiltração em dispositivos Amicon® Ultra 15mL (Millipore) com *Molecular Weight Cutoff* (MWCO) de 3kDa. Os sobrenadantes concentrados sofreram sonicação (dois pulsos de 15 s, com intervalos de 30 s, em banho de gelo) no Branson Sonifier 450 e, em seguida, o material foi centrifugado por 30 min a 12000 *g* a 4 °C, para separar a fração solúvel de restos celulares. A preparação concentrada foi utilizada para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, SDS-PAGE e a análise proteômica *shotgun*.

Os extratos concentrados obtidos de 3 réplicas biológicas de cultivos independentes das cepas WT e  $\Delta rpfF$  foram reunidos perfazendo duas únicas amostras que foram, então, misturadas na proporção 1:8:1 com as seguintes soluções: 1 ml do extrato concentrado; 8 ml de acetona gelada (100%) e 1 mL de ácido tricloroacético (100% de TCA). As amostras foram mantidas sob -20 °C, durante 1 h, até completa precipitação e em seguida, foram centrifugadas a 18.000 x *g*, durante 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de acetona gelada com ressuspensão completa e nova centrifugação a 18.000 x *g*, durante 15 min, a 4 °C. Finalmente, após a aspiração de toda a acetona, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e mantido a -20 °C até análise proteômica.

### **3.8. Dosagem de proteínas por Bradford**

A dosagem de proteínas totais foi realizada segundo o método de Bradford (Bradford, 1976), tendo como padrão BSA (albumina de soro bovino). Para montagem da curva padrão foram utilizadas as seguintes concentrações de BSA: 1, 5, 10, 15 e 20 µg/mL. A reação foi realizada em 1 mL, sendo 750 µL de H<sub>2</sub>O, 50 µL do extrato proteico e 200 µL de Reagente de Bradford (BioRad) concentrado. Após adição do reagente, as amostras foram vigorosamente agitadas e incubadas em temperatura ambiente por 10 min, seguindo-se leitura da absorbância a 595 nm ( $Ab_{595nm}$ ). As concentrações de proteína total nas amostras de interesse foram calculadas a partir da curva padrão. Todas as dosagens foram feitas em triplicata.

### **3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)**

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% ou 12,5% contendo SDS (Laemmli, 1970) em placas. As amostras a serem analisadas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE (Tris 50mM, pH 6,8, DTT 25mM, glicerol 10%, SDS 1% e azul de bromofenol 0,025%), fervidas por 3 minutos antes da

aplicação no gel. A eletroforese foi realizada a 200V até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. As proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie R 0,2%, preparado em metanol 50% e ácido acético 10%, seguindo-se de descoloração com ácido acético 7% em metanol 30%. Alternativamente as proteínas foram visualizadas por coloração pelo método da prata (Blum *et al.*, 1989) utilizando o *Pierce™ Silver Stain Kit* (Thermo Scientific). Após descoloração, os géis foram fotodocumentados utilizando-se MiniBis Pro (DNR Bio Imaging System).

### **3.10. Transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose e imunodeteção de proteínas**

Após SDS-PAGE, o gel incubado por 10 min em tampão de transferência (Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037 % e metanol 20 %) e os polipeptídeos foram transferidos para a membrana de nitrocelulose (BioRad) utilizando-se um aparato de transferência eletroforética (Harlow e Lane, 1988). Para a transferência foi feita a montagem na seguinte ordem: 3 folhas de papel *Whatman*, membrana de nitrocelulose previamente molhada com tampão de transferência, gel de poliacrilamida e mais 3 folhas de papel *Whatman*. A transferência foi realizada por 1 h a 12 V e 0,3 A.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com PBS (NaCl 137 mmol/L; KCl 2,7 mmol/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mmol/L) pH 7,4 por 10 min. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (*Odyssey Blocking Buffer*, LI-COR Biosciences) por 1 h. Em seguida, o anticorpo policlonal anti-XadA1 (Caserta *et al.*, 2010) na diluição 1:20.000 foi adicionado, seguindo-se incubação por 12 h a 5 °C. A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBS contendo Tween 20, 0,1 %, por 4 vezes a cada 5 min, antes da adição do anticorpo secundário IRDye 680RD Goat Anti-Rabbit IgG (1:15.000), seguindo-se incubação por 1 h. Após esse período, a membrana de nitrocelulose foi lavada outra vez com PBS contendo Tween 20, 0,1 %, por 4 vezes a cada 5 min. A captura da imagem foi feita no aparelho Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) nos comprimentos de onda de 700 e 800 nm e intensidade de 3,5 com uma resolução de 169 µm.

### **3.9. Análise proteômica *shotgun***

As amostras relativas aos sobrenadantes dos cultivos e de OMVs purificadas de *X. fastidiosa* obtidas como descrito nos itens 3.6 e 3.7 foram encaminhadas para análise proteômica na Universidade da Califórnia em Davis, EUA, onde foi realizada com auxílio dos Dr. Paulo A. Zaini e do Dr. Rafael Nascimento.

As amostras secas foram reconstituídas em PBS e 300 µg delas foram precipitados com 4 vezes o volume do reagente de precipitação (CalBiochem) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras precipitadas foram reconstituídas em 100 µl de ureia 6M + DTT 5 mM e incubadas a 37 °C durante 30 min. Foi adicionado iodoacetoamida 15 mM (IAA), seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 30 min. O IAA foi então neutralizado com DTT 30 mM em incubação por 10 min. Lys-C/tripsina foi adicionada (1:25 enzima:proteína total) seguindo-se incubação a 37 °C por 4 horas. Bicarbonato de amônio 50 mM foi adicionado para diluir a ureia e ativar digestão por tripsina que ocorreu por 16-18 °C a 37 °C. Os peptídeos digeridos foram submetidos a dessalinização com Aspire RP30 Desalting Tips (Thermo Fisher Scientific), ressuspensos no tampão de carregamento e analisados em espectrômetro de massa QExactive (Thermo Fisher Scientific) acoplado com uma fonte Easy-LC (Thermo Fisher Scientific) e uma fonte de ionização nanospray. Os peptídeos foram carregados num Trap (100 micron, C18 100Å 5U) e dessalinizados *online* antes da separação utilizando uma coluna de fase inversa (75 micron, C18 200Å 3U). A duração do gradiente de separação dos peptídeos foi de 60 min utilizando ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (ACN) a 100% para os solventes A e B, respectivamente. Os dados foram adquiridos usando um método MS/MS dependente de dados, que tinha um intervalo de varredura completo de 300-1600 Da e uma resolução de 70.000. A resolução do método MS/MS foi de 17.500 e a largura de isolamento de 2 m/z com energia de colisão normalizada de 27. A fonte do nanospray foi operada utilizando uma tensão de pulverização de 2,2 KV e uma temperatura capilar de transferência aquecida de 250 °C.

Os dados brutos foram analisados usando X! Tandem e visualizados usando o *Scaffold Proteome Software* (Versão 4). As amostras foram pesquisadas contra bancos de dados Uniprot anexados ao banco de dados cRAP, que contém contaminantes comuns de laboratório. Os bancos de dados *decoy* reverso também foram aplicados ao banco de dados antes das buscas em X! Tandem.

As CDS anotadas nos genomas das cepas Temecula1 e 9a5c foram utilizados como referência para identificação das proteínas nos respectivos proteomas (o genoma da cepa 9a5c também foi usado como referência para as proteínas das OMVs de Fb7). As proteínas identificadas foram filtradas (no programa *Scaffold*) com base nos seguintes critérios: probabilidade proteica de 1,0% FDR (segundo o algoritmo *prophet*: <http://proteinprophet.sourceforge.net/>), número mínimo de peptídeos igual a 2 e probabilidade de peptídeos utilizando classificador bayesiano ingênuo de 0,1% FDR.

### 3.10. Análise de metabólitos das OMVs por espectrometria de massas

As OMVs de *X. fastidiosa* obtidas como descrito no item 3.6 e ressuspensas em PBS foram secas em *speedvac*. Ao precipitado, foi adicionado metanol e a preparação foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 g, seguindo-se filtração em membrana de PVDF de 0,45 µm. As amostras foram então injetadas no cromatógrafo Shimadzu UFLC-20AD acoplado a espectrômetro de massas Bruker TOF (Tabela 2), com os seguintes parâmetros: modo negativo, voltagem -3800V, *offset* 500, temperatura do gás 250 °C, gás secante 10 L/min, faixa de leitura 50-1000 m/z, taxa de escaneamento 1 Hz/s. Condições cromatográficas: Phenomenex Kinetex C18 100 mm por 2.1 mm, tamanho da partícula 2.6µm, poro 100 Å. Fase móvel A: H<sub>2</sub>O NH<sub>4</sub>Ac 10 mM + NH<sub>4</sub>OH 10 mM pH 8; fase móvel B: 95% ACN + 5% de solução da fase móvel A; Temperatura do forno: 40 °C. Um controle negativo foi preparado seguindo as mesmas etapas previamente descritas. As análises foram realizadas no Laboratório de Metabolômica do IQ-USP, dirigido pelo Prof. Pio Colepicolo Neto e com auxílio do Dr. Eliezer Stefanello.

**Tabela 2.** Programa do gradiente binário.

Tempo (min)	%B
0	5
1	5
12	40
18	80
20	80
21	5
24	5

### 3.11. Análise de ácidos graxos no sobrenadante de cultivos de *X. fastidiosa* por cromatografia gasosa (GC)

Os sobrenadantes de 250 mL do cultivo em meio PWG das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1 foram liofilizados e pesados. O material seco (~2,5 g) foi misturado com 200 mL de metanol e agitado vigorosamente *overnight* a -20 °C. A suspensão foi centrifugada a 1.500 g a 4 °C por 1 min e o sobrenadante foi transferido para tubo de vidro. As amostras foram concentradas sob gás nitrogênio até o volume de 6 mL (Temecula1), 4 mL (9a5c) e 4 mL (Fb7). Destas soluções foram retirados 1,8 mL aos quais foram acrescidos 100 µL de cloreto de acetila. Após 1 min de homogeneização sob agitação vigorosa, as preparações foram incubadas por 60 min a 100°C, e em seguida deixadas à temperatura ambiente, até total resfriamento. Foram então adicionados 750 µL de hexano, os tubos foram misturados por 1 min e a fase superior foi coletada. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As duas fases

coletadas foram combinadas, secas com gás nitrogênio ou em *speedvac* e ressuspensas em 50-75 µL de hexano.

O perfil de ácidos graxos na forma metilada foi analisado utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (*gas chromatography using flame ionization detection*). A análise foi conduzida em um cromatógrafo à gas modelo Trace 1310 (Thermo Scientific) utilizando uma coluna DB-FFAP (15 m por 0,1 mm ID por 0,1 µm espessura do filme). Programa de temperatura: inicial 150 °C por 0.25 min; rampa 35 °C/min até 200 °C; rampa 8 °C/min até 225 °C; mantém em 225 °C por 3.2 min; rampa 80 °C/min até 245 °C e mantido por 4.75 min; gás de arraste (hidrogênio - H<sub>2</sub>) em modo de pressão constante (345 kPa). O injetor foi acertado para as seguintes condições: temperatura 250 °C, em modo Split com fluxo de 60 mL/min, razão 30:1, fluxo da purga igual a 5 mL/min e volume de injeção de 1µL. O detector foi acertado da seguinte forma: temperatura igual a 250 °C, fluxo do ar sintético 350 mL/min, do hidrogênio igual a 35 mL/min, e do nitrogênio de 40 mL/min.

Os ácidos graxos foram identificados pelo tempo de retenção usando como padrão o reagente Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich). Com este mesmo reagente foram construídas curvas de calibração. Cada pico identificado foi integrado a sua área e esta foi normalizada pela área do padrão interno. A percentagem de cada um foi calculada em relação ao total de ácidos graxos identificados e integrados para cada amostra.

Estas análises foram realizadas com auxílio da Dra. Priscilla B. M. Cruz Derogis no laboratório dirigido pelo Profa. Sayuri Miyamoto (IQ-USP).

### **3.12. Análise de ácidos graxos no sobrenadante de cultivos de *X. fastidiosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)**

Após cultivo no meio PD3, os sobrenadantes das cepas Temecula1 WT,  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  foram liofilizados, submetidos à extração metanólica como descrito no item 3.11 e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS). As amostras derivatizadas foram manipuladas usando um sistema *MultiPurpose Sampler* (MPS) de troca de revestimento automático Gerstel (Gerstel, Muehlheim, Alemanha) controlado pelo software Maestro para injetar 2,0 µL de amostra em um sistema de injeção Cooled Gerstel (CIS4). O injetor foi operado em modo sem divisão. As amostras foram injetadas na entrada de injetor a 60 °C que foi aumentada para 270 °C num gradiente térmico a 12 °C/s e mantida durante 3 min. Os metabólitos volatilizados foram separados utilizando o cromatógrafo de fase gasosa Agilent 7890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), controlado pelo software Agilent GC/MS MassHunter Acquisition. O cromatógrafo de fase gasosa foi equipado com uma coluna de Rtx5Sil-MS de 0,25 mm de comprimento (Restek, Bellefonte, PA) de 30 m de comprimento,

0,25 mm de película de difenil a 5% com uma coluna de guarda integrada de 10 m. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C com o seguinte gradiente aplicado: rampa a 5 °C, por 1 min, até 65 °C, mantida durante 0,2 min; Rampa a 15 °C, 1 min, até 80 °C, mantida durante 0,2 min; Rampa a 15 °C, 1 min, até 310 °C, mantida durante 12 min. A espectrometria de massas (MS) foi realizada no espectrômetro de massas Agilent 5977 com temperatura de linha de transferência de 250 °C, ionização eletrônica a 70 eV e temperatura de fonte de íons de 230 °C. Os espectros de massa foram adquiridos de 50 a 700 m/z a 8 espectros por segundo.

A análise dos dados foi feita com o software *Agilent MassHunter Qualitative Analysis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e, desta forma, os ácidos graxos foram identificados pelo tempo de retenção e perfil de fragmentação usando como referência os respectivos padrões sintéticos de DSF (ácido cis-11-metil-2-dodecenoico), BDSF (ácido cis-2-dodecenoico), XfDSF1 (ácido 2-cis-tetradecenoico), CVC-DSF (ácido 12-metiltetradecenoico) e XfDSF2 (ácido 2-cis-hexadecenoico).

Estas análises foram realizadas no laboratório dirigido pelo Dr. Trent Northen (Joint Genome Institute, Walnut Creek, California, EUA) com auxílio da Dra. Andrea Lubbe.

### **3.13. Ensaio de formação de biofilme em *X. fastidiosa* com adição de extratos apolares do sobrenadante de cultivos de *B. phytofirmans* PsJN**

Foi realizada uma centrifugação a 4000 g por 30 min do cultivo de *B. phytofirmans* PsJN em meio PD3 para separação preliminar entre o sobrenadante e o pellet celular, seguindo-se ajuste do pH para 4 e filtração à vácuo em membrana 0,22 µm. Os filtrados foram transferidos para funil de separação e os compostos apolares foram extraídos com acetato de etila (1:1) com agitação vigorosa. A fase superior foi recuperada, seca sob vácuo (Savant SpeedVac Plus SC110A) e ressuspensa em 1 mL de metanol. A eluição fracionada do extrato metanólico foi realizada em coluna de cromatografia C18. Para tal, o extrato metanólico foi aplicado na coluna C18 e a eluição foi feita sequencialmente com incremento de gradiente apolar de solventes, na seguinte ordem: 1 mL de H<sub>2</sub>O; 1 mL de H<sub>2</sub>O e MeOH (3:1); 1 mL de H<sub>2</sub>O e MeOH (1:1); 1 mL de H<sub>2</sub>O e MeOH (1:3); 1 mL MeOH; 1 mL de Acetato de etila (AcEt); 1 mL de AcEt e hexano (1:1); 1 mL de hexano.

Uma alíquota (50 µL) dos eluatos foi adicionada a 2,5 mL de cultivos da cepa Temecula1 em meio PD3, seguindo-se incubação a 28 °C a 200 rpm por 7 dias. Após este período o biofilme formado foi quantificado por coloração com o reagente cristal violeta como previamente descrito (Zaini *et al.*, 2009; Fogaca *et al.*, 2010). Brevemente, o biofilme depositado na interface ar-meio de cultura da cepa Temecula1 foi lavado com água destilada,

corado por 20 min com o reagente cristal violeta 0,1%, lavado novamente com água destilada, e depois removido em acetona:etanol (6:4). A quantificação foi realizada pela medida da absorbância a 595 nm ( $Abs_{595nm}$ ).

### **3.14. Análise de metabólitos do sobrenadante de cultivos de *X. fastidiosa* por cromatografia líquida acoplada espectrometria de massa (LC-MS)**

Volumes de 1 mL de cultivos de cepas de *X. fastidiosa*, de *B. phytofirmans* PsJN ou do meio de cultura PD3 estéril foram centrifugados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL a 1700 *g* por 5 min. Os sobrenadantes, contendo metabólitos extracelulares, foram liofilizados e depois ressuspensos em 300  $\mu$ L de metanol grau LC-MS. As amostras ressuspensas foram novamente centrifugadas para sedimentar eventuais sais presentes. Os sobrenadantes foram secos sob vácuo (Savant SpeedVac Plus SC110A) e ressuspensos em 500  $\mu$ L de metanol de grau LC-MS contendo uma mistura de padrões internos (25  $\mu$ M). As amostras foram filtradas através de dispositivos de filtração de 0,22  $\mu$ m para microcentrífuga e transferidas para frascos de vidro de borossilicato de 1,5 mL (Agilent) para análise de LC-MS como previamente descrito (Kosina *et al.*, 2016).

As amostras de extração (tubos de microcentrífuga vazios foram submetidos a todo o processo de extração para verificar a presença de contaminantes introduzidos durante a preparação da amostra) foram incluídas na análise. Amostras denominadas como controle de qualidade (uma mistura definida de metabólitos comuns) e branco (metanol puro) também foram analisadas no início e no final de cada execução para minimizar eventuais efeitos da deriva nos tempos de retenção ou abundância de sinal e também evitar sinais de incrustação de coluna ou metabólito. Para a análise de metabólitos polares, utilizou-se um sistema Agilent 1290 LC equipado com uma coluna ZIC-pHILIC (150 mm x 1 mm, Merck Sequant) de 3,5  $\mu$ m para separação de metabólitos com as seguintes condições de cromatografia líquida: solvente A – acetato de amônio 5 mM; Solvente B – acetonitrilo:H<sub>2</sub>O 9:1, com acetato de amônio 5 mM; tabela de tempo: 0 min em B a 100%, 1,5 min em B a 100%, 21 min em B a 0%, 27 min em B a 0%, 33 min em B a 100% e 45 min em B a 100%; 0,8 mL/min; Temperatura do compartimento da coluna de 40 °C. As análises de espectrometria de massa foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa Q-TOF 6550. Os dados de espectrometria de massa foram recolhidos num intervalo de massa de 30-1200 *m/z*, taxa de gás de secagem de 11 L/min e temperatura do gás de 290 °C. A pressão do nebulizador foi ajustada a 30 *psi* e a voltagem capilar foi de 3500 V.

O software de análise qualitativa Mass Hunter (Agilent, Santa Clara, CA) foi usado para inspecionar os dados brutos. Em seguida, os dados brutos obtidos foram parseados

utilizando *scripts* em Perl com a geração de resultados, que alimentaram o programa Metabolite Atlas (Bowen e Northen, 2010), o qual extraiu picos de metabolitos putativos utilizando uma base de dados de metabolitos criada internamente contendo m/z e dados de tempo de retenção.

Especificamente, os dados de LC-MS, foram analisados usando um código personalizado em Python (Bowen e Northen, 2010; Yao *et al.*, 2015). Um conjunto de critérios foi utilizado para avaliar cada um dos picos detectados e atribuir um nível de confiança na identificação do composto. Os compostos que receberam uma identificação positiva tinham um tempo de retenção correspondente e m/z para um padrão puro utilizando os mesmos métodos acima. Um composto com o maior nível de identificação positiva tinha adicionalmente um espectro de fragmentação MS/MS correspondente a uma base de dados externa (METLIN) ou coletados em análises internas.

Os dados dos perfis de metabólitos de cada amostra foram submetidos a análise de dados multivariados sob a forma de análise de coordenadas principais (PCoA) (Gower, 1966), a partir da distância euclidiana entre as amostras utilizando a função *cmdscale* na plataforma R. Também através da plataforma R foi gerado o gráfico do tipo *heatmap* com o módulo *pheatmap* e *ggplot2*, sendo cada composto normalizado em função da média dos valores (com valores correspondendo a zero e o desvio padrão a um, respectivamente). A análise de abundância diferencial de metabólitos (em  $\log_2$ ) entre os compostos identificados foi realizada em função da área normalizada de cada pico para as amostras que foram comparadas (controle ou suplementadas por 20% de sobrenadante de *B. phytofirmans* PsJN cultivada em meio PD3 por 1 dia).

As análises de LC-MS foram realizadas no laboratório dirigido pelo Dr. Trent Northen (Joint Genome Institute, Walnut Creek, California, EUA) com auxílio da Dra. Andrea Lubbe.

### **3.15. Análise do transcrito das cepas Temecula1 e $\Delta rpfF$ através de RNAseq**

Os transcritomas das cepas Temecula1 e  $\Delta rpfF$  cultivadas por 3 dias em 100mL de meio PIM6 foram obtidos pelo sequenciamento de bibliotecas de cDNA (RNAseq) na plataforma Illumina/MiSeq com a estratégia *Paired-End* que resulta em sequências (*reads*) de até 250 nucleotídeos para cada extremidade dos fragmentos sequenciados. Os procedimentos descritos a seguir seguiram protocolos já padronizados para análise de transcritomas de *X. fastidiosa* (Pierry, 2017) e contaram com a supervisão do Dr. Paulo M. Pierry para sua execução.

### 3.15.1. Purificação de RNA total

O RNA total das cepas Temecula1 e  $\Delta rpfF$  cultivadas por 3 dias em 100mL de meio PIM6 foi extraído a partir de cultivos realizados em duplicata (duas réplicas biológicas). Para tal, as células foram coletadas por centrifugação (4000 g, 10 minutos) e o precipitado foi imediatamente ressuspensão em 2 mL do reagente *LifeGuard (Mobio)* para garantir a integridade das moléculas de RNA. Após incubação de 1 hora à temperatura ambiente, nova centrifugação foi realizada e o reagente completamente removido. Em seguida, o precipitado foi ressuspensão em 1 a 3 mL do reagente *Trizol (Invitrogen)* dependendo da massa celular. O protocolo do fabricante é seguido até a obtenção do RNA em suspensão, após adição de isopropanol e etanol. A partir desta etapa, a purificação do RNA foi realizada com o *PureLink RNA Mini Kit (Ambion)*, sendo o RNA em suspensão obtido na etapa anterior aplicado à coluna de purificação de RNA do kit *PureLink*. O protocolo seguiu conforme especificado pelo fabricante, com diversas lavagens com tampões e com a eluição sendo realizada com água DEPC (dicarbonato de dietila) adicionada ao centro do filtro. O RNA total purificado foi armazenado em freezer a -80°C. Alíquotas de 1,5  $\mu$ L foram separadas para quantificação e análise da qualidade em espectrofotômetro *NanoDrop* e avaliação da integridade por eletroforese capilar no equipamento *2100 BioAnalyzer* utilizando-se o *RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies)*. A integridade do RNA foi analisada pelo software do próprio *BioAnalyzer*, o qual calcula os valores do RIN (*RNA Integrity Number*) (Schroeder *et al.*, 2006) com base nos tamanhos dos picos observados por todo o perfil eletroforético, incluindo os correspondentes aos RNAs ribossômicos 16S e 23S (rRNA). Consideramos que amostras de RNA total com RIN ~ 8,0 eram adequadas para prosseguimento nas etapas seguintes.

Em seguida, 15 $\mu$ g de RNA total diluídos 100 $\mu$ L de água DEPC foram tratados 20  $\mu$ L de DNase (*Illustra RNAspin Mini RNA isolation Kit da GE Healthcare*) a temperatura ambiente por 50 minutos. Após diversas lavagens com tampões, a eluição da coluna foi realizada com 50  $\mu$ L de água DEPC pré-aquecida a 50°C. Para melhorar a eficiência, o eluato foi passado novamente pela coluna. Alíquotas de 1,5  $\mu$ L foram separadas para análise da integridade por eletroforese capilar no *BioAnalyzer* e confirmação da ausência de DNA na amostra por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para PCR foi utilizado o par de oligonucleotídeos específico para detecção de DNA de *X. fastidiosa* (CVC-1; 5'-AGATGAAAACAATCATGCAAA-3' e 272-2-int; 5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCCT-3') (Pooler e Hartung, 1995), o qual gera amplicons de 500 pb. Além das amostras de RNA tratado, amostras de DNA genômico de *X. fastidiosa* foram utilizadas como controle positivo do ensaio de PCR. O controle negativo da reação de PCR foi realizado substituindo-se a quantidade de RNA/DNA molde por água DEPC. As reações

de PCR (dNTPs 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; *primers* CVC-1 e 272-2 0,2 μM; tampão da enzima diluído 1x e Taq DNA Polimerase 2,5U; 100 ng de amostra de RNA ou DNA) foram incubadas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* a 95°C por 5 minutos seguindo-se 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. Ao final, as reações foram incubadas a 72°C por 10 minutos e armazenadas a 4°C até análise por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0).

As amostras de RNA total purificadas e livres de DNA foram quantificadas utilizando o *Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit (ThermoFisher Scientific)* seguindo-se o protocolo do fabricante.

### **3.15.2. Preparação e quantificação de bibliotecas de cDNA para RNAseq**

Após a análise de integridade e precisa quantificação das amostras de RNA total, foi realizada a depleção dos rRNAs utilizando o *Ribo-Zero Magnetic Kit (Gram-negative bacteria)* (Illumina). O protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações. Aproximadamente 5 μg de RNA total purificado foram utilizados e ao final da depleção, 90 μL do sobrenadante foi removido cuidadosamente e separado em um tubo de 1,5mL para precipitação com etanol *overnight* a -20°C, e um pequeno volume restante foi separado para posterior análise da eficiência da depleção por eletroforese capilar no *BioAnalyzer*. O precipitado de RNA foi seco e ressuspenso diretamente em 18 μL da solução “*Elute, Prime, Fragment Mix*” do *kit TruSeq RNA sample preparation kit v2* (Illumina), permitindo o acoplamento imediato do protocolo de depleção de rRNA com a etapa de preparação da biblioteca de cDNA.

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizada a transcriptase reversa *ImProm II* (Promega). Todos os procedimentos foram realizados em placas de 96 poços no termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Em diversas etapas, o protocolo requer a purificação da amostra para eliminação de adaptadores, oligonucleotídeos ou de fragmentos de cDNA muito pequenos. Tais purificações foram realizadas com o uso de *Agencourt AMPure XP beads* (Beckman Coulter Life Sciences). Ao final, foram coletados 30 μL da biblioteca final, transferidos para um tubo de 1,5mL e este armazenado a -20 °C. Seguiu-se a análise de distribuição dos fragmentos da biblioteca por eletroforese capilar no equipamento *2100 BioAnalyzer* utilizando-se o *High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies)* e quantificação por qPCR. Cada biblioteca de cDNA foi identificada pela ligação de adaptadores de sequências conhecidas e distintas (*indexes* ou *barcodes*) às duas

extremidades dos fragmentos de cDNA, o que possibilita o sequenciamento simultâneo de mais de uma biblioteca de cDNA em uma mesma corrida.

A quantificação das bibliotecas de cDNA foi realizada por meio de qPCR (PCR quantitativo) absoluto utilizando o *Kapa Library Quantification kit (Kapa Biosystems)* para plataformas de sequenciamento *Illumina*.

### **3.15.3. Sequenciamento de bibliotecas de cDNA no equipamento MiSeq**

O sequenciamento das bibliotecas de cDNA foi realizado no equipamento *MiSeq (Illumina)* instalado no Centro Avançado de Tecnologias em Genômica (CATG) do IQ-USP.

Antes de iniciar o sequenciamento, a concentração das bibliotecas foi ajustada para 4 nM e o mesmo volume de cada uma delas foi misturado em um único tubo, seguindo-se adição de volume igual de NaOH 0,2N e incubações a temperatura ambiente por 5 minutos e a 95°C por 1 minuto. Após essa etapa de desnaturação, foi realizada a diluição com tampão fornecido pelo *kit* para concentração final de 6 a 10 pM, seguindo-se aplicação de todo volume (600 µL) do *pool* desnaturado de bibliotecas no cartucho de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado com *MiSeq Reagent Kit v2* de 500 ciclos com a estratégia de sequenciamento *Paired-End* que resulta em sequências (*reads*) de até 250 nucleotídeos para cada extremidade de um fragmento sequenciado. O *workflow* escolhido para a análise após a corrida foi o *Generate FastQ*. Tal formato de arquivo de saída permite obter as sequências geradas na corrida (*read1* e *read2*), acoplado com a informação da qualidade para cada nucleotídeo sequenciado.

### **3.15.4. Análises dos dados de RNAseq**

Após o término do sequenciamento, os arquivos em formato FastQ são obtidos e analisados. Um primeiro passo consiste em analisar a qualidade das sequências e para isso foi utilizado o *software* FASTQC (Andrews, 2010), o qual realiza uma série de análises relacionadas a avaliação de dados de sequenciamento. Dentre elas estão a geração de plotagens baseadas no Q score por base sequenciada e na presença de adaptadores remanescentes, entre outras.

O mapeamento das sequências obtidas por RNAseq na sequência genômica da cepa Temecula1 foi realizado utilizando o *software* CLC Genomics Workbench, versão 6.5 (<http://www.clcbio.com>). Foi usado o módulo RNA-Seq analysis. Foram utilizados arquivos em formato gbk, o qual contém as informações das sequências de todos os genes anotados dos genomas das cepas em questão. Duas opções de mapeamento foram realizadas, gerando

listas de genes com valores de expressão normalizados por FPKM (*Fragments per kilobase transcript per million reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008) ou com valores brutos de contagem de quantas sequências mapearam em cada gene ou CDS.

Análises de correlação de Pearson entre as réplicas biológicas foram realizadas com os valores de expressão por FPKM utilizando a função “cor.test” do pacote “stats” do *software* R (2013). Para as análises estatísticas de expressão diferencial entre genes de transcritomas diferentes, foi usado o pacote DESeq2 (Love *et al.*, 2014) do *software* R (2013), tendo como dados de entrada os valores brutos de contagem de sequências para cada gene. Foram utilizados como parâmetros para definir um gene como diferencialmente expresso entre duas condições distintas ter um valor de  $p_{adj} < 0,1$  e um valor de  $\log_2\text{FoldChange} > |0|$ . A função plotMA do mesmo pacote foi usada para gerar os gráficos de dispersão dos genes baseado em seus respectivos valores de expressão média e razão de expressão. A função heatmap.2 do pacote gplots foi utilizada para gerar *heatmaps*.

### 3.16. Análises bioinformáticas

Análises comparativas de genes dos genomas de cepas de *X. fastidiosa* foram realizadas utilizando-se a plataforma IMG/M ER (Integrated Microbial Genomes-Expert Review) (Markowitz *et al.*, 2012), disponível em <http://img.jgi.doe.gov/>. Para pesquisa de identidade/similaridade de sequências de DNA ou de proteínas também foram utilizados os programas BLASTn, BLASTp e BLASTx em bases públicas de dados tais como GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *Xylella fastidiosa* Genome Project (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>).

Os diagramas de Venn confeccionados para possibilitar a comparação visual entre diferentes conjuntos amostrais nas análises proteômicas foram gerados utilizando o pacote venn.diagram da linguagem R.

A localização subcelular e as funções para cada uma das proteínas identificadas nas análises proteômicas foram preditas, respectivamente, com PSORTb 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) e por ontologia de gene (GO, *Gene Ontology*) (Gene Ontology, 2015) derivada da base de dados UniProt (UniProt, 2015). As proteínas também foram submetidas à análise com o Servidor SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) para predição da posição de clivagem do peptídeo sinal ([cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/)). De maneira similar, foi realizada a predição de secreção não-clássica para proteínas sem peptídeo de sinal utilizando-se o servidor SecretomeP 2.0 (Bendtsen *et al.*, 2005) ([cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/](http://cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/)), nesse caso, pontuação acima de 0,5 indicavam um tipo secreção proteica não-clássica.

## 4. Resultados e Discussão

Para realização dessa tese de Doutorado desenvolvemos paralelamente três estudos para investigar distintos aspectos do secretoma de *X. fastidiosa*. No primeiro (item 4.1) analisamos o transcrito e o secretoma (exoproteoma) da cepa Temecula selvagem e do mutante no gene *rpfF*, o qual exibe fenótipo de hipervirulência em videiras. Os resultados dessas duas abordagens metodológicas foram analisados conjuntamente para prospecção de fatores de virulência. No segundo estudo (item 4.2) visamos a caracterização detalhada da composição de OMVs secretadas por *X. fastidiosa* com ênfase na identificação de fatores de virulência e patogenicidade e na proposição de um modelo de atuação das OMVs. Finalmente, o terceiro estudo (item 4.3), focalizamos a análise de metabólitos secretados por *X. fastidiosa* em resposta a sua interação com metabólitos secretados por *Burkholderia phytofirmans*, proposta como uma cepa para o biocontrole da doença de Pierce de videiras.

### 4.1. Análise do transcrito e do secretoma de *X. fastidiosa*, cepas Temecula selvagem (WT) e mutante $\Delta rpfF$

O gene *rpfF* de *X. fastidiosa* codifica a enzima enoil-CoA hidratase que está envolvida na síntese de moléculas da família DSF (Fatores de Sinalização Difusíveis). Este gene é parte do operon *rpf* o qual codifica proteínas que participam de mecanismos de percepção de quórum e estão relacionadas à regulação da expressão de determinantes de virulência e patogenicidade em *X. fastidiosa*. Mutantes em que *rpfF* foi nocauteado ou deletado ( $\Delta rpfF$ ) não produzem DSF e são também incapazes de perceber este sinal, além de exibirem fenótipo de hipervirulência (Newman *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008c; Almeida *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2013). A comparação de perfis transcricionais (obtidos através da técnica de hibridização de microarranjos de DNA) da cepa Temecula selvagem (WT) e do mutante isogênico  $\Delta rpfF$  permitiu confirmar o papel de DSF na regulação da expressão de determinantes de virulência e patogenicidade (Wang *et al.*, 2012). Como detalhado adiante, ampliamos a comparação das cepas WT e  $\Delta rpfF$  através da análise de seus transcritomas completos, obtidos por RNAseq, e de seus exoproteomas, obtidos por meio de proteômica *shotgun*. Diferentemente do estudo realizado por Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2012) onde as cepas foram cultivadas por 6 dias em suspensão no meio rico PW, em nossos estudos, o cultivo foi realizado por 3 dias no meio mínimo PIM6, o qual mimetiza a composição da seiva do xilema.

#### 4.1.1. Cultivo das cepas WT e $\Delta rpfF$ em meio PIM6

PWG e PD3 são meios de cultura consagrados e os mais utilizados para o cultivo de *X. fastidiosa* (Davis *et al.*, 1980; Davis *et al.*, 1981), pois nesses meios as culturas atingem alta densidade celular (Killiny e Almeida, 2009a; Pierry, 2017). A composição desses meios de cultura, porém, em nada se compara as condições nutricionais que a bactéria encontra no interior dos vasos do xilema ou no aparelho bucal do inseto vetor. Killiny e Almeida (2009a) desenvolveram o meio definido XFM e observaram que o cultivo de *X. fastidiosa* nesse meio favorece o fenótipo mais relacionado a fase de aquisição da bactéria pelo inseto (aumento da expressão de adesinas afimbriais). O meio mínimo PIM6 foi desenvolvido com base na composição do xilema de videiras (Michelle Igo, Universidade da Califórnia em Davis, comunicação pessoal), e assim mimetizar as condições associadas à fase de colonização da planta pela bactéria (Chatterjee *et al.*, 2008a; Ionescu *et al.*, 2014). Análises comparativas de transcritomas de cepas de *X. fastidiosa* cultivadas nos meios PWG e PIM6 demonstraram que vários genes associados a virulência e colonização do hospedeiro vegetal (por exemplo, biogênese do pilus longo) são diferencialmente expressos e/ou tem expressão aumentada no cultivo de *X. fastidiosa* no meio PIM6 (Pierry, 2017).

