UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

RODRIGO ROBERTO RAFAGNIN DUARTE

Predição *in silico* e caracterização parcial
das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa*

Versão corrigida

São Paulo

2012

Data do depósito na SPG: 05/11/2012

RODRIGO ROBERTO RAFAGNIN DUARTE

**Predição *in silico* e caracterização parcial
das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica).

Orientação: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo

2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO DE TODO OU PARTE DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO DO CONJUNTO DAS QUÍMICAS

Duarte, Rodrigo Roberto Rafagnin

Predição *in silico* e caracterização parcial das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa*
Rodrigo Roberto Rafagnin Duarte -- São Paulo, 2012.

Orientadora: Aline Maria da Silva.

87 pp.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Química,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração:
Bioquímica.

Descritores: 1. Bacteriocinas. 2. Microcinas. 3. Clorose Variegada do Citros. 4.
Doença de Pierce. 5. *Xylella fastidiosa*. I. da Silva, Aline Maria.
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). III. Predição *in silico* e
caracterização parcial das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa*.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Predição *in silico* e caracterização parcial das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa*”

RODRIGO ROBERTO RAFAGNIN DUARTE

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

Aprovado (a) por:

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

Prof. Dra. Regina Lúcia Baldini
IQ - USP

Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo
ICB - USP

SÃO PAULO
16 de janeiro de 2013

Dedico..

À família e aos amigos: minha fortaleza, meus refúgios.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos “oráculos” que tornaram meu trabalho possível: (1) Professora Aline, minha tutora durante os últimos anos, quem abriu inúmeras portas para meu futuro na Ciência e sempre soube me tirar umas boas gargalhadas com as piadas mais nerds e inesperadas! (2) Professora Andréa Cristina Fogaça (ICB-USP), cujo esforço neste trabalho está por entre as linhas que escrevi. (3) Dr. Paulo Adriano Zaini, *post-doctoral fellow* do nosso laboratório, com quem tive inúmeras discussões que me nortearam e fizeram-me ver quantos caminhos tortos eu tentei seguir desnecessariamente. Sou eternamente grato pelas lições e desafios que me propuseram ao longo dessa etapa, e se descrevesse o quanto os admiro, não caberia minha sessão de Resultados e Discussão inteira, então resolvi seguir adiante! (rs)

Sou muito grato ao Alexandre Chuck Norris Sanchez, nosso querido técnico encarregado de colocar ordem na casa. Seu tom de voz dócil enquanto reclama de vendedores ou tenta descobrir quem deixou o fluxo laminar bagunçado jamais será esquecido. Gostaria de agradecer especialmente ao Gutto Chaves e ao Fernando Tria pela amizade, filosofias e “cervejas com Ciência” ao longo da jornada de pós-graduação que iniciamos juntos; aos *labmates* Wesley Santana e Paulo Pierry, que foram os veteranos que nos acolheram quando éramos zigotos no laboratório; à Luciana Principal, Ana Paula Souza, Oséias Feitosa Junior, Joaquim Martins e Deibs Barbosa, que foram os zigotos do laboratório que cuidamos com carinho, bandejeões e parcerias.

Gostaria de agradecer também à Dra. Layla Farage pela assistência desde que iniciei minha empreitada no lab, com suas dicas preciosas e seu constante sorriso desde a primeira conversa; às Dras. Daniela Betton, Daniela Gonzalez, Marilene Oliveira e Claudia Angeli pelo suporte técnico ou dicas; a todo o *staff* do IQ-USP por eventuais empréstimos ou serviços.

Não poderia deixar de contemplar a arte que me fez enxergar os obstáculos encontrados ao longo dos semestres como meros treinos em busca do meu crescimento e aprimoramento: o Jiu-jitsu ensinado pelo *sensei* Adriano Silva. Campeão brasileiro e mundial do esporte, esse lutador se tornou meu grande ídolo e ensinou-me muito mais da vida do que eu esperava aprender na luta: “*Mens sana in corpore sano*”.