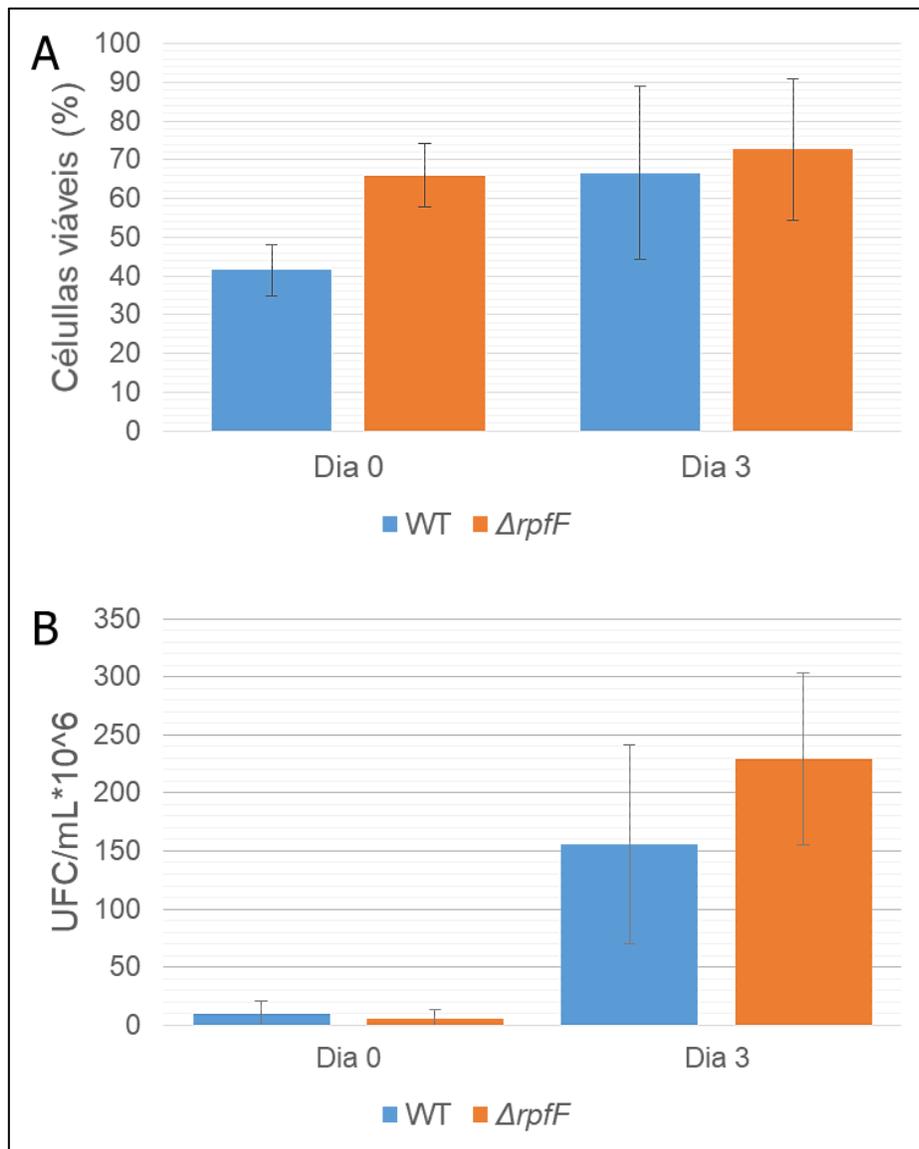
Para análise do transcritoma e do exoproteoma, o cultivo das cepas WT e  $\Delta rpfF$  em meio PIM6 foi iniciado com células previamente crescidas em meio PWG sólido por 7 dias, tempo que corresponde ao início da fase estacionária da curva de crescimento de *X. fastidiosa* em meio rico (Silva *et al.*, 2011; Pierry, 2017). Imediatamente após o inóculo em PIM6 (Dia 0) e após 3 dias de cultivo (Dia 3), a viabilidade das cepas WT e  $\Delta rpfF$  foi avaliada (Figura 4). O ensaio de *live and dead* (Figura 4A) mostra que o inóculo da cepa  $\Delta rpfF$  tem maior viabilidade do que a cepa WT. Esta diferença deve refletir o fato de que a cepa selvagem cultivada por 7 dias em meio PWG sofreu efeitos do acúmulo de DSF, que parece comprometer a divisão celular paralelamente a indução da formação de biofilme (Newman *et al.*, 2004). Este efeito, não é verificado para a cepa  $\Delta rpfF$ , visto que ela não produz DSF. Mesmo tendo sido cultivada nas mesmas condições, a mutação no gene *rpfF* resulta em um fenótipo que parece simular a fase de colonização da planta (Davis *et al.*, 1981; Marques *et al.*, 2002; Newman *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008a).

Após 3 dias de cultivo no meio PIM6, a diferença na viabilidade entre as duas cepas deixa de ser significativa (Figura 4A), sendo que a cepa WT tem sua viabilidade consideravelmente aumentada. A contagem de unidades formadora de colônia (UFC) também foi realizada (Figura 4B) para acessar a viabilidade das células, e os resultados são condizentes com os verificados no ensaio de viabilidade por *live and dead*.

Estes resultados sugerem a cepa WT adaptou-se a condição de carência nutricional, e após os 3 dias de cultivo em meio PIM6 exibiu viabilidade similar a observada para o mutante  $\Delta rpfF$ . A avaliação da viabilidade e do crescimento celular, e não apenas a quantificação do número de células pela medida da densidade ótica a 600nm, demonstra que as variações fenotípicas eventualmente verificadas são efeitos da adaptação face a alterações num dado ambiente e não artefatos que dissimulem a morte celular (Truernit e Haseloff, 2008).

Quando comparado a cepa WT, o mutante  $\Delta rpfF$  exibe aumento nos níveis dos transcritos de várias proteínas relacionadas à virulência e patogenicidade tais como enzimas de degradação da parede celular vegetal, colicinas, adesinas afimbriais (HxfA e HxfB), proteínas do pilus longo e proteínas de bomba de efluxo (como TolC) (Killiny e Almeida, 2009b; Wang *et al.*, 2012).

Deste modo, nossa premissa é que a sinergia desses dois fatores, cultivo em meio mínimo e a mutação do gene *rpfF*, num mesmo experimento para avaliação global do transcrito e do secretoma, tem o potencial de evidenciar efetores de virulência e patogenicidade importantes na fase de colonização do hospedeiro vegetal (Newman *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2014).



**Figura 4. Avaliação da viabilidade celular das cepas WT e  $\Delta rpfF$  no cultivo em meio PIM6.** Em (A) ensaio *live and dead* e em (B) contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) das cepas selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ) inoculadas no meio PIM6 (Dia 0) e após 3 dias de cultivo (Dia 3).

#### 4.1.2. Obtenção dos transcritomas das cepas WT e $\Delta rpfF$ por RNAseq

O RNA total das cepas WT e  $\Delta rpfF$  cultivadas por 3 dias em meio PIM6 foi extraído observando-se os cuidados necessários (ver item 3.15) para obtenção de preparações com elevado grau de pureza e integridade. Esta etapa representou um desafio metodológico, pois a extração de RNA de *X. fastidiosa* cultivada em meio mínimo demanda a utilização reagentes para preservar a integridade do RNA, o que não é necessário para cultivos provenientes de meio rico PW (Pierry, 2017). Após as análises de qualidade e pureza das preparações de RNA, foi realizada a depleção do rRNA e as frações enriquecidas em mRNAs foram utilizadas para a confecção de bibliotecas de cDNA. As bibliotecas de fragmentos de cDNA foram sequenciadas no equipamento *MiSeq* (*Illumina*) utilizando-se a estratégia de *Paired-End* com o kit para 500 ciclos, que resulta em sequências pareadas de 250 bases. Duas bibliotecas de cDNA para cada cepa (duplicata biológicas) foram combinadas e sequenciadas em duas corridas. O rendimento das duas corridas realizadas foi excelente (Tabela 3), tendo sido obtido a quantidade de sequências (*reads*) próxima da prevista pelo fabricante que é de ~25 milhões/corrida. Além disso, ambas as corridas geraram alta porcentagem de *reads* com ótima qualidade (~80% dos *reads*  $\geq$ Q30).

**Tabela 3.** Rendimento das corridas das bibliotecas de fragmentos de cDNA das cepas WT e  $\Delta rpfF$

Corrida	1	2
Total de sequências ( <i>reads</i> )	20.148.102	20.118.080
Número de sequências após filtragem/remoção de sequências de baixa qualidade	18.502.372 (91,83%)	18.057.640 (89,76%)
% $\geq$ Q30	80,3	79,9

Os conjuntos de *reads* obtidos para as cepas WT e  $\Delta rpfF$  foram mapeados contra o genoma referência da cepa Temecula (Van Sluys *et al.*, 2003) utilizando-se o *software CLC Genomics Workbench*. O primeiro mapeamento indicou contaminação com sequências de rRNA em algumas das bibliotecas de cDNA, a qual foi removida computacionalmente (Schmieder *et al.*, 2012). Embora a etapa de depleção do rRNA tenha sido aparentemente bem sucedida, a persistência de contaminação não é infrequente em experimentos de RNAseq (Conesa *et al.*, 2016). Na Tabela 4 estão mostradas as métricas do mapeamento das *reads* no genoma de referência e o rendimento das bibliotecas sequenciadas, após a remoção das sequências de rRNA contaminantes. De modo geral, os valores obtidos estão adequados, ainda que o

rendimento de uma das bibliotecas da cepa WT (replica 1) tenha sido bem menor do que as demais.

**Tabela 4.** Dados de mapeamento das amostras no genoma referência.

Biblioteca		Estatísticas do mapeamento		
Cepa	Réplica	Total de Reads	% de Reads mapeados	Distância em bases entre <i>paired reads</i> (moda)
WT	1	1.493.512	91,80	64 - 264 (130)
WT	2	5.144.712	87,39	67 - 248 (137)
$\Delta rpfF$	1	4.640.358	93,50	66 - 250 (137)
$\Delta rpfF$	2	4.038.412	76,58	68 - 247 (130)

Após o mapeamento dos transcritomas das cepas WT e  $\Delta rpfF$ , obtivemos os valores de expressão dos genes baseados na normalização por FPKM (*Fragments per kilobase per million mapped reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008). A Tabela 5 compara o número de genes por faixa de FPKM. Os resultados mostram que o maior número de genes está na faixa de FPKM entre 0 e 100 de modo similar a outras análises de transcritomas de *X. fastidiosa* (Pierry, 2017). Também de modo similar a outros estudos realizados em nosso grupo, a porcentagem de genes expressos (FPKM >0) foi alta (87-89%).

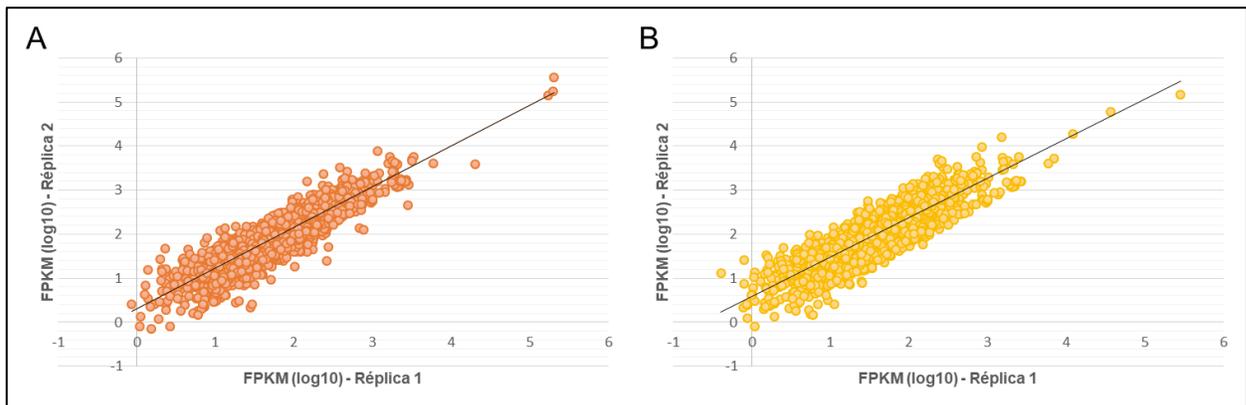
Chama a atenção que o número de genes seja o dobro (50 genes) na faixa de 1.000 a 10.000 FPKM no transcritoma do mutante  $\Delta rpfF$ , o que é um indicativo de que os transcritos de parte destes genes são relativamente mais abundantes no mutante. Estes dados confirmam observações prévias que o DSF regula negativamente a expressão de vários genes em *X. fastidiosa* (Chatterjee *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2012).

**Tabela 5.** Número de genes por faixa de valores de FPKM.

Cepa	FPKM (Fragments Per Kilobase per Million mapped reads)					
	>10.000	10.000 - 1.000	1.000 - 100	100 - > 0	0 (%)	> 0 (%)
WT	3	25	762	1368	13	87
$\Delta rpfF$	3	50	818	1331	11	89

Os valores de FPKM foram utilizados para análises de correlação de Pearson entre as duas réplicas biológicas de cada cepa. Os gráficos dos valores de FPKM dos genes expressos para cada uma das réplicas de cada cepa, transformados em  $\log_{10}$  (Figura 5) demonstram um alto e satisfatório grau de correlação (>0,9) entre as réplicas biológicas. Esse resultado garante a

confiança nas diferenças de expressão apontadas nas análises subsequentes (Nookaew *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2014).



**Figura 5. Gráficos dos valores de correlação de Pearson entre réplicas biológicas baseados nos valores de FPKM transformados em  $\log_{10}$ . Em (A) réplicas biológicas dos transcritomas da cepa selvagem (WT) e em (B) da cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ).**

A literatura demonstra ser aceitável a análise de dados de RNAseq obtidos com duas réplicas biológicas, desde que os experimentos sejam realizados de forma bem controlada para que a variabilidade esperada entre as réplicas seja baixa de modo a ficarem evidentes as diferenças entre transcritomas que serão comparados (Park *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016b). Por outro lado, embora o número mínimo ideal de réplicas biológicas em experimentos de RNAseq seja 3 para Conesa *et al.* (2016) e 6 para Schurch *et al.* (2016), este último autor demonstra que, para números menores de réplicas, a ferramenta computacional DESeq2 (Love *et al.*, 2014) é a que tem melhor desempenho e precisão para identificação de genes diferencialmente expressos, minimizando a identificação de falsos positivos. Como será apresentado adiante, utilizamos a ferramenta DESeq2 na comparação dos transcritomas.

#### 4.1.3. Panorama dos transcritomas das cepas WT e $\Delta rpfF$

Os 50 genes mais expressos nas cepas WT e  $\Delta rpfF$  com base em seus valores de FPKM estão listados na Tabela 6. A lista completa de todos os genes com seus respectivos FPKM consta no Apêndice 1. Observamos que os genes mais expressos nas cepas WT e  $\Delta rpfF$  também já foram verificados como mais expressos em estudo anterior de nosso grupo, em que foram investigados o transcrito da cepa Temecula1 WT cultivada em meio mínimo (Pierry, 2017). Assim como no estudo anterior, o gene que apresentou o maior valor de FPKM codifica o ncRNA que é componente catalítico da *Bacterial RNase P class A* (Mondragon, 2013). Outro ncRNA que também está entre os transcritos mais abundantes nos transcritomas de WT e  $\Delta rpfF$  é o RNA 6S, que tem um papel regulador na transcrição pela interação com a RNA polimerase ligada ao  $\sigma 70$  em resposta à mudança da fase exponencial de crescimento para a fase estacionária ou em condições de estresse (Wassarman e Storz, 2000). Outros trabalhos de análise de transcritomas por meio de RNAseq já reportaram a presença destes dois ncRNAs (RNase P e 6S) sendo altamente expressos em algumas condições em diversas espécies bacterianas, incluindo fitopatógenos como *Pseudomonas syringae* (Filiatrault *et al.*, 2010), *Xanthomonas oryzae patovar oryzae* (Liang *et al.*, 2011) e *Pectobacterium atrosepticum* (Kwenda *et al.*, 2016).

Destacamos também que entre os transcritos mais abundantes estão aqueles que codificam proteínas preditas como secretadas (possuem peptídeo sinal) ou de membrana. Entre estas estão colicina V (PD0215), OmpW, OmpA, lipases/esterases e proteases. Estes resultados confirmam observações anteriores (Pierry, 2017) que, mesmo no cultivo *in vitro*, *X. fastidiosa* continua a produzir, além de determinantes de virulência, toxinas que, supostamente, tem papel de controlar populações bacterianas de outras cepas de *Xylella* e de outras espécies endofíticas no xilema (Pashalidis *et al.*, 2005; Koide *et al.*, 2006; Zaini *et al.*, 2008; Fogaca *et al.*, 2010).

Também, entre os 50 transcritos mais abundantes está o que codifica a proteína Ax21 (PD1063), primeiramente descrita em *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. A função dessa proteína é controversa, mas em *X. fastidiosa*, ela é ortóloga de Omp1X/Ax21 presente em vesículas de membrana externa. Análises com a cepa mutante deste gene mostraram uma diminuição da agregação celular, embora não foram observadas diferenças no crescimento celular, formação de biofilme e virulência em ensaios de infecção em planta comparativamente à cepa selvagem (Pierce *et al.*, 2014).

A lista de transcritos mais abundantes inclui ainda transcritos de chaperonas moleculares (Hfq, CspA) e proteínas de respostas de estresse (bacterioferritina e peroxiredoxina), que, ou são

proteínas de modo geral reconhecidamente abundantes nas células, ou indicam que estas condições de cultivo *in vitro* são estressantes para *X. fastidiosa*.

**Tabela 6.** Ordenamento dos 50 transcritos mais abundantes nos transcritomas das cepas WT e  $\Delta rpfF$ .

CDS <sub>PD</sub>	Descrição	Posição baseada na média dos valores de FPKM	
		$\Delta rpfF$	WT
	Bacterial RNase P class A	1	1
	6S RNA	2	2
PD1280	Heat shock protein Hsp20	3	4
PD0657	Cysteine/serine peptidase protein	4	34
PD0215	Colicin V precursor CvaC (102 aa)	5	3
PD1807	Outer membrane protein W	6	8
PD1040	Peroxiredoxin Ohr	7	6
PD0066	RNA chaperone Hfq	8	18
PD1993	Cold shock protein CspA	9	9
PD0745	Peroxiredoxin AhpC	10	13
PD1502	Acyl carrier protein AcpP	11	7
PD0895	Outer membrane protein A3	12	12
PD0312	Membrane lipoprotein (106aa)	13	21
PD0540	Membrane lipoprotein (99aa)	14	5
PD1703	Esterase/lipase LesA	15	27
PD2048	Sigma factor RpoH (sigma 32)	16	10
PD0472	ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit ClpP	17	11
PD1702	Esterase/lipase LesB	18	39
PD1063	Omp1X/Ax21	19	28
PD0095	Carbon storage regulator CsrA	20	51
	Unknown function protein (152 aa)	21	45
PD0458	Ribosomal protein RpsM	22	50
PD0473	Endopeptidase ClpX	23	47
PD0444	Ribosomal protein RplP	24	35
PD1915	Translation initiation factor IF-3	25	26
PD0719	DNA-directed RNA polymerase, omega subunit	26	17
PD1709	Outer membrane protein OmpA	27	14
PD0749	Ribosomal protein RpmE2	28	29
PD0440	Ribosomal protein RplB	29	68
PD1126	Unknown function protein (127 aa)	30	19
PD1917	Unknown function protein (92aa)	31	42
PD1998	Ribosomal protein RpsG	32	59
PD2005	Ribosomal protein RplK	33	41
PD0906	Phage related protein	34	40

PD0593	RNA polymerase sigma factor, sigma-70 family	35	43
PD1672	Bacterioferritin Bfr	36	22
PD1558	Competence protein ComEA	37	31
PD0459	Ribosomal protein RpsK	38	63
PD2000	RNA polymerase RpoC	39	71
PD1999	Ribosomal protein RpsL	40	133
PD0452	Ribosomal protein RplF	41	46
PD0474	ATP-dependent protease Lon	42	53
PD0439	Ribosomal protein RplW	43	131
PD0961	Antitoxin ParD	44	20
PD2006	Transcription termination NusG	45	142
PD1371	Molecular chaperone GrpE (heat shock protein)	46	90
PD0752	Ribosomal protein RplM	47	66
PD1668	Bactofilin family protein CcmA	48	30
PD0437	Ribosomal protein RplC	49	99
PD0438	Ribosomal protein RplD	50	94
PD0497	Predicted Microcin XfmA (84 aa)	55	15
PD0521	Unknown function protein (72 aa)	56	16
PD1222	Unknown function protein (75 aa)	58	23
PD0932	Unknown function protein (82aa)	53	24
PD1176	Putative addiction module killer protein	82	25
PD0636	Sigma 54 modulation protein	61	32
PD1924	Type IV pilus assembly protein PilA	317	33
PD0471	Trigger factor Tig	77	36
PD0708	DNA-binding protein H-NS	64	37
PD1295	Predicted membrane protein DUF485	865	38
PD0755	Cyclic AMP receptor protein CRP	83	44

A análise comparativa dos transcritomas das cepas WT e  $\Delta rpfF$  revelou apenas 20 genes com expressão diferencial significativa ( $p < 0,1$ ) (Tabela 7). Este número foi bastante enxuto se comparado a outros estudos de expressão gênica global de *X. fastidiosa* que utilizaram microarranjos de DNA (de Souza *et al.*, 2003; de Souza *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008; da Silva Neto *et al.*, 2010; Fogaca *et al.*, 2010; Dourado *et al.*, 2015), os quais identificaram centenas de genes diferencialmente expressos nas diferentes condições de cultivo que foram avaliadas. Estudos utilizando RNAseq para análise do transcrito global de *X. fastidiosa* reportam algumas dezenas e até centenas de genes diferencialmente expressos, dependendo das condições de cultivo e das cepas ensaiadas (Giampetruzzi *et al.*, 2016; Parker *et al.*, 2016; Pierry, 2017).

**Tabela 7.** Lista com genes diferencialmente expressos na comparação entre as cepas selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ) quando cultivadas no meio PIM6 por 3 dias.

CDS <sub>NCBI</sub>	Gene	Descrição	$\Delta rpfF/WT$ ( $\log_2$ )
PD0399	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate CarB	3,44
PD0919		Unknown function protein	2,98
PD1245		Domain unknown function protein 596	2,14
PD0920		Unknown function protein	1,91
PD0959	<i>jayE</i>	Uncharacterized phage protein gp47/JayE	1,59
PD0126		Unknown function protein	1,50
PD1280	<i>hsp20</i>	Heat shock protein 20	1,35
PD0858	<i>camKII_AD</i>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase association domain protein CamKII_AD	1,23
PD0497	<i>xfmA</i>	Colicin V XfmA	-1,38
PD1094	<i>FI</i>	Phage-related protein FI	-1,46
PD1362	<i>slpD</i>	Proteinase slpD	-1,48
	<i>topB</i>	DNA topoisomerase-3 TopB	-1,49
PD1924	<i>pilA</i>	Fimbrial protein PilA1	-1,52
PD1113	<i>rrrD</i>	Phage-related lysozyme RrrD	-1,58
	6S RNA	Small RNA regulator of transcription 6S RNA	-1,63
	<i>orfA</i>	Transposase OrfA	-1,93
PD0790	<i>traC</i>	DNA primase TraC	-2,01
PD1348	<i>trbL</i>	Conjugal transfer protein TrbL	-2,30
PD1295		Domain unknown function protein 485	-284
PD0215	<i>cvaC</i>	Colicin V CvaC	-3,03

O pequeno conjunto de genes (20 genes) diferencialmente expressos encontrado na análise comparativa dos transcritomas das cepas WT e  $\Delta rpfF$  cultivadas por 3 dias em meio PIM6 também contrasta com os 446 genes diferencialmente expressos contabilizados na comparação dos transcritomas dessas mesmas cepas cultivadas por 6 dias em meio PW (Wang *et al.*, 2012). Esses autores detectaram 165 genes reprimidos e 281 genes com expressão aumentada no mutante  $\Delta rpfF$ , em experimentos de microarranjos de DNA, porém apenas uma pequena fração (17 genes) apresentam  $p < 10^{-4}$ .

Os genes detectados como diferencialmente expressos em nosso estudo não coincidem com o que foi descrito por Wang e colaboradores (2012), e em alguns casos os resultados são exatamente o oposto. Por exemplo, os transcritos de Colicina V (PD0215) e *pilA* (PD1924) apontados por estes autores como sendo mais expressos no mutante  $\Delta rpfF$  em relação a cepa WT, encontram-se reprimidos no mutante de acordo com nossos resultados (Tabela 7). Diante disso, apontamos que análises dos transcritomas das cepas selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ) desenvolvidos neste estudo apresentam boa correlação com os resultados obtidos no secretoma,

como será apresentado e discutido no item 4.1.4. A maior parte dos genes com alto número de FPKM no transcrito estão também presentes no ranking das proteínas mais abundantes do secretoma das cepas selvagem (WT) e mutante  $\Delta rpfF$ . Sendo essa correlação um indício razoável da plausibilidade dos nossos resultados. Desta forma, embora entendamos que outras estratégias devam ser empregadas futuramente (como a análise do transcrito das cepas WT e  $\Delta rpfF$  em diferentes tempos de cultivo no meio PIM6 e confirmação de resultados do transcrito por RT-qPCR) para melhor entender e conciliar com as diferenças que apontamos em relação ao trabalho de Wang (2012), admitimos que a condição de cultivo (meio PIM6) e o uso da técnica de *RNAseq* (mais atual e mais restritiva) utilizadas em nosso estudo podem ter sido determinantes para os resultados obtidos.

Além da Colicina V (PD0215), outro gene precursor de bacteriocinas PD0497 (*xfmA*) está diferencialmente expresso em nossos transcritomas. Destacamos que o gene PD0497 foi identificado e descrito como uma microcina (*xfmA*) por Duarte (2012). Wang (2012) sugeriu que *X. fastidiosa* utiliza seu arsenal antimicrobiano para, ao ter acesso ao xilema, eliminar outros microrganismos potenciais competidores de nicho e espaço. Contudo, em nossos transcritomas, a cepa selvagem tem os genes das colicinas V (*cvaC*/PD0215) e PD0497 (*xfmA*) mais expressos do que a cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ). Como já descrito, um importante aspecto que diferencia nossos experimentos dos que foram desenvolvidos por Wang (2012) é o meio de cultivo. O meio PIM6 é um meio mínimo e, portanto, mais limitado em disponibilidade de nutrientes do que o meio PW ou PWG. Dessa forma, admitimos a possibilidade de que a limitação nutricional encontrada em PIM6 seja responsável pela alteração da expressão de bacteriocinas entre a cepa selvagem (WT) e o mutante ( $\Delta rpfF$ ) comparada com o que foi reportado por Wang (2012). Em determinadas situações a limitação nutricional pode implicar em aumento da produção de bacteriocinas, justamente para melhor competir em seus nichos ambientais com outros microrganismos (Kuo *et al.*, 2013).

Nossos resultados também mostram que os genes *topB* (topoisomerase) e PD0790 (*traC*, helicase/primase), ligados à divisão celular; PD0497 (*xfmA*, atividade antimicrobiana); PD1113 (*rrrD*, lisozima), PD1362 (*slpD*, protease) estão com suas expressões aumentadas na cepa selvagem (WT) em relação ao mutante  $\Delta rpfF$ . Por outro lado, genes como PD1280 (*hsp20*, heat shock protein), PD0858 (*camKII\_AD*, proteína com domínio associado a Ca<sup>+</sup>/Calmodulina), encontram-se com maior expressão no mutante ( $\Delta rpfF$ ) em comparação à cepa selvagem,

Observamos que os genes *trbL* (ligado ao sistema de secreção do tipo IV) e *orfA* (com domínio de transposon), ligados à secreção e metabolismo de DNA, respectivamente, encontram-

se com suas expressões aumentadas na cepa selvagem em relação ao mutante ( $\Delta rpfF$ ). Também, o gene, PD0790 (*traC*), que codifica uma enzima helicase, responsável pelo desenovelamento do DNA na forquilha de replicação e, portanto, também está relacionado ao metabolismo de DNA, apresenta maior expressão na cepa selvagem (WT) em relação a cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ) (Burns, 1999; Odenbreit *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2008a; Duarte, 2012; Wang *et al.*, 2012).

O ncRNA 6S está mais expresso na cepa selvagem (WT) do que na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ). Em *E. coli* o RNA não codificador 6 S se acumula à medida que a bactéria entra na fase estacionária e sua ação se dá na interação com o fator sigma 70 (Wassarman e Storz, 2000; Trotochaud e Wassarman, 2005).

Dois genes relacionados a bacteriófagos foram encontrados diferencialmente expressos nas análises do transcrito. O gene PD1094 (FI) é predito como uma proteína da cauda de fago e está mais expresso na cepa selvagem (WT) do que na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ). De modo interessante também, o gene PD0959, que codifica para a proteína de fago *jayE* está sob regulação diferenciada de sua expressão, tendo sua expressão aumentada no mutante ( $\Delta rpfF$ ). Com a utilização de ferramentas de análise da plataforma IMG/M ER (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) observou-se a vizinhança de ambos os genes PD1094 e PD0959. Ambos estão inseridos em regiões com outros genes de fagos. Especificamente PD0959 também flanqueia genes de proteínas que codificam para sistemas de toxina-antitoxina. De fato, a inserção de genes de bacteriófagos não ocorre de maneira aleatória nos genomas de bactérias, mas podem, na verdade, ser inseridos em regiões passíveis de “espera” de estímulos de estresse para despertar em seus ciclos líticos (Tal *et al.*, 2014). Sistemas toxina-antitoxina quando presentes nos cromossomos bacterianos são úteis para a estabilização de superintegrons (elementos genéticos que codificam proteínas relacionadas à resistência, virulência e atividades metabólicas) e também para resistência a fagos (Fineran *et al.*, 2009; Unterholzner *et al.*, 2013). No entanto, para este último caso, admite-se que alguns fagos tenham evoluído sequências codificadoras de proteínas que imitam a função das antitoxinas. Assim, uma hipótese que poderia ser melhor investigada é a de que o gene da proteína JayE, tenha sua expressão aumentada em função do estresse causado pelo crescimento em meio mínimo PIM6 (Samson *et al.*, 2013).

O gene PD0399, que codifica para a enzima Carbamoil-fosfato sintase (*carB*), tem sua expressão aumentada no mutante  $\Delta rpfF$  em relação à cepa selvagem. Esta proteína, segundo a base de dados do uniprot (<http://www.uniprot.org>) tem sua função relacionada tanto à síntese de aminoácidos, quanto ao metabolismo de pirimidinas. Em *X. fastidiosa* essa função deve estar

preservada uma vez que este fitopatógeno possui todos os genes do metabolismo de pirimidinas presentes no seu genoma (Simpson *et al.*, 2000), incluindo genes relacionados a incorporação de pirimidinas exógenas em ácidos nucleicos (Mendz, 2001). Por outro lado, em alguns microrganismos, como *Pseudomonas* a atividade de *carB* está ligada também a degradação rápida de DSF, o qual tem seu mutante de *carB* deficiente não apenas na produção de arginina e pirimidinas, como esperado, mas também na produção de exopolissacarídeos (EPS) (Llamas *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2008). Em *X. fastidiosa* um trabalho recente demonstrou que a mutação no gene *prtA* (relacionado à proliferação celular, motilidade e formação de biofilme) está atrelada à diminuição da expressão do operon *carAB* (PD0398 e PD0399) e, por consequência, da produção de biofilme também diminui (Ciraulo *et al.*, 2010; Gouran *et al.*, 2016).

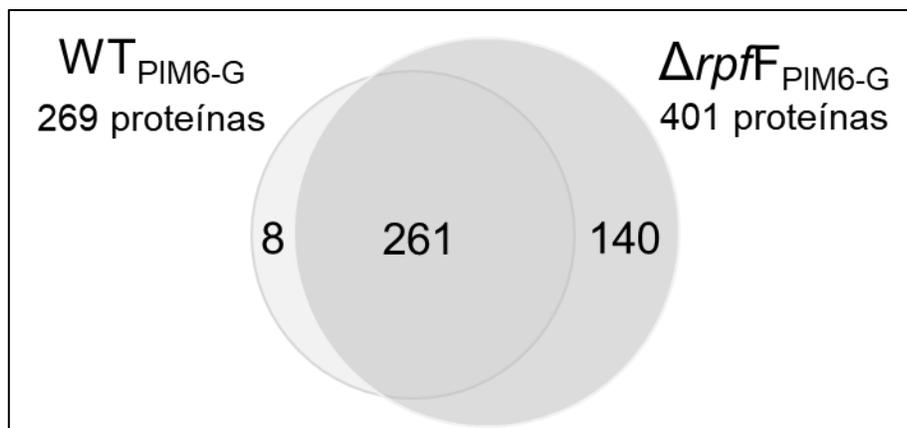
Alguns genes diferencialmente expressos ainda não têm função descrita. O gene PD1295 (que possui o *Domain unknown function protein 485*) está mais expresso na cepa selvagem (WT) do que na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ) e a análise de sua sequência de nucleotídeos revela a predição de um domínio de hélices transmembranar. Sem uma função predita, os genes PD0919, PD0920, PD0126, PD1295 e PD0858 estão mais expressos no mutante ( $\Delta rpfF$ ) em relação à cepa selvagem. Análise da vizinhança dos genes PD0919 e PD0920 na plataforma IMG/M ER indica a presença de vários genes de fagos. O gene PD0126 não possui qualquer predição incluindo a ausência de domínio conservado ou peptídeo sinal. Apesar de não possuir uma predição de função, o gene PD1295 tem um domínio conservado *Domain Unknown Function Protein 596*, porém sem função descrita até o momento (Goodacre *et al.*, 2013). Finalmente, PD0858 (que possui o domínio *camKII\_AD*, de proteína quinase  $Ca^{+}/calmodulina$ ), têm peptídeo sinal predito e também foi identificada no secretoma da cepa  $\Delta rpfF$ , confirmando uma integração entre os resultados do transcrito e do proteoma do secretoma, integração, que será melhor descrita no item 4.1.4.

Globalmente, o mutante ( $\Delta rpfF$ ) possui 8 genes mais expressos e 12 genes reprimidos em relação à cepa selvagem (WT). Diferenças de *fitness* entre as cepas  $\Delta rpfF$  e WT já foram demonstradas em outros trabalhos, também em diferentes condições de cultivos das que foram conduzidas neste estudo (Newman *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Contudo, no meio PIM6, em virtude do perfil da cepa selvagem (WT), tanto em relação aos resultados de viabilidade quanto pela análise dos genes diferencialmente expressos, inferimos que esta cepa consegue se adaptar melhor às condições de um meio limitado nutricionalmente. Alguns genes, como o de motilidade PD1924 (*pilA*), outros, ligados às maquinarias de processamento de DNA, como *topB* (helicase), *orfA* (transposase), PD0790 (DNA primase) e PD1348 (proteína do sistema de secreção do tipo

IV, TrbL), e, ao menos, duas bacteriocinas, PD0215 (Colicina V, *cvaC*) e PD0497 (microcina predita, *xfmA*), de um vasto arsenal descrito por Duarte (2012), são mais expressas na cepa selvagem (WT), sugerindo que em ambientes limitados nutricionalmente *X. fastidiosa* realiza uma maior atividade de replicação, condizente com seu perfil de viabilidade e crescimento identificados no item 4.1.1, também parece privilegiar parte do seu gasto energético em atividade antimicrobiana para sua manutenção num dado nicho ambiental (Killiny e Almeida, 2009a; Wang *et al.*, 2012). Os resultados obtidos também parecem implicar que a condição onde os nossos experimentos foram realizados (meio mínimo PIM6) é um ambiente de crescimento mais estressante e que parece deixar *X. fastidiosa* mais vulnerável para os ciclos líticos de fagos que estão presentes em seu genoma (Ahern *et al.*, 2014). Finalmente, mais investigações são necessárias, pois é possível que genes altamente expressos (Apêndice 1), mas não regulados diretamente por DSF também desempenhem um papel chave na virulência e patogenicidade do fitopatógeno, como evidenciado em outros trabalhos (Zaini *et al.*, 2008; da Silva Neto *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Pierry, 2017).

#### **4.1.4. Análise do secretoma de *Xylella fastidiosa* e sua integração com o transcritoma**

A identidade das proteínas solúveis do sobrenadante de culturas no meio PIM6 foi determinada após a remoção de células bacterianas e frações celulares por meio de etapas de centrifugações e concentrações (com filtros de centrifugação) das amostras. Um total de 409 proteínas foram identificadas no sobrenadante das duas cepas estudadas, selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ), por meio de análises em LC-MS/MS (Figura 6). Dentre as proteínas mais abundantes (Tabela 8) há muitas proteínas de membrana externa e OMVs que já foram apontadas em trabalhos anteriores (Smolka *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2016), das quais podemos citar: proteínas envolvidas com degradação da parede dos vasos da planta (PD1702/LesA e PD1703/LesB), proteases (PD0313/PspB, PD0856/Dcp, PD0956, PD1850, PD0950, PD0904 e PD0106/PepA), uma proteína relacionada a adesão (PD0731/XadA1), proteínas relacionadas à toxicidade e/ou patogenicidade bacteriana (PD0305, PD1427, PD1506 e PD2097, atualmente denominadas como RTX), porinas de membrana (PD1807/OmpW, PD1709/MopB, PD1063, PD1379, PD0318, PD2065/CirA), chaperoninas (PD1538/GroL e PD1370/DnaK), síntese proteica (PD1525/Fkbp e PD1026/GlnA), estresse oxidativo (PD1040/Ohr e PD2039/Slt) e síntese de nucleotídeos (PD0198/Pnp).



**Figura 6. Proteínas identificadas por LC-MS/MS.** Do total de proteínas identificadas nas duas cepas (409), selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ), cultivadas sob a mesma condição (PIM6), um número substancial de proteínas exclusivas estão contidas no secretoma da cepa  $\Delta rpfF$  (140).

Ambas as cepas, selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ) produzem as proteínas de toxicidade RTX (PD0305, PD1427, PD1506 e PD2097). Estas proteínas estão mais abundantes e/ou melhor posicionadas no ranking da cepa selvagem (Tabela 8 e Apêndice 2). As proteínas de toxicidade do tipo RTX pertencem a uma classe com várias funções descritas em bactérias Gram-negativas. Proteínas do tipo RTX possuem atividade de bacteriocina, proteases, lipases, além de em sua maioria não terem uma atividade conhecida (Linhartova *et al.*, 2010).

Encontramos, na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ), um número maior de proteínas citoplasmáticas e de membrana citoplasmática (267) em comparação com a cepa selvagem (159). Embora os resultados descritos no item 4.1.1 indiquem que ambas as cepas, mutante ( $\Delta rpfF$ ) e selvagem (WT), apresentam razoável viabilidade no meio mínimo PIM6 (comparável com os valores encontrados para estas cepas no meio rico PWG), consideramos que este alto número de proteínas citoplasmáticas pode estar associado a uma situação de estresse para *X. fastidiosa* em função do ambiente limitado nutricionalmente que é o meio mínimo PIM6 e que a cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ), dada sua falha no sistema de sinalização por DSF, seja mais suscetível. Os perfis de curva de crescimento em PIM6 para várias cepas de *X. fastidiosa* obtidos por Pierry (2017) indicam que embora mimetize a composição do fluido xilemático, o meio PIM6 não é adequado para cultivos de longo prazo.

Investigamos o transcrito e o secretoma de *Xylella fastidiosa* para caracterizarmos os genes e as proteínas mais expressos quando as cepas, selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ), são cultivadas em meio PIM6 por 3 dias. As análises em LC-MS/MS de *shotgun* do sobrenadante

concentrado das culturas de cepas, selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ), de *X. fastidiosa* identificaram um total de 409 proteínas (Figura 6 e Apêndice 2). Dentro do conjunto de 50 proteínas mais expressas há um número razoável de proteínas sem predição de secreção celular (especificamente 14 proteínas na cepa selvagem e 20 proteínas na cepa mutante,  $\Delta rpfF$ ) e a alta sensibilidade da análise de espectrometria de massas empregada levou à identificação de muitas enzimas e proteínas envolvidas em processos intracelulares, por exemplo, proteínas ribossômicas e enzimas glicolíticas (Tabela 8 e Apêndice 2, para detalhes completos das proteínas secretadas).