Agradeço calorosamente aos amigos Bruno Quint, Kelly de Carvalho, Norton Witeck e Caio Marolcci, que em diferentes momentos cimentaram minha vida em São Paulo; e Jakeline Mendes, Edson Oliveira, Juliane Fagotti, Pricilla Oro e Kako Lorini pela fraternidade de muitos anos que nem 16h de ônibus conseguiram afastar! Por fim, e mais importante, sou eternamente agradecido à família: minha mãe, Mari, dona dos melhores abraços do mundo e que me patrocinou por todo esse tempo, mesmo querendo que o filhote voltasse para a toca; minha irmã, Gisele, que deu toda a assistência nas minhas idas e vindas para casa; os *nonni* Rafagnin, meus guias e protetores lá de cima; meus tios Junior, Dani, Cleber e Marinez, e meus primos Arthur, Laura, Pâmella e Isabelle, que são diferentes inspirações e blocos de tijolos para o meu crescer.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP e do CNPq. O autor foi bolsista de Mestrado do CNPq.

RESUMO

DUARTE, R. R. R. **Predição *in silico* e caracterização parcial das bacteriocinas de *Xylella fastidiosa***. 2012. 87 pp. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Xylella fastidiosa é o agente causal de uma série de doenças que ocorrem em plantas economicamente importantes como laranjeiras, videiras e cafeeiros, causando no Estado de São Paulo prejuízos relevantes à indústria citrícola. Esta bactéria Gram-negativa é restrita ao xilema das plantas e à porção anterior do trato digestório dos insetos vetores das famílias Cicadellidae e Cercopidae, conhecidos como cigarrinhas. Tentativas de elucidar os mecanismos de virulência e patogenicidade adotados por esta bactéria apontam a formação do biofilme como etapa fundamental para o estabelecimento da infecção e o consequente desenvolvimento da doença na planta, mas fatores adicionais parecem contribuir, tais como a produção de toxinas. As bacteriocinas são proteínas com atividade antibiótica contra cepas próximas à espécie produtora e que já foram associadas à virulência e patogenicidade de outras bactérias. Uma varredura *in silico* no genoma de *X. fastidiosa* 9a5c revelou 13 sequências codificadoras de microcinas putativas no cromossomo. Transcritos de todos esses genes foram detectados por RT-qPCR em culturas de *X. fastidiosa* 9a5c, e análises comparativas com genomas públicos (cepas Temecula1, Dixon, Ann-1, M23, M12, EB92-1 e GB514) e recém sequenciados por nosso grupo de pesquisa (cepas U24d, J1a12, 3124, Hib4, Pr8x e Fb7) revelaram que cada cepa possui seu próprio arsenal de bacteriocinas. Diferenças encontradas *in silico* entre os *loci* de bacteriocinas nas cepas foram demonstradas experimentalmente. Nossos resultados comprovam a variabilidade predita nos quatro *clusters* de bacteriocinas que identificamos, o que é esperado para genes relacionados à adaptação e patogenicidade. Destes *loci*, três foram detectados por RT-PCR como transcritos policistrônicos. Nossa tentativa de detectar essas proteínas em culturas de *X. fastidiosa* (através de sequenciamento de polipeptídeos por HPLC-MS/MS) foi capaz de identificar uma das bacteriocinas putativas e, portanto, o conjunto de nossas observações apóia a continuidade dos estudos para elucidar o papel das bacteriocinas na fisiopatologia de *X. fastidiosa*.

Palavras-chave: bacteriocinas, microcinas, Clorose Variegada do Citros, Doença de Pierce, fitopatógeno.

ABSTRACT

DUARTE, R. R. R. ***In silico* prediction and partial characterization of the bacteriocins produced by *Xylella fastidiosa***. 2012. 87 pp. Master's dissertation – Graduate program in Biological Sciences, Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Xylella fastidiosa is the causal agent of diseases that affect several economically important crops such as sweet orange trees, grapevines and coffee trees, causing in the State of São Paulo considerable losses mainly to the citrus industry. This Gram-negative bacterium is restricted to the plant xylem and to the upper gastrointestinal tract of its insect vectors, the sharpshooters from the Cicadellidae and Cercopidae families. Attempts to elucidate the virulence and pathogenicity pathways employed by this bacterium point the biofilm formation as a fundamental step for the establishment of the infection and the consequent development of the plant disease, but additional factors seem to contribute to these processes, such as the production of toxins. Bacteriocins are proteinaceous antibiotics that act against closely-related species and have been previously associated with virulence and pathogenicity in other bacteria. An *in silico* screening of the *X. fastidiosa* 9a5c genome revealed 13 coding sequences as putative microcins in the chromosome. Transcripts from all those genes were detected through RT-qPCR in *X. fastidiosa* 9a5c cultures, and comparative analyses on the public genomes (Temecula1, Dixon, Ann-1, M23, M12, EB92-1 and GB514) plus the ones recently sequenced by our group (U24d, J1a12, 3124, Hib4, Pr8x and Fb7) revealed that each strain possesses its own arsenal of bacteriocins. Differences found *in silico* among the *loci* in all strains were experimentally confirmed. Our results demonstrated the predicted variability in the four bacteriocins clusters as expected for adaptation and pathogenicity-related genes. Three out of the four bacteriocins *loci* were detected by RT-PCR as polycistronic transcripts. Our attempt to detect these proteins in *X. fastidiosa* cultures (using HPLC-MS/MS polypeptide sequencing) identified one of the putative bacteriocins, and therefore our observations warrant further efforts to elucidate the role of bacteriocins in the *X. fastidiosa* physiopathology.

Keywords: bacteriocins, microcins, Citrus Variegated Chlorosis, Pierce's Disease, plant pathogen.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Xylella fastidiosa</i> , seus hospedeiros e o prejuízo econômico	13
1.1.1. Distribuição geográfica de <i>X. fastidiosa</i> e os problemas causados	14
1.1.2. A dispersão pelo inseto vetor	15
1.1.3. A doença nas plantas	17
1.1.4. Mecanismos de virulência e patogenicidade	19
1.2. Bacteriocinas	20
1.2.1. Diversidade e virulência promovidas pelas bacteriocinas	22
1.2.2. Classificação das bacteriocinas e mecanismos gerais	23
1.2.3. Microcinas de Classe II em <i>X. fastidiosa</i>	24
2. OBJETIVOS	30
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
3.1. Análises <i>in silico</i> do genoma de <i>X. fastidiosa</i>	31
3.1.1. <i>Predição</i> de genes codificadores de bacteriocinas	31
3.1.2. Análise das regiões promotoras dos genes das bacteriocinas putativas	32
3.1.3. Genômica comparativa	32
3.2. Validação da presença de genes de bacteriocinas nos diferentes genomas de <i>X. fastidiosa</i>	34
3.2.1. Cepas e condições de cultivo	34
3.2.2. Isolamento de DNA genômico	35
3.2.3. Reações de PCR e sequenciamento	35
3.3. Análise de expressão de genes de bacteriocinas em 9a5c e J1a12	37
3.3.1. Cepas e condições de cultivo	37
3.3.2. PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR)	38
3.3.3. PCR precedida de transcrição reversa (RT-PCR)	40
3.4. Sequenciamento <i>shotgun</i> de proteínas para detecção das bacteriocinas	40
3.4.1. Cepas e condições de cultivo	40
3.4.2. Concentração e fracionamento das proteínas do sobrenatante e do extrato celular de <i>X. fastidiosa</i>	41
3.4.3. Redução, alquilação, tripsinização e dessalinização das amostras	41
3.4.4. Análise dos fragmentos trípticos por HPLC-MS/MS	42
3.4.5. SDS-PAGE em sistema tricina para proteínas pequenas	43

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Análise <i>in silico</i> de genes de bacteriocinas em <i>X. fastidiosa</i>	43
4.1.1. Predição de genes relacionados à síntese de bacteriocinas.....	43
4.1.2. Análise das regiões promotoras das bacteriocinas putativas.....	47
4.1.3. Predição do arsenal de bacteriocinas em diversas cepas de <i>X. fastidiosa</i> ...	51
4.2. Avaliação dos grupos de genes de bacteriocinas por PCR	58
4.3. Análise da expressão de bacteriocinas de 9a5c e J1a12	61
4.3.1. Avaliação do nível dos transcritos de bacteriocinas em culturas submetidas a estresses	61
4.3.2. Detecção de mRNAs policistrônicos de grupos de bacteriocinas	67
4.4. Proteômica <i>shotgun</i> para a detecção de bacteriocinas	70
5. CONCLUSÕES.....	76
6. BIBLIOGRAFIA	77
Anexo A - Súmula curricular	88

1. Introdução

1.1. *Xylella fastidiosa*, seus hospedeiros e o prejuízo econômico

Xylella fastidiosa é uma gamaproteobactéria da família das Xanthomonadaceae e é espécie única do gênero *Xylella*. É o agente causal de uma série de doenças em plantas, como a Clorose Variegada do Citros (CVC) em laranjeiras e a Doença de Pierce (PD) em videiras (Hopkins e Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008a). A bactéria é considerada fastidiosa (tem crescimento lento) e é restrita ao xilema das plantas que habita e ao trato intestinal dos insetos responsáveis pela sua disseminação no campo (Janse e Obradovic, 2010).