**Tabela 8. Proteínas identificadas no secretoma das cepas selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ) de Temecula1.**

Número da CDS <sub>PD</sub> *	Nome do gene**	Nome da proteína (atribuído)‡	Ranking#	
			$\Delta rpfF$	WT
PD1807	OmpW	Outer membrane protein W	1	2
PD1703	LesA	Lipase/Esterase LesA	2	1
PD1538	GroL	Chaperonin GroL	3	7
PD1063		Omp1X/Ax21	4	13
PD1370	DnaK	Chaperone protein DnaK	5	10
PD1283		Outer membrane protein/TonB dependent receptor	6	21
PD1709	OmpA/MopB	Outer membrane protein A OmpA	7	9
PD1040	Ohr	Hydroperoxide reductase Ohr	8	8
PD0731	XadA1	Adhesin XadA1	9	5
PD0856	Dcp	Peptidyl-dipeptidase Dcp	10	11
PD0318		Porin	11	38
PD0904		Cysteine/serine peptidase PS-46	12	20
PD0313	PspB	Serine Protease	13	4
PD1028	Ycel	Periplasmic protein Ycel	14	29
PD0198	Pnp	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase Pnp	15	26
PD2065	CirA	Porin CirA	16	56
PD1850		Zn-dependent amino- or carboxypeptidase	17	16
PD0106	PepA	Aminopeptidase A	18	30
PD2039	Slt	Murein transglycosylase Slt	19	35
PD1026	GlnA	Glutamine synthetase GlnA	20	31
PD0696	PtrB	Oligopeptidase B PtrB	21	41
PD1525	Fkbp	Peptidylprolyl isomerase Fkbp	22	19
PD0950		Serine protease	23	18
PD2000	RpoC	RNA polymerase RpoC	24	73

PD1853		Zn-dependent peptidase	25	23
PD1202	PstS	Phosphate ABC transporter PstS	26	27
PD1997	FusA	Elongation factor G FusA	27	46
PD0745	AhpC	Peroxiredoxin AhpC	28	28
PD0894	TolB	TolB protein	29	48
PD1537	GroS	Chaperonin GroS	30	37
PD1964	TolC	Outer membrane protein TolC	31	49
PD0540		Unknown function protein	32	25
PD1996	TufA	Elongation factor-Tu TufA	33	70
PD0956		Cysteine/serine peptidase	34	14
PD2001	RpoB	RNA polymerase RpoB	35	111
PD0895	OmpA	Outer membrane protein A	36	33
PD1300		Dipeptidyl aminopeptidase	37	65
PD0270	OprP	Porin O OprP	38	112
PD0858	CAMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase CAMKII	39	-
PD1931	SucD	Succinyl-CoA ligase SucD	40	22
PD1570		Metallo peptidase	41	61
PD1711		Porin	42	40
PD1973	IcdA	Isocitrate dehydrogenase IcdA	43	43
PD1930	SucC	Succinyl-CoA synthetase SucC	44	36
PD1168	FkpA	Peptidyl-prolyl isomerase FkpA	45	44
PD0273	HtpG	Chaperone HtpG	46	74
PD0058	MrkD	Fimbrial protein MrkD	47	34
PD2056	Icd	Isocitrate dehydrogenase Icd	48	75
PD0236	AcnB	Aconitate hydratase AcnB	49	59
PD1427	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	50	6
PD1286		Serine protease	51	76
PD1506	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	86	3
PD0305	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	138	12
PD1319	TonB	Outer membrane protein TonB	128	15
PD0528		Autotransporter beta-domain	154	24
PD0744	Hsf	Surface protein Hsf	344	42
PD0573	YceL	Polyisoprenoid-binding protein YceL	134	45
PD0492	Mdh	Malate dehydrogenase Mdh	55	47
PD0824	XadA3	Adhesin XadA3	260	50
PD1380	CspA	Cold shock protein CspA	80	51

\*Número da locus tag na cepa de videira (Temecula1). \*\*Nome do gene recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. \*Nome atribuído de forma equivalente nas duas cepas (selvagem e mutante). #Ranking das proteínas em ordem de abundância de espectros.

Um número total, substancialmente maior de proteínas, foi identificado no secretoma da cepa  $\Delta rpfF$  (401) em relação à cepa selvagem (269). Sendo que as cepas selvagem e mutante de  $\Delta rpfF$  compartilham 261 proteínas das que foram identificadas em cada um dos secretomas. Embora, como já mencionado, não seja possível indicar diretamente se a condição dos cultivos pelos quais obteve-se as amostras favoreceu a identificação desse número maior de proteínas na cepa mutante, sugere-se que esses dados são condizentes com a Tabela 5, a qual mostra um aumento de 100 por cento do número de genes na faixa de 10.000 a 1000 FPKM, onde as duas cepas WT e  $\Delta rpfF$  são cultivadas nas mesmas condições do secretoma (PIM6, por 3 dias), isto é, o número de genes na faixa dos genes altamente expressos dobra de tamanho, indicando que a cepa mutante é mais suscetível às condições estressantes do meio mínimo PIM6 (Chatterjee *et al.*, 2008a; Killiny e Almeida, 2009a; Wang *et al.*, 2012).

Um exemplo de integração entre os resultados de proteômica do secretoma (exoproteoma) e a análise de expressão diferencial do transcrito é o gene PD0399 (*carB*, Carbamoil-fosfato sintase) (Tabela 8) (Newman *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2015; Gouran *et al.*, 2016). Este gene encontra-se cerca de 11 vezes mais expresso na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ), em comparação à cepa selvagem (WT). Corroborando esses resultados, a enzima, PD0399 (*carB*), está no conjunto de proteínas secretadas pelo mutante ( $\Delta rpfF$ ), ainda que em baixa abundância (presente com apenas 11 espectros de acordo com os resultados das análises de LC-MS/MS), mas não foi detectada no secretoma da cepa selvagem (WT). Esta ausência pode ser atribuída ainda ao alcance de identificação de proteínas ou cobertura da amostra nas análises proteômicas do secretoma, mas é provável que esse fenômeno seja condizente com o perfil de expressão do gene PD0399 (*carB*). Cabe destacar que a enzima PD0399 (*carB*) foi identificada (Tabela 15) exclusivamente no proteoma de vesículas da cepa selvagem (WT) de Temecula1 como será discutido no item 4.2.3.

Além de PD0399 (*carB*), os genes PD1280 (*hsp20*) e PD0858 (*CamkII\_AD*), que estão ligeiramente mais expressos, nas análises do transcrito, no mutante ( $\Delta rpfF$ ) em relação à cepa selvagem (WT), aparecem também mais abundantes ou de forma exclusiva, respectivamente, no secretoma da cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ) quando comparado com a cepa selvagem. Também presentes no transcrito e secretoma de *Xylella fastidiosa* produzidos nesse estudo, os genes PD1094 e PD1924, estão reprimidos na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ) em relação à cepa selvagem. No secretoma a proteína PD1094, predita como uma proteína da cauda de fago, está presente e minimamente abundante no secretoma da cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ), mas não foi detectada no secretoma da cepa WT. De forma similar, a proteína PD1924 (*pilA*), predita como uma proteína

do pilus do tipo IV, está posicionada no *ranking* da cepa selvagem (WT) na 66° posição e na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ) encontra-se 76° posição.

Embora o número de espectros possua uma relação linear com a abundância das proteínas (McIlwain *et al.*, 2012), a análise comparativa da abundância de uma mesma proteína em dois diferentes proteomas não é possível. Por isso, uma possibilidade futura, é a realização da proteômica *shotgun* quantitativa, com marcação de peptídeos e proteínas, para melhor comparação e integração de dados de expressão diferencial do transcrito com proteoma (Schubert *et al.*, 2017; Vidova e Spacil, 2017).

**Tabela 8.** Integração do transcrito e do secretoma (exoproteoma).

CDS <sub>NCBI</sub>	Descrição	Transcritoma $\Delta rpfF/WT^*$	Secretoma <sup>‡</sup>	
			$\Delta rpfF$	WT
PD0399	Carbamoyl-phosphate <i>carB</i>	3,44	11 (229°)	--
PD1280	Heat shock protein <i>hsp20</i>	1,35	101 (55°)	45 (82°)
PD0858	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent associate domain protein kinase CAMKII_AD	1,23	155 (40°)	--
PD1094	Proteína de cauda de fago <i>FI</i>	-1,46	6 (298°)	--
PD1924	Type IV pilus <i>pilA1</i>	-1,52	66 (76°)	65 (66°)

\* Razão *fold change* de  $\Delta rpfF/WT$  em log<sub>2</sub>. ‡ Abundância de espectros (posição no ranking do respectivo secretoma).

## 4.2. Caracterização da composição de OMVs secretadas por *X. fastidiosa*

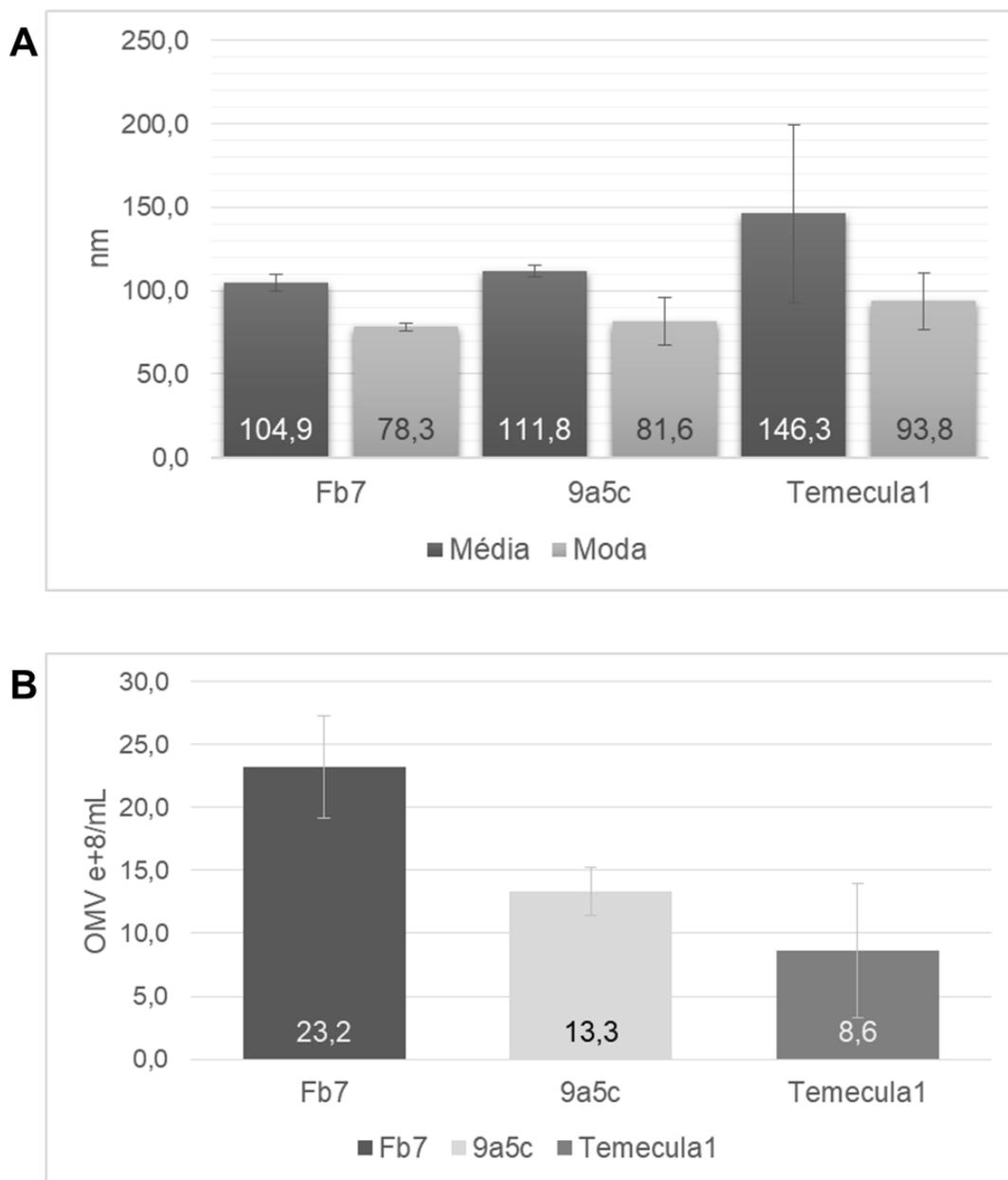
*X. fastidiosa* (cepa Temecula1) libera OMVs (*Outer Membrane Vesicles*) que interferem na adesão das células a superfícies, facilitando, assim, a migração da bactéria pelos vasos do xilema (Ionescu *et al.*, 2014). Além disso, as OMVs de *X. fastidiosa* poderiam atuar como veículo de dispersão de fatores de virulência, assim como verificado para outras bactérias Gram-negativas (Sidhu *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2015; Devos *et al.*, 2015; Rompikuntal *et al.*, 2015; Turkina *et al.*, 2015). A composição proteica das OMVs da cepa Temecula1 já foi parcialmente determinada, sendo verificado que elas contêm, entre outras proteínas, a lipase/esterase LesA, proposta como um fator de virulência nessa cepa (Nascimento *et al.*, 2016).

Visando ampliar a caracterização bioquímica de OMVs de *X. fastidiosa*, analisamos o proteoma total e o metaboloma destas nanopartículas. Além da cepa Temecula1, isolada de videira, utilizamos as cepas Fb7 e 9a5c, isoladas de citros, para caracterização das OMVs secretadas por *X. fastidiosa*. As cepas Temecula1 e 9a5c são reconhecidamente cepas virulentas (Li *et al.*, 1999; Van Sluys *et al.*, 2003). A cepa Fb7, embora tenha sido isolada de uma planta com sintomas de CVC, não teve ainda sua virulência demonstrada *in planta*. Esta cepa,

entretanto, exibe, no cultivo *in vitro*, características fenotípicas muito distintas da cepa 9a5c, tais como crescimento predominantemente planctônico e ausência de formação de biofilme denso (Pierry, 2017) além de uma aparente produção aumentada de OMVs, como será discutido a seguir.

#### **4.2.1. Quantificação da secreção de OMVs**

A quantificação da produção de OMVs produzidas pelas cepas Fb7, 9a5c e Temecula1, após cultivo em meio completo PWG por 07 dias, foi realizada através de rastreamento de nanopartículas (NTA, *Nano Tracking Analysis*) como previamente descrito (Ionescu *et al.*, 2014). Os resultados de NTA indicaram que as OMVs das três cepas *X. fastidiosa* tem tamanho médio variando de 100 a 150 nm (Figura 7A), que são compatíveis com os valores previamente determinados para cepa Temecula1 (Ionescu *et al.*, 2014). Entretanto, a cepa Temecula1 parece liberar partículas maiores do que as cepas 9a5c e Fb7, sendo que para estas cepas as vesículas de 80 a 90 nm são as mais abundantes (Figura 7A). Interessantemente, observamos uma maior produção de vesículas pela cepa Fb7 (Figura 7B), a qual produz, nas condições experimentais utilizadas ~57% mais OMVs do que as cepas 9a5c e Temecula1. Estes resultados foram normalizados em relação da densidade ótica (DO) das culturas das diferentes cepas ao invés da utilização de unidades formadoras de colônia (UFC), pois diferentemente da cepa Temecula1, as cepas de citros praticamente não formam colônias isoladas.



**Figura 7. Análise da produção de OMV secretadas no sobrenadante de cultivos de cepas de *X. fastidiosa* através da técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA).** Em (A) média (barras em cinza-escuro) e moda (barras em cinza-claro) os tamanhos de OMVs secretadas pelas cepas Fb7, 9a5c e Temecula1 cultivadas por 7 dias em meio completo PWG. Em (B) contagens da produção de OMVs normalizadas pelas densidades óticas de cada cultivo. As barras de erro em (A) e (B) correspondem ao desvio padrão de medidas realizadas para três réplicas biológicas (cultivos independentes).

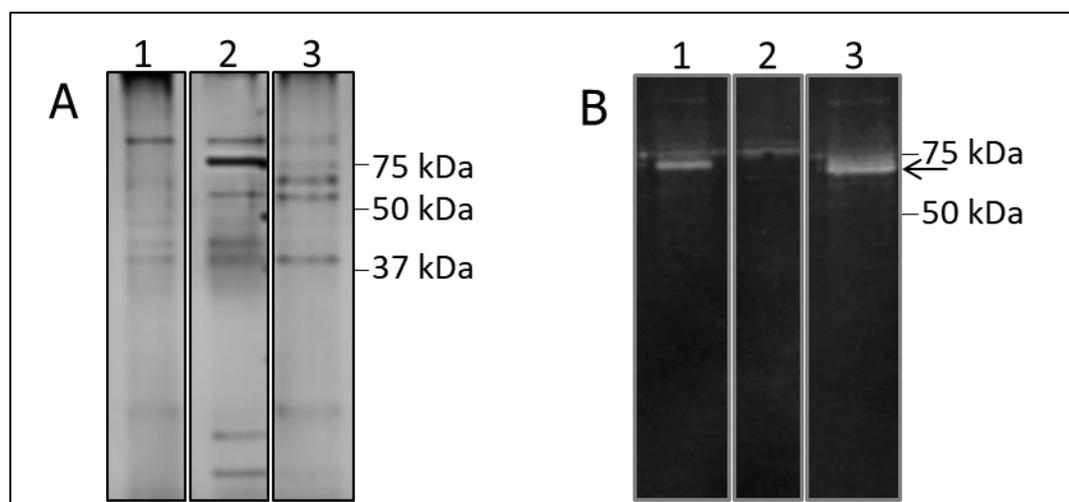
O fenótipo de maior produção de OMVs exibido pela cepa Fb7 é similar ao fenótipo do mutante  $\Delta rpfF$  (Ionescu *et al.*, 2014). Este mutante não produz a molécula sinalizadora DSF, apresenta deficiência na produção de biofilme denso e exibe um fenótipo de hipervirulência disseminando-se acentuadamente por toda a planta (Newman *et al.*, 2004). A cepa Fb7 também parece compartilhar outras características fenotípicas com o mutante  $\Delta rpfF$ , como a deficiência na formação de biofilme denso. Entre várias diferenças genômicas encontradas na cepa Fb7, foi verificado que ela tem uma mutação no gene *rpfC*, que codifica o receptor de DSF, e que supostamente resulta na expressão de uma proteína truncada, com ~199 aminoácidos, que se produzida seria incapaz de ligar DSF (Santana, 2013). Dessa forma postulamos que esta mutação resultaria em deficiência na percepção do DSF bem como na transdução deste sinal pela cepa Fb7. O fenótipo de deficiência na percepção do DSF poderia ser indiretamente comparado ao mutante  $\Delta rpfF$ , o qual além de ser deficiente na produção de DSF (Newman *et al.*, 2004) mostrou-se também deficiente na percepção do sinal, que em *X. fastidiosa*, é dependente tanto de RpfC como de RpfF (Ionescu *et al.*, 2013). No entanto, a explicação definitiva para o fenótipo de Fb7 ainda carece de comprovação experimental adicional.

#### **4.2.2. Análise de OMVs purificadas a partir do cultivo *in vitro***

Para análise proteômica, foram obtidas preparações enriquecidas em OMVs (livres de fragmentos de células resultante de lise) por meio de sucessivas centrifugações e ultracentrifugações de sobrenadantes de cultivos das cepas Fb7, 9a5c e Temecula. Os cultivos foram realizados em meio PWG por 7 dias.

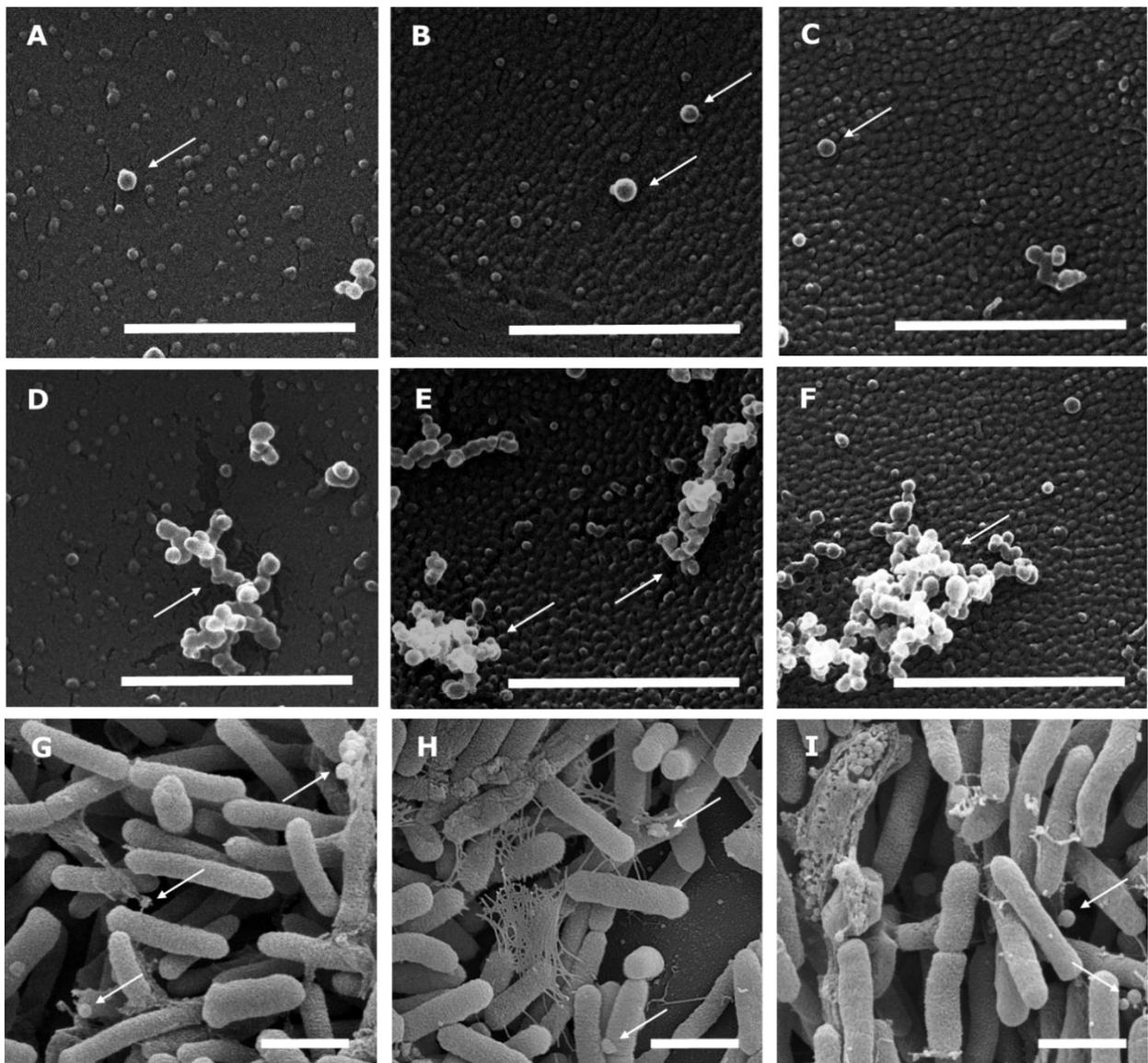
Os perfis de polipeptídeos das preparações de OMVs das 3 cepas foram inicialmente avaliados pela coloração com prata do gel de SDS-PAGE e se mostram ligeiramente distintos (Figura 8A) quanto a abundância relativa das bandas visíveis. Entretanto, as OMVs das 3 cepas contem, como esperado, a proteína XadA1, conforme revelado por imunodeteção com anticorpo policlonal anti-XadA1 (Figura 8B). XadA1 é uma adesina do tipo autotransportador trimérico associada a superfície das células bacterianas e proposta como um marcador de OMVs em *X. fastidiosa* (Ionescu *et al.*, 2014). A ligeira diferença na migração eletroforética de XadA1 entre as 3 cepas é, provavelmente, reflexo de diferenças no tamanho da CDS predita em cada um destes genomas. A anotação de XadA1 nestes genomas indica um polipeptídeo de 998 e 1004 aminoácidos, respectivamente, para Temecula1 e para 9a5c e Fb7. Além disso, há diferenças

entre as sequências de aminoácidos, sendo que XadA1 de Temecula1 é 94% idêntica as proteínas ortólogas de 9a5c e Fb7, que por sua vez são 99% idênticas (dados não mostrados).



**Figura 8. Imunodeteção de XadA1 nas OMVs purificadas de *X. fastidiosa*.** As suspensões de OMVs purificadas do sobrenadante do cultivo das cepas Fb7 (1), 9a5c (2) e Temecula1 (3) em meio PWG foram separadas em SDS-PAGE (12,5 % de poliacrilamida) e o gel foi corado com prata (A). Em (B) uma réplica do gel utilizado mostrado em (A) foi utilizado para *Western blot* para imunodeteção de XadA1 com anticorpo policlonal anti-XadA1 (1:20.000). A detecção foi realizada com anticorpo secundário acoplado a IRDye 680RD (1:15.000), seguindo-se captura da imagem no aparelho *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences). Os marcadores de massa molecular estão indicados e a seta em (B) aponta a banda de XadA1.

Um aspecto que consideramos relevante era a demonstração de que a preparação de OMVs estivesse enriquecida em partículas íntegras. Este aspecto foi avaliado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens apresentadas na Figura 9 demonstram a integridade das OMVs purificadas das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1.



**Figura 9. Imagens de OMVs das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1 obtidas por MEV. As imagens A a F são de preparações de OMVs as quais podem ser visualizadas isoladas (A a C) ou em agregados formando “cachos” de OMVs (D a F). As imagens G a I são imagens das células. A, D e G correspondem à cepa Fb7; B, E e H, à 9a5c e C, F e I, à cepa Temecula1. As setas utilizadas destacam as OMVs e as barras indicam 1 μM.**

### 4.2.3. Proteoma das OMVs

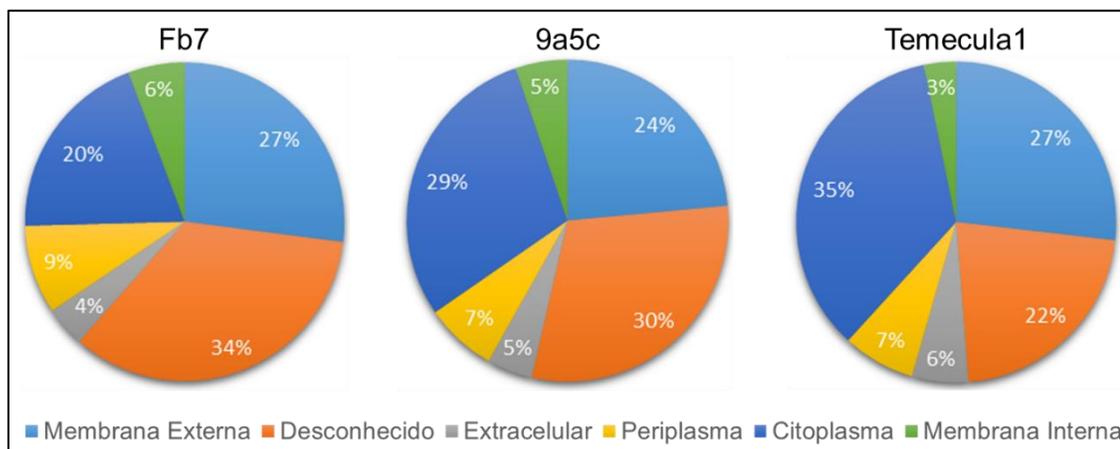
As preparações (triplicatas biológicas) de OMVs obtidas e analisadas como descrito acima foram reunidas para realização de proteômica *shotgun*, sendo o precipitado de OMVs submetido a digestão com tripsina e os peptídeos obtidos identificados por LC-MS/MS (ver itens 3.8 e 3.9). Esta análise identificou, com elevado grau de confiança (1,0% FDR proteico e 0,1% FDR para aminoácidos) 122, 152 e 123 proteínas nas preparações de OMVs, respectivamente, das cepas Fb7, 9a5c e Temecula (Apêndice 3). Em resumo, o total de 202 proteínas distintas foram identificadas nas preparações de OMVs dessas 3 cepas, caracterizando um conjunto proteico bastante diverso. As proteínas identificadas nas OMVs de cada uma das cepas foram ordenadas pelo software de análise (Scaffold 4) segundo sua abundância inferida a partir de uma relação entre o número de peptídeos detectados, número de espectros e massa molecular predita. Esse ordenamento (*ranking*) foi utilizado como uma inferência da abundância das proteínas identificadas nos proteomas das OMVs das 3 cepas.

Por meio das ferramentas de predição SignalP (Petersen *et al.*, 2011) e SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2005), identificamos que 65%, 72% e 79% do proteoma das OMV das cepas Temecula1, 9a5c e Fb7, respectivamente, são preditas como proteínas secretadas (Apêndice 3). Essas duas ferramentas são capazes de predizer quais as proteínas são secretadas por vias clássicas e não clássicas. O resultado dessa análise, mostrou que todas as 25 proteínas mais abundantes no proteoma da cepa 9a5c possuem peptídeo sinal ou são secretadas por uma via não clássica (Tabela 9), na cepa Fb7 24 das 25 proteínas e na cepa Temecula, 23 das 25 proteínas mais abundantes também foram preditas como secretadas. Além disso, entre as proteínas mais abundantes, são verificadas várias proteínas (19 em 9a5c e 11 em Temecula1) que foram detectadas em estudos anteriores que avaliaram o proteoma de OMVs de 9a5c (Mendes *et al.*, 2016) ou de Temecula1 (Nascimento *et al.*, 2016). Estas observações podem ser consideradas como uma validação da pureza das preparações de OMVs que analisamos através de proteômica *shotgun* e demonstram a consistência dos dados obtidos.

Outro aspecto que destacamos é que as proteínas mais abundantes nas OMVs de Temecula1 foram também detectadas no secretoma (exoproteoma) desta cepa cultivada em meio mínimo PIM6 (ver item 4.1), exceto pela PD1702 (LesB) que não foi detectada (Apêndice 1 e Tabela 9). No secretoma de Temecula1, a maioria dessas proteínas não está necessariamente entre as mais abundantes refletindo o fato de que não se trata de uma preparação enriquecida em OMVs.

Adicionalmente, utilizamos o *software* PsortB (Yu *et al.*, 2010) para a predição de localização subcelular para cada uma das proteínas identificadas na análise proteômica das OMVs e o resultado obtido também está listado no Apêndice 3. Foi possível prever a localização subcelular para 69,9%, 65,6% e 73% do proteoma de 9a5c, Fb7 e Temecula1, respectivamente. Uma fração relevante (20-35%) corresponde a proteínas preditas como citoplasmáticas enquanto que 24%-27% das proteínas foi predita como sendo localizadas na membrana externa (Figura 10). Não é possível excluir completamente que as proteínas citoplasmáticas identificadas sejam fruto de contaminação durante o processo de isolamento das OMVs, entretanto é plausível supor que proteínas citoplasmáticas possam ser recrutadas durante a formação das OMVs. Vale destacar, entretanto, que as proteínas preditas como citoplasmáticas figuram entre as proteínas de menor abundância na análise do proteoma das OMVs das três cepas, representando menos do que 10% das 50 proteínas mais abundantes nos 3 proteomas (Apêndice 3).

Por outro lado, a presença de proteínas citoplasmáticas em OMV pode ser fruto de recrutamento durante o processo de gênese das vesículas (Kato *et al.*, 2002; Kulp e Kuehn, 2010; Siljamaki *et al.*, 2014; Perez-Cruz *et al.*, 2015). Além disso, já foi demonstrado que bactérias Gram-negativas secretam vesículas de membrana externa e interna (I-OMV, *Outer-Inner Membrane Vesicle*) de forma coordenada e não aleatória, as quais podem empacotar em seu interior proteínas citoplasmáticas (Perez-Cruz *et al.*, 2015), o que poderia explicar, assim, a presença de proteínas citoplasmáticas e/ou associadas a membrana citoplasmática nas OMVs.



**Figura 10. Localização subcelular predita para as proteínas identificadas nas OMVs de *X. fastidiosa*.** A predição da localização subcelular foi realizada com *software* PsortB proteínas e está listada no Apêndice 3.

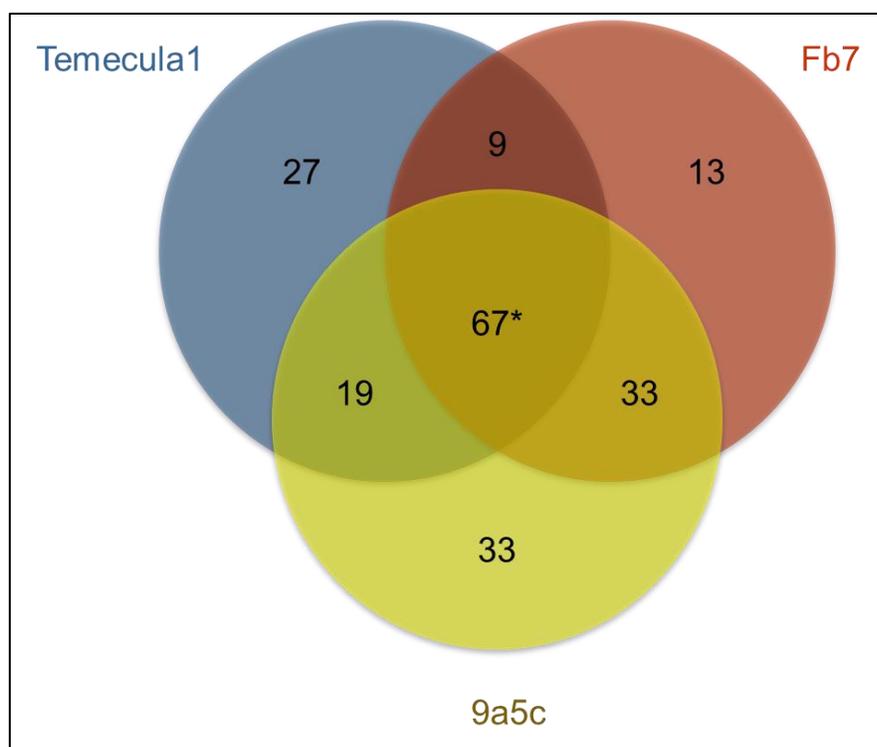
**Tabela 9. Proteínas mais abundantes identificadas no proteoma das OMV das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1.**

Fb7					9a5c					Temecula1							
CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	Descrição ***	SignalP	SecP Score	CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	Descrição ***	SignalP	SecP Score	CDS <sub>PD</sub> **	CDS <sub>CVC</sub> *	Descrição ***	SignalP	SecP Score			
1	XF0872	PD1807	Outer membrane protein W		0.885248	1	XF1026	PD0313	Serine Protease		0.945786	1	PD1702	XF0357	Lipase/Esterase LesB		0.884462
2	XF1516	PD0731	Adhesin XadA1		0.962290	2	XF0343	PD1709	Outer membrane protein A		0.936425	2	PD1703	XF0358	Lipase/Esterase LesA		0.897285
3	XF1036	PD0318	Porin	33 34		3	XF1981	PD0824	Adhesin XadA3		0.947713	3	PD1807	XF0872	Outer membrane protein W	23 24	
4	XF2237	PD1283	TonB-dependent receptor	31 32		4	XF2237	PD1283	TonB-dependent receptor	31 32		4	PD0313	XF1026	Serine Protease		0.963157
5	XF1287	PD0540	Unknown function protein		0.914419	5	XF2713	PD2065	Porin CirA	24 25		5	PD0731	XF1516	Adhesin XadA1	26 27	
6	XF2586	PD1964	Outer membrane export factor	21 22		6	XF1803	PD1063	Omp1X/Ax21	20 21		6	PD1709	XF0343	Outer membrane protein OmpA/MopB		0.939696
7	XF0357	PD1702	Lipase/Esterase LesB		0.898363	7	XF0363	PD1699	Outer membrane protein A	27 28		7	PD0318	XF1036	Porin	33 34	
8	XF2713	PD2065	Porin CirA	24 25		8	XF2586	PD1964	Outer membrane export factor	21 22		8	PD1283	XF2237	TonB-dependent receptor	31 32	
9	XF0343	PD1709	Outer membrane protein A		0.936425	9	XF0975	PD0270	Porin O	21 22		9	PD0950	XF1851	Serine protease		0.955476
10	XF0975	PD0270	Porin O	21 22		10	XF0550	PD1589	Porin	34 35		10	PD1699	XF0363	Outer membrane protein OmpA	27 28	
11	XF0358	PD1703	Lipase/Esterase LesB		0.897285	11	XF1851	PD0950	Serine protease		0.951957	11	PD0757	XF1547	Membrane lipoprotein Lpp	24 25	
12	XF2677	PD2039	L-ascorbate oxidase Aoo	29 30		12	XF1036	PD0318	Porin	33 34		12	PD0824	XF1981	Adhesin XadA3	21 22	
13	XF0363	PD1699	Outer membrane protein A	27 28		13	XF1287	PD0540	Unknown function protein		0.914419	13	PD2065	XF2713	Porin CirA	21 22	

14	XF0339	PD1711	Porin	34 35	14	XF0357	PD1702	Lipase/Esterase LesB	0.898363	14	PD0270	XF0975	PorinO OprP	0.944895
15	XF2151	PD1211	Lipase/Esterase LesC	0.939447	15	XF1577	PD0978	DUF2184	0.534336	15	PD1964	XF2586	Outer membrane export factor	17 18
16	XF1897	PD0894	TolB protein	0.776817	16	XF2349	PD0528	Autotransporter beta-domain	0.848566	16	PD2118	XF2775	Hemagglutinin PspA	34 35
17	XF1896	PD0895	Outer membrane protein A	27 28	17	XF0668	PD1506	Hemolysin toxin protein RTX	0.740758	17	PD1589	XF0550	Porin BtuB	0.873189
18	XF1384	-	Alpha/beta-Hydrolases PqaA	0.746899	18	XF1547	PD0757	outer membrane lipoprotein precursor	17 18	18	PD0744	XF1529	Adhesin XadA2/Hsf	0.912769
19	XF1851	PD0950	Serine protease	0.951957	19	XF1887	PD0904	Cysteine/serine peptidase PS-46	22 23	19	PD0503	XF1226	Unknown function protein	0.605475
20	XF1981	PD0824	Adhesin XadA3	0.947713	20	XF0081	PD0060	Outer membrane FimD	0.912805	20	PD0062	XF0083	Fimbrial protein FimA	0.928989
21	XF1811	PD1055	Outer membrane protein Slp	0.912827	21	XF1011	PD0305	Hemolysin toxin protein RTX	0.566194	21	PD1427	XF2407	Hemolysin toxin protein RTX	0.908850
22	XF0781	PD1879	Lipase/Esterase	23 24	22	XF0321	PD0264	Porin O	24 25	22	PD1996	XF2628 or XF2640	Elongation factor Tu	
23	XF1547	PD0757	Membrane lipoprotein Lpp	17 18	23	XF1897	PD0894	TolB protein	0.776817	23	PD1711	XF0339	Porin	
24	XF1911	PD0880	Membrane lipoprotein		24	XF0358	PD1703	Lipase/Esterase LesB	0.897285	24	PD0540	XF1287	Unknown function protein	34 35
25	XF1024	PD0312	Membrane lipoprotein	17 18	25	XF1046	PD0326	Outer membrane protein BamA	26 27	25	PD1200	XF2137	Ferric enterobactin receptor BfeA	25 26

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1). \*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra. As colunas Signal P e SecP score indicam, respectivamente, a posição do peptídeo sinal predito ou indicam secreção por uma via não clássica. Proteínas também detectadas em estudos anteriores estão sombreadas em laranja (Mendes *et al.*, 2016) ou cinza (Nascimento *et al.*, 2016).

A análise comparativa mostra que 67 proteínas são compartilhadas entre os proteomas das OMVs das 3 cepas (Figura 11). São também observadas proteínas específicas nas OMVs de uma das três cepas, sendo 27 para Temecula1, 13 para Fb7 e 33 para 9a5c. Vale destacar, que as OMVs de 9a5c e Fb7 (cepas de citros) têm composição mais semelhante entre si (compartilham 33 proteínas) do que com as OMVs de Temecula1 que compartilha 19 proteínas ou de Fb7 com Temecula1 onde 9 proteínas são compartilhadas.



**Figura 11. Proteoma das OMVs de *X. fastidiosa*.** O proteoma completo das OMVs das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1 foi determinado por LC-MS/MS e os dados obtidos foram comparados. Os números no diagrama de Venn indicam proteínas detectadas com elevado grau de confiança na análise por proteômica *shotgun* de triplicatas biológicas de preparações de OMVs das 3 cepas. \*Os genes PD0528 e PD1379 identificados no proteoma de OMVs da cepa Temecula1, correspondem à CDS XF2349 das cepas Fb7 e 9a5c sendo contada, portanto, uma única vez nesta análise.

Embora tenhamos identificado 67 proteínas em comum aos proteomas de OMVs das 3 cepas, há grande variação em suas abundâncias indicadas pelas posições que ocupam no *ranking* (Tabela 10). Como esperado, a adesina XadA1 foi detectada nas preparações de OMVs das três cepas, sendo que nas cepas Fb7 e Temecula1, está entre as cinco proteínas mais abundantes. Como já mencionado esta proteína é um marcador de OMVs (Ionescu *et al.*, 2014).

Além de XadA1, as OMVs das três cepas também compartilham a adesina afimbrial XadA3, uma outra adesina do tipo autotransportador trimérico de função ainda não esclarecida, além de várias proteínas de membrana externa (por exemplo, OmpW, TolC, *TonB-dependent receptor*, OmpA, TolB, Bam), porinas e lipoproteínas. De fato, as OMVs de *X. fastidiosa* são altamente enriquecidas com proteínas de membrana externa. XF2237/PD1283 (*TonB-dependent receptor*) é uma das proteínas mais abundantes nas OMVs de 9a5c, Temecula1 e Fb7. Essa proteína é descrita como associada, entre outras, com as proteínas CirA e BtuB, que também aparecem nas OMVs de *X. fastidiosa* e são parte do sistema de secreção do tipo I (T1SS, *Type 1 Secretion System*) (Buchanan *et al.*, 2007; Noinaj *et al.*, 2010). Outra proteína também comum às OMVs das 3 cepas é a proteína conhecida como Omp1X/Ax21 (PD1063), primeiramente descrita em *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Em *X. fastidiosa*, ela é ortóloga de Omp1X/Ax-21 e está presente em OMVs, sendo que mutação neste gene resulta em uma diminuição da agregação celular, embora não foram observadas diferenças no crescimento celular, formação de biofilme e virulência em ensaios de infecção em planta comparativamente à cepa selvagem (Pierce *et al.*, 2014). Em resumo, boa parte das proteínas mais abundantes nas OMVs das três cepas de *X. fastidiosa* são porinas de membrana externa (14), o que pode sugerir uma capacidade das OMV secretarem ou internalizarem efetores de forma seletiva.

As OMVs das 3 cepas também contêm várias hidrolases (lipases/esterases, proteases e peptidases). As lipases/esterases LesA (PD1703/XF0358) e LesB (PD1702/XF0357) estão entre proteínas mais abundantes nas OMVs das cepas Temecula1 e Fb7. Estas enzimas já foram previamente descritas como proteínas secretadas solúveis e associadas a OMVs, sendo que tem um papel relevante na virulência da cepa Temecula1 (Nascimento *et al.*, 2016). A literatura também reporta a detecção de proteases secretadas em sobrenadantes de culturas de *X. fastidiosa* (Smolka *et al.*, 2003; Maria Fedatto *et al.*, 2006; Gouran *et al.*, 2016). A protease PtrA (XF0531/PD0956) encontrada nas OMVs das 3 cepas desempenha um importante papel no controle da proliferação celular, formação de biofilme e virulência da cepa Temecula1, sendo que a deleção desse gene resulta em um fenótipo de hipervirulência (Gouran *et al.*, 2016).

Destacamos ainda a identificação da proteína XF0119/PD0090 nas OMVs das 3 cepas. Esta proteína tem um domínio que é similar a um domínio estrutural característico de pectina liases, mas sua função e/ou atividade são desconhecidas em *X. fastidiosa*. Além disso XF0119/PD0090 tem alguma similaridade de sequência (31%) com pectato liase de *Xanthomonas oryzae* (dados não mostrados). Enzimas da família das pectina liases são reconhecidos fatores de virulência em fitopatógenos (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014) e, portanto, esta proteína é uma boa candidata para estudos posteriores.

Em resumo, os dados até aqui discutidos confirmam das OMVs de *X. fastidiosa* como veículos carreadores de enzimas que podem conferir às OMVs proteção a possíveis toxinas e/ou atuar como determinantes de colonização do hospedeiro e de virulência, assim como verificado para outras bactérias Gram-negativas (Sidhu *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2015; Devos *et al.*, 2015; Rompikuntal *et al.*, 2015; Turkina *et al.*, 2015).

Várias das proteínas comuns as OMVs das 3 cepas, fazem parte da lista de 11 proteínas detectadas em preparações de OMVs de Temecula1, incluindo além das lipases/esterases LesA, LesB e LesC, também as proteínas XadA1, *TonB-dependent receptor*, OmpW e OmpA (Nascimento *et al.*, 2016) (Tabelas 9 e 10). A análise do exoproteoma das cepas de citros 9a5c e J1a12 cultivadas em meio completo PW revelou 72 proteínas (Mendes *et al.*, 2016), sendo que várias destas proteínas também são comuns aos proteomas das OMVs das 3 cepas (por exemplo, TolC, *TonB-dependent receptor*, OmpA, OprP, XadA3, Lpp, Ax-21, BtuB, PspB, Slf) (Tabelas 9 e 10). O número menor de proteínas detectadas por estes autores provavelmente reflete a menor sensibilidade de metodologia por eles utilizada (identificação por LC-MS/MS de proteínas separadas em SDS-PAGE) comparada a abordagem que utilizamos (proteômica *shotgun*).

Por outro lado, não detectamos em nenhum dos proteomas que analisamos, a antitoxina XfYgiT (XF2491) do sistema toxina-antitoxina XfMqsR/XfYgiT descrita como uma proteína secretada através de OMVs na cepa 9a5c (Santiago *et al.*, 2016).

A protease de membrana externa OmpT foi descrita como um dos principais atores na gênese das OMV em *E. coli* (Premjani *et al.*, 2014). Porém *X. fastidiosa* não possui OmpT. Entre potenciais candidatos a ser funcionalmente correspondente a OmpT, citamos a proteína de membrana externa (*TonB-dependent receptor*, XF2237/PD1283) que possui baixa identidade (20%) a OmpT de *E. coli* mas é uma das proteínas mais abundantes nas OMVs das três cepas. Além desta, citamos também a proteína OmpA (XF0363/PD1699) que é abundante nas OMVs das 3 cepas de *X. fastidiosa*. As proteínas de membrana externa OmpA interagem com as

proteínas do sistema Tol/Pal que já foram também implicadas no recrutamento e seleção de proteínas e no número de OMV produzidas (Schwechheimer e Kuehn, 2015). Estas são hipóteses, sendo que futuros experimentos são necessários para investigar quais das proteínas de membrana presentes nas OMVs de *X. fastidiosa* participam da biogênese de OMVs preservando a integridade da célula bacteriana.

**Tabela 10. Proteínas identificadas nos proteomas de OMVs das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição†	Ranking		
				F	9	T
<b>XF0872</b>	PD1807	OmpW	Outer membrane protein W OmpW	1	54	3
<b>XF1516</b>	PD0731	XadA1	Adhesin XadA1	2	63	5
<b>XF1036</b>	PD0318		Porin	3	12	7
<b>XF2237</b>	PD1283		TonB-dependent receptor	4	4	8
<b>XF1287</b>	PD0540		Unknown function protein	5	13	24
<b>XF2586</b>	PD1964	TolC	Outer membrane export factor	6	8	15
<b>XF0357</b>	PD1702	LesA	Lipase/Esterase LesA	7	14	1
<b>XF2713</b>	PD2065	CirA	Porin CirA	8	5	13
<b>XF0343</b>	PD1709	OmpA/MopB	Outer membrane protein A	9	2	6
<b>XF0975</b>	PD0270	OprP	Porin O	10	9	14
<b>XF0358</b>	PD1703	LesB	Lipase/Esterase LesB	11	24	2
<b>XF0363</b>	PD1699	OmpA	Outer membrane protein A	13	7	10
<b>XF0339</b>	PD1711		Porin	14	33	23
<b>XF2151</b>	PD1211	LesC	Lipase/Esterase LesC	15	148	40
<b>XF1897</b>	PD0894	TolB	TolB protein	16	23	51
<b>XF1896</b>	PD0895	OmpA	Outer membrane protein	17	34	44
<b>XF1851</b>	PD0950		Serine protease	19	11	9
<b>XF1981</b>	PD0824	XadA3	Adhesin XadA3	20	3	12
<b>XF1811</b>	PD1055	Slp	Outer membrane protein Slp	21	42	35
<b>XF0781</b>	PD1879	EstA	Lipase/Esterase	22	45	52
<b>XF1547</b>	PD0757	Lpp	Membrane lipoprotein Lpp	23	18	11
<b>XF1911</b>	PD0880		Membrane lipoprotein	24	35	46
<b>XF1803</b>	PD1063		Omp1X/Ax21	26	6	32
<b>XF0816</b>	PD1853		Zn-dependent peptidase	29	46	53
<b>XF0531</b>	PD0956	PtrA	Cysteine/serine peptidase	30	76	27
<b>XF1887</b>	PD0904		Cysteine/serine peptidase PS-46	32	19	50
<b>XF0395</b>	PD1672	Bfr	Bacterioferritin Bfr	33	67	37
<b>XF0464</b>	PD1620	BamB	Outer membrane protein BamB	35	40	62
<b>XF0550</b>	PD1589	BtuB	Porin BtuB	36	10	17
<b>XF0138</b>	PD0106	PepA	Aminopeptidase A	37	109	56

<b>XF1053</b>	PD0332	FadL	Fatty acid outer membrane porin	38	149	69
<b>XF2137</b>	PD1200	BfeA	Ferric enterobactin receptor BfeA	40	119	25
<b>XF0838</b>	PD1835	SurA	Chaperone SurA	41	44	73
<b>XF1605</b>	PD1168	FkpA	Peptidyl-prolyl isomerase FkpA	43	72	74
<b>XF1026</b>	PD0313	PspB	Serine Protease	45	1	4
<b>XF0855</b>	PD1820	NlpD	Lipoprotein NlpD	47	27	60
<b>XF0644</b>	PD1525	Fkbp	Peptidylprolyl isomerase Fkbp	49	50	57
<b>XF0964</b>	PD1736		Membrane lipoprotein	50	43	49
<b>XF2283</b>	PD1317		Beta-lactamase-like	51	51	76
<b>XF0601</b>	PD1550	UptE	Outer membrane protein UptE	52	68	67
<b>XF1628</b>	PD1151	YdiY	Outer membrane protein YdiY	53	29	123
<b>XF2184</b>	PD1235	MltB	Murein transglycosylase B	54	118	68
<b>XF1226</b>	PD0503		Unknown function protein	55	32	19
<b>XF2202</b>	PD1252		Unknown function protein	57	52	42
<b>XF0820</b>	PD1850		Zn-dependent amino- or carboxypeptidase	58	92	33
<b>XF1480</b>	PD0697		Membrane lipoprotein	59	71	48
<b>XF1363</b>	PD0603	Slt	Murein transglycosylase Slt	62	77	34
<b>XF1529</b>	PD0744	XadA2/Hsf	Adhesin XadA2/Hsf	64	60	18
<b>XF1479</b>	PD0696	PtrB	Oligopeptidase B PtrB	67	152	83
<b>XF2349</b>	PD0528		Autotransporter beta-domain	68	16	31
<b>XF2349</b>	PD1379		Autotransporter beta-domain	68	16	63
<b>XF0119</b>	PD0090		Putative pectin lyase	69	78	88
<b>XF0066</b>	PD0044	RssA	Phospholipase lipoprotein RssA	70	79	89
<b>XF0321</b>	PD0264	OprO	Porin O OprO	77	22	47
<b>XF1155</b>	PD0440	RplB	Ribosomal protein RplB	78	39	45
<b>XF1344</b>	PD0588	Sbp	ABC sulfate transport periplasmic protein Sbp	86	82	64
<b>XF2340</b>	PD1370	DnaK	Chaperone protein DnaK	89	97	59
<b>XF2407</b>	PD1427	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	94	36	21
<b>XF2134</b>	PD1198		Ferric enterobactin receptor BfeA	98	55	117
<b>XF0883</b>	PD1797		Membrane lipoprotein	101	101	71
<b>XF0898</b>	PD1786		Membrane lipoprotein	104	30	30
<b>XF0384</b>	PD1682		Porin	105	61	114
<b>XF1827</b>	PD1040	OsmC/OhrA	Hydroperoxide reductase OsmC/OhrA	108	81	29
<b>XF0668</b>	PD1506	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	109	17	28
<b>XF1434</b>	PD0955		Cysteine/serine peptidase	110	28	54
<b>XF0082</b>	PD0061	PapD	Fimbrial chaperone protein PapD	112	53	61
<b>XF0239</b>	PD0198	Pnp	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase Pnp	115	113	92
<b>XF0615</b>	PD1538	GroL	Chaperonin GroL	116	31	41

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1).

\*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento

(*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

As tabelas seguintes listam as proteínas de OMVs compartilhadas entre duas cepas. Como já mencionado (Figura 11), as OMVs de 9a5c e Fb7 (cepas de citros) têm composição mais semelhante entre si (compartilham 33 proteínas, Tabela 11) do que com as OMVs de Temecula1 que compartilha 9 proteínas com Fb7 (Tabela 12) e 19 proteínas com 9a5c (Tabela 13). Com algumas poucas exceções, a maioria das proteínas compartilhadas entre dois proteomas de OMVs são proteínas de abundância bem menor do que a verificada para as proteínas compartilhadas entre as 3 cepas. Destacamos a proteína BamA (XF1046), a porina XF1496 e as toxinas da família das hemolisinas RTX (XF2407/PD1427 e XF0668/PD1506) que foram detectadas apenas nas OMVs das cepas de citros (Fb7 e 9a5c), sendo as toxinas RTX mais abundantes nas OMVs da cepa 9a5c do que em Fb7. Uma proteína do tipo RTX (XF1011/PD0305) também está nas OMVs das cepas 9a5c e Temecula1 (Tabela 13).

Entre as proteínas comuns às OMVs das cepas Fb7 e Temecula, ressaltamos a *L-ascorbate oxidase* (XF2677/PD2039), uma enzima também codificada no genoma de outros fitopatógenos. Esta enzima catalisa a oxidação do ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, o que poderia resultar em uma provável depleção do ascorbato produzido pelo hospedeiro vegetal. O ácido ascórbico é um antioxidante universal que modula diversas funções em plantas tanto em condições fisiológicas normais ou de estresse (Akram *et al.*, 2017).

Da inspeção das proteínas que são exclusivas das OMVs de cada uma das cepas, destacamos a presença de uma lisozima M1 nas OMVs de Fb7 (Tabela 14), que são hidrolases de peptidoglicano que degradam parede celular bacteriana.

Entre as proteínas de OMVs exclusivas de 9a5c estão algumas proteínas codificadas pelo plasmídeo pXF51 existente nesta cepa, mas ausente nas duas outras cepas (Tabela 15).

Entre as proteínas exclusivas de OMVs da cepa Temecula1 (Tabela 16) está a hemaglutinina PspA (XF2775/PD2118, HxfA). Além desta, o genoma de *X. fastidiosa* codifica outra hemaglutinina (XF0889/PD1792, HxfB) e ambas são importantes na adesão celular e formação do biofilme na cepa Temecula1 (Guilhabert e Kirkpatrick, 2005). Uma dessas hemaglutininas também está presente nas OMVs de 9a5c (Tabela 15). É interessante observar, entretanto, que nenhuma das hemaglutininas foi encontrada nas OMVs da cepa Fb7, que como já mencionado é uma cepa que não forma agregados celulares ou biofilme.

Finalmente destacamos que entre as proteínas identificadas nos proteomas das OMVs das 3 cepas, há 17 proteínas de função desconhecida (Tabela 17), sendo três destas compartilhadas entre as OMVs das 3 cepas. As proteínas XF1217 e XF1219 encontradas apenas nas OMVs da cepa 9a5c correspondem a microcininas preditas computacionalmente em genomas de *X. fastidiosa* (Duarte, 2012). A verificação de que proteínas de função ainda desconhecida preditas na anotação de genomas está presente em OMVs e/ou são secretadas pode contribuir para futuros estudos que busquem elucidar a função de tais proteínas.

**Tabela 11. Proteínas identificadas no proteoma das OMV das cepas Fb7 e 9a5c.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição <sup>†</sup>	Ranking		
				F	9	T
<b>XF1384</b>	-	PqaA	Alpha/beta-Hydrolases PqaA	18	59	-
<b>XF1046</b>	PD0326	BamA	Outer membrane protein BamA	28	25	-
<b>XF2551</b>	PD1934		Dipeptidyl aminopeptidase protein	34	66	-
<b>XF0576</b>	PD1570		Metallo peptidase	39	117	-
<b>XF2675</b>	PD2038		DUF2272	42	91	-
<b>XF1496</b>	PD0711		Porin	46	26	-
<b>XF0032</b>	PD0023	pilY1a	Type IV pilus PilY1	60	48	-
<b>XF0896</b>	PD0987 /PD1788		Membrane lipoprotein	61	49	-
<b>XF0373</b>	PD1691	PilQ	Fimbrial assembly protein PilQ	63	151	-
<b>XF0593</b>	PD1558	ComEA	Competence protein ComEA	65	96	-
<b>XF1152</b>	PD0437	RplC	Ribosomal protein rplC	71	122	-
<b>XF1527</b>	PD0742	GspD	Type II lipoprotein GspD	72	104	-
<b>XF0006</b>	PD0007		Membrane lipoprotein	75	89	-
<b>XF1123</b>	PD0414	YggE	Kinase protein YggE	79	150	-
<b>XF2424</b>	PD1443	RplU	Ribosomal protein RplU	81	147	-
<b>XF1297</b>	PD0548		Gluconolactonase	82	69	-
<b>XF1153</b>	PD0438	RplD	Ribosomal protein RplD	84	135	-
<b>XF0418</b>	PD1657	MlaC	Outer membrane lipid periplasmic protein MlaC	88	88	-
<b>XF1133</b>	PD0422	WrbA	Tryptophan repressor binding protein WrbA	91	137	-
<b>XF2782</b>	PD2123	RpmH	Ribosomal protein RpmH	92	111	-
<b>XF2407</b>	PD1427	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	94	37	-
<b>XF2646</b>	PD2019	LoIB	Outer membrane lipoprotein LoIB	99	138	-
<b>XF1895</b>	PD0896	YbgF	Tol-Pal protein YbgF	103	75	-
<b>XF1604</b>	PD1169	BtuE	Glutathione peroxidase BtuE	107	102	-

<b>XF0938</b>	PD1756	BamD	Outer membrane protein BamD	111	80	-
<b>XF1231</b>	PD0507	TamA	Outer membrane protein TamA	113	57	-
<b>XF1842</b>	PD1026	GlnA	L-glutamine synthetase GlnA	114	112	-
<b>XF1177</b>	PD0462	RplQ	Ribosomal protein RplQ	117	126	-
<b>XF1171</b>	PD0456	RplO	Ribosomal protein RplO	118	85	-
<b>XF1157</b>	PD0442	RplV	Ribosomal protein RplV	119	114	-
<b>XF0196</b>	PD0159		DUF2059	120	115	-
<b>XF2632</b>	PD2000	RpoC	DNA-directed RNA polymerase RpoC	121	90	-
<b>XF2704</b>	PD2057	CtpA	Carboxyl-terminal processing protease CtpA	122	144	-

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1). \*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

**Tabela 12. Proteínas identificadas no proteoma das OMV das cepas Fb7 e Temecula1.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição <sup>†</sup>	Ranking		
				F	9	T
XF2677	PD2039	Aoo	L-ascorbate oxidase Aoo	12	-	34
XF2539	PD1924	PilA1	Type IV pilus PilA1	44	-	72
XF1840	PD1028	Ycel	Periplasmic protein Ycel	56	-	110
XF1944	PD0856	Dcp	Peptidyl-dipeptidase Dcp	66	-	106
XF1548	PD0758	Lpd	Dihydrolipoamide dehydrogenase Lpd	74	-	85
XF1945	PD0855	VirK	Protein VirK	76	-	55
XF1187	PD0472	ClpP	ATP-dependent Clp protease	83	-	122
XF0457	PD1626	GapA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GapA	90	-	113
XF1141	PD0426	PheA1	Chorismate mutase PheA1	102	-	105

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1). \*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

**Tabela 13. Proteínas identificadas no proteoma das OMV das cepas 9a5c e Temecula1.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição <sup>†</sup>	Ranking		
				F	9	T
<b>XF0081</b>	PD0060	FimD	Outer membrane protein FimD	-	20	115
<b>XF0083</b>	PD0062	FimA	Pilin FimA	-	38	20

<b>XF2628</b>	PD1996	TufA	Elongation factor-Tu TufA	-	41	22
<b>XF1175</b>	PD0460	RpsD	Ribosomal protein RpsD	-	65	70
<b>XF1151</b>	PD0436	RpsJ	Ribosomal protein RpsJ	-	70	78
<b>XF2548</b>	PD1931	SucD	Succinyl-CoA ligase SucD	-	73	94
<b>XF1530</b>	PD0745	AhpC	Peroxiredoxin AhpC	-	86	58
<b>XF1164</b>	PD0449	RplE	Ribosomal protein RplE	-	87	80
<b>XF0235</b>	PD0194	InfB	Translation initiation factor-2 InfB	-	93	95
<b>XF2643</b>	PD2015	RplY	Ribosomal protein RplY	-	94	108
<b>XF0078</b>	PD0058	MrkD	Fimbrial protein MrkD	-	95	36
<b>XF2631</b>	PD1999	RpsL	Ribosomal protein RpsL	-	98	96
<b>XF1537</b>	PD0752	RplM	Ribosomal protein RplM	-	100	121
<b>XF0290</b>	PD0234	RpfA	Aconitase RpfA	-	108	120
<b>XF1606</b>	PD1167	Ugd	UDPglucose 6-dehydrogenase Ugd	-	110	65
<b>XF0553</b>	PD1587	LpoA	Outer membrane lipoprotein LpoA	-	124	93
<b>XF0260</b>	PD0213	XanA	Phosphoglucomutase XanA	-	127	84
<b>XF2629</b>	PD1997	FusA	Elongation factor G FusA	-	128	99
<b>XF2636</b>	PD2004	RplA	Ribosomal protein RplA	-	133	115

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1).

\*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

**Tabela 14. Proteínas identificadas exclusivamente no proteoma das OMV da cepa Fb7.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição <sup>†</sup>	Ranking		
				F	9	T
<b>XF1024</b>	PD0312		Membrane lipoprotein	25	-	-
<b>XF1745</b>	-		Alpha/beta-Hydrolases	31	-	-
<b>XF1252</b>	PD0518	YfaS	Membrane lipoprotein YfaS	48	-	-
<b>XF1744</b>	-	YdfG	Dehydrogenase YdfG	73	-	-
<b>XF2392</b>	PD1408		Lysozyme M1	80	-	-
<b>XF0274</b>	PD0221	Pfp	6-phosphofructokinase Pfp	85	-	-
<b>XF0846</b>	PD1828		Beta-mannosidase	87	-	-
<b>XF0221</b>	PD0178		DUF885	93	-	-
<b>XF1823</b>	PD1042	Prc	Protease Prc	95	-	-
<b>XF0015</b>	PD0013		Dipeptidyl acylaminoacyl peptidase	96	-	-
<b>XF2685</b>	PD2043	SppA	Protease IV SppA	97	-	-
<b>XF1324</b>	PD0570		Regulatory factor protein	100	-	-
<b>XF0430</b>	PD1647	DnaG	DNA primase dnaG	106	-	-

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1).

\*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento

(*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

**Tabela 15. Proteínas identificadas exclusivamente no proteoma das OMV da cepa 9a5c.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição†	Ranking		
				F	9	T
XF1577	PD0978		DUF2184	-	15	-
XF1011	PD0305	RTX	Hemolysin toxin protein RTX	-	21	-
XF1217	PD0497	UFP	Unknown function protein	-	47	-
XF0889	PD1792		Haemagglutinin protein	-	56	-
XF1219	-	UFP	Unknown function protein	-	58	-
XFa0031	-		Cysteine/serine peptidase	-	62	-
XF0565	PD1577		Lipid-binding SYLF	-	64	-
XF0616	PD1537	GroS	Chaperonin GroS	-	74	-
XF1163	PD0448	RplX	Ribosomal protein RplX	-	83	-
XF0714	PD0377		Phage capsid protein HK97	-	84	-
XF0107	PD0081	RpsP	Ribosomal protein RpsP	-	99	-
XF1571	PD0984		DUF1073	-	103	-
XF0759	PD1898		N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase	-	105	-
XF1488	PD0705	PepN	Aminopeptidase N PepN	-	106	-
XF0053	PD0038	HmpA	Nitric oxide dioxygenase HmpA	-	107	-
XF1170	-	RpmD	Ribosomal protein RpmD	-	116	-
XF0837	PD1836	LptD	LPS protein LptD	-	120	-
XF1451	PD0671		Transglutaminase	-	121	-
XF2241	PD1286		Serine protease	-	123	-
XF1575	PD0980		DUF2213	-	125	-
XF1706	PD0957/PD1173		Phage protein 1	-	129	-
XF0319	PD0262	FabG	Acetoacetyl-CoA reductase FabG	-	130	-
XF2754	PD2089		Unknown function protein	-	131	-
XFa0032	-		Pimeloyl-ACP carboxylesterase	-	132	-
XFa0010	-		Unknown function protein	-	134	-
XF2630	PD1998	RpsG	Ribosomal protein RpsG	-	136	-
XF0292	PD0236	AcnB	Aconitate hydratase AcnB	-	139	-
XF0595	PD1556		DUF4198	-	140	-
XF1173	PD0458	RpsM	Ribosomal protein RpsM	-	141	-
XF0146	PD0115	FtsN	Cell division protein FtsN	-	142	-
XF0609	PD1545	Gmd	GDPmannose 4,6- dehydratase Gmd	-	143	-
XF1167	PD0452	RplF	Ribosomal protein RplF	-	145	-

<b>XF1087</b>	PD0388	Cardiolipin synthase	-	146	-
---------------	--------	----------------------	---	-----	---

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1).  
 \*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

**Tabela 16. Proteínas identificadas exclusivamente no proteoma das OMV da cepa Temecula1.**

CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	CDS***	Descrição†	Ranking		
				F	9	T
<b>XF2775</b>	PD2118	PspA/HxfA	Hemagglutinin PspA/HxfA	-	-	16
<b>XF0894</b>	PD1791		Porin	-	-	38
<b>XF2497</b>	PD1106		Phage capsid protein HK97	-	-	39
<b>XF2259</b>	PD1299		Autotransporter beta-domain	-	-	43
<b>XF0392</b>	PD1677	MetK	S-adenosylmethionine synthase MetK	-	-	66
<b>XF0434</b>	PD1644	RpsU	Ribosomal protein RpsU	-	-	75
<b>XF2559</b>	PD1943	RplI	Ribosomal protein RplI	-	-	77
<b>XF1921</b>	PD0870	SodA	Superoxide dismutase SodA	-	-	81
<b>XF0672</b>	PD1502	AcpP	Acyl carrier protein AcpP	-	-	82
<b>XF1746</b>	PD1406	YahK	Alcohol dehydrogenase YahK	-	-	86
<b>XF0010</b>	PD0010	ExbB	Outer membrane protein ExbB	-	-	87
<b>XF1072</b>	PD0352	SdhA	Succinate dehydrogenase SdhA	-	-	90
<b>XF0826</b>	PD1845		Fructose-biphosphate aldolase	-	-	91
<b>XF1174</b>	PD0459	RpsK	Ribosomal protein RpsK	-	-	97
<b>XF0204</b>	PD0165	DnaE	DNA polymerase DnaE	-	-	98
<b>XF1505</b>	PD0722	Rph	Ribonuclease PH	-	-	100
<b>XF1392</b>	PD0626	Ssb	Single-stranded DNA-binding protein Ssb	-	-	101
<b>XF2550</b>	PD1933	HecB	Hemolysin activation protein HecB	-	-	102
<b>XF1423</b>	PD0650	PurL	Phosphoribosylformylglycinamidin e synthase PurL	-	-	103
<b>XF1064</b>	PD0345	Glk	Glucokinase Glk	-	-	104
<b>XF1822</b>	PD1043	IlvC	Ketol-acid reductoisomerase IlvC	-	-	107
<b>XF1107</b>	PD0399	CarB	Carbamoyl-phosphate CarB	-	-	109
<b>XF0600</b>	PD1551	UptD	Outer membrane protein UptD	-	-	111
<b>XF0049</b>	PD0036	AccC	Biotin carboxylase AccC	-	-	112
<b>XF2542</b>	PD1926	PilA	Type IV pilus PilA	-	-	116
<b>XF2432</b>	PD1450	GtaB	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-	-	118
<b>XF1206</b>	PD0488	RpmB	Ribosomal protein RpmB	-	-	119

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1).  
 \*\*\*Descrição do produto gênico recuperado das plataformas UNIPROT e IMG/M ER. O ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1.

**Tabela 17. Proteínas de função desconhecida identificadas nos proteomas de OMVs das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1.**

<i>Ranking</i>										
CDS <sub>CVC</sub> *	CDS <sub>PD</sub> **	F	9	T	Tamanho	SignalP	SecP	Ranking*** Secretoma Tem/ $\Delta$ <i>rpfF</i>	ortólogo <i>Xanthomonas</i> <i>sp</i>	Observações
XF1287	PD0540	5	13	24	146aa		0.914419	-	Não	transmembrane helix
XF1226	PD0503	55	31	19	163aa	20 21		-	Sim	
XF2202	PD1252	57	50	42	150aa		0.856845	165/218	Não	
XF2675	PD2038	42	89		345aa			/399	Sim	DUF2272/ similar com domínio CHAP de enzimas que clivam peptoglicano
XF0196	PD0159	120	114		174aa	26 27		-	Sim	DUF2059
XF0221	PD0178	93			613aa	32 33		-	Sim	DUF885
XF1324	PD0570	100			395aa		0.866018	/187	Sim	transmembrane helix/hydrophobic ligand binding site
XF1577	PD0978		15		327aa		0.534336	-	-	DUF2184/COG4834 /phage-related protein
XF1217	PD0497		45		84aa			-	Não	transmembrane helix/putative microcin
XF1219	-		56		79aa			-	Não	putative microcin
XFa0031	-		60		339aa	20 21		-	Sim	Cysteine/serine peptidase domain
XF1571	PD0984		101		386aa			-	-	DUF1073/phage-related protein
XF1575	PD0980		124		403aa			-	-	DUF2213/phage-related protein
XF2754	PD2089		130		154aa	23 24		247/	Sim	
XFa0032	-		131		251aa		0.938446	-	Não	alpha/beta-hydrolases family
XFa0010	-		133		82aa	21 22		-	Não	transmembrane helix
XF0595	PD1556		139		267aa	20 21		113/133	Sim	DUF4198

\*Número da CDS nas cepas de citros (9a5c e Fb7). \*\*Número da CDS na cepa de videira (Temecula1). Ordenamento (*ranking*) reflete a abundância das proteínas em cada amostra conforme a abundância de espectros tendo a cepa Fb7 como referência para as demais cepas (9a5c e Temecula1). F: Fb7, 9: 9a5c e T: Temecula1. \*\*\*Ranking das proteínas identificadas também no secretoma total das cepas Temecula (Tem) e mutante  $\Delta$ *rpfF* (item 4.1.).

#### 4.2.4. Perfil de metabólitos das OMVs

Visando complementar a caracterização das OMVs, realizamos a análise de seu metaboloma por meio de espectrometria de massas. Aproximadamente 275 compostos das OMVs das cepas 9a5c, Temecula1 e Fb7 tiveram suas massas resolvidas. Em seguida, com o auxílio da ferramenta de bioinformática ProbMetab, que por sua vez, acessa a base de dados KEGG (<http://www.kegg.jp/>), conseguimos associar alguns dos íons encontrados com metabólitos cuja predição indica produção por *X. fastidiosa*. A lista dos prováveis metabólitos preditos para as OMVs de cada uma das cepas está apresentada nas Tabelas 18 a 20, sendo ordenados em ordem decrescente de abundância. Os compostos preditos nas OMVs de *X. fastidiosa* incluem ácidos graxos, aminoácidos livres, carboidratos e compostos fenólicos.

Ainda que escassos, os estudos sobre metabolomas de OMVs, sugerem que as OMVs parecem ter como uma de suas funções o de transporte de moléculas de sinalização para atuação distante do local de produção (Kulp e Kuehn, 2010). Além disso, assim como as proteínas, também os metabólitos constituintes das OMVs não seriam selecionadas de modo aleatório (Kulp e Kuehn, 2010). Ácidos graxos, especificamente os que participam da sinalização nos mecanismos de percepção de quórum em microrganismos podem ter função como constituintes de membrana participando, inclusive, do modo de formação de OMVs (Mashburn e Whiteley, 2005; Mashburn-Warren *et al.*, 2008; Devos *et al.*, 2015). Neste contexto, dirigimos nossa atenção para os ácidos graxos constituintes das OMVs (Tabelas 18 a 20, Figura 12), em particular os ácidos graxos da família de DSFs (Figura 2).

Dados da literatura indicam que a cepa Temecula1 é capaz de produzir uma gama de ácidos carboxílicos com mais de 12 carbonos (entre eles, XfDSF, XfDSF2; Figura 2), sendo que as moléculas com dupla ligação parecem ter um efeito agonista na via de sinalização mediada pelo receptor RpfC e ácidos graxos saturados parecem ter o efeito oposto, isto é, antagonistas competidores (Ionescu *et al.*, 2016). Há um relato de que a cepa 9a5c produz o ácido 12-metil-tetradecenoico (também chamado CVC-DSF) (Colnaghi Simionato *et al.*, 2007), o qual tem um efeito antagonista em ensaios realizados com a cepa Temecula1 (Ionescu *et al.*, 2016).

**Tabela 18. Perfil de metabólitos de OMVs da cepa Fb7.**

#	MP	Prováveis Compostos*	Prob
<b>1</b>	129,0427	<b>L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate</b>	0,212
		1-Pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylate	0,204
		Pidolic acid	0,204
		5-Oxo-D-proline	0,200
		4-Oxoproline	0,181
<b>2</b>	165,0782	<b>L-Phenylalanine</b>	0,734
		D-Phenylalanine	0,266
<b>3</b>	254,2233	<b>(9Z)-Hexadecenoic acid</b>	1,000
<b>4</b>	256,2388	<b>Hexadecanoic acid</b>	1,000
<b>5</b>	282,2539	<b>(9Z)-Octadecenoic acid</b>	1,000
<b>6</b>	284,2689	<b>Octadecanoic acid</b>	1,000
<b>7</b>	244,0758	<b>Piceatannol</b>	1,000
<b>8</b>	131,0940	<b>L-Leucine</b>	0,348
		6-Aminohexanoate	0,341
		L-Isoleucine	0,311
<b>9</b>	113,9942	<b>Acetylenedicarboxylate</b>	1,000
<b>10</b>	132,0800	<b>6-Hydroxyhexanoic acid</b>	1,000
<b>11</b>	134,0583	<b>2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate</b>	0,345
		(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate	0,331
		Deoxyribose	0,324
<b>12</b>	142,0253	<b>(S)-5-Oxo-2,5-dihydrofuran-2-acetate</b>	0,208
		cis,cis-4-Hydroxymuconic semialdehyde	0,204
		2-Oxo-2,3-dihydrofuran-5-acetate	0,202
		cis,cis-Muconate	0,194
		2-Hydroxymuconate semialdehyde	0,192
<b>13</b>	146,0701	<b>L-Glutamine</b>	0,362
		D-Glutamine	0,220
		(R)-3-Ureidoisobutyrate	0,211
		Isoglutamine	0,208
<b>14</b>	148,0380	<b>(R)-2-Methylmalate</b>	0,117
		(S)-2-Methylmalate	0,111
		D-erythro-3-Methylmalate	0,103
		D-threo-3-Methylmalate	0,102
		2-Dehydro-3-deoxy-L-arabinonate	0,100
		L-threo-3-Methylmalate	0,098
		L-Arabinono-1,4-lactone	0,094
		2-Hydroxyglutarate	0,094
		2-Dehydro-3-deoxy-D-xylonate	0,092
		D-Xylonolactone	0,089
<b>15</b>	148,0528	<b>trans-Cinnamate</b>	0,278

		Dihydrocoumarin	0,162
		Pyruvophenone	0,147
		3-Isochromanone	0,144
		3-Hydroxy-1-indanone	0,138
		4-Hydroxycinnamyl aldehyde	0,131
<b>16</b>	166,0631	<b>Tropate</b>	0,239
		3-(2-Hydroxyphenyl)propanoate	0,178
		Phenyllactate	0,172
		Caffeyl alcohol	0,141
		3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetaldehyde	0,136
		3-(3-Hydroxyphenyl)propanoic acid	0,134
<b>17</b>	176,0321	<b>Parapyruvate</b>	0,162
		5-Dehydro-4-deoxy-D-glucuronate	0,150
		2-Hydroxy-3-oxoadipate	0,141
		(4S)-4,6-Dihydroxy-2,5-dioxohexanoate	0,140
		Ascorbate	0,136
		L-xylo-Hexulonolactone	0,136
		D-Glucuronolactone	0,133
<b>18</b>	180,0634	<b>alpha-D-Galactose</b>	0,063
		alpha-D-Glucose	0,062
		L-Fuconate	0,056
		L-Galactose	0,056
		1D-chiro-Inositol	0,056
		beta-D-Fructose	0,055
		D-Allose	0,054
		L-Gulose	0,054
		D-Mannose	0,053
		D-Tagatose	0,053
		Sorbose	0,053
		D-Glucose	0,052
		scyllo-Inositol	0,052
		L-Sorbose	0,047
		myo-Inositol	0,046
		L-Rhamnonate	0,046
		D-Fructose	0,044
		D-Galactose	0,042
		beta-D-Glucose	0,041
		Theophylline	0,008
		Theobromine	0,003
		1,7-Dimethylxanthine	0,003
<b>19</b>	204,0889	<b>L-Tryptophan</b>	1,000
<b>20</b>	211,0452	<b>Betalamic acid</b>	1,000

<b>21</b>	228,2085	<b>Tetradecanoic acid</b>	1,000
<b>22</b>	242,2242	<b>12-Methyltetradecanoic acid</b>	1,000
<b>23</b>	258,0846	<b>(1-Ribosylimidazole)-4-acetate</b>	1,000
<b>24</b>	280,2389	<b>Linoleate</b>	1,000
<b>25</b>	297,0939	<b>5'-Methylthioadenosine</b>	1,000
<b>26</b>	306,0288	<b>gamma-Glutamyl-Semethylselenocysteine</b>	0,910
		4-Carboxy-4'-sulfoazobenzene	0,082
		Monobromobisphenol A	0,007
		2',3'-Cyclic UMP	0,001

Predição de compostos metabólicos presentes nas OMVs de acordo com o software ProbMetab. # Ranking. <sup>MP</sup> Massa proposta em função da anotação iônica. \* Prováveis compostos em função da correlação do genoma com a anotação iônica e em negrito os compostos com maior probabilidade. <sup>Prob</sup> Composto putativo de maior probabilidade.