Esta bactéria Gram-negativa considerada generalista já foi detectada em cerca de 200 tipos de plantas com ou sem sintomas de sua infecção, ainda que algumas linhagens desta espécie sejam restritas a um ou poucos hospedeiros (informação completa em <http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/>). Várias espécies de gramíneas, lenhosas, plantas ornamentais, exóticas ou nativas, podem carregar o patógeno em sua forma latente, sem que haja sintomatologia (Redak *et al.*, 2004; Janse e Obradovic, 2010), mas em outras plantas como ameixeira, amendoeira, cafeeiro, hibisco e espirradeira, além das já mencionadas laranjeira e videira, observam-se sintomas da infecção como a escaldadura da folha ou requeima, clorose e outros.

Análises filogenéticas utilizando RNA ribossomal 16S dos isolados e ainda outros *loci* genômicos permitem separar as linhagens ou cepas de *X. fastidiosa* nas subespécies *fastidiosa* ou *piercei* (encontrada em videira, alfalfa, amendoeira e bordo), *multiplex* (em pessegueiro, ameixeira e amendoeira), *pauca* (em citros e café), *sandyi* (em espirradeira, jacarandá e magnólia) e *tashke* (em chitalpa) (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005; Randall *et al.*, 2009).

De uma forma geral, as linhagens de *X. fastidiosa* apresentam certa diversidade genética mesmo entre isolados que infectam o mesmo hospedeiro, o que é um padrão que aparece com frequência na subdivisão gama das proteobactérias (Schuenzel *et al.*, 2005; Studholme *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2010). Mas, de todo modo, as células de *X. fastidiosa* possuem forma de bastonetes com comprimento entre 1,0 e 4,0 µm e diâmetro entre 0,25 e

0,50 μm , podendo formar filamentos de células em determinados meios de cultura. São bactérias catalase-positivas, formando colônias circulares, lisas ou rugosas. São aeróbias obrigatórias, aflageladas, não-halofílicas, com tempo de duplicação entre 9 e 55 horas dependendo do meio de cultura. As temperaturas ótimas de crescimento se dão entre 26 e 28°C, sendo que sua temperatura máxima de crescimento é de 33°C, e temperaturas abaixo de 10°C reduzem a população da bactéria em videiras. Seu pH ótimo de crescimento varia de 6,5 a 6,9, chegando até 7,8 no final das culturas (Davis *et al.*, 1978; Davis *et al.*, 1981; Wells *et al.*, 1981; Hopkins, 1989; Hopkins e Purcell, 2002).

1.1.1. Distribuição geográfica de *X. fastidiosa* e os problemas causados

Doenças causadas por *X. fastidiosa* foram relatadas em várias regiões tropicais e subtropicais das Américas e possivelmente em Taiwan (Ásia) (Janse e Obradovic, 2010). Na América do Norte, a doença com maior impacto econômico causada por este fitopatógeno é a Doença de Pierce, que ganhou importância a partir de 1989 em decorrência da introdução da espécie *Homalodisca coagulata* como inseto vetor na região Sul da Califórnia, nos Estados Unidos (Sorensen e Gill, 1996). Alguns anos depois, a área apresentava focos de infecção por *X. fastidiosa* (Blua *et al.*, 1999), que em pouco tempo foi constatada em todos os vinhedos do Vale da Temecula (Perring *et al.*, 2001; Purcell e Feil, 2001).

A viticultura movimenta uma economia estimada em US\$ 3 bilhões ao ano somente na Califórnia, sendo a uva o cultivar de maior importância. Somando as indústrias de citros, uva e plantas ornamentais deste Estado, o lucro combinado é de US\$ 20,8 bilhões ao ano, ficando atrás apenas da indústria do milho (US\$ 26,8 bilhões ao ano) (Jetter e Morse, 2010).