**Tabela 19. Perfil de metabólitos de OMVs da cepa 9a5c.**

#	MP	Prováveis Compostos	Prob
<b>1</b>	129,0425	<b>5-Oxo-D-proline</b>	0,212
<b>2</b>	165,0782	<b>L-Phenylalanine</b>	0,721
<b>3</b>	254,2226	<b>(9Z)-Hexadecenoic acid</b>	1,000
<b>4</b>	256,2385	<b>Hexadecanoic acid</b>	1,000
<b>5</b>	284,2688	<b>Octadecanoic acid</b>	1,000
<b>6</b>	256,2381	<b>Hexadecanoic acid</b>	1,000
<b>7</b>	131,0940	<b>L-Isoleucine</b>	0,336
<b>8</b>	148,0521	<b>trans-Cinnamate</b>	0,268
		Dihydrocoumarin	0,166
		3-Isochromanone	0,144
		3-Hydroxy-1-indanone	0,142
		Pyruvophenone	0,142
		4-Hydroxycinnamyl aldehyde	0,138
<b>9</b>	113,9940	<b>Acetylenedicarboxylate</b>	1,000
<b>10</b>	150,0537	<b>D-Ribose</b>	0,112
<b>11</b>	166,0632	<b>Tropate</b>	0,221
		Phenyllactate	0,186
		3-(2-Hydroxyphenyl)propanoate	0,170
		3-(3-Hydroxyphenyl)propanoic acid	0,147
		3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetaldehyde	0,140
		Caffeyl alcohol	0,136
<b>12</b>	180,0631	<b>D-Glucose</b>	0,092
<b>13</b>	204,0886	<b>L-Tryptophan</b>	1,000
<b>14</b>	228,2081	<b>Tetradecanoic acid</b>	1,000
<b>15</b>	242,2240	<b>12-Methyltetradecanoic acid</b>	1,000

<b>16</b>	256,2389	<b>Hexadecanoic acid</b>	1,000
<b>17</b>	280,2376	<b>Linoleate</b>	1,000
<b>18</b>	282,2539	<b>(9Z)-Octadecenoic acid</b>	1,000
<b>19</b>	342,1146	<b>Sucrose</b>	0,128
		Lactose	0,122
		Maltose	0,122
		Isomaltose	0,114
		Melibiose	0,112
		alpha,alpha-Trehalose	0,110
		Epimelibiose	0,100
		alpha-D-Galactosyl-(1->3)-1D-myo-inositol	0,097
		Cellobiose	0,096
		UWM6	0,000

Predição de compostos metabólicos presentes nas OMVs de acordo com o software ProbMetab. # Ranking. <sup>MP</sup> Massa proposta em função da anotação iônica. \* Prováveis compostos em função da correlação do genoma com a anotação iônica e em negrito os compostos com maior probabilidade. <sup>Prob</sup> Composto putativo de maior probabilidade.

**Tabela 20. Perfil de metabólitos de OMVs da cepa Temecula1.**

#	MP	Prováveis Compostos	Prob
<b>1</b>	129,0430	<b>5-Oxo-D-proline</b>	0,206
<b>2</b>	131,0948	<b>L-Isoleucine</b>	0,390
<b>3</b>	165,0788	<b>L-Phenylalanine</b>	0,659
		D-Phenylalanine	0,341
<b>4</b>	254,2235	<b>(9Z)-Hexadecenoic acid</b>	1,000
<b>5</b>	256,2394	<b>Hexadecanoic acid</b>	1,000
<b>6</b>	276,1099	<b>5-Amino-6-(1-D-ribitylamino)uracil</b>	1,000
<b>7</b>	282,2544	<b>(9Z)-Octadecenoic acid</b>	1,000
<b>8</b>	284,2702	<b>Octadecanoic acid</b>	1,000
<b>9</b>	131,0946	<b>L-Isoleucine</b>	0,390
		L-Leucine	0,306
		6-Aminohexanoate	0,304
<b>10</b>	148,0527	<b>trans-Cinnamate</b>	0,237
		Pyruvophenone	0,168
		4-Hydroxycinnamyl aldehyde	0,161
		Dihydrocoumarin	0,149
		3-Isochromanone	0,144
		3-Hydroxy-1-indanone	0,141
<b>11</b>	256,0310	<b>1-epi-Valienol 1-phosphate</b>	0,351
		Validone 7-phosphate	0,335
		1-epi-Valienol 7-phosphate	0,314

<b>12</b>	180,0638	<b>D-Glucose</b>	0,083
<b>13</b>	113,9945	<b>Acetylenedicarboxylate</b>	1,000
<b>14</b>	117,0805	<b>L-Valine</b>	0,371
<b>15</b>	135,0557	<b>Adenine</b>	1,000
<b>16</b>	142,0258	<b>(S)-5-Oxo-2,5-dihydrofuran-2-acetate</b>	0,214
		2-Oxo-2,3-dihydrofuran-5-acetate	0,199
		cis,cis-4-Hydroxymuconic semialdehyde	0,198
		2-Hydroxymuconate semialdehyde	0,196
		cis,cis-Muconate	0,194
<b>17</b>	199,0825	<b>L-Anticapsin</b>	1,000
<b>18</b>	204,0894	<b>L-Tryptophan</b>	1,000
<b>19</b>	228,2087	<b>Tetradecanoic acid</b>	1,000
<b>20</b>	234,1615	<b>Germacrene A acid</b>	1,000
<b>21</b>	242,2244	<b>12-Methyltetradecanoic acid</b>	1,000
<b>22</b>	254,0580	<b>Anhydroglycinol</b>	0,504
		Daidzein	0,496
<b>23</b>	254,0573	<b>Daidzein</b>	0,513
		Anhydroglycinol	0,487
<b>24</b>	256,2389	<b>Hexadecanoic acid</b>	1,000
<b>25</b>	270,0525	<b>Apigenin</b>	0,338
		Genistein	0,335
		4',6,7-Trihydroxyisoflavone	0,326
<b>26</b>	342,1169	<b>Sucrose</b>	0,126
		Maltose	0,124
		Melibiose	0,117
		Lactose	0,108
		alpha-D-Galactosyl-(1->3)-1D-myo-inositol	0,108
		Cellobiose	0,107
		Isomaltose	0,104
		alpha,alpha-Trehalose	0,104
		Epimelibiose	0,101
<b>27</b>	451,2660	<b>Terpendole G</b>	1,000

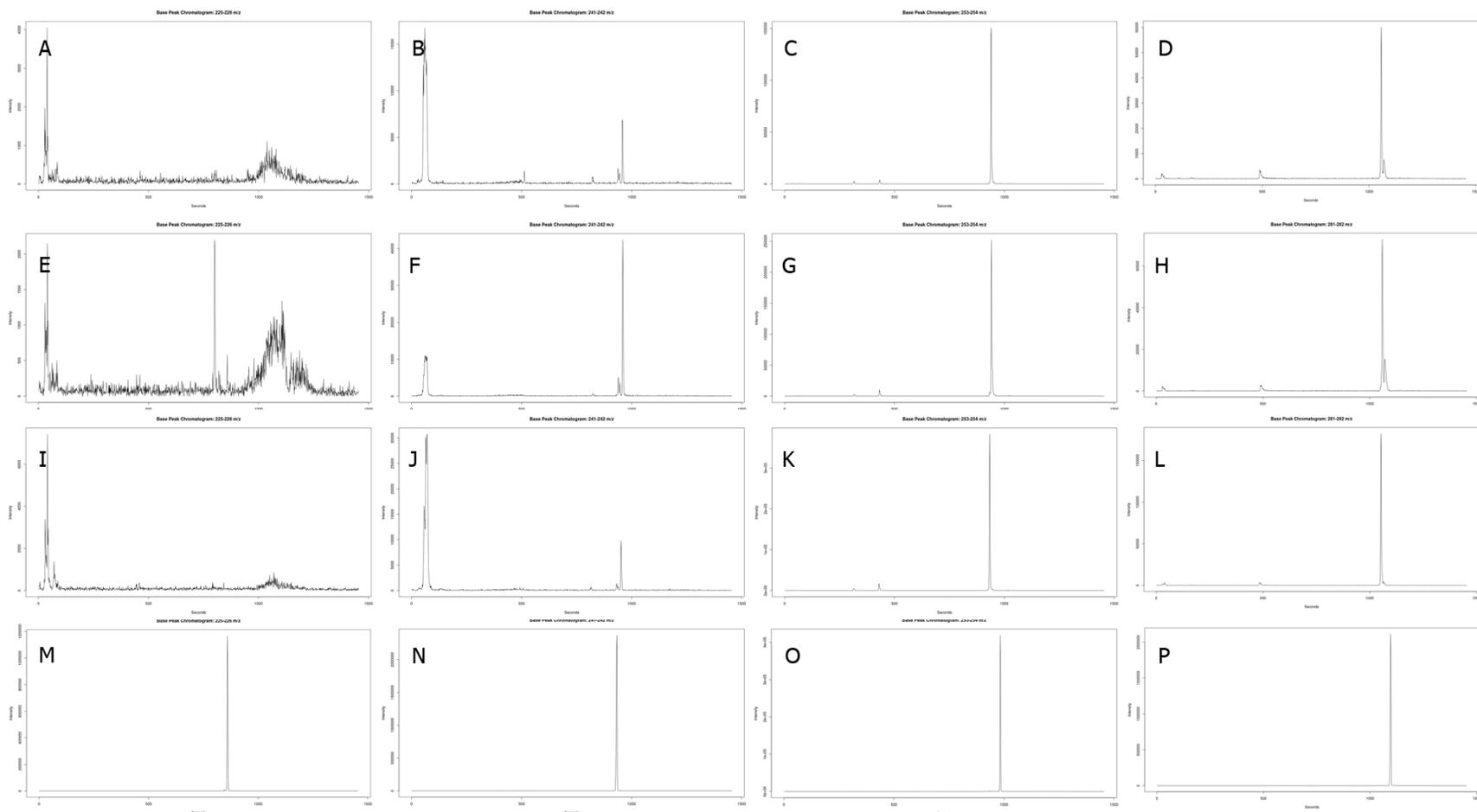
Predição de compostos metabólicos presentes nas OMVs de acordo com o software ProbMetab. # Ranking. <sup>MP</sup> Massa proposta em função da anotação iônica. \* Prováveis compostos em função da correlação do genoma com a anotação iônica e em negrito os compostos com maior probabilidade. <sup>Prob</sup> Composto putativo de maior probabilidade.

Na análise do metaboloma das OMVs detectamos e confirmamos a provável identidade, pela análise comparativa com padrões sintéticos, dos seguintes compostos: ácido 12-metil-tetradecenoico (CVC-DSF), ácido hexadecenoico (X#DSF2) e ácido octadecenoico (Figura 12). O composto ácido hexadecenoico, também chamado de X#DSF2, possui atividade de sinalização

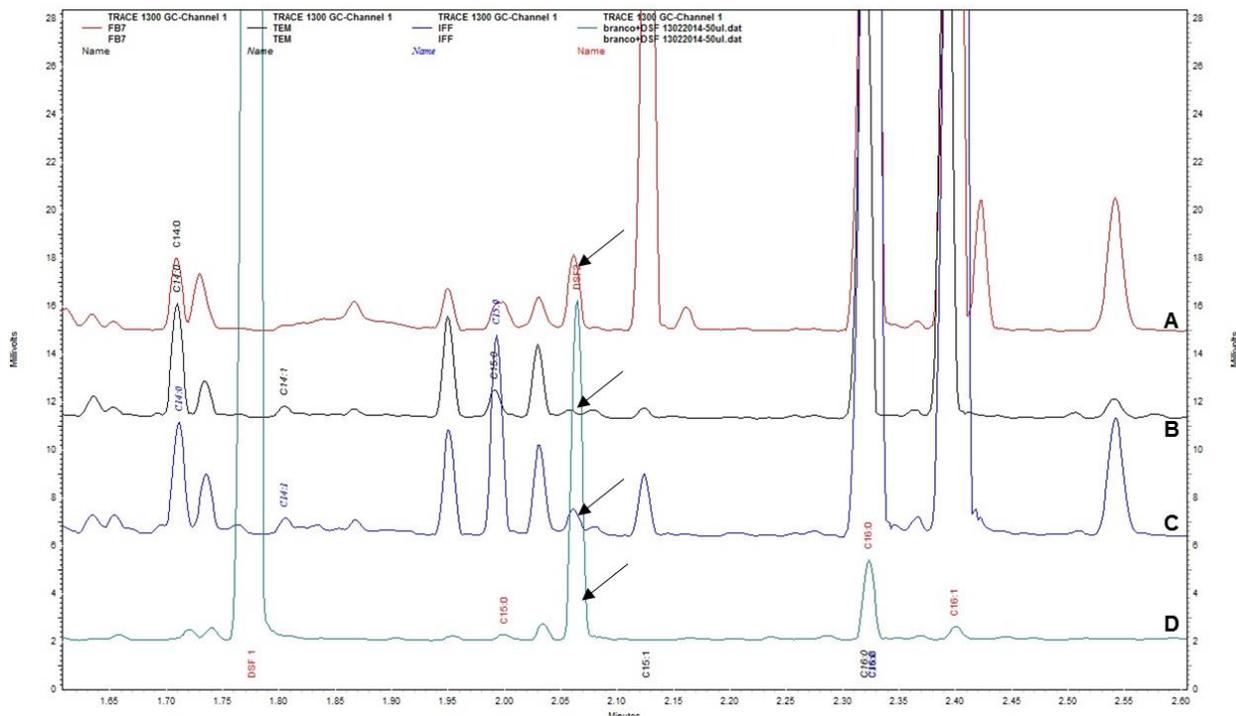
no sistema de percepção de quórum de *X. fastidiosa*, sendo que este composto provoca maior resposta da cepa sensora *rpfF\** (cepa de *X. fastidiosa* que possui gene repórter para revelar sinalização por DSF e expressa RpfF intacta porém inativa por mutação em seu sítio catalítico (Ionescu *et al*, 2013)) mesmo em baixas concentrações (Beaulieu *et al.*, 2013). A molécula ácido 2-*cis*-tetradecenoico (C<sub>14:1</sub>), descrita como *Xf*DSF ou *Xf*DSF1, foi a primeira molécula a ser demonstrada ter capacidade de atuar no sistema de sinalização por percepção de quórum em *X. fastidiosa*, através de ensaio com a cepa sensora *rpfF\** (Beaulieu *et al.*, 2013). No entanto, nas condições de cultivo nas quais desenvolvemos nossos experimentos *Xf*DSF1 não foi detectado. A produção de distintos compostos da família DSF em diferentes proporções relativas, tem sido apontada como moduladora da mudança de comportamento *X. fastidiosa* de móvel para sésil (Almeida *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2016).

Os dados aqui apresentados, mostram, pela primeira vez, a presença dos compostos da família DSF nas OMVs de *X. fastidiosa*. O xilema ou o interior do aparelho bucal de insetos vetores tendem a ser ambientes altamente hidrofílicos e as OMVs poderiam favorecer o transporte desses efetores tanto na vizinhança das células produtoras como para células de *X. fastidiosa* em partes distantes, uma vez que a doença tenha se tornado sistêmica na planta.

A ausência de *Xf*DSF1 nas OMVs pode indicar que essa molécula possua maior capacidade de difusão nos ambientes hidrofílicos e/ou hidrofóbicos sem a necessidade, portanto, de ser carregada pelas OMVs. Como já mencionado Temecula 1 produz *Xf*DSF1 (Beaulieu *et al.*, 2013) e nós temos evidências dessa espécie de DSF também pelas cepas 9a5c e Fb7. A Figura 13 mostra que *Xf*DSF1 (ácido 2-*cis*-tetradecenoico) está presente nos sobrenadantes da cultura das cepas 9a5c, Fb7 e Temecula1, conforme análise realizada utilizando cromatografia gasosa (GC). Embora seja uma metodologia diferente da utilizada para análise do metaboloma das OMVs, foi possível detectar *Xf*DSF1 e também outros compostos da família DSF no extrato metanólico dos sobrenadantes dos cultivos dessas cepas. Ainda que este método de identificação não fora realizado de modo quantitativo, a intensidade do pico de *Xf*DSF1 na cepa Fb7 foi maior do que nas outras duas cepas estudadas, Temecula1 e 9a5c.



**Figura 12. Cromatogramas de compostos da família DSF identificados nas OMVs das cepas de *X. fastidiosa*.** A, B, C e D correspondem a íons extraídos (XIC, *Extracted Ions Chromatograms*) da cepa Fb7; E, F, G e H correspondem a XIC da cepa 9a5c; I, J, K e L correspondem a XIC da cepa Temecula1. M, N, O e P correspondem a XIC dos padrões XfDSF1, CVC-DSF, XfDSF2 e C18:0, respectivamente. Os cromatogramas estão na mesma escala de tempo de retenção.



**Figura 13. Análise do perfil lipídico do sobrenadante de cultura das cepas 9a5c, Fb7 e Temecula1 em meio PWG.** Amostras (1  $\mu$ L) do extrato metanólico do sobrenadante das culturas das cepas Fb7 (A), Temecula1 (B), 9a5c (C), e (D) do meio PWG contaminado com o padrão de XfDSF (C<sub>14:1</sub>) foram injetadas para análise em GC. O composto XfDSF1 sintético utilizado como padrão foi eluído sob dois tempos de retenção, indicados como DSF1 e DSF2.

#### 4.2.5. Modelo de sinalização mediado por OMVs em *X. fastidiosa*

Os resultados do proteoma das OMVs das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1 confirmam resultados da literatura (Ionescu *et al.*, 2014; Pierce *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2016) e reforçam a proposição de que entre as possíveis funções dessas vesículas está a de carregar determinantes de virulência contribuindo para o aparecimento dos sintomas nas doenças causadas por *X. fastidiosa*.

Uma função adicional, mas não menos importante, para as OMVs evidenciada pela análise metabolômica é a de transportar compostos da família DSF. A partir dessa observação propomos um modelo de sinalização mediado por OMVs em *X. fastidiosa* (Figura 14), as quais transportariam DSFs de cadeia mais longa, como XfDSF2, promovendo sua difusão em meios aquosos como o xilema. Assim além da sua carga proteica, as OMVs de *X. fastidiosa* seriam veículos de transporte e de entrega de DSFs para células na vizinhança ou mais distantes. As

moléculas de DSF de cadeia mais curta como *Xf*DSF1, por outro lado, dispensam o transporte via OMVs.

Como já mencionado, *X. fastidiosa* produz ácidos graxos com 12 ou mais carbonos com uma dupla ligação, coletivamente denominados fatores de sinalização difusíveis (DSF) e que são reconhecidos pelo receptor RpfC, uma histidina quinase sensora do sistema de sinalização de dois componentes (Chatterjee *et al.*, 2008a; Almeida *et al.*, 2012; Beaulieu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2016). A premissa é que as moléculas de DSF presentes no meio extracelular difundam pela membrana externa de *X. fastidiosa* para ativar o receptor, RpfC, na membrana interna (Chatterjee *et al.*, 2008a; Chatterjee *et al.*, 2008b; Wang *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2016). Curiosamente, em *X. fastidiosa*, a ativação de RpfC por DSF requer interação de RpfC com RpfF (sintase de DSF) ativa ou inativa (Ionescu *et al.*, 2013). Ainda que sistemas de sinalização envolvendo DSF sejam bastante estudados em outras Gram-negativas, como *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cenocepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (Boon *et al.*, 2008; Davies e Marques, 2009; Zhou *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017), apenas recentemente foi bioquimicamente demonstrado que DSF liga-se ao segmento N-terminal de RpfC, modulando alostericamente a atividade de histidina quinase de RpfC em *Xanthomonas campestris* (Cai *et al.*, 2017).

Outro aspecto ainda pouco esclarecido refere-se aos mecanismos de degradação ou inativação dos DSFs (Zhou *et al.*, 2017). Sabe-se que o produto do gene *rpfB* (*fatty acyl-CoA ligase*) RpfB é requerido para o *turnover* de DSF em *X. campestris pv. campestris* (Zhou *et al.*, 2015) e está envolvido no processamento de DSFs em *X. fastidiosa* (Almeida *et al.*, 2012). Já em outro estudo foi mostrado que os genes *carAB* de *Pseudomonas spp* cepa G, que codificam enzimas carbomoi-fosfato sintetase, são necessários para inativação de DSF de *X. campestris pv. campestris* e *X. fastidiosa* em ensaios de co-infecção com estas cepas (Newman *et al.*, 2008). Interessantemente, a proteína CarB (PD0399) foi detectada no exoproteoma de  $\Delta rpfF$  (Tabela 8) e no proteoma das OMVs de Temecula1 (Tabela 16) além de seu transcrito ser significativamente mais expresso no mutante  $\Delta rpfF$  (Tabela 7). Estas são peças de um quebra-cabeças que requer experimentos adicionais para ser montado.

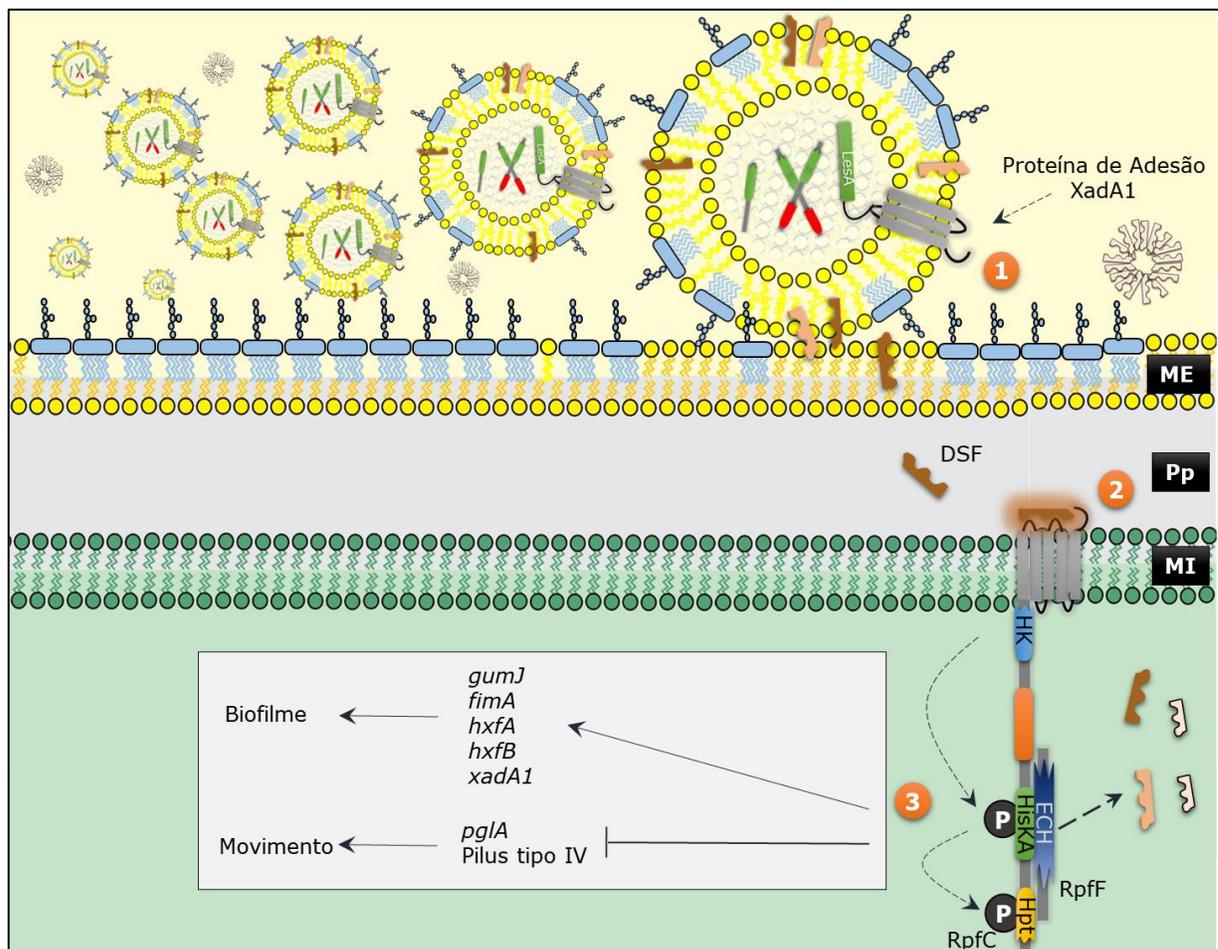
A partir da observação que OMVs de *X. fastidiosa* carregam DSF propomos também um modelo para sua formação, o qual considera o resultado de que cepa Fb7 produz mais vesículas do as cepas 9a5c e Temecula1 (Figura 15). Sugerimos que um desbalanço na produção de DSF poderia interferir no formato da membrana externa levando a produção de OMVs.

Alguns mecanismos para a produção de OMVs em bactérias Gram-negativas têm sido propostos. A participação de certas proteínas de membrana externa (por exemplo, OmpT), como verificado para *E. coli*, pode indicar a existência de uma maquinaria e um mecanismo razoavelmente complexo para a formação de vesículas de membranas (Premjani *et al.*, 2014). No entanto, as variações de fosfolípidos nas membranas parecem exercer um papel fundamental no formato e dobramento das membranas de bactérias, sendo que o acúmulo localizado de fosfolípidos poderia desencadear a produção de OMVs (Roier *et al.*, 2016a; Roier *et al.*, 2016b), como esquematizado na Figura 1.

Entre as várias alterações existentes no genoma de Fb7 quando comparado aos genomas das cepas Temecula1 e 9a5c, foi verificada a inserção de um nucleotídeo no gene que codifica a proteína RpfC (PD0406, em Temecula1 e XF1114, em 9a5c) que resulta no surgimento de um códon de parada prematuro. Dessa forma, a proteína RpfC eventualmente expressa na cepa Fb7 apresenta apenas o domínio sensor transmembranar. Alternativamente, a proteína truncada não seria estável e Fb7 não teria RpfC. Em qualquer das duas situações RpfF estaria constitutivamente ativada e os níveis de DSF seriam aumentados, como esquematizado na Figura 15. Entretanto, assim como o mutante  $\Delta rpfF$ , Fb7 não é capaz de perceber e transduzir este sinal.

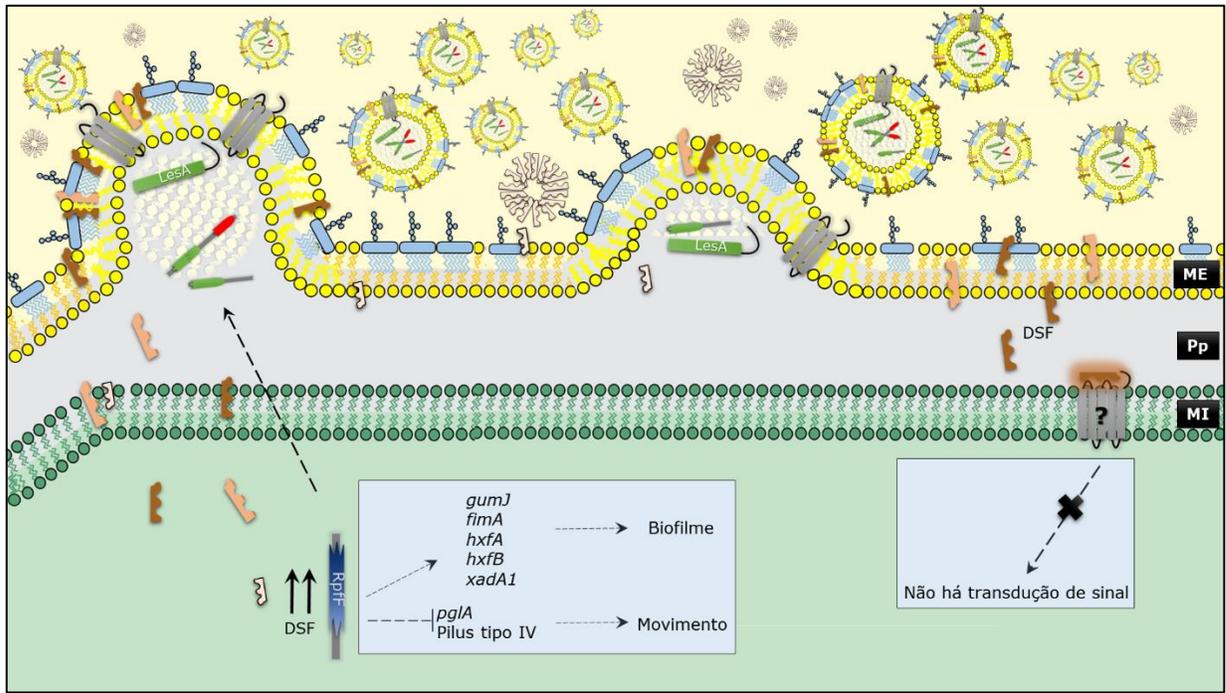
A mutação em *rpfC* de Fb7, que foi devidamente confirmada, parece explicar aspectos do fenótipo de Fb7, como a ausência da formação de biofilme e alta produção de exopolissacarídeo, bem como seu perfil de expressão gênica característico, que inclui níveis maiores de transcritos relacionados a produção de exopolissacarídeo, de lipases e de proteases (Santana, 2013; Pierry, 2017). Vale ressaltar que um mutante  $\Delta rpfC$  da cepa Temecula1 foi produzido, o qual tem um fenótipo altamente contrastante com a cepa Fb7, pois no mutante  $\Delta rpfC$  verifica-se uma maior formação de biofilme, um fenótipo de caráter mais agregativo e menos virulento (Chatterjee *et al.*, 2008c). Por outro lado, os fenótipos exibidos por Fb7 se assemelham a vários dos fenótipos exibidos pelo mutante  $\Delta rpfF$ . Vale lembrar, que o mutante  $\Delta rpfF$  produz mais OMVs do que a cepa selvagem Temecula1 e que, como já mencionado, é deficiente tanto na síntese como na percepção de DSF (Ionescu *et al.*, 2013; Ionescu *et al.*, 2014). A premissa que embasa o modelo proposto na Figura 15 é que a cepa Fb7 produz excesso de DSF em contraste com  $\Delta rpfF$  que não produz. Em ambos os casos haveria um desbalanço na concentração dessas moléculas eventualmente inseridas na membrana externa de *X. fastidiosa*, resultando em uma maior produção de OMVs.

Além do transporte de fatores de virulência e de DSF, as OMVs de *X. fastidiosa* também transportam as adesinas XadA1 e XadA3. A primeira está entre as proteínas mais abundantes nas OMVs das cepas Fb7 e Temecula (Tabela 9 e Figura 10), e a segunda parece ser mais abundante apenas nas OMVs da cepa 9a5c (Tabela 9). A hipótese corrente é que as OMVs de *X. fastidiosa* recobririam os vasos do xilema de modo a modular a adesão das células a esta superfície, facilitando sua disseminação pelo interior dos vasos. Este efeito é mais evidente no mutante  $\Delta rpfF$  hipervesiculador que coloniza sistemicamente a planta mais rapidamente e exibe um fenótipo de hipervirulência (Ionescu *et al.*, 2014). Futuros experimentos são necessários para verificar se este fenótipo de hipervirulência é também exibido pela cepa Fb7.



**Figura 14. Proposta de modelo de sinalização mediada por OMVs em *X. fastidiosa*.** (1) DSF produzido pela enzima RpfF se acumula e se intercala na membrana externa; uma vez secretadas as OMVs carregam moléculas de DSF até células alvo na vizinhança ou distantes, onde é entregue (2), exercendo sua função de sinalização através da histidina quinase sensora RpfC (3). DSF de cadeia mais curta difundem no meio aquoso. As OMVs contêm fatores de virulência como

a lipase LesA, além de adesinas como XadA1. Genes cuja expressão é modulada pela via de sinalização DSF/RpfC estão indicados (Chatterjee *et al.*, 2008a).



**Figura 15. Modelo de formação de OMVs na cepa Fb7.** Na cepa Fb7, *rpfC* que codifica o sensor do sistema de dois componentes não produziria RpfC funcional devido a uma mutação. Desta forma, RpfF estaria livre e ativa e, portanto, DSF seria produzido constitutivamente. A produção supostamente aumentada de DSF poderia levar a produção aumentada de OMVs. Como RpfC mutado não é capaz de transduzir o sinal de DSF, tão pouco se complexa com RpfF, na cepa Fb7 a sinalização DSF/RpfC não é funcional e consequentemente a regulação de genes cuja expressão é modulada pela via de sinalização DSF/RpfC estaria comprometida.

### **4.3. Análise de metabólitos secretados por *X. fastidiosa* na interação com *Burkholderia phytofirmans***

A identificação de metabólitos extracelulares, ou *footprint* metabólico ou exometaboloma, é uma abordagem poderosa para caracterização de respostas dos organismos a distintas situações a que são expostos e para análise de cepas mutantes (Allen *et al.*, 2003; Kell *et al.*, 2005; Kell e Oliver, 2016b). Além disso, a análise de metabólitos secretados possui muitas vantagens analíticas em relação à análise de compostos intracelulares dado seu menor *turnover*, maior estabilidade e, conseqüentemente, uma maior reprodutibilidade do *footprint* metabólico (Villas-Boas *et al.*, 2005a; Villas-Boas *et al.*, 2006; Chumnanpuen *et al.*, 2014).

Nesta parte do trabalho, propusemos a realização de um estudo dos metabólitos secretados por *X. fastidiosa* em resposta a sua interação com metabólitos secretados por *Burkholderia phytofirmans* PsJN, uma cepa que tem sido sugerida como biocontrole para a doença de Pierce das videiras (Lindow *et al.*, 2016).

A cepa PsJN de *Burkholderia phytofirmans*, descrita como um endofítico de videiras (Miotto-Vilanova *et al.*, 2016), é capaz de se multiplicar e se espalhar no interior de videiras de forma semelhante a *X. fastidiosa*, sendo que a co-inoculação de *X. fastidiosa* e *B. phytofirmans* em videiras resultou na redução drástica dos sintomas da Doença de Pierce (Lindow *et al.*, 2016). Atribui-se que este efeito resulte da eventual produção, pela cepa biocontrole, de moléculas de sinalização e percepção de quórum, como DSF, que causem confusão (*pathogen confusion*) nos mecanismos de virulência e patogenicidade de *X. fastidiosa*, de modo similar ao verificado em plantas transgênicas que produzem DSF e que tem redução de sintomas quando infectadas com *X. fastidiosa* (Lindow *et al.*, 2014; Caserta *et al.*, 2017).

Os experimentos descritos a seguir foram realizados sob supervisão do Prof. Steven Lindow (Universidade da Califórnia, Berkeley, California, EUA) e do Dr. Trent Northen (Joint Genome Institute, Walnut Creek, EUA) durante período de estágio de doutorado sanduíche de 12 meses apoiado pela CAPES.

#### **4.3.1. Análise da produção de XfDSF em meio PD3**

Previamente a realização dos ensaios de interação de *X. fastidiosa* com *B. phytofirmans* PsJN co-cultivadas em meio PD3, foi necessário confirmar se *X. fastidiosa* produz DSF nesse meio de cultura. Dessa forma avaliamos a produção de XfDSF1 pela cepa Temecula1 (WT) e por mutantes da via de sinalização de DSF ( $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$ ) (Newman *et al.*, 2004;

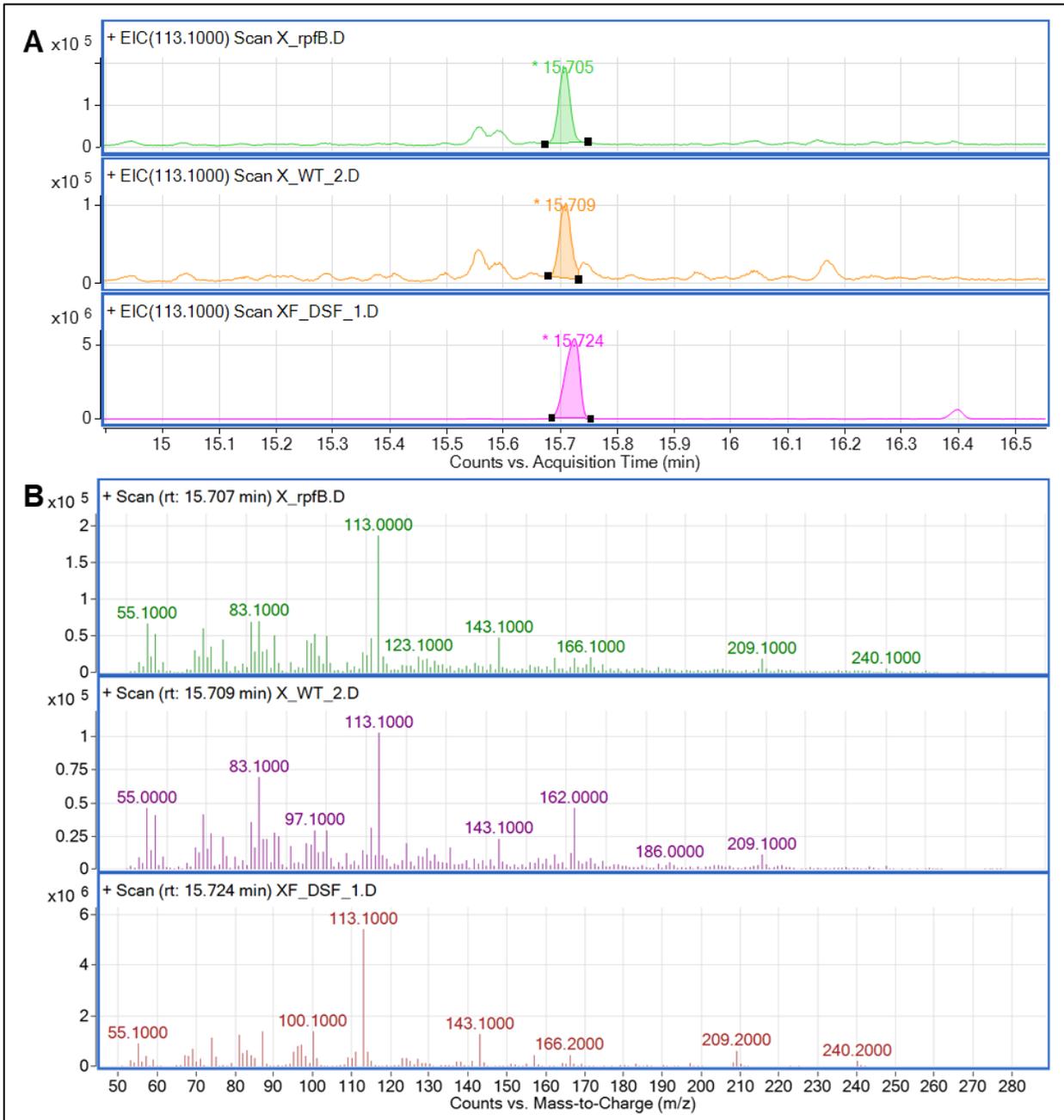
Chatterjee *et al.*, 2008c; Almeida *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2013), os quais seriam também utilizados nos experimentos de interação com *B. phytofirmans*.

Após cultivo no meio PD3 os sobrenadantes das cepas WT,  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  foram liofilizados, submetidos à extração metanólica e, em seguida, foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Os sobrenadantes das cepas  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  não continham nenhuma molécula similar aos padrões de DSF que utilizamos (dados não apresentados), o que era esperado, pelo menos para  $\Delta rpfF$  (mutante que não produz DSF). Os resultados mostrados na Figura 16A foram obtidos com os sobrenadantes das cepas  $\Delta rpfB$  e WT, nos quais, como esperado, foram encontrados os picos de  $XfDSF1$  (ácido 2-*cis*-tetradecenoico), devidamente confirmados pelo perfil de fragmentação de íons (Figura 16B) em comparação com o padrão ( $XfDSF1$  sintético). Não detectamos, em nenhuma das cepas analisadas,  $XfDSF2$  (ácido 2-*cis*-hexadecenoico), CVC-DSF (ácido 12-metiltetradecenoico) e BDSF (ácido *cis*-2-dodecenoico), cujos padrões sintéticos foram utilizados como referência.

Em um estudo recente (Ionescu *et al.*, 2016), a espécie  $XfDSF1$  não foi detectada no sobrenadante do cultivo das cepas Temecula1 e  $\Delta rpfF$ , enquanto que a presença de  $XfDSF2$  de forma abundante no sobrenadante das cepas Temecula1 e  $\Delta rpfC$  foi confirmada. Embora, o cultivo destas cepas também tenha sido realizado em meio PD3, o método de extração utilizado por Ionescu e colaboradores (acetato de etila) difere do que utilizamos (metanol). Ressalte-se que neste estudo (Ionescu *et al.*, 2016), não foi avaliada a produção de DSF pelo mutante  $\Delta rpfB$ .

Além de  $XfDSF2$  (Figura 13), também  $XfDSF1$  (Figura 12) (Beaulieu *et al.*, 2013) é produzido pela cepa Temecula1 no cultivo em meio PWG. A literatura (He *et al.*, 2010; Ionescu *et al.*, 2016) sugere que há uma aparente variação na proporção entre as espécies de DSF produzidas, dependendo do meio utilizado no cultivo *in vitro*. Além disso, os métodos de extração e de análise também parecem influenciar na identificação das moléculas de DSF, e, portanto, a não identificação de uma molécula por um dado método não caracteriza sua ausência.

Em resumo, podemos concluir com razoável segurança que, em meio PD3, a cepa Temecula1 (WT) produz  $XfDSF1$  e  $XfDSF2$ ,  $\Delta rpfB$  produz, pelo menos,  $XfDSF1$  e  $\Delta rpfC$  produz apenas  $XfDSF2$ . A cepa  $\Delta rpfF$  não produz  $XfDSF1$  e seu sobrenadante exibe apenas traços de  $XfDSF2$  (Ionescu *et al.*, 2016).



**Figura 16.** LC/MS de extratos metanólicos de sobrenadantes do cultivo das cepas de *Temecula1* WT e  $\Delta rpfB$  em meio PD3. **(A)** Picos integrados identificados nas cepas WT e  $\Delta rpfB$  representam *XfDSF1*, identificado no mesmo tempo de retenção do padrão sintético. **(B)** Perfis de fragmentação dos íons presentes no composto identificado como *XfDSF1* nas cepas WT e  $\Delta rpfB$  são compatíveis com o perfil de fragmentação do padrão sintético.

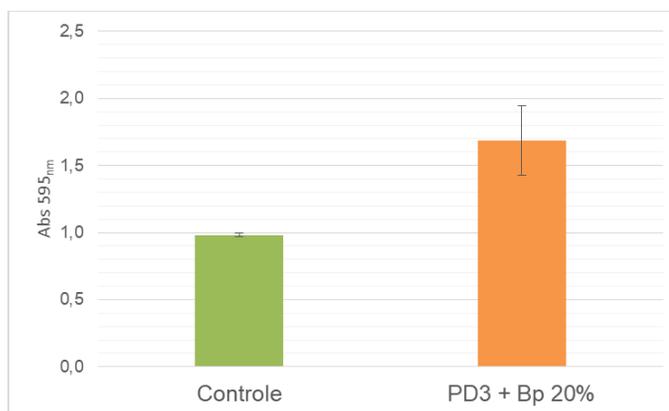
#### 4.3.2. Efeito do sobrenadante de *B. phytofirmans* no biofilme de *X. fastidiosa*

Ainda que a natureza do composto que *B. phytofirmans* PsJN produz e que promove a redução da população de *X. fastidiosa* Temecula1 em videiras em que ambas foram co-inoculadas (Lindow *et al.*, 2016) seja desconhecida, sabe-se que outras espécies de *Burkholderia* produzem moléculas da família DSF (Boon *et al.*, 2008). Também já é conhecido que extratos de acetato de etila do sobrenadante de cultura de *B. phytofirmans* PsJN modula positivamente a expressão de um promotor em *X. campestris* sabidamente regulado por DSF e que o genoma de *B. phytofirmans* PsJN contém um possível ortólogo de *rpfF* (DSF sintase) (Lindow *et al.*, 2016). Assim, estes resultados sugerem que moléculas sinalizadoras produzidas por *B. phytofirmans* PsJN possam incluir compostos da família DSF.

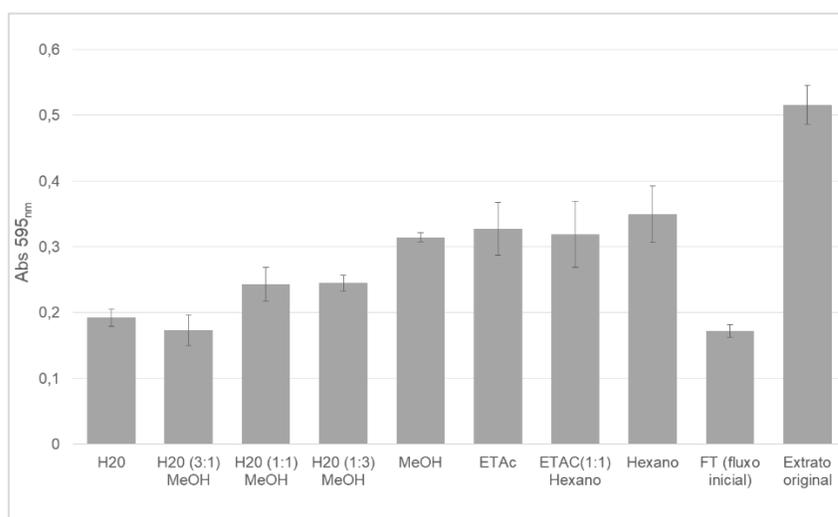
Por outro lado, pouca ou nenhuma mudança na expressão do gene repórter *phoA* foi observada quando uma cepa de *X. fastidiosa* biossensora de DSF (*Xf:phoA*) foi exposta a extratos de acetato de etila de *B. phytofirmans* (dados não mostrados) (Lindow *et al.*, 2016). Entretanto, quando esta cepa sensora foi exposta a extratos de acetato de etila de sobrenadantes de cultura de *B. phytofirmans* PsJN, observamos um aumento de 50% na formação de biofilme de *X. fastidiosa* (Figura 17). Além disso, visualmente a quantidade de biomassa bacteriana que se acumula na interface meio/ar é maior, assim como o número de células de *X. fastidiosa* que adere nas paredes dos frascos de cultura abaixo da interface meio/ar também aumenta (dados não mostrados). De forma similar, experimentos preliminares demonstraram que as cepas mutantes  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  de *X. fastidiosa* também reproduzem o perfil visual de biomassa bacteriana em culturas *in vitro*, sugerindo que o efator produzido por *B. phytofirmans* desencadeie o mesmo efeito nas cepas mutantes como medido na cepa selvagem (WT). Deste modo, sugerimos que algum composto do sobrenadante da cultura de *B. phytofirmans* interfere na sinalização de *X. fastidiosa* induzindo aumento da formação de biofilme.

Com o objetivo de purificar o composto de *B. phytofirmans* capaz de induzir alterações na formação de biofilme na cepa Temecula1 de *X. fastidiosa*, o extrato de acetato de etila do sobrenadante de cultura de *B. phytofirmans* foi concentrado e separado em coluna de fase reversa C18. A eluição sequencial foi realizada com solventes de polaridade decrescente, consistindo em diferentes proporções de água e metanol e finalmente com solventes mais apolares tais como acetato de etila e hexano. O composto que induziu a formação de biofilme em *X. fastidiosa* parece ser bastante apolar, sendo eluído preferencialmente pelos solventes mais apolares testados (Figura 18). Entretanto, ainda não foi possível decifrar a natureza química dos

compostos das frações mais ativas. Recentemente foi demonstrado que a cepa biocontrole PsJN expressa genes relacionados a biossíntese de moléculas de sinalização de percepção de quórum da família das homoserina lactonas (Zuniga *et al.*, 2017). Assim, mesmo não tendo sido possível confirmar a existência de compostos da família DSF produzidos por *B. phytofirmans*, prosseguimos na determinação do exometaboloma de *X. fastidiosa* resultante da sua interação com o sobrenadante da cepa PsJN.



**Figura 17. Aumento do biofilme em *X. fastidiosa* em resposta a adição do sobrenadante de *B. phytofirmans*.** A cepa Temecula1 foi cultivada em meio PD3 por 7 dias sem (A) com (B) 20% v/v de sobrenadante de cultura de *B. phytofirmans* (Bp) em meio PD3 por 1 dia. A quantificação do biofilme foi realizada por medição da coloração com cristal violeta (Abs<sub>595nm</sub>). Barras de erro indicam o desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.



**Figura 18. Efeito de extratos do sobrenadante de *B. phytofirmans* na formação de biofilme em *X. fastidiosa*.** A cepa Temecula1 foi cultivada em meio PD3 por 7 dias com adição de volumes iguais de eluatos de uma coluna C18 em que foi aplicado o extrato de acetato de etila (Extrato original) do sobrenadante da cultura de *B. phytofirmans* cultivada em meio KB. Os eluatos

sequenciais de solventes de polaridade decrescente são mostrados da esquerda para a direita no eixo X. A quantificação do biofilme foi realizada por medição da coloração com cristal violeta ( $Abs_{595nm}$ ). MeOH (metanol); EtAc (acetato de etila); FT (fração não adsorvida a coluna). Barras de erro indicam o desvio padrão de ensaios realizados em triplicata.

#### 4.3.3. Efeito do sobrenadante de *B. phytofirmans* no exometaboloma em *X. fastidiosa*

Para análise do exometaboloma de *X. fastidiosa* em função da sua interação com o sobrenadante de *B. phytofirmans*, utilizamos as cepas Temecula1 (WT),  $\Delta rpfF$ ,  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$  cultivadas em meio PD3 por 7 dias sem (controle) ou com (tratamento) o suplemento de 20% de sobrenadante de *B. phytofirmans* PsJN cultivada em meio PD3 por 1 dia. Os cultivos foram geralmente iniciados com  $DO_{600nm} = 0,05$  e interrompidos após atingir  $DO_{600nm} = 0,5$ . Os cultivos de *B. phytofirmans* foram filtrados em membrana 0,22 mm e utilizados para suplementação das culturas de *X. fastidiosa*. Após coleta e processamento, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas.

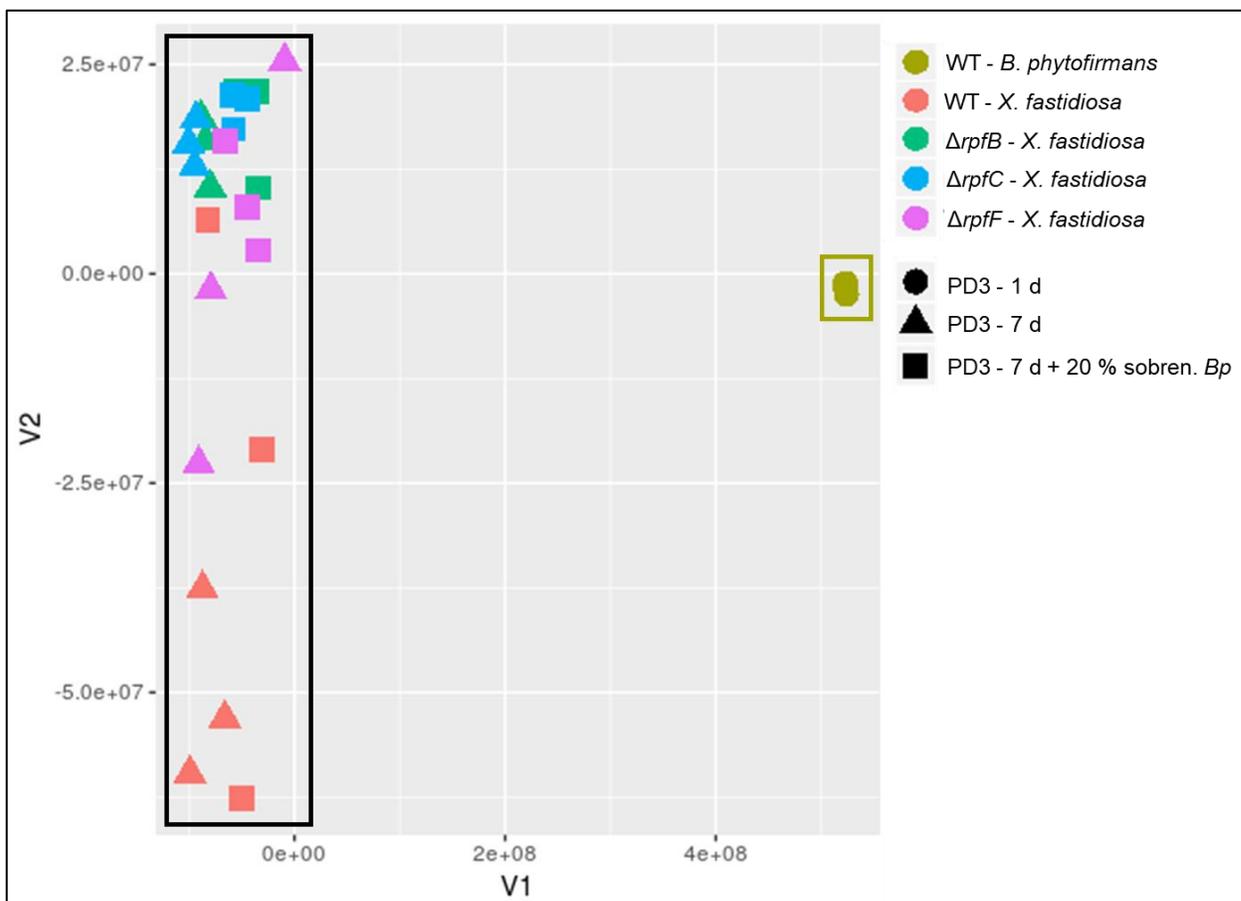
Os conjuntos de espectros das amostras foram analisados contra uma biblioteca de compostos com perfil conhecido (perfil de ionização e tempo de retenção). Assim, foram identificados 86 compostos presentes no exometaboloma de todas as amostras (no Apêndice 4 há uma descrição detalhada destes 86 compostos detectados e seus valores normalizados para as cepas de *X. fastidiosa* e *B. phytofirmans*). Os compostos presentes são, em sua maioria, aminoácidos (L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-glicina, L-glutamato, L-glutamina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-metionina, L-prolina, L-serina e L-tirosina), derivados de nucleotídeos (orotato, adenina, citosina, guanina, inosina, timina e uracila), compostos intermediários do metabolismo e ciclo do ácido cítrico ( $\alpha$ -cetoglutarato, fumarato, lactato e succinato), além de alguns metabólitos secundários (ácido subérico, xiquimato, entre outros). Compostos de identidade desconhecida (untargeted analysis) não foram incluídos nas análises subsequentes.

A fim de reduzir as proporções dimensionais após a obtenção dos perfis metabólicos, os dados foram submetidos a análise de coordenadas principais (PCoA) não supervisionada para diagnóstico rápido do perfil das amostras. Com base na identificação e quantificação de 86 compostos, a PCoA separou, como esperado, as amostras em dois grupos: *X. fastidiosa* e *B. phytofirmans* (Figura 19), refletindo os distintos exometabolomas dessas duas espécies bacterianas.

O grupo *X. fastidiosa* inclui as cepas WT,  $\Delta rpfF$ ,  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$ , sendo notória uma ligeira separação entre as amostras da condição controle e tratamento, refletindo a influência do

sobrenadante de *B. phytofirmans* nos exometabolomas das cepas de *X. fastidiosa*. A cepa WT está mais distante das demais cepas de *X. fastidiosa*, embora não possua um agrupamento amostral coeso como as demais cepas mutantes de *X. fastidiosa*. Por outro lado, no subgrupo onde se encontram as cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$ , percebe-se um agrupamento coeso e uma separação sutil das réplicas entre as duas condições de cultivo, controle e tratamento. De forma interessante, uma réplica biológica da cepa WT (tratamento) está próxima do subconjunto das cepas mutantes e uma réplica biológica de  $\Delta rpfF$  (controle), está mais próxima do subconjunto da cepa WT.

Os resultados sugerem que a cepa WT tem um *footprinting* metabólico aparentemente mais distinto em comparação com as cepas mutantes de *X. fastidiosa* e também parece ser a cepa que sofreu mais influência no cultivo *in vitro* na interação com o sobrenadante de *B. phytofirmans*.

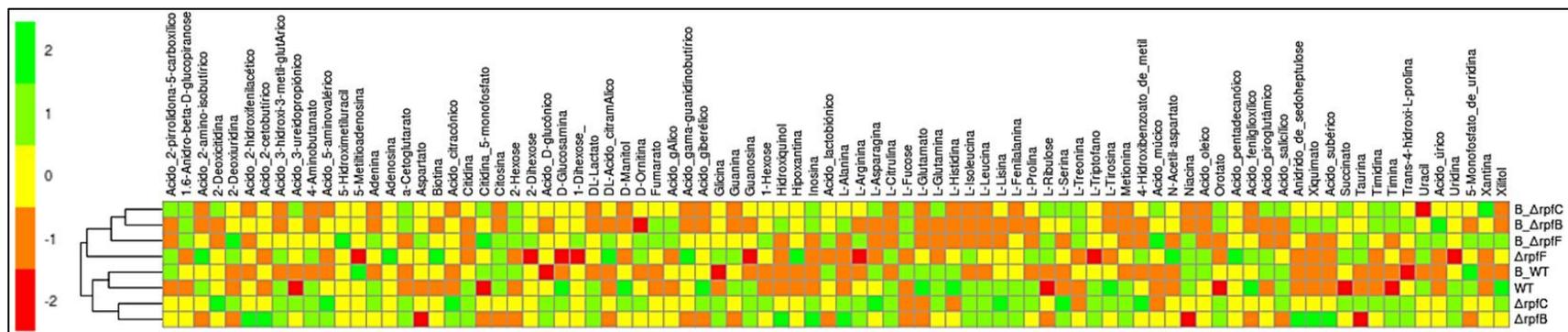


**Figura 19. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) do exometaboloma de *X. fastidiosa* em resposta a adição do sobrenadante de *B. phytofirmans*.** As cepas Temecula1,  $\Delta rpfF$ ,  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$  foram cultivadas em meio PD3 por 7 dias sem (triângulos) ou com (quadrados) o suplemento de 20% de sobrenadante de *B. phytofirmans* PsJN cultivada em meio PD3 por 1 dia (círculos). Os símbolos representam três medições com 86 metabólitos identificados para cada amostra. As molduras em preto e vermelho indicam os grupos *X. fastidiosa* e *B. phytofirmans*, respectivamente. Três réplicas de cada experimento foram analisadas.

Os resultados da composição dos exometabolomas foram também utilizados para confecção de um *heatmap* (Figura 20) no qual um cladograma aponta proximidades, apenas das cepas de *Xylella fastidiosa*, dos seus respectivos tratamentos, em função da variação de abundância relativa dos compostos identificados. O cladograma do *heatmap* mostra que as cepas foram ordenadas em dois grupos, sendo um deles o que contém os exometabolomas das cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  (tratamento), tendo a cepa  $\Delta rpfF$  (controle) como um “grupo externo” (*outgroup*) neste clado. O outro clado observado no *heatmap* tem-se dois subgrupos, sendo um o da cepa WT (controle e tratamento) e o outro o das cepas mutantes  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$  (ambas na condição controle).

Dentre os L-aminoácidos detectados nos exometabolomas, 13 são, em grande parte, os compostos que indicam diferenças na variação do padrão de abundância de metabólitos entre as cepas e condições de cultivo. Os L-aminoácidos estão escassos nos exometabolomas das cepas submetidas a tratamento de 20% de sobrenadante de *B. phytofirmans* e mais abundantes na condição controle. A maior escassez dos aminoácidos no exometaboloma pode indicar a ativação da síntese proteica e da multiplicação celular, em resposta a ação de algum composto no sobrenadante de *B. phytofirmans*. Experimentos para averiguar o efeito do sobrenadante de *B. phytofirmans* na formação do biofilme e no crescimento das cepas mutantes ainda não foram realizados, mas são importantes para um melhor entendimento da interação *X. fastidiosa* com *B. phytofirmans*.

Os resultados mostram que os exometabolomas dos mutantes  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$  são bem similares entre si na condição controle e também são similares entre si na condição tratamento. Por sua vez, a cepa mutante  $\Delta rpfF$  (controle), possui diferenças marcantes no seu exometaboloma, que a separa das demais cepas mutantes,  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$ , e, principalmente da cepa selvagem de *X. fastidiosa*. Desta forma, a cepa  $\Delta rpfF$  é uma candidata a estudos posteriores do seu exometaboloma.



**Figura 20. Heatmap** representando a abundância de metabólitos nos exometabolomas das cepas de *X. fastidiosa* em resposta a adição do sobrenadante de *B. phytofirmans*. Cada um dos 86 compostos presentes nas cepas estudadas está indicado nas colunas enquanto que as cepas e seus respectivos tratamentos estão indicadas nas linhas. O gráfico foi gerado através da plataforma R, módulo *pheatmap*, e cada composto foi normalizado de forma que a média dos valores correspondesse a zero e o desvio padrão a 1. O agrupamento visualiza a abundância dos metabólitos em cada uma das amostras, variando de alta (verde), média (amarela) a baixa (vermelha). Três réplicas biológicas de cada experimento foram analisadas.

#### 4.3.4. Efeito do sobrenadante de *B. phytofirmans* no perfil de abundância de metabólitos do exometaboloma de *X. fastidiosa*

A fim de facilitar a comparação de compostos identificados no exometaboloma e que são sintetizados<sup>1</sup> pelas diferentes cepas de *X. fastidiosa* realizamos uma análise de abundância diferencial (*fold change*). A Figura 21 mostra 20 dos compostos mais escassos ou mais abundantes nas cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  em relação à cepa selvagem no cultivo por 7 dias no meio PD3 (controle, Figura 21A) ou no cultivo por 7 dias no meio PD3 suplementado com 20% do sobrenadante da cultura de *B. phytofirmans* (tratamento, Figura 21B). Cabe ressaltar que embora os compostos dessas análises tenham sido preliminarmente confirmados pela comparação com uma biblioteca de padrões sintéticos (conforme descrito no item 3.14) análises futuras de espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) serão realizadas.

Entre os 20 compostos detectados com maior diferença na abundância na condição controle, estão os metabólitos de vias redutoras (casos de fumarato, orotato,  $\alpha$ -cetoglutarato, xiquimato e hidroxiquinol), que estão bem mais abundantes em todas as três cepas mutantes  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  comparados com a cepa selvagem. É, de certa forma, plausível que os níveis destes metabólitos de vias redutoras estejam alterados e/ou acumulados nas cepas mutantes  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$ , uma vez que podem ser subprodutos de vias metabólicas relacionadas a maior taxa de crescimento e multiplicação. Nesse sentido, sabe-se que a cepa  $\Delta rpfF$  é capaz de se espalhar mais no interior dos vasos do xilema, desencadeando uma infecção mais sistêmica do que a cepa selvagem, sugerindo assim que tenha uma maior taxa de crescimento (Newman *et al.*, 2004). A cepa  $\Delta rpfB$ , por sua vez, apesar de ter sua transmissibilidade para o inseto afetada, não apresenta uma diferença significativa de outros aspectos do seu fenótipo na planta em comparação com a cepa selvagem (Almeida *et al.*, 2012). Por outro lado, o mutante  $\Delta rpfC$  forma mais biofilme, num fenótipo de caráter mais agregativo, menos virulento (Chatterjee *et al.*, 2008c), um fenótipo altamente contrastante com o fenótipo da cepa Fb7, que é um mutante natural do gene *rpfC*, e que possui como características pouca ou nenhuma formação de biofilme (ver item 4.2).

Como visto no item 4.1.3, o gene PD0399 (*carB*) que codifica a enzima carbamoil fosfato sintetase está mais expresso no mutante  $\Delta rpfF$ , em relação à cepa selvagem. Embora os dados da literatura indiquem que esta enzima participaria do processo de degradação rápida de DSF (Newman *et al.*, 2008), sua principal função descrita permanece atrelada ao metabolismo de

---

<sup>1</sup> Compostos que são degradados por *X. fastidiosa* foram omitidos dessa análise.

pirimidinas (uniprot.org e kegg.jp). O orotato, um intermediário desta mesma via de metabolismo de pirimidinas, está mais abundante na cepa  $\Delta rpfF$  do que na cepa selvagem. Desta forma, inferimos que o aumento da abundância de orotato verificada em nossas análises do exometaboloma para o mutante  $\Delta rpfF$  em relação à cepa selvagem, pode ser indiretamente relacionada com a maior expressão de PD0399 (*carB*) verificada também no mutante  $\Delta rpfF$  em relação à cepa selvagem (Baker *et al.*, 1996). O aumento ainda mais significativo de orotato nas demais cepas  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$  carece de estudos, que devem ser realizados posteriormente, sobre a expressão gênica nesses mutantes.

Na condição tratamento (onde as cepas foram cultivadas em meio PD3 suplementado com 20 % de sobrenadante de cultura de *B. phytofirmans*) os metabólitos fumarato,  $\alpha$ -cetoglutarato, ácido subérico, xiquimato e também o ácido mícico (derivado de carboidratos, entre eles a galactose), encontram-se mais abundantes nas cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  do que na cepa selvagem, porém em menor grau do que verificado na condição controle. Exometabolomas descritos na literatura têm demonstrado que bactérias e outros microrganismos interagem de forma dinâmica com o meio ambiente, sendo influenciados e influenciando sua composição. De maneira que essa influência mútua afeta a expressão de genes bacterianos, a síntese proteica, a absorção e produção de metabólitos (Romano *et al.*, 2014).

Os compostos mais abundantes na cepa selvagem (WT) em relação aos mutantes  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  em ambas as condições são nucleotídeos e derivados de nucleotídeos (monofosfato de uridina, guanina, citosina e 2-desoxicitidina), aminoácidos e derivados (L-glutamato, L-histidina e ácido gama guanidinobutírico) e um hormônio (ácido giberélico). Outros compostos como niacina, 2-desoxicitidina, ácido 2-amino-isobutírico, ácido lactobiônico, D-glucosamina e ácido fenilglioxílico estão mais abundantes em apenas uma das condições, controle ou tratamento.

Alguns intermediários das vias de síntese de ácidos nucleicos, como inosina, timidina e timina, estão mais abundantes nos exometabolomas das cepas mutantes  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  do que na cepa selvagem. Por outro lado, estão mais abundantes no sobrenadante da cepa selvagem do que nas cepas mutantes,  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$ , os derivados e intermediários de ácidos nucleicos: guanina, citosina, 2-desoxicitidina e 5-monofosfato de uridina. O aumento da síntese de ácidos nucleicos está intimamente relacionado com seu uso na replicação celular e síntese proteica (Yoshioka e Newell, 2016). Entretanto, o acúmulo de nucleotídeos em sobrenadantes de bactérias Gram-negativas já foi relacionado também com uso destas moléculas como precursores de componentes da parede celular (Lilly *et al.*, 1963).

Entre as cepas mutantes,  $\Delta rpfF$  possui o perfil de abundância de derivados de ácidos nucleicos mais similar ao da cepa selvagem (com exceção dos nucleosídeos 2-desoxicitidina e 2-desoxiuridina, mais abundante e mais escasso, respectivamente, na cepa  $\Delta rpfF$ ). Na sequência deste trabalho maiores estudos serão necessários a fim de relacionar o perfil de abundância de bases nitrogenadas, nucleosídeos e nucleotídeos no mutante  $\Delta rpfF$  com as evidências reportadas na literatura de que apresenta maior taxa de multiplicação e tem maior capacidade de se disseminar dentro dos vasos do xilema do que a cepa selvagem (Newman *et al.*, 2004), como já mencionado.

Os metabólitos secundários xiquimato (intermediário de vias de síntese de aminoácidos) e ácido subérico (um ácido dicarboxílico), que possuem potencial ação antibiótica, podem ter suas vias de síntese influenciadas tanto pela quantidade quanto pela proporção de moléculas da família DSF, pois parecem estar sob forte modulação do gene *rpfB* (Almeida *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2015; Golebiowski *et al.*, 2015; Ionescu *et al.*, 2016). Xiquimato e ácido subérico foram também detectados em maiores quantidades no exometaboloma do mutante  $\Delta rpfC$  em relação à cepa WT, mas os níveis desses dois compostos não sofreram alterações significantes no mutante  $\Delta rpfF$  em comparação com a cepa selvagem (WT) em ambas as condições, controle e tratamento.

Foram detectados 3 aminoácidos (aspartato, L-histidina e L-glutamato) e 3 derivados de aminoácidos (n-acetil-aspartato, ácido guanidino-butírico e ácido 2-amino-isobutírico) entre os compostos mais abundantes ou mais escassos na cepa selvagem em comparação com os mutantes  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$ ,  $\Delta rpfF$ . O aminoácido aspartato está mais abundante apenas nos exometaboloma das cepas mutantes  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  em comparação com a cepa selvagem. Por sua vez, os aminoácidos L-histidina e L-glutamato estão mais abundantes na cepa selvagem em comparação com os mutantes,  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$ ,  $\Delta rpfF$ , nas condições controle e tratamento com o sobrenadante de *B. phytofirmans*. A liberação de compostos metabólicos, como nucleotídeos, amino ácidos e seus derivados para o meio tem sido descrita no exometaboloma de outras bactérias e fungos (Behrends *et al.*, 2009; Paczia *et al.*, 2012). Essa liberação vem sendo apontada como fruto de “excesso de fluxo metabólico”, onde condições como excesso de carbono ou fonte de energia e até mesmo limitações nutricionais são “gatilhos” para que diferentes intermediários de vias metabólicas sejam secretados pelas células (Krämer, 1994; Romano *et al.*, 2014).

O ácido  $\alpha$ -amino-isobutírico (AIB) foi um dos metabólitos secundários detectados. Trata-se de um aminoácido não proteínogênico, constituinte de alguns peptídeos com ação anti-

microbiana (Keating *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2002; Masschelein *et al.*, 2017). Está mais abundante na cepa selvagem do que nas três cepas mutantes ( $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$ ), é interessante e pode refletir uma estratégia de sobrevivência de *X. fastidiosa* nos ambientes que habita.

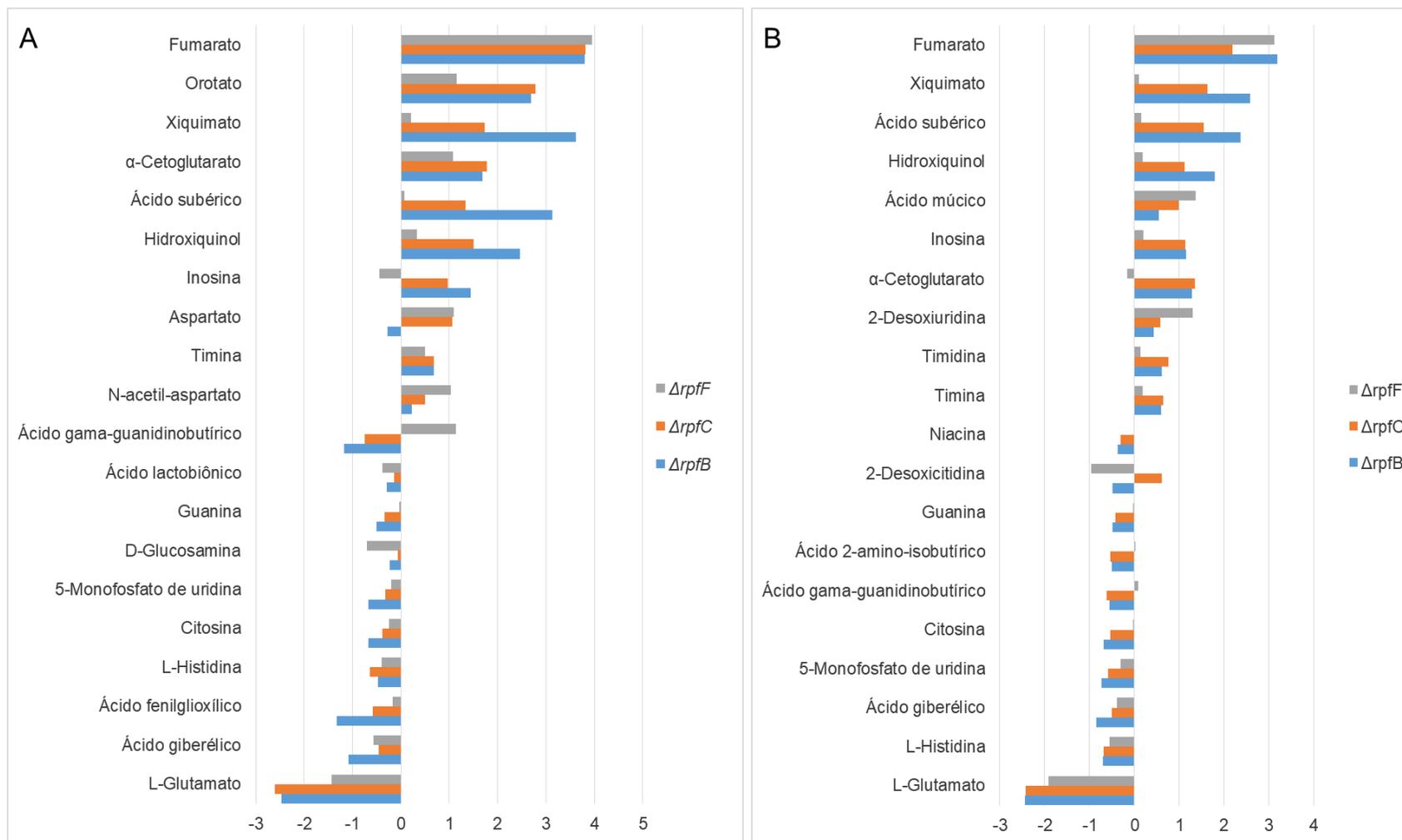
*X. fastidiosa*, apesar de ser um fitopatógeno com um conjunto otimizado de genes para habitar o ambiente restrito que é o xilema, tem revelado a capacidade de produzir efetores que contribuem para a sua competição com outros microorganismos, bem como para lidar com a planta hospedeira (Zaini *et al.*, 2008; Duarte, 2012). Entretanto, nossas análises indicam que a produção de AIB, se é que este aminoácido tem relação com síntese de peptídeos antimicrobianos em *X. fastidiosa*, não sofreu alteração em função das condições controle e tratamento, estando sempre abundante nos sobrenadantes das cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  em relação à cepa selvagem.

O composto fenilglioxilato (benzoilformato), que foi descrito em único estudo como agente antibacteriano tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas, aparece mais abundante nos mutantes na condição controle (Obafemi *et al.*, 2012).