No Brasil, ainda que sejam detectados cafeeiros e ameixeiras com sintomas de infecção por *X. fastidiosa*, o maior problema econômico é a Clorose Variegada do Citros, cuja disseminação se deu no início da década de 80 e já se encontrava em todas as regiões citrícolas do país apenas 10 anos depois (Rossetti *et al.*, 1990; Coletta-Filho e Machado, 2003). Tamanho foi o problema que grandes esforços foram reunidos para o sequenciamento do genoma da principal responsável pela CVC no Brasil, *X. fastidiosa* cepa 9a5c (Simpson *et al.*, 2000). Nos anos seguintes se tornaram frequentes os relatos da doença na América

Latina, como na Argentina, Venezuela, Uruguai, Paraguai (Redak *et al.*, 2004) e Costa Rica (Rodríguez *et al.*, 2001; Aguilar *et al.*, 2005).

Juntos, os Estados da Florida (Estados Unidos) e o de São Paulo são responsáveis por 81% da produção mundial de suco de laranja (Neves *et al.*, 2011), sendo que a indústria citrícola movimenta no Brasil de US\$ 1,5 a 2,5 bilhões ao ano (Lopes *et al.*, 2012). Ainda que a CVC acometa somente pomares da América do Sul, as perdas econômicas com esta doença são relevantes: em 2000, 34% do parque citrícola do Estado estava contaminado, e apenas 5 anos depois a incidência passou a 43% (Bove e Ayres, 2007). A introdução de práticas adequadas de manejo (plantio de mudas sadias, o controle do inseto vetor e poda de ramos infectados, quando apresentando sinais iniciais de infecção, ou da árvore inteira, quando em estágios tardios) contribuiu para redução da incidência. Entretanto, levantamentos recentes mostram novo aumento de casos de CVC nos pomares paulistas, passando de 35,5% em 2010 para 40,3% em 2011 (<http://www.fundecitrus.com.br>).

1.1.2. A dispersão pelo inseto vetor

Ainda que a bactéria tenha sido encontrada em sementes de laranjeira doce contaminada (Li *et al.*, 2003), sabe-se que a disseminação da doença nas plantas se dá principalmente através de insetos vetores (Figura 1). Estes são popularmente conhecidos como cigarrinhas e compreendem membros da família Cicadellidae (*sharpshooters*) e Cercopidae (*spittlebugs*), sendo que todas são supostamente capazes de transmitir qualquer linhagem de *X. fastidiosa*, ainda que com eficiências diferentes (Hill e Purcell, 1997). Estes Hemiptera possuem um aparato de sucção desenvolvido que permite a tomada do fluido xilemático mesmo sob a forte pressão negativa existente no vaso, permitindo-os ingerir grandes quantidades de seiva (Milanez *et al.*, 2003), o que é necessário pela baixa concentração de nutrientes ali disponíveis, principalmente ácidos orgânicos e aminoácidos (Andersen *et al.*, 1989).

Imagens retiradas de <http://nature.berkeley.edu/xylella>

Figura 1: Principais espécies de cigarrinhas responsáveis pela transmissão da Clorose Variegada do Citros em São Paulo (*Dilobopterus costalimai*, à esquerda) e da Doença de Pierce na Califórnia (*Graphocephala atropunctata*, à direita).

Curiosamente, *X. fastidiosa* é a única bactéria fitopatogênica transmitida por artrópodes que não circula pela hemolinfa do inseto (Hill e Purcell, 1994) e que se multiplica no vetor, o qual permanece infeccioso até que fenece (Alves *et al.*, 2008). O processo de transmissão consiste basicamente na contaminação de uma cigarrinha pela ingestão do fluido xilemático contendo *X. fastidiosa*. Ocorre então a adesão das células do patógeno por um de seus polos à porção anterior do tubo digestório do inseto (pré-cibário e cibário), onde as células formam uma camada organizada. Em alimentações subsequentes da cigarrinha, bactérias destacam-se e, através do aparato bucal do inseto, contaminam e colonizam o xilema (Almeida *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2005).