Finalmente, o ácido giberélico aparece mais abundante na cepa selvagem em comparação com as cepas mutantes nas condições controle e tratamento (quando cultivados no meio suplementado com o sobrenadante de *B. phytofirmans*). Este composto é um hormônio de crescimento de plantas que também é sintetizado por certas bactérias e fungos (Hedden e Sponsel, 2015; Nett *et al.*, 2017). Vale destacar que o ácido giberélico foi detectado nos sobrenadantes de *B. phytofirmans* e *X. fastidiosa* cultivadas em meio PD3 (por 1 dia ou 7 dias, respectivamente), mas parece ser sintetizado apenas por *X. fastidiosa* (Apêndice 4). Por outro lado, embora uma cepa do gênero *Burkholderia* já tenha sido descrita como capaz de sintetizar esse hormônio (Joo *et al.*, 2009), não encontramos evidência na literatura para sua síntese por *X. fastidiosa*. Ainda assim, detectamos que em *X. fastidiosa* o ácido giberélico está até 2 vezes mais abundante na cepa selvagem do que nas cepas mutantes,  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$ . Deste modo, é possível que *X. fastidiosa* utilize-se deste efector como um mecanismo de virulência, uma vez que, a literatura indica que a indução do crescimento da planta, em fases iniciais da colonização, pelo fitopatógeno pode contribuir para o seu estabelecimento efetivo, impedindo que a planta possa desencadear mecanismos de imunidade (Jones e Dangl, 2006). Esse intrigante resultado requer confirmação, e novos experimentos são necessários para investigar se *X. fastidiosa* sintetiza ácido giberélico.

Entre os compostos mais abundantes ou mais escassos, 14 se repetem nas condições controle e tratamento (L-glutamato, ácido giberélico, L-histidina, citosina, 5-monofosfato de

uridina, guanina, ácido gama-guanidinobutírico, timina, inosina, hidroxiquinol, ácido subérico,  $\alpha$ -cetogluturato, xiquimato e fumarato), permitindo avaliar a influência do sobrenadante de *B. phytofirmans* sobre as diferentes cepas de *X. fastidiosa*. Vale salientar que eventualmente o sobrenadante de *B. phytofirmans* possui o papel apenas de “diluir” as concentrações de compostos já presentes no meio de cultivo PD3, mas que também são sintetizados pelas cepas de *X. fastidiosa* (Apêndice 4). Dessa forma, nos parece que o sobrenadante de *B. phytofirmans* parece provocar, via de regra, a diminuição geral dos compostos nas cepas mutantes ao invés de contribuir para o acúmulo de compostos específicos. Então, ainda que o perfil do biofilme das culturas *in vitro* das cepas selvagem (WT) e mutantes ( $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$ ,  $\Delta rpfF$ ) de *X. fastidiosa* seja drasticamente alterado após a adição do sobrenadante do cultivo de *B. phytofirmans* (percebido de forma preliminar pelo visual do cultivo *in vitro* das cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$ ,  $\Delta rpfF$  e WT e medido por cristal violeta para a cepa WT), não há indícios claros que os metabólitos identificados em nossas análises sejam marcadores dessas alterações. Mesmo assim, a obtenção do exometaboloma, mostrou-se útil para a identificação de mudanças sutis entre estas cepas de *X. fastidiosa* e contribui para a caracterização de mais um aspecto relacionado aos seus fenótipos, além dos já descritos na literatura (Newman *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2008c; Almeida *et al.*, 2012).



**Figura 21. Análise diferencial da abundância de metabólitos do exometaboloma das cepas de *X. fastidiosa* na condição controle e em resposta à adição do sobrenadante de *B. phytofirmans*. Os níveis de metabólitos das cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  foi comparado em relação a cepa WT (selvagem), cultivadas em meio PD3 por 7 dias sem adição (A) ou com adição (B) de 20 % de sobrenadante da cultura de *B. phytofirmans*. As razões de abundância foram convertidas em  $\log_2$ . Três réplicas biológicas de cada experimento foram analisadas.**

## 5. Conclusões

Nossos resultados indicam, por ensaios de *live and dead* e UFC, que não há diferenças significantes de viabilidade entre as cepas WT e  $\Delta rpfF$  de Temecula1 no cultivo em meio PIM6 após 3 dias, como ocorre no cultivo em meio PWG. O que permite, então, comparações adequadas em análises de expressão gênica nessas condições de cultivo.

Detectamos um maior número de genes na faixa de 1.000 a 10.000 FPKM no transcrito da cepa  $\Delta rpfF$  (50 genes), em relação à cepa WT (25 genes), porém a análise comparativa dos transcritomas das cepas WT e  $\Delta rpfF$  revelou apenas 20 genes com expressão diferencial significativa ( $p < 0,1$ ). Os genes detectados como diferencialmente expressos em nosso estudo não coincidem com o que está descrito na literatura, e em alguns casos os resultados são exatamente o oposto. Entre os transcritos mais abundantes estão aqueles que codificam proteínas preditas como secretadas (possuem peptídeo sinal) ou de membrana. Entre estas estão colicina V (PD0215), OmpW, OmpA, lipases/esterases e proteases. Mesmo no cultivo *in vitro*, *X. fastidiosa* continua a produzir, além de determinantes de virulência, toxinas que, supostamente, tem papel de controlar populações bacterianas de outras cepas de *X. fastidiosa* e/ou de outras espécies endofíticas no xilema. Também, entre os 50 transcritos mais abundantes está o que codifica a proteína Omp1X/Ax21 (PD1063), presente em vesículas de membrana externa, e que é relacionada à agregação celular.

As análises de proteômica shotgun em LC-MS/MS do sobrenadante concentrado de culturas das cepas selvagem (WT) e mutante ( $\Delta rpfF$ ) de *X. fastidiosa*, identificaram um total de 409 proteínas (261 compartilhadas) e ampliaram o conjunto descrito de proteínas do secretoma deste fitopatógeno, incluindo um conjunto razoável de proteínas, entre as 50 mais expressas, sem predição de secreção celular, sendo 14 proteínas na cepa selvagem e 20 proteínas na cepa mutante,  $\Delta rpfF$ .

Embora a proteômica do secretoma (exoproteoma) empregada não tenha sido uma análise quantitativa, esta razoavelmente validou alguns dos dados obtidos pelos resultados da análise de expressão diferencial do transcrito, como acontece no caso da proteína expressa pelo gene PD0399 (CarB, Carbamoil-fosfato sintase). *carB* é mais expresso na cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ), em comparação à cepa selvagem (WT) e a proteína CarB foi detectada no proteoma da cepa mutante ( $\Delta rpfF$ ), mas não foi detectada no secretoma da cepa selvagem (WT).

Nossos experimentos indicaram que há uma maior produção de OMVs pela cepa Fb7 em até 57% comparados aos valores obtidos para as cepas 9a5c e Temecula1.

A análise do proteoma das OMVs produzidas pelas cepas de citros, Fb7 e 9a5c, e de videira, Temecula1, identificou um total de 202 proteínas distintas ampliando consideravelmente o número de proteínas secretadas por meio de OMVs descrito até então para *X. fastidiosa*. Sendo 79%, 72% e 65% a proporção de proteínas preditas computacionalmente como secretadas no proteoma das OMVs das cepas Fb7, 9a5c e Temecula1, respectivamente. Sessenta e sete proteínas são compartilhadas entre os proteomas das OMVs das 3 cepas, e, como esperado, as OMVs de 9a5c e Fb7 (cepas de citros) têm composição mais semelhante entre si (compartilham 33 proteínas) do que com as OMVs de 9a5c e Temecula1 que compartilham 9 proteínas ou de Fb7 com Temecula1 onde há compartilhamento de 19 proteínas.

*X. fastidiosa* utiliza suas OMVs como um sistema de secreção (T0SS). As OMVs de *X. fastidiosa* são altamente enriquecidas com proteínas de membrana externa, como o marcador de OMVs, a adesina XadA1, a adesina afimbrial, XadA3, além de várias proteínas de membrana externa, como OmpW, TolC, TonB-dependent receptor, OmpA, TolB, Bam, porinas e lipoproteínas, detectadas nas preparações de OMVs das três cepas. As OMVs das 3 cepas também contêm várias hidrolases (lipases/esterases, proteases e peptidases). As lipases/esterases LesA (PD1702/XF0357) e LesB (PD1703/XF0358) estão entre as proteínas mais abundantes nas OMVs das cepas Temecula1 e Fb7. A enzima *L-ascorbate oxidase* (XF2677/PD2039), que pode atuar na depleção do ascorbato produzido pelo hospedeiro vegetal, é comum às OMVs das cepas Fb7 e Temecula. A proteína XF0119/PD0090, com um domínio que é similar ao de pectina liases, foi identificada nas OMVs das 3 cepas e pode atuar como um fator de virulência na degradação de parede celular e, portanto, é uma boa candidata para estudos posteriores.

O metaboloma das OMVs foi analisado e 275 compostos das OMVs das cepas 9a5c, Temecula1 e Fb7 tiveram suas massas resolvidas. Nesta análise detectamos e confirmamos a provável identidade, pela análise comparativa com padrões sintéticos, dos seguintes compostos: ácido 12-metil-tetradecenoico (CVC-DSF), ácido hexadecenoico (XfDSF2) e ácido octadecenoico. Desta forma, descrevemos, pela primeira vez, uma função adicional, mas não menos importante, para as OMVs, evidenciada pela análise metabolômica, que é a de transportar compostos da família DSF. Também, uma vez que as OMVs de *X. fastidiosa* carregam DSF propomos um modelo para sua formação em que um desbalanço na produção de DSF interferiria no formato da membrana externa levando a produção de um maior número de OMVs. A premissa que embasa este modelo é que a cepa Fb7 produz excesso DSF em contraste com  $\Delta rpfF$  que não produz. Em ambos os casos haveria um desbalanço na concentração dessas moléculas

eventualmente inseridas na membrana externa de *X. fastidiosa*, resultando em uma maior produção de OMVs, o que é observado tanto para Fb7 como  $\Delta rpfF$ .

Concluimos com razoável segurança que, em meio PD3, a cepa Temecula1 (WT) produz *XfDSF1* e *XfDSF2*,  $\Delta rpfB$  produz, pelo menos, *XfDSF1* e  $\Delta rpfC$  produz apenas *XfDSF2*. A cepa  $\Delta rpfF$  não produz *XfDSF1* e seu sobrenadante exibe apenas traços de *XfDSF2*.

Através de nossos experimentos confirmamos que o sobrenadante de *B. phytofirmans* possui um composto de natureza apolar que induz a formação de biofilme em *X. fastidiosa*, contudo ainda não foi possível decifrar a natureza química deste composto.

A cepa mutante  $\Delta rpfF$  possui diferenças marcantes em seu exometaboloma, separando-a drasticamente das demais cepas mutantes,  $\Delta rpfB$  e  $\Delta rpfC$  e, principalmente, selvagem (WT) de *X. fastidiosa*, a qual deve ser melhor estudada futuramente. Entre os metabólitos com diferenças de abundância destacamos o orotato, um intermediário da via de metabolismo de pirimidinas, mais abundante nas cepas  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  do que na cepa selvagem. Particularmente em  $\Delta rpfF$ , o aumento da abundância de orotato em relação à cepa selvagem, pode ser indiretamente relacionado com a maior expressão de PD0399 (*carB*) no mutante  $\Delta rpfF$  em relação à cepa selvagem. O gene PD0399 (*carB*) codifica a enzima carbamoil fosfato sintetase que atua no metabolismo de pirimidinas.

A obtenção do exometaboloma, mostrou-se útil para a identificação de mudanças ainda que sutis entre as cepas WT,  $\Delta rpfB$ ,  $\Delta rpfC$  e  $\Delta rpfF$  de *X. fastidiosa* e contribui para a caracterização de mais um aspecto relacionado aos seus fenótipos, além dos já descritos na literatura.

Em resumo, nesta tese, reportamos, pela primeira vez, a utilização conjunta de diferentes técnicas ômicas (transcritômica, proteômica e metabolômica) para o estudo de proteínas e metabólitos secretados por *X. fastidiosa*. Esta abordagem holística permitiu identificar conjuntos de genes e proteínas bem como vias metabólicas potencialmente relevantes para a virulência e adaptação desta fitobactéria.

## Referências bibliográficas

1. **Abby, S. S., Cury, J., Guglielmini, J., Neron, B., Touchon, M. e Rocha, E. P.** 2016. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep* 6:23080.
2. **Aebersold, R. e Mann, M.** 2016. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537:347-55.
3. **Ahern, S. J., Das, M., Bhowmick, T. S., Young, R. e Gonzalez, C. F.** 2014. Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *J Bacteriol* 196:459-71.
4. **Akram, N. A., Shafiq, F. e Ashraf, M.** 2017. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Front Plant Sci* 8:613.
5. **Alencar, V. C., Barbosa, D., Santos, D. S., Oliveira, A. C., de Oliveira, R. C. e Nunes, L. R.** 2014. Genomic Sequencing of Two Coffee-Infecting Strains of *Xylella fastidiosa* Isolated from Brazil. *Genome Announc* 2.
6. **Allen, J., Davey, H. M., Broadhurst, D., Heald, J. K., Rowland, J. J., Oliver, S. G. e Kell, D. B.** 2003. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol* 21:692-696.
7. **Allwood, J. W., Erban, A., de Koning, S., Dunn, W. B., Luedemann, A., Lommen, A., Kay, L., Loscher, R., Kopka, J. e Goodacre, R.** 2009. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography-electron impact-time of flight mass spectrometry (GC-EI-TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics* 5:479-496.
8. **Almeida, R. P., Killiny, N., Newman, K. L., Chatterjee, S., Ionescu, M. e Lindow, S. E.** 2012. Contribution of *rpfB* to cell-to-cell signal synthesis, virulence, and vector transmission of *Xylella fastidiosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:453-62.
9. **Almeida, R. P., Nascimento, F. E., Chau, J., Prado, S. S., Tsai, C. W., Lopes, S. A. e Lopes, J. R.** 2008. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Appl Environ Microbiol* 74:3690-701.
10. **Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S. e Purcell, A. H.** 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America* 98:775-786.
11. **Alves, E., Kitajima, E. W. e Leite, B.** 2003. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 151:500-506.
12. **Andrews, S.** 2010, posting date. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [Online.]
13. **Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W. e Azevedo, J. L.** 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol* 68:4906-14.
14. **Armengaud, J. e Dupont, C.** 2017. Exoproteomics of Pathogens: Analysis of Toxins and Other Virulence Factors by Proteomics. *Proteomics in Biology, Pt B* 586:211-227.
15. **Azevedo, J. L., Araujo, W. L. e Lacava, P. T.** 2016. The diversity of citrus endophytic bacteria and their interactions with *Xylella fastidiosa* and host plants. *Genetics and Molecular Biology* 39:476-491.
16. **Baccari, C., Killiny, N., Ionescu, M., Almeida, R. P. e Lindow, S. E.** 2014. Diffusible signal factor-repressed extracellular traits enable attachment of *Xylella fastidiosa* to insect vectors and transmission. *Phytopathology* 104:27-33.

17. **Backus, E. A., Shugart, H. J., Rogers, E. E., Morgan, J. K. e Shatters, R.** 2015. Direct Evidence of Egestion and Salivation of *Xylella fastidiosa* Suggests Sharpshooters Can Be "Flying Syringes". *Phytopathology* 105:608-20.
18. **Bai, J., Wu, Y., Liu, X., Zhong, K., Huang, Y. e Gao, H.** 2015. Antibacterial Activity of Shikimic Acid from Pine Needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus* through Damage to Cell Membrane. *Int J Mol Sci* 16:27145-55.
19. **Baker, K. E., Ditullio, K. P., Neuhard, J. e Klein, R. A.** 1996. Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by *dctA*. *Journal of Bacteriology* 178:7099-7105.
20. **Balsalobre, C., Silvan, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E. e Wai, S. N.** 2006. Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 59:99-112.
21. **Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. e Daniels, M. J.** 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* 24:555-66.
22. **Beaulieu, E. D., Ionescu, M., Chatterjee, S., Yokota, K., Trauner, D. e Lindow, S.** 2013. Characterization of a diffusible signaling factor from *Xylella fastidiosa*. *MBio* 4:e00539-12.
23. **Behrends, V., Ebbels, T. M., Williams, H. D. e Bundy, J. G.** 2009. Time-resolved metabolic footprinting for nonlinear modeling of bacterial substrate utilization. *Appl Environ Microbiol* 75:2453-63.
24. **Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J. et al.** 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11105-10.
25. **Beltran-Garcia, M. J., White, J. F., Jr., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S., Kato, M. J., Medeiros, M. H. e Di Mascio, P.** 2014. Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria. *Scientific Reports* 4:6938.
26. **Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausboll, A. e Brunak, S.** 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *Bmc Microbiology* 5.
27. **Beveridge, T. J.** 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 181:4725-4733.
28. **Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Ivanova, N., D'Souza, M., Bernal, A. et al.** 2002. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12403-8.
29. **Bi, H. K., Yu, Y. H., Dong, H. J., Wang, H. H. e Cronan, J. E.** 2014. *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase. *Molecular Microbiology* 93:262-275.
30. **Blum, H., Gross, H. J. e Beier, H.** 1989. The expression of the TMV-specific 30-kDa protein in tobacco protoplasts is strongly and selectively enhanced by actinomycin. *Virology* 169:51-61.
31. **Bomberger, J. M., Maceachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O'Toole, G. A. e Stanton, B. A.** 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS pathogens* 5:e1000382.
32. **Boon, C., Deng, Y., Wang, L. H., He, Y., Xu, J. L., Fan, Y., Pan, S. Q. e Zhang, L. H.** 2008. A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *ISME J* 2:27-36.
33. **Bos, M. P., Robert, V. e Tommassen, J.** 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annual Review of Microbiology* 61:191-214.

34. **Bowen, B. P. e Northen, T. R.** 2010. Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. *J Am Soc Mass Spectrom* 21:1471-6.
35. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
36. **Buchanan, S. K., Lukacik, P., Grizot, S., Ghirlando, R., Ali, M. M., Barnard, T. J., Jakes, K. S., Kienker, P. K. e Esser, L.** 2007. Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *Embo J* 26:2594-604.
37. **Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T. et al.** 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10181-6.
38. **Burns, D. L.** 1999. Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* 2:25-9.
39. **Cahill, B. K., Seeley, K. W., Gutel, D. e Ellis, T. N.** 2015. *Klebsiella pneumoniae* O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles. *Microbiological Research* 180:1-10.
40. **Cai, Z., Yuan, Z. H., Zhang, H., Pan, Y., Wu, Y., Tian, X. Q., Wang, F. F., Wang, L. e Qian, W.** 2017. Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence. *PLoS pathogens* 13:e1006304.
41. **Camacho, A. I., de Souza, J., Sanchez-Gomez, S., Pardo-Ros, M., Irache, J. M. e Gamazo, C.** 2011. Mucosal immunization with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice. *Vaccine* 29:8222-9.
42. **Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R. e Grutter, M. G.** 2006. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and infection* 8:2284-90.
43. **Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O. e Martelli, G. P.** 2014. Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology* 96:425-429.
44. **Caserta, R., Souza-Neto, R. R., Takita, M. A., Lindow, S. e Souza, A.** 2017. Ectopic expression of *Xylella fastidiosa* rpfF conferring production of diffusible signal factor in transgenic tobacco and citrus alters pathogen behavior and reduces disease severity. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*.
45. **Caserta, R., Takita, M. A., Targon, M. L., Rosselli-Murai, L. K., de Souza, A. P., Peroni, L., Stach-Machado, D. R., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A. e de Souza, A. A.** 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 76:4250-9.
46. **Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. e Bove, J. M.** 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* 27:137-42.
47. **Chatterjee, S., Almeida, R. P. e Lindow, S.** 2008a. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol* 46:243-71.
48. **Chatterjee, S., Killiny, N., Almeida, R. P. e Lindow, S. E.** 2010. Role of Cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* Biofilm Formation, Plant Virulence, and Insect Transmission. *Mol Plant Microbe Interact* 23:1356-63.
49. **Chatterjee, S., Newman, K. L. e Lindow, S. E.** 2008b. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1309-1315.
50. **Chatterjee, S., Wistrom, C. e Lindow, S. E.** 2008c. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2670-5.

51. **Chatterjee, S. N. e Das, J.** 1967. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *Journal of general microbiology* 49:1-11.
52. **Chaves, G. A. T., Zaini, P. A. e Da Silva, A. M.** 2014. Iron as a regulator of virulence in plant pathogenic bacteria. In: *Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria*, p. 263-283. In N. Wang, J. Jones, G. Sundin, F. White, S. Hogenhout, C. Roper, L. De La Fuente eJ. Ham (ed.), *Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
53. **Chen, G.** 2014. Secretion systems of plant pathogenic bacteria, p. 125-148. In N. Wang, J. Jones, G. Sundin, F. White, S. Hogenhout, C. Roper, L. De La Fuente eJ. Ham (ed.), *Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
54. **Chen, J., Civerolo, E., Tubajika, K., Livingston, S. e Higbee, B.** 2008. Hypervariations of a protease-encoding gene, PD0218 (*pspB*), in *Xylella fastidiosa* strains causing almond leaf scorch and Pierce's disease in California. *Appl Environ Microbiol* 74:3652-7.
55. **Chen, J., Huang, H., Chang, C. J. e Stenger, D. C.** 2013. Draft Genome Sequence of *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* Strain Griffin-1 from *Quercus rubra* in Georgia. *Genome announcements* 1.
56. **Chen, J., Wu, F., Zheng, Z., Deng, X., Burbank, L. P. e Stenger, D. C.** 2016a. Draft Genome Sequence of *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* Strain Stag's Leap. *Genome announcements* 4.
57. **Chen, J., Xie, G., Han, S., Chertkov, O., Sims, D. e Civerolo, E. L.** 2010. Whole Genome Sequences of Two *Xylella fastidiosa* Strains (M12 and M23) Causing Almond Leaf Scorch Disease in California. *Journal of Bacteriology* 192:4534-4534.
58. **Chen, Y., Lun, A. T. e Smyth, G. K.** 2016b. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Res* 5:1438.
59. **Choi, D. S., Kim, D. K., Choi, S. J., Lee, J., Choi, J. P., Rho, S., Park, S. H., Kim, Y. K., Hwang, D. e Gho, Y. S.** 2011. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* 11:3424-9.
60. **Chou, F. L., Chou, H. C., Lin, Y. S., Yang, B. Y., Lin, N. T., Weng, S. F. e Tseng, Y. H.** 1997. The *Xanthomonas campestris* *gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem Biophys Res Commun* 233:265-9.
61. **Chumnanpuen, P., Hansen, M. A., Smedsgaard, J. e Nielsen, J.** 2014. Dynamic Metabolic Footprinting Reveals the Key Components of Metabolic Network in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of genomics* 2014:894296.
62. **Ciraulo, M. B., Santos, D. S., Rodrigues, A. C. D. O., de Oliveira, M. V., Rodrigues, T., de Oliveira, R. C. e Nunes, L. R.** 2010. Transcriptome Analysis of the Phytobacterium *Xylella fastidiosa* Growing under Xylem- Based Chemical Conditions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*:-.
63. **Clair, G., Roussi, S., Armengaud, J. e Duport, C.** 2010. Expanding the Known Repertoire of Virulence Factors Produced by *Bacillus cereus* through Early Secretome Profiling in Three Redox Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics* 9:1486-1498.
64. **Colnaghi Simionato, A. V., da Silva, D. S., Lambais, M. R. e Carrilho, E.** 2007. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. *J Mass Spectrom* 42:490-6.
65. **Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczeniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X. G. e Mortazavi, A.** 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 17.

66. **Couto, N., Schooling, S. R., Dutcher, J. R. e Barber, J.** 2015. Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of proteome research* 14:4207-22.
67. **Cursino, L., Athinuwat, D., Patel, K. R., Galvani, C. D., Zaini, P. A., Li, Y., De La Fuente, L., Hoch, H. C., Burr, T. J. e Mowery, P.** 2015. Characterization of the *Xylella fastidiosa* PD1671 gene encoding degenerate c-di-GMP GGDEF/EAL domains, and its role in the development of Pierce's disease. *PLoS ONE* 10:e0121851.
68. **Cursino, L., Galvani, C. D., Athinuwat, D., Zaini, P. A., Li, Y., De La Fuente, L., Hoch, H. C., Burr, T. J. e Mowery, P.** 2011. Identification of an operon, Pil-Chp, that controls twitching motility and virulence in *Xylella fastidiosa*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 24:1198-206.
69. **Cussiol, J. R., Alves, S. V., de Oliveira, M. A. e Netto, L. E.** 2003. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J Biol Chem* 278:11570-8.
70. **da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R. et al.** 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-63.
71. **da Silva Neto, J. F., Koide, T., Abe, C. M., Gomes, S. L. e Marques, M. V.** 2008. Role of sigma54 in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. *Arch Microbiol* 189:249-61.
72. **da Silva Neto, J. F., Koide, T., Gomes, S. L. e Marques, M. V.** 2007. The single extracytoplasmic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. *J Bacteriol* 189:551-60.
73. **da Silva Neto, J. F., Koide, T., Gomes, S. L. e Marques, M. V.** 2010. Global gene expression under nitrogen starvation in *Xylella fastidiosa*: contribution of the sigma54 regulon. *BMC Microbiol* 10:231.
74. **da Silva, V. S., Shida, C. S., Rodrigues, F. B., Ribeiro, D. C., de Souza, A. A., Coletta-Filho, H. D., Machado, M. A., Nunes, L. R. e de Oliveira, R. C.** 2007. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. *BMC Genomics* 8:474.
75. **Dalbey, R. E. e Kuhn, A.** 2000. Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:51-87.
76. **Davies, D. G. e Marques, C. N. H.** 2009. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology* 191:1393-1403.
77. **Davis, M. J., French, W. J. e Schaad, N. W.** 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6:309-314.
78. **Davis, M. J., Purcell, A. H. e Thomson, S. V.** 1980. Isolation Media for the Pierces Disease Bacterium. *Phytopathology* 70:425-429.
79. **de Bruijn, I., Cheng, X., de Jager, V., Exposito, R. G., Watrous, J., Patel, N., Postma, J., Dorrestein, P. C., Kobayashi, D. e Raaijmakers, J. M.** 2015. Comparative genomics and metabolic profiling of the genus *Lysobacter*. *BMC Genomics* 16:991.
80. **De Buck, E., Lammertyn, E. e Anne, J.** 2008. The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends in microbiology* 16:442-53.
81. **de Diego, I., Ksiazek, M., Mizgalska, D., Koneru, L., Golik, P., Szmigielski, B., Nowak, M., Nowakowska, Z., Potempa, B., Houston, J. A., Enghild, J. J., Thogersen, I. B., Gao, J. L., Kwan, A. H., Trewhella, J., Dubin, G., Gomis-Ruth, F. X., Nguyen, K. A. e Potempa, J.** 2016. The outer-membrane export signal of *Porphyromonas gingivalis* type IX secretion system (T9SS) is a conserved C-terminal beta-sandwich domain. *Scientific Reports* 6.

82. **de Souza, A. A., Ionescu, M., Baccari, C., da Silva, A. M. e Lindow, S. E.** 2013. Phenotype Overlap in *Xylella fastidiosa* Is Controlled by the Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Eal in Response to Antibiotic Exposure and Diffusible Signal Factor-Mediated Cell-Cell Signaling. *Applied and Environmental Microbiology* 79:3444-3454.
83. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Caldana, C., Goldman, G. H., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. e Machado, M. A.** 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 16:867-75.
84. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Caldana, C., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. e Machado, M. A.** 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 237:341-53.
85. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Pereira, E. O., Coletta-Filho, H. D. e Machado, M. A.** 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Curr Microbiol* 50:223-8.
86. **Demuyser, L., Jabra-Rizk, M. A. e Van Dijck, P.** 2014. Microbial cell surface proteins and secreted metabolites involved in multispecies biofilms. *Pathogens and disease* 70:219-30.
87. **Deng, Y., Wu, J., Eberl, L. e Zhang, L. H.** 2010. Structural and functional characterization of diffusible signal factor family quorum-sensing signals produced by members of the Burkholderia cepacia complex. *Appl Environ Microbiol* 76:4675-83.
88. **Deng, Y., Wu, J., Yin, W., Li, P., Zhou, J., Chen, S., He, F., Cai, J. e Zhang, L. H.** 2016. Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition. *Environ Microbiol* 18:1534-45.
89. **Devos, S., Van Oudenhove, L., Stremersch, S., Van Putte, W., De Rycke, R., Van Driessche, G., Vitse, J., Raemdonck, K. e Devreese, B.** 2015. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology* 6:298.
90. **Dirix, G., Monsieurs, P., Dombrecht, B., Daniels, R., Marchal, K., Vanderleyden, J. e Michiels, J.** 2004. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides* 25:1425-1440.
91. **Dourado, M. N., Santos, D. S., Nunes, L. R., Costa de Oliveira, R. L., de Oliveira, M. V. e Araujo, W. L.** 2015. Differential gene expression in *Xylella fastidiosa* 9a5c during co-cultivation with the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6. *J Basic Microbiol* 55:1357-66.
92. **Dow, J. M.** 2017. Diffusible signal factor-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. *Journal of Applied Microbiology* 122:2-11.
93. **Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X. e Tang, J. L.** 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10995-1000.
94. **Dow, J. M. e Daniels, M. J.** 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17:263-71.
95. **Dow, J. M., Naughton, L. M., Hollmann, B., An, S. Q. e Ryan, R. P.** 2016. The Diffusible Signal Factor Family of Bacterial Cell-Cell Signals. *Israel Journal of Chemistry* 56:321-329.
96. **Dow, M.** 2008. Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Sci Signal* 1:pe23.
97. **Duarte, R. R. R.** 2012. Predição in silico e caracterização parcial das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa*. Departamento de Bioquímica, University of São Paulo, São Paulo. 85.

98. **Economou, A.** 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiology* 7:315-320.
99. **Eljounaidi, K., Lee, S. K. e Bae, H.** 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases - Review and future prospects. *Biological Control* 103:62-68.
100. **Ellis, E. A., McEachern, G. R., Clark, S. e Cobb, B. G.** 2010a. Ultrastructure of pit membrane dissolution and movement of *Xylella fastidiosa* through pit membranes in petioles of *Vitis vinifera*. *Botany-Botanique* 88:596-600.
101. **Ellis, T. N., Leiman, S. A. e Kuehn, M. J.** 2010b. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect Immun* 78:3822-31.
102. **Farag, M. A., Ryu, C. M., Sumner, L. W. e Pare, P. W.** 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry* 67:2262-8.
103. **Ferreira, R. M., Moreira, L. M., Ferro, J. A., Soares, M. R. R., Laia, M. L., Varani, A. M., de Oliveira, J. C. F. e Ferro, M. I. T.** 2016. Unravelling potential virulence factor candidates in *Xanthomonas citri*. subsp *citri* by secretome analysis. *Peerj* 4.
104. **Fiehn, O.** 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155-171.
105. **Filiatrault, M. J., Stodghill, P. V., Bronstein, P. A., Moll, S., Lindeberg, M., Grills, G., Schweitzer, P., Wang, W., Schroth, G. P., Luo, S., Khrebtukova, I., Yang, Y., Thannhauser, T., Butcher, B. G., Cartinhour, S. e Schneider, D. J.** 2010. Transcriptome analysis of *Pseudomonas syringae* identifies new genes, noncoding RNAs, and antisense activity. *J Bacteriol* 192:2359-72.
106. **Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S. e Salmond, G. P. C.** 2009. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:894-899.
107. **Fogaca, A. C., Zaini, P. A., Wulff, N. A., da Silva, P. I., Fazio, M. A., Miranda, A., Daffre, S. e da Silva, A. M.** 2010. Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett* 306:152-159.
108. **Frommel, M. I., Nowak, J. e Lazarovits, G.** 1991. Growth Enhancement and Developmental Modifications of in Vitro Grown Potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as Affected by a Nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol* 96:928-36.
109. **Gambetta, G. A., Fei, J., Rost, T. L. e Matthews, M. A.** 2007. Leaf scorch symptoms are not correlated with bacterial populations during Pierce's disease. *J Exp Bot* 58:4037-46.
110. **Gene Ontology, C.** 2015. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 43:D1049-56.
111. **Ghosh, P.** 2004a. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 68:771-95.
112. **Ghosh, P.** 2004b. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:771-95.
113. **Giampetruzzi, A., Chiumenti, M., Saponari, M., Donvito, G., Italiano, A., Loconsole, G., Boscia, D., Cariddi, C., Martelli, G. P. e Saldarelli, P.** 2015a. Draft Genome Sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO Strain. *Genome announcements* 3.
114. **Giampetruzzi, A., Loconsole, G., Boscia, D., Calzolari, A., Chiumenti, M., Martelli, G. P., Saldarelli, P., Almeida, R. P. e Saponari, M.** 2015b. Draft Genome Sequence of CO33, a Coffee-Infecting Isolate of *Xylella fastidiosa*. *Genome announcements* 3.

115. **Giampetruzzi, A., Morelli, M., Saponari, M., Loconsole, G., Chiumenti, M., Boscia, D., Savino, V. N., Martelli, G. P. e Saldarelli, P.** 2016. Transcriptome profiling of two olive cultivars in response to infection by the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. *BMC Genomics* 17:475.
116. **Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N. e Strong, R. K.** 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell* 10:1033-1043.
117. **Golebiowski, M., Cerkowniak, M., Urbanek, A., Dawgul, M., Kamysz, W., Bogus, M. I. e Stepnowski, P.** 2015. Identification and antifungal activity of novel organic compounds found in cuticular and internal lipids of medically important flies. *Microbiol Res* 170:213-22.
118. **Gong, B. S., Wang, C., Su, Z. Q., Hong, H. X., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Shi, L. M., Auerbach, S. S., Tong, W. D. e Xu, J.** 2014. Transcriptomic profiling of rat liver samples in a comprehensive study design by RNA-Seq. *Scientific Data* 1.
119. **Goodacre, N. F., Gerloff, D. L. e Uetz, P.** 2013. Protein domains of unknown function are essential in bacteria. *MBio* 5:e00744-13.
120. **Gottig, N., Garavaglia, B. S., Garofalo, C. G., Orellano, E. G. e Ottado, J.** 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4:e4358.
121. **Gouran, H., Gillespie, H., Nascimento, R., Chakraborty, S., Zaini, P. A., Jacobson, A., Phinney, B. S., Dolan, D., Durbin-Johnson, B. P., Antonova, E. S., Lindow, S. E., Mellema, M. S., Goulart, L. R. e Dandekar, A. M.** 2016. The Secreted Protease PrtA Controls Cell Growth, Biofilm Formation and Pathogenicity in *Xylella fastidiosa*. *Sci Rep* 6:31098.
122. **Gower, J. C.** 1966. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. *Biometrika* 53:325-&.
123. **Gray, D. J., Li, Z. T. e Jayasankar, S.** 2005. Tissue-specific expression of lytic peptides in transgenic grapevines via use of a NPTII/GFP fusion marker. *Proceedings of the Second International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species*:125-130.
124. **Green, E. R. e Meccas, J.** 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology spectrum* 4.
125. **Grenier, D. e Mayrand, D.** 1987. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 55:111-7.
126. **Guan, W., Shao, J., Davis, R. E., Zhao, T. e Huang, Q.** 2014a. Genome Sequence of a *Xylella fastidiosa* Strain Causing Sycamore Leaf Scorch Disease in Virginia. *Genome announcements* 2.
127. **Guan, W., Shao, J., Zhao, T. e Huang, Q.** 2014b. Genome Sequence of a *Xylella fastidiosa* Strain Causing Mulberry Leaf Scorch Disease in Maryland. *Genome announcements* 2.
128. **Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A. e Castro-Escarpulli, G.** 2017. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* 18:425-432.
129. **Guilhabert, M. R. e Kirkpatrick, B. C.** 2005. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 18:856-68.
130. **Guo, Y., Zhang, Y., Li, J. L. e Wang, N.** 2012. Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 25:165-79.

131. **Gupta, R., Lee, S. E., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Park, S., Wang, Y. M. e Kim, S. T.** 2015. Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory. *Frontiers in Plant Science* 6.
132. **Harlow, E. e Lane, D.** 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
133. **Hathout, Y.** 2007. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert review of proteomics* 4:239-48.
134. **He, Y. W., Ng, A. Y., Xu, M., Lin, K., Wang, L. H., Dong, Y. H. e Zhang, L. H.** 2007. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Molecular Microbiology* 64:281-92.
135. **He, Y. W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J. M. e Zhang, L. H.** 2006. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *J Biol Chem* 281:33414-21.
136. **He, Y. W., Wu, J., Cha, J. S. e Zhang, L. H.** 2010. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiol* 10:187.
137. **Hedden, P. e Sponsel, V.** 2015. A Century of Gibberellin Research. *Journal of Plant Growth Regulation* 34:740-760.
138. **Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. e Ala'Aldeen, D.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:692-+.
139. **Hok, S., Attard, A. e Keller, H.** 2010. Getting the most from the host: how pathogens force plants to cooperate in disease. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 23:1253-9.
140. **Hopkins, D. L.** 1989. *Xylella fastidiosa* - Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. *Annual Review of Phytopathology* 27:271-290.
141. **Hopkins, D. L.** 2005. Biological control of Pierce's disease in the vineyard with strains of *Xylella fastidiosa* benign to grapevine. *Plant Disease* 89:1348-1352.
142. **Hopkins, D. L. e Purcell, A. H.** 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* 86:1056-1066.
143. **Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G. e Shevchik, V. E.** 2014. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports* 6:427-440.
144. **Ionescu, M., Baccari, C., Da Silva, A. M., Garcia, A., Yokota, K. e Lindow, S. E.** 2013. Diffusible signal factor (DSF) synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multifunction protein also required for response to DSF. *J Bacteriol* 195:5273-84.
145. **Ionescu, M., Yokota, K., Antonova, E., Garcia, A., Beaulieu, E., Hayes, T., Iavarone, A. T. e Lindow, S. E.** 2016. Promiscuous Diffusible Signal Factor Production and Responsiveness of the *Xylella fastidiosa* Rpf System. *MBio* 7.
146. **Ionescu, M., Zaini, P. A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A. M. e Lindow, S. E.** 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:E3910-8.
147. **Iwobi, A., Heesemann, J., Garcia, E., Igwe, E., Noelting, C. e Rakin, A.** 2003. Novel virulence-associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 71:1872-9.
148. **Janse, J. D. e Obradovic, A.** 2010. *Xylella Fastidiosa*: Its Biology, Diagnosis, Control and Risks. *Journal of Plant Pathology* 92:S35-S48.
149. **Jayaraman, A. e Wood, T. K.** 2008. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual review of biomedical engineering* 10:145-67.