As células de *X. fastidiosa* aderidas ao tubo digestório do inseto estão inseridas em um biofilme, constituído de proteínas, ácidos nucleicos e exopolissacarídeos (EPS), que reforça a adesão entre as células e constitui um fator de virulência e patogenicidade para a bactéria (da Silva *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2008a). Recentes estudos mostram que as

enzimas salivares do inseto degradam a matriz exopolissacarídica do biofilme bacteriano no seu trato digestório e ocasionam a liberação das células para infectarem o xilema de novas plantas (Backus *et al.*, 2012). É sabido que a maioria das espécies de cigarrinhas contaminadas possui uma taxa de transmissão de *X. fastidiosa* inferior a 15% nas alimentações seguintes (Lopes, 1999), fato que pode ser relacionado à dificuldade de liberação das células imposta pelo biofilme.

1.1.3. A doença nas plantas

Uma vez no xilema, uma série de fatores deve determinar se a bactéria permanecerá como endofítico, constituindo um reservatório para sua posterior propagação, ou se irá multiplicar e acarretar no aparecimento de sintomas na planta (Hopkins, 1989; Purcell e Hopkins, 1996; Hopkins e Purcell, 2002; Newman *et al.*, 2003). A Figura 2 mostra os sintomas que aparecem nas folhas e frutos de laranjeiras e videiras contaminadas por *X. fastidiosa*.

De uma forma geral, acredita-se que a doença seja causada por um acúmulo de células bacterianas no xilema, com sua disseminação ao longo do vaso inicialmente infectado e para vasos adjacentes, atravessando as regiões de pontuações areoladas que os conectam. Postula-se que estas pontuações possam ser danificadas ou degradadas pela ação de celulasas e hemicelulasas secretadas pela bactéria. O genoma de *X. fastidiosa* codifica endoglucanases, xilanases, xilosidases e uma poligalacturonase (pectinase), sendo que o mutante deste gene na cepa Temecula1 apresentou deficiência na colonização de *Vitis vinifera* (Wulff *et al.*, 2006; Roper *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008a). Polimorfismos no gene da poligalacturonase encontrados no genoma de cepas isoladas de citros e cafeeiros parecem resultar na ausência da enzima ativa e têm sido associados à menor agressividade destes isolados (Van Sluys *et al.*, 2003).

Por Marcos A. Machado, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis.

Por Alexander Purcell, Universidade da Califórnia, Berkeley

Fonte: <http://www.ipm.ucdavis.edu>

Figura 2: Sintomas em laranjeiras (acima) e videiras (abaixo) infectadas por *X. fastidiosa*. As manchas amarelas/marrons nas folhas são características de plantas contaminadas e são similares aos observados na deficiência de zinco. O nanismo e o enrijecimento dos frutos são também sintomas característicos.

Dentre várias observações e hipóteses quanto à causa dos sintomas, é correto afirmar que existe uma correlação direta entre o grau de colonização por *X. fastidiosa* e a sintomatologia observada na planta. Inicialmente, afirmava-se que os sintomas apareciam exclusivamente em resposta ao estresse hídrico gerado pela oclusão dos vasos com os grumos celulares do fitopatógeno (Purcell e Hopkins, 1996). Os sintomas exacerbados

durante o verão, justamente quando a planta necessita de maior quantidade de água nas folhas e frutos, reforçava esta teoria. Acreditava-se inclusive que a planta formasse tiloses nos vasos e secretasse géis contendo polissacarídeos como resposta à infecção, piorando o quadro de oclusão (Chatterjee *et al.*, 2008a). Entretanto, estudos em videiras sugerem que os sintomas de estresse hídrico nesta planta são diferentes daqueles ocasionados pela infecção por *X. fastidiosa* (Thorne *et al.*, 2006).

Outras hipóteses propostas para a explicação dos sintomas causados pela infecção por este patógeno incluem a produção de fitotoxinas e o sequestro de nutrientes, particularmente cálcio, magnésio e zinco, atraídos pela alta densidade de cargas negativas presente nos agregados bacterianos (Simpson *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2002).