150. **Jha, G., Rajeshwari, R. e Sonti, R. V.** 2005. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:891-8.
151. **Jha, G., Rajeshwari, R. e Sonti, R. V.** 2007. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 20:31-40.
152. **Jones, J. D. e Dangl, J. L.** 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-9.
153. **Joo, G. J., Kang, S. M., Hamayun, M., Kim, S. K., Na, C. I., Shin, D. H. e Lee, I. J.** 2009. *Burkholderia* sp KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *Journal of Microbiology* 47:167-171.
154. **Jungblut, P. e Wittmann-Liebold, B.** 1995. Protein analysis on a genomic scale. *J Biotechnol* 41:111-20.
155. **Kato, S., Kowashi, Y. e Demuth, D. R.** 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* 32:1-13.
156. **Kay, S. e Bonas, U.** 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12:37-43.
157. **Keating, T. A., Suo, Z. C., Ehmman, D. E. e Walsh, C. T.** 2000. Selectivity of the yersiniabactin synthetase adenylation domain in the two-step process of amino acid activation and transfer to a hole-carrier protein domain. *Biochemistry* 39:2297-2306.
158. **Kell, D. B., Brown, M., Davey, H. M., Dunn, W. B., Spasic, I. e Oliver, S. G.** 2005. Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. *Nature Reviews Microbiology* 3:557-565.
159. **Kell, D. B. e Oliver, S. G.** 2016a. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 12:148.
160. **Kell, D. B. e Oliver, S. G.** 2016b. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics* 12.
161. **Killiny, N. e Almeida, R. P.** 2009a. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial plant pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22416-20.
162. **Killiny, N. e Almeida, R. P.** 2009b. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Appl Environ Microbiol* 75:521-8.
163. **Killiny, N. e Almeida, R. P.** 2011. Gene regulation mediates host specificity of a bacterial pathogen. *Environ Microbiol Rep* 3:791-7.
164. **Killiny, N., Prado, S. S. e Almeida, R. P. P.** 2010. Chitin Utilization by the Insect-Transmitted Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6134-6140.
165. **Koch, E., Kempf, H. J. e Hessenmuller, A.** 1998. Characterization of the biocontrol activity and evaluation of potential plant growth-promoting properties of selected rhizobacteria. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 105:567-580.
166. **Koide, T., Vencio, R. Z. e Gomes, S. L.** 2006. Global gene expression analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* 188:5821-30.
167. **Kolling, G. L. e Matthews, K. R.** 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1843-8.
168. **Korotkov, K. V., Sandkvist, M. e Hol, W. G. J.** 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology* 10:336-351.
169. **Kosina, S. M., Danielewicz, M. A., Mohammed, M., Ray, J., Suh, Y., Yilmaz, S., Singh, A. K., Arkin, A. P., Deutschbauer, A. M. e Northen, T. R.** 2016. Exometabolomics

- Assisted Design and Validation of Synthetic Obligate Mutualism. ACS Synth Biol 5:569-76.
170. **Krämer, R.** 1994. Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. FEMS Microbiology Reviews 13:75-93.
  171. **Kulp, A. e Kuehn, M. J.** 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu Rev Microbiol 64:163-84.
  172. **Kuo, P. A., Kuo, C. H., Lai, Y. K., Graumann, P. L. e Tu, J.** 2013. Phosphate limitation induces the intergeneric inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by *Serratia marcescens* isolated from paper machines. Fems Microbiology Ecology 84:577-587.
  173. **Kwenda, S., Gorshkov, V., Ramesh, A. M., Naidoo, S., Rubagotti, E., Birch, P. R. e Moleleki, L. N.** 2016. Discovery and profiling of small RNAs responsive to stress conditions in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. BMC Genomics 17:47.
  174. **Lacava, P. T., Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., Jr. e Azevedo, J. L.** 2004. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. Lett Appl Microbiol 39:55-9.
  175. **Lacava, P. T., Li, W., Araujo, W. L., Azevedo, J. L. e Hartung, J. S.** 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. J Microbiol 45:388-93.
  176. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-5.
  177. **Lambais, M. R., Goldman, M. H., Camargo, L. E. e Goldman, G. H.** 2000. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. Curr Opin Microbiol 3:459-62.
  178. **Lasica, A. M., Ksiazek, M., Madej, M. e Potempa, J.** 2017. The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7.
  179. **Leduc, J. L. e Roberts, G. P.** 2009. Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Journal of Bacteriology 191:7121-2.
  180. **Lee, E. Y., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D. S., Kang, J. S., Kim, H. J., Park, K. S., Lee, J. O., Kim, Y. K., Kwon, K. H., Kim, K. P. e Gho, Y. S.** 2007. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. Proteomics 7:3143-53.
  181. **Lee, H. M., Chen, J. R., Lee, H. L., Leu, W. M., Chen, L. Y. e Hu, N. T.** 2004. Functional dissection of the XpsN (GspC) protein of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion machinery. Journal of Bacteriology 186:2946-55.
  182. **Lee, P. A., Tullman-Ercek, D. e Georgiou, G.** 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. Annual Review of Microbiology 60:373-95.
  183. **Lei, B., Mackie, S., Lukomski, S. e Musser, J. M.** 2000. Identification and immunogenicity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins. Infect Immun 68:6807-18.
  184. **Leonard, S., Hommais, F., Nasser, W. e Reverchon, S.** 2017. Plant-phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli. Environmental Microbiology 19:1689-1716.
  185. **Leyton, D. L., Rossiter, A. E. e Henderson, I. R.** 2012. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. Nat Rev Microbiol 10:213-25.
  186. **Li, J., Azam, F. e Zhang, S.** 2016. Outer membrane vesicles containing signalling molecules and active hydrolytic enzymes released by a coral pathogen *Vibrio shilonii* AK1. Environmental Microbiology 18:3850-3866.

187. **Li, W. B., Pria, W. D., Teixeira, C., Miranda, V. S., Ayres, A. J., Franco, C. F., Costa, M. G., He, C. X., Costa, P. I. e Hartung, J. S.** 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant Disease* 85:501-505.
188. **Li, W. B., Zreik, L., Fernandes, N. G., Miranda, V. S., Teixeira, D. C., Ayres, A. J., Garnier, M. e Bov, J. M.** 1999. A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr Microbiol* 39:106-8.
189. **Li, Z. T., Hopkins, D. L. e Gray, D. J.** 2015. Overexpression of antimicrobial lytic peptides protects grapevine from Pierce's disease under greenhouse but not field conditions. *Transgenic research* 24:821-36.
190. **Liang, H., Zhao, Y. T., Zhang, J. Q., Wang, X. J., Fang, R. X. e Jia, Y. T.** 2011. Identification and functional characterization of small non-coding RNAs in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. *BMC Genomics* 12:87.
191. **Lilly, M. D., Clarke, P. H. e Meadow, P. M.** 1963. The Accumulation of Nucleotides by *Escherichia Coli* Strain 26-26. *J Gen Microbiol* 32:103-16.
192. **Lin, H., Doddapaneni, H., Takahashi, Y. e Walker, M. A.** 2007. Comparative analysis of ESTs involved in grape responses to *Xylella fastidiosa* infection. *BMC Plant Biol* 7:8.
193. **Lindow, S., Antonova, E., Strano, C. e Baccari, C.** 2016. Comparison and optimization of different methods to alter dsf-mediated signaling in *Xylella fastidiosa* in plants to achieve Pierce's Disease control. University of California, Berkeley.
194. **Lindow, S., Newman, K., Chatterjee, S., Baccari, C., Lavarone, A. T. e Ionescu, M.** 2014. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease. *Mol Plant Microbe Interact* 27:244-54.
195. **Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J. e Sebo, P.** 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 34:1076-112.
196. **Lippmann, R., Kaspar, S., Rutten, T., Melzer, M., Kumlehn, J., Matros, A. e Mock, H. P.** 2009. Protein and metabolite analysis reveals permanent induction of stress defense and cell regeneration processes in a tobacco cell suspension culture. *International journal of molecular sciences* 10:3012-32.
197. **Llomas, I., Suarez, A., Quesada, E., Bejar, V. e del Moral, A.** 2003. Identification and characterization of the *carAB* genes responsible for encoding carbamoylphosphate synthetase in *Halomonas eurihalina*. *Extremophiles* 7:205-11.
198. **Lopes, J. R. S., Daugherty, M. P. e Almeida, R. P. P.** 2010. Strain origin drives virulence and persistence of *Xylella fastidiosa* in alfalfa. *Plant Pathology* 59:963-971.
199. **Lopes, S. A., Marcussi, S., Torres, S. C. Z., Souza, V., Fagan, C., Franca, S. C., Fernandes, N. G. e Lopes, J. R. S.** 2003. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Plant Disease* 87:544-549.
200. **Lopes, S. A., Ribeiro, D. M., Roberto, P. G., Franca, S. C. e Santos, J. M.** 2000. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Disease* 84:827-830.
201. **Loquet, A., Sgourakis, N. G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger, C., Kolbe, M., Baker, D., Becker, S. e Lange, A.** 2012. Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* 486:276-9.
202. **Love, M. I., Huber, W. e Anders, S.** 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.

203. **Lubelski, J., Konings, W. N. e Driessen, A. J.** 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 71:463-76.
204. **Macdonald, I. A. e Kuehn, M. J.** 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 195:2971-81.
205. **Maria Fedatto, L., Silva-Stenico, M. E., Etchegaray, A., Pacheco, F. T., Rodrigues, J. L. e Tsai, S. M.** 2006. Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiol Res* 161:263-72.
206. **Markowitz, V. M., Chen, I. M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N. N. e Kyrpides, N. C.** 2012. IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res* 40:D115-22.
207. **Marques, L. L. R., Ceri, H., Manfio, G. P., Reid, D. M. e Olson, M. E.** 2002. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Disease* 86:633-638.
208. **Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K. e Whiteley, M.** 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* 69:491-502.
209. **Mashburn, L. M. e Whiteley, M.** 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437:422-5.
210. **Masschelein, J., Jenner, M. e Challis, G. L.** 2017. Antibiotics from Gram-negative bacteria: a comprehensive overview and selected biosynthetic highlights. *Natural Product Reports* 34:712-783.
211. **Mayrand, D. e Grenier, D.** 1989. Biological activities of outer membrane vesicles. *Canadian Journal of Microbiology* 35:607-13.
212. **McCann, H. C. e Guttman, D. S.** 2007. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytologist* 177:33-47.
213. **McIlwain, S., Mathews, M., Bereman, M. S., Rubel, E. W., MacCoss, M. J. e Noble, W. S.** 2012. Estimating relative abundances of proteins from shotgun proteomics data. *BMC Bioinformatics* 13:308.
214. **Meidanis, J., Braga, M. D. e Verjovski-Almeida, S.** 2002. Whole-genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:272-99.
215. **Mendes, J. S., Santiago, A. S., Toledo, M. A., Horta, M. A., de Souza, A. A., Tasic, L. e de Souza, A. P.** 2016. In vitro Determination of Extracellular Proteins from *Xylella fastidiosa*. *Frontiers in microbiology* 7:2090.
216. **Mendz, G. L.** 2001. Nucleotide Metabolism. *In* H. L. T. Mobley, G. L. Mendz e S. L. Hazell (ed.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Washington (DC).
217. **Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J. e Hoch, H. C.** 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* 187:5560-7.
218. **Merfa, M. V., Niza, B., Takita, M. A. e De Souza, A. A.** 2016. The MqsRA Toxin-Antitoxin System from *Xylella fastidiosa* Plays a Key Role in Bacterial Fitness, Pathogenicity, and Persister Cell Formation. *Frontiers in Microbiology* 7.
219. **Miotto-Vilanova, L., Jacquard, C., Courteaux, B., Wortham, L., Michel, J., Clement, C., Barka, E. A. e Sanchez, L.** 2016. Burkholderia phytofirmans PsJN Confers Grapevine Resistance against *Botrytis cinerea* via a Direct Antimicrobial Effect Combined with a Better Resource Mobilization. *Front Plant Sci* 7:1236.
220. **Mirlashari, M. R., Hoiby, E. A., Holst, J. e Lyberg, T.** 2002. Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 110:193-204.

221. **Mitra, S., Barman, S., Nag, D., Sinha, R., Saha, D. R. e Koley, H.** 2012. Outer membrane vesicles of *Shigella boydii* type 4 induce passive immunity in neonatal mice. *FEMS immunology and medical microbiology* 66:240-50.
222. **Mondragon, A.** 2013. Structural Studies of RNase P. *Annual Review of Biophysics*, Vol 42 42:537-557.
223. **Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. e Wold, B.** 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5:621-8.
224. **Mukherjee, P. e Mani, S.** 2013. Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochimica et biophysica acta* 1834:2226-32.
225. **Mullaney, E., Brown, P. A., Smith, S. M., Botting, C. H., Yamaoka, Y. Y., Terres, A. M., Kelleher, D. P. e Windle, H. J.** 2009. Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics. Clinical applications* 3:785-96.
226. **Muller, M. e Klosgen, R. B.** 2005. The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Molecular membrane biology* 22:113-21.
227. **Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. e Dunand, C.** 2010. Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:195-204.
228. **Nascimento, R., Gouran, H., Chakraborty, S., Gillespie, H. W., Almeida-Souza, H. O., Tu, A., Rao, B. J., Feldstein, P. A., Bruening, G., Goulart, L. R. e Dandekar, A. M.** 2016. The Type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. *Scientific Reports* 6:18598.
229. **Natale, P., Bruser, T. e Driessen, A. J.** 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778:1735-56.
230. **Nett, R. S., Montanares, M., Marcassa, A., Lul, X., Nagel, R., Charles, T. C., Hedden, P., Rojas, M. C. e Peters, R. J.** 2017. Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nature Chemical Biology* 13:69-74.
231. **Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. e Lindow, S. E.** 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl Environ Microbiol* 69:7319-27.
232. **Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. e Lindow, S. E.** 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1737-42.
233. **Newman, K. L., Chatterjee, S., Ho, K. A. e Lindow, S. E.** 2008. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Mol Plant Microbe Interact* 21:326-34.
234. **Niza, B., Merfa, M. V., Alencar, V. C., Menegidio, F. B., Nunes, L. R., Machado, M. A., Takita, M. A. e de Souza, A. A.** 2016. Draft Genome Sequence of 11399, a Transformable Citrus-Pathogenic Strain of *Xylella fastidiosa*. *Genome announcements* 4.
235. **Nogaroto, V., Tagliavini, S., Gianotti, A., Mikawa, A., Barros, N. T., Puzer, L., Carmona, A. K., Costa, P. e Henrique-Silva, F.** 2006. Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. *FEMS Microbiol Lett* 261:187-93.
236. **Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J. e Buchanan, S. K.** 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual Review of Microbiology* 64:43-60.
237. **Nookaew, I., Papini, M., Pornputtpong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlen, M. e Nielsen, J.** 2012. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 40:10084-10097.

238. **Obafemi, C., Taiwo, F. O. e Akinpelu, D.** 2012. Synthesis, antibacterial and anti-inflammatory activities of some 2-phenylglyoxylic acid derivatives, vol. Volume 2.
239. **Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. e Haas, R.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287:1497-500.
240. **Oliveira, M. A., Guimaraes, B. G., Cussiol, J. R. R., Medrano, F. J., Gozzo, F. C. e Netto, L. E. S.** 2006. Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. *Journal of Molecular Biology* 359:433-445.
241. **Oliver, J. E., Cobine, P. A. e De La Fuente, L.** 2015. *Xylella fastidiosa* Isolates from Both subsp. multiplex and fastidiosa Cause Disease on Southern Highbush Blueberry (*Vaccinium* sp.) Under Greenhouse Conditions. *Phytopathology* 105:855-62.
242. **Paczia, N., Nilgen, A., Lehmann, T., Gatgens, J., Wiechert, W. e Noack, S.** 2012. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. *Microb Cell Fact* 11:122.
243. **Paranjpye, R. N. e Strom, M. S.** 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect Immun* 73:1411-22.
244. **Park, E., Williams, B., Wold, B. J. e Mortazavi, A.** 2012. RNA editing in the human ENCODE RNA-seq data. *Genome Res* 22:1626-33.
245. **Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, M. B. e Keenan, J. I.** 2010. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect Immun* 78:5054-61.
246. **Parker, H. e Keenan, J. I.** 2012. Composition and function of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. *Microbes and infection* 14:9-16.
247. **Parker, J. K., Chen, H. Y., McCarty, S. E., Liu, L. Y. e De La Fuente, L.** 2016. Calcium transcriptionally regulates the biofilm machinery of *Xylella fastidiosa* to promote continued biofilm development in batch cultures. *Environmental Microbiology* 18:1620-1634.
248. **Pashalidis, S., Moreira, L. M., Zaini, P. A., Campanharo, J. C., Alves, L. M., Ciapina, L. P., Vencio, R. Z., Lemos, E. G., Da Silva, A. M. e Da Silva, A. C.** 2005. Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *Omics* 9:77-90.
249. **Perez-Cruz, C., Delgado, L., Lopez-Iglesias, C. e Mercade, E.** 2015. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS ONE* 10:e0116896.
250. **Perez-Donoso, A. G., Sun, Q., Roper, M. C., Greve, L. C., Kirkpatrick, B. e Labavitch, J. M.** 2010. Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and *Xylella fastidiosa*-Infected Grapevines. *Plant Physiology* 152:1748-1759.
251. **Perez-Llarena, F. J. e Bou, G.** 2016. Proteomics As a Tool for Studying Bacterial Virulence and Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology* 7.
252. **Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. e Nielsen, H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786.
253. **Pierce, B. K., Voegel, T. e Kirkpatrick, B. C.** 2014. The *Xylella fastidiosa* PD1063 Protein Is Secreted in Association with Outer Membrane Vesicles. *Plos One* 9.
254. **Pierry, P. M.** 2012. Pirosequenciamento e análise comparativa de genomas do fitopatógeno *Xylella fastidiosa*. Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 147.
255. **Pierry, P. M.** 2017. Transcritômica comparativa de cepas de *Xylella fastidiosa*. Doutorado. Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 196.
256. **Pollumaa, L., Alamae, T. e Mae, A.** 2012. Quorum sensing and expression of virulence in *Pectobacterium*. *Sensors* 12:3327-49.

257. **Pooler, M. R. e Hartung, J. S.** 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr Microbiol* 31:377-81.
258. **Prado, S. D., Lopes, J. R. S., Demetrio, C. G. B., Borgatto, A. F. e Almeida, R. P. P.** 2008. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. *Scientia Agricola* 65:251-258.
259. **Premjani, V., Tilley, D., Gruenheid, S., Le Moual, H. e Samis, J. A.** 2014. Enterohemorrhagic Escherichia coli OmpT regulates outer membrane vesicle biogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 355:185-92.
260. **Preston, G. M., Studholme, D. J. e Caldelari, I.** 2005. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29:331-60.
261. **Purcino, R. P., Medina, C. L., Martins de Souza, D., Winck, F. V., Machado, E. C., Novello, J. C., Machado, M. A. e Mazzafera, P.** 2007. *Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange *Citrus sinensis* cv. Pera. *J Exp Bot* 58:2733-44.
262. **R-Core-Team.** 2013. R: A language and environment for statistical computing. . R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
263. **Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R., Blua, M. J., Mizell, R. F. e Andersen, P. C.** 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol* 49:243-70.
264. **Reddy, J. D., Reddy, S. L., Hopkins, D. L. e Gabriel, D. W.** 2007. TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol Plant Microbe Interact* 20:403-10.
265. **Reddy, V. S., Kumar, Y. N., Raghavendra, A., Sowjanya, G., Kumar, S., Ramyasree, G. e Reddy, G. R.** 2012. In silico model of DSF synthase RpfF protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*: a novel target for bacterial blight of rice disease. *Bioinformatics* 8:504-7.
266. **Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y. e Beveridge, T. J.** 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150:2161-9.
267. **Riekkki, R., Palomaki, T., Virtaharju, O., Kokko, H., Romantschuk, M. e Saarilahti, H. T.** 2000. Members of the amylovora group of *Erwinia* are cellulolytic and possess genes homologous to the type II secretion pathway. *Molecular & general genetics : MGG* 263:1031-7.
268. **Riley, M. A.** 2011. Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities, p. pp 13-26. *In* D. D. (ID1) eS. R. (ID2) (ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer New York.
269. **Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T. O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R., Lass, A., Daum, G., Reidl, J., Feldman, M. F. e Schild, S.** 2016a. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications* 7.
270. **Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F. e Schild, S.** 2016b. Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. *Microbial Cell* 3:257-259.
271. **Romano, S., Dittmar, T., Bondarev, V., Weber, R. J., Viant, M. R. e Schulz-Vogt, H. N.** 2014. Exo-metabolome of *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 analyzed by ultra-high resolution mass spectrometry and the effect of phosphate limitation. *PLoS One* 9:e96038.
272. **Rompikuntal, P. K., Vdovikova, S., Duperthuy, M., Johnson, T. L., Ahlund, M., Lundmark, R., Oscarsson, J., Sandkvist, M., Uhlin, B. E. e Wai, S. N.** 2015. Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE* 10:e0134098.

273. **Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2007a. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol* 73:7252-8.
274. **Roper, M. C., Greve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2007b. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:411-419.
275. **Rosenkrands, I., King, A., Weldingh, K., Moniatte, M., Moertz, E. e Andersen, P.** 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis* 21:3740-56.
276. **Rossetti, V., Garnier, M., Bove, J. M., Beretta, M. J. G., Teixeira, A. R. R., Quaggio, J. A. e Denegri, J. D.** 1990. Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. *Comptes Rendus de L Academie Des Sciences* 310:345-349.
277. **Rossier, O., Starkenburg, S. R. e Cianciotto, N. P.** 2004. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun* 72:310-21.
278. **Roy, K., Hamilton, D. J., Munson, G. P. e Fleckenstein, J. M.** 2011. Outer Membrane Vesicles Induce Immune Responses to Virulence Proteins and Protect against Colonization by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical and Vaccine Immunology* 18:1803-1808.
279. **Ryan, R. P., An, S. Q., Allan, J. H., McCarthy, Y. e Dow, J. M.** 2015. The DSF Family of Cell-Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators. *PLoS pathogens* 11:e1004986.
280. **Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L. H., Heeb, S., Camara, M., Williams, P. e Dow, J. M.** 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6712-7.
281. **Ryan, R. P., Vorholter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J. e Dow, J. M.** 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature reviews. Microbiology* 9:344-55.
282. **Saier, M. H., Jr.** 2006. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 214:75-90.
283. **Samson, J. E., Magadan, A. H., Sabri, M. e Moineau, S.** 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol* 11:675-87.
284. **Sandkvist, M.** 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* 69:3523-35.
285. **Santana, W. O.** 2013. Genômica comparativa de *Xylella fastidiosa*: diversidade do pangenoma e análise de genes de patogenicidade. Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
286. **Santiago, A. D., Mendes, J. S., Dos Santos, C. A., de Toledo, M. A., Beloti, L. L., Crucello, A., Horta, M. A., Favaro, M. T., Munar, D. M., de Souza, A. A., Cotta, M. A. e de Souza, A. P.** 2016. The Antitoxin Protein of a Toxin-Antitoxin System from *Xylella fastidiosa* Is Secreted via Outer Membrane Vesicles. *Frontiers in microbiology* 7:2030.
287. **Santos, S., Arauz, L. J., Baruque-Ramos, J., Lebrun, I., Carneiro, S. M., Barreto, S. A. e Schenkman, R. P.** 2012. Outer membrane vesicles (OMV) production of *Neisseria meningitidis* serogroup B in batch process. *Vaccine* 30:6064-9.
288. **Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F. e Martelli, G. P.** 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology* 95:668.

289. **Scarpari, L. M., Lambais, M. R., Silva, D. S., Carraro, D. M. e Carrer, H.** 2003. Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 222:83-92.
290. **Scherling, C., Ulrich, K., Ewald, D. e Weckwerth, W.** 2009. A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics. *Mol Plant Microbe Interact* 22:1032-7.
291. **Schmieder, R., Lim, Y. W. e Edwards, R.** 2012. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics* 28:433-435.
292. **Schreiber, H. L., Koirala, M., Lara, A., Ojeda, M., Dowd, S. E., Bextine, B. e Morano, L.** 2010. Unraveling the First *Xylella fastidiosa* subsp *fastidiosa* Genome from Texas. *Southwestern Entomologist* 35:479-483.
293. **Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. e Ragg, T.** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3.
294. **Schubert, O. T., Rost, H. L., Collins, B. C., Rosenberger, G. e Aebersold, R.** 2017. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc* 12:1289-1294.
295. **Schurch, N. J., Schofield, P., Gierlinski, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G. G., Owen-Hughes, T., Blaxter, M. e Barton, G. J.** 2016. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *Rna* 22:839-851.
296. **Schwechheimer, C. e Kuehn, M. J.** 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology* 13:605-19.
297. **Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E. A., Salles, J. F., Van Elsas, J. D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B. R., Wang-Pruski, G. e Nowak, J.** 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1187-1192.
298. **Shriner, A. D. e Andersen, P. C.** 2014. Effect of oxygen on the growth and biofilm formation of *Xylella fastidiosa* in liquid media. *Curr Microbiol* 69:866-73.
299. **Shu, H. Y., Lin, G. H., Wu, Y. C., Tschen, J. S. M. e Liu, S. T.** 2002. Amino acids activated by fengycin synthetase FenE. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292:789-793.
300. **Sidhu, V. K., Vorholter, F. J., Niehaus, K. e Watt, S. A.** 2008. Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol* 8:87.
301. **Siljamaki, P., Varmanen, P., Kankainen, M., Sukura, A., Savijoki, K. e Nyman, T. A.** 2014. Comparative exoprotein profiling of different *Staphylococcus epidermidis* strains reveals potential link between nonclassical protein export and virulence. *J Proteome Res* 13:3249-61.
302. **Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T. H., Pereira, E. R., Rodrigues, J. L. M., Souza, A. N., Etcheagaray, A., Gomes, J. E. e Tsai, S. M.** 2009. Nutritional deficiency in citrus with symptoms of citrus variegated chlorosis disease. *Brazilian Journal of Biology* 69:861-866.
303. **Silva, M. S., De Souza, A. A., Takita, M. A., Labate, C. A. e Machado, M. A.** 2011. Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. *Proteome Sci* 9:58.
304. **Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M. et al.** 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-7.
305. **Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J. e Dow, J. M.** 2000. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 38:986-1003.

306. **Smolka, M. B., Martins, D., Winck, F. V., Santoro, C. E., Castellari, R. R., Ferrari, F., Brum, I. J., Galembeck, E., Coletta, H. D., Machado, M. A., Marangoni, S. e Novello, J. C.** 2003. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* 3:224-237.
307. **Sole, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A. K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., Jordan, M., Lautier, M., Arlat, M. e Buttner, D.** 2015. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Secretes Proteases and Xylanases via the Xps Type II Secretion System and Outer Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology* 197:2879-93.
308. **Sondermann, H., Shikuma, N. J. e Yildiz, F. H.** 2012. You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol* 15:140-6.
309. **Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., Cavalcante, N. S., Alegria, M. C., Barbosa, L. R., Salinas, R. K., Guzzo, C. R. e Farah, C. S.** 2015. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun* 6:6453.
310. **Strona, G., Carstens, C. J. e Beck, P. S.** 2017. Network analysis reveals why *Xylella fastidiosa* will persist in Europe. *Sci Rep* 7:71.
311. **Su, C. C., Deng, W. L., Jan, F. J., Chang, C. J., Huang, H. e Chen, J.** 2014. Draft Genome Sequence of *Xylella fastidiosa* Pear Leaf Scorch Strain in Taiwan. *Genome announcements* 2.
312. **Subramanian, S. e Smith, D. L.** 2015. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome - from an agriculture perspective. *Frontiers in Plant Science* 6.
313. **Sun, Q., Greve, L. C. e Labavitch, J. M.** 2011. Polysaccharide compositions of intervessel pit membranes contribute to Pierce's disease resistance of grapevines. *Plant Physiol* 155:1976-87.
314. **Tal, A., Arbel-Goren, R., Costantino, N., Court, D. L. e Stavans, J.** 2014. Location of the unique integration site on an *Escherichia coli* chromosome by bacteriophage lambda DNA in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:7308-12.
315. **Tauschek, M., Gorrell, R. J., Strugnell, R. A. e Robins-Browne, R. M.** 2002. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7066-71.
316. **Tayi, L., Maku, R., Patel, H. K. e Sonti, R. V.** 2016. Action of Multiple Cell Wall-Degrading Enzymes Is Required for Elicitation of Innate Immune Responses During *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29:599-608.
317. **Thomas, S., Holland, I. B. e Schmitt, L.** 2014. The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1843:1629-41.
318. **Toledo, M. A. S., Schneider, D. R., Azzoni, A. R., Favaro, M. T. P., Pelloso, A. C., Santos, C. A., Saraiva, A. M. e Souza, A. P.** 2011. Characterization of an oxidative stress response regulator, homologous to *Escherichia coli* OxyR, from the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Protein Expr Purif* 75:204-210.
319. **Torres, P. S., Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M. e Vojnov, A. A.** 2007. Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environmental Microbiology* 9:2101-2109.
320. **Trotochaud, A. E. e Wassarman, K. M.** 2005. A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol* 12:313-9.
321. **Truernit, E. e Haseloff, J.** 2008. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods* 4:15.

322. **Turkina, M. V., Olofsson, A., Magnusson, K. E., Arnqvist, A. e Vikstrom, E.** 2015. Helicobacter pylori vesicles carrying CagA localize in the vicinity of cell-cell contacts and induce histone H1 binding to ATP in epithelial cells. FEMS Microbiology Letters 362.
323. **UniProt, C.** 2015. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res 43:D204-12.
324. **Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. e Rozhon, W.** 2013. Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. Mob Genet Elements 3:e26219.
325. **Van Horn, C., Chang, C. J. e Chen, J.** 2017. De Novo Whole-Genome Sequence of Xylella fastidiosa subsp. multiplex Strain BB01 Isolated from a Blueberry in Georgia, USA. Genome Announc 5.
326. **Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan, L. R. et al.** 2003. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. J Bacteriol 185:1018-26.
327. **Vanden Bergh, P., Heller, M., Braga-Lagache, S. e Frey, J.** 2013. The Aeromonas salmonicida subsp salmonicida exoproteome: determination of the complete repertoire of Type-Three Secretion System effectors and identification of other virulence factors. Proteome Science 11.
328. **Vida, A., Troelstra, A., Antal-Szalmas, P., van Bommel, T. J., Verheul, A. F., Verhoef, J., van Kessel, K. P. e van Strijp, J. A.** 2011. Neutralization of Neisseria meningitidis outer membrane vesicles. Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] 60:801-5.
329. **Vidova, V. e Spacil, Z.** 2017. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. Anal Chim Acta 964:7-23.
330. **Villas-Boas, S. G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J. e Nielsen, J.** 2005a. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass spectrometry reviews 24:613-46.
331. **Villas-Boas, S. G., Noel, S., Lane, G. A., Attwood, G. e Cookson, A.** 2006. Extracellular metabolomics: a metabolic footprinting approach to assess fiber degradation in complex media. Analytical biochemistry 349:297-305.
332. **Villas-Boas, S. G., Rasmussen, S. e Lane, G. A.** 2005b. Metabolomics or metabolite profiles? Trends Biotechnol 23:385-6.
333. **Voegel, T. M., Warren, J. G., Matsumoto, A., Igo, M. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2010. Localization and characterization of Xylella fastidiosa haemagglutinin adhesins. Microbiology-Sgm 156:2172-2179.
334. **Wai, S. N., Takade, A. e Amako, K.** 1995. The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiology and immunology 39:451-6.
335. **Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X. e Zhang, L. H.** 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Mol Microbiol 51:903-12.
336. **Wang, N., Li, J. L. e Lindow, S. E.** 2012. RpfF-dependent regulon of Xylella fastidiosa. Phytopathology 102:1045-53.
337. **Wang, P., Lee, Y., Igo, M. M. e Roper, M. C.** 2017. Tolerance to oxidative stress is required for maximal xylem colonization by the xylem-limited bacterial phytopathogen, Xylella fastidiosa. Molecular Plant Pathology 18:990-1000.
338. **Wang, Y. M., Kim, S. G., Wu, J. N., Huh, H. H., Lee, S. J., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Park, Z. Y., Young Kang, K. e Kim, S. T.** 2013. Secretome analysis of the rice bacterium Xanthomonas oryzae (Xoo) using in vitro and in planta systems. Proteomics 13:1901-1912.
339. **Wassarman, K. M. e Storz, G.** 2000. 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. Cell 101:613-23.

340. **Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelcopaul, L. e Brenner, D. J.** 1987. *Xylella-Fastidiosa* Gen-Nov, Sp-Nov - Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas*-Spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143.
341. **Wilmes, P., Bowen, B. P., Thomas, B. C., Mueller, R. S., Denef, V. J., VerBerkmoes, N. C., Hettich, R. L., Northen, T. R. e Banfield, J. F.** 2010. Metabolome-proteome differentiation coupled to microbial divergence. *MBio* 1.
342. **Wulff, N. A., Carrer, H. e Pascholati, S. F.** 2006. Expression and Purification of Cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 53:198-203.
343. **Yao, Y., Sun, T., Wang, T., Ruebel, O., Northen, T. e Bowen, B. P.** 2015. Analysis of Metabolomics Datasets with High-Performance Computing and Metabolite Atlases. *Metabolites* 5:431-42.
344. **Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T. e Kamiya, S.** 2009. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* 9:197.
345. **Yoshioka, S. e Newell, P. D.** 2016. Disruption of de novo purine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 leads to reduced biofilm formation and a reduction in cell size of surface-attached but not planktonic cells. *PeerJ* 4:e1543.
346. **Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J. e Brinkman, F. S. L.** 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26:1608-1615.
347. **Zaini, P. A., De La Fuente, L., Hoch, H. C. e Burr, T. J.** 2009. Grapevine xylem sap enhances biofilm development by *Xylella fastidiosa*. *Fems Microbiology Letters* 295:129-134.
348. **Zaini, P. A., Fogaca, A. C., Lupo, F. G., Nakaya, H. I., Vencio, R. Z. e da Silva, A. M.** 2008. The iron stimulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type IV pilus and colicin V-like bacteriocins. *J Bacteriol* 190:2368-78.
349. **Zhang, L. H.** 2010. A novel C-di-GMP effector linking intracellular virulence regulon to quorum sensing and hypoxia sensing. *Virulence* 1:391-4.
350. **Zhang, S., Flores-Cruz, Z., Kumar, D., Chakrabarty, P., Hopkins, D. L. e Gabriel, D. W.** 2011. The *Xylella fastidiosa* biocontrol strain EB92-1 genome is very similar and syntenic to Pierce's disease strains. *Journal of Bacteriology* 193:5576-7.
351. **Zhang, S. J., Chakrabarty, P. K., Fleites, L. A., Rayside, P. A., Hopkins, D. L. e Gabriel, D. W.** 2015. Three New Pierce's Disease Pathogenicity Effectors Identified Using *Xylella fastidiosa* Biocontrol Strain EB92-1. *Plos One* 10.
352. **Zhou, L., Wang, X. Y., Sun, S., Yang, L. C., Jiang, B. L. e He, Y. W.** 2015. Identification and characterization of naturally occurring DSF-family quorum sensing signal turnover system in the phytopathogen *Xanthomonas*. *Environ Microbiol* 17:4646-58.
353. **Zhou, L., Zhang, L. H., Camara, M. e He, Y. W.** 2017. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends in Microbiology* 25:293-303.
354. **Zuniga, A., Donoso, R. A., Ruiz, D., Ruz, G. A. e Gonzalez, B.** 2017. Quorum-Sensing Systems in the Plant Growth-Promoting Bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN Exhibit Cross-Regulation and Are Involved in Biofilm Formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30:557-565.

## Súmula curricular

### Oséias Rodrigues Feitosa Junior

Nascimento: 13/01/1987 – Santos/SP - Brasil

---

#### Formação Acadêmica

- 2014-atual      Graduação em Engenharia da Computação  
Universidade Virtual do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- 2012-atual      Doutorado Direto  
Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química,  
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.  
Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva.  
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES).
- 2015-2016      Doutorado Sanduíche  
University of California, Berkeley, Califórnia, EUA.  
Orientador no exterior: Prof. Steven E. Lindow  
Joint Genome Institute, Walnut Creek, Califórnia, EUA.  
Co-orientador no exterior: Dr. Trent Northen  
Bolsista do Programa Ciência sem Fronteiras, Coordenação de  
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- 2007-2011      Graduação em Farmácia.  
Universidade Católica de Santos, Santos, SP, Brasil.  
Bolsista do Programa Universidade para Todos (PROUNI).
- 

#### Atuação Profissional

- 2005-2009      Yara Brasil Fertilizantes  
Analista Químico
- 

#### Formação complementar

- 2012–2016      Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)  
Universidade de São Paulo.
- 2009-2011      Iniciação Científica  
Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo  
Orientador: Profa. Dra. Aline Maria da Silva  
Bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
- 

#### Prêmios

- 2017              Pós-Graduação – Prêmio “Earlier Career Researchers”: Melhores resumos  
para apresentação oral, submetidos à European conference on *Xylella*

- fastidiosa*: finding answers to a global problem. European Food and Safety Authority – UE.
- 2012 Graduação – Prêmio “Paulo Minami”: Melhor aluno da turma de 2011 do curso de Farmácia da Universidade Católica de Santos. Conselho Regional de Farmácia – SP
- 2005 Ensino Técnico em Química – Prêmio “Lavoisier”: Melhor aluno do curso Técnico em Química da turma 2004/2005. Conselho Regional de Química - IV Região.
- 

### **Comunicações em Congressos**

FEITOSA JÚNIOR, O. R.; Zaini, P. A.; DA SILVA, A. M. Analysis of *Xylella fastidiosa* secretome. In: 60º Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá. Genética de Microrganismos, 2014. p. 55.

Farage, L.; FEITOSA JÚNIOR, O. R. Characterization of a novel protein that interacts with type 1 serine/threonine phosphatase catalytic subunit in *Dictyostelium discoideum*. In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Reunião Anual da SBBq, 2010.

Farage, L.; FEITOSA JÚNIOR, O. R. Caracterização funcional de uma nova proteína que interage com a serina/treonina fosfatase do tipo 1 em *Dictyostelium discoideum*. In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá, SP. 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010.

---

### **Apresentações de Trabalho**

FEITOSA JÚNIOR, O. R.; Zaini, P. A. Análise da expressão da poligalacturonase em diferentes cepas de *Xylella fastidiosa*. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

CORRÊA, C. F.; CAMAPANHÃ, R. B.; MONTANARI, P.M.; FEITOSA JÚNIOR, O. R.; FREITAS, D. D. de; LIRA, F. B. C. de; NASCIMENTO, J. B. P. do; ARRUDA, G. F. F. de. Levantamento de espécies vegetais utilizadas com finalidade terapêutica pela comunidade Vila de Itatinga Bertioiga / SP. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

---

### **Demais produções técnicas**

Zaini, P. A.; FEITOSA JÚNIOR, O. R.; PIERRY, P. M. V Curso de Inverno - Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular. 2010. (Curso de curta duração).  
Outras informações

---