1.1.4. Mecanismos de virulência e patogenicidade

Os estudos dos mecanismos de patogenicidade e virulência de *X. fastidiosa* apontam a formação do biofilme como um passo fundamental para o estabelecimento da infecção e o consequente desenvolvimento da doença (Figura 3) (McElrone *et al.*, 2001; McElrone *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Scarpari *et al.*, 2003; Osiro *et al.*, 2004; Guilhabert e Kirkpatrick, 2005; Chatterjee *et al.*, 2008b). Entretanto, análises *in silico* do repertório de genes das várias cepas deste fitopatógeno com genomas já sequenciados, além de estudos de expressão global, evidenciaram mecanismos adicionais potencialmente envolvidos na patogenicidade, virulência, competição e sobrevivência da bactéria nos nichos que habita. Dentre eles, temos (1) a movimentação da bactéria ao longo do xilema e através do aparato bucal do inseto graças à motilidade do tipo *twitching* realizada com os *pili* longos (tipo IV) codificados no genoma (Meng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008a; De La Fuente *et al.*, 2008); (2) a migração da bactéria entre os vasos do xilema, proporcionada pela expressão de celulasas e hemicelulasas, as quais degradariam as regiões de pontuações de membrana que comunicam vasos adjacentes (Newman *et al.*, 2003; Scarpari *et al.*, 2003; Koide *et al.*, 2006; Roper *et al.*, 2007; Warren e Kirkpatrick, 2009); (3) a captação de metais de transição, ocasionando a depleção destes no xilema de plantas infectadas

Por Elliot Watanabe Kitajima, ESALQ-USP.

Fonte: Almeida e Purcell (2006).

Figura 3: Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *X. fastidiosa* formados nos hospedeiros. Biofilme desorganizado no xilema de uma folha de laranjeira doce infectada (à esquerda); biofilme com células polarizadas, na porção anterior do sistema digestório de cigarrinha contaminada (à direita).

(Meidanis *et al.*, 2002; Silva-Stenico *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008); (4) mudanças fenotípicas na adesão da bactéria por modulação de adesinas fimbriais e afimbriais, que facilitariam sua transmissão pelo vetor ou sua disseminação pelo hospedeiro vegetal (Guilhabert e Kirkpatrick, 2005; Killiny e Almeida, 2008; Killiny e Almeida, 2009b, a); e finalmente (5), a secreção de toxinas, tais como as bacteriocinas, que de alguma forma proporcionariam a sobrevivência da bactéria no xilema (Meidanis *et al.*, 2002; Koide *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005; Pashalidis *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008).

1.2. Bacteriocinas

Dentre os compostos de defesa sintetizados pelos procariontes, que incluem os antibióticos clássicos de amplo espectro de ação, exotoxinas, enzimas líticas e metabólitos secundários secretados, as bacteriocinas se destacam pela sua diversidade natural e presença em virtualmente todas as espécies dos domínios Bacteria e Archaea estudadas até o momento (Riley e Wertz, 2002). Dezenas ou centenas de diferentes bacteriocinas podem ser

produzidas pela mesma espécie bacteriana (Riley, 2011), apresentando diferentes tamanhos, alvos, modos de ação e mecanismos de imunidade. Sintetizadas via ribossomo e podendo sofrer modificações pós-traducionais, as bacteriocinas são geralmente efetivas contra cepas filogeneticamente próximas ou que habitam o mesmo nicho do produtor, onde a competição é grande pela exigência nutricional semelhante entre as espécies da microbiota (Riley e Chavan, 2007). O espectro de ação restrito advém da necessidade de uma proteína de membrana na célula-alvo, que geralmente é um receptor de nutrientes que a bacteriocina “parasita” para exercer seus efeitos tóxicos (Cascales *et al.*, 2007). Dentre estes, os mais frequentes são aqueles utilizados por bacteriófagos, antibióticos, sideróforos e vitamina B12 (Vassiliadis *et al.*, 2011).

Com a crescente verificação de resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, grandes esforços têm sido dirigidos à exploração das bacteriocinas, desde seu potencial como medicação complementar ou substituta aos antibióticos tradicionais, até o seu uso na conservação de alimentos, e ainda a utilização de cepas bacteriocinogênicas como probióticos e no biocontrole de fungos e fitopatógenos (Gordon *et al.*, 2007).

De acordo com estimativas da indústria farmacêutica, aproximadamente 7 milhões de compostos são testados para o rendimento de apenas um antibiótico de uso clínico, cujo tempo de desenvolvimento, desde a triagem dos compostos até a aprovação de uma única droga, está entre 10 e 25 anos, custando mais de US\$ 500 milhões até a sua chegada às prateleiras. Ainda que milhares de antibióticos sejam conhecidos, menos de 1% pode ser aplicado eficientemente, principalmente por efeitos tóxicos ao hospedeiro ou por serem incapazes de entrar no patógeno e exercer sua ação, além daqueles produzidos em concentrações tão baixas que não são detectados pelos métodos de *screening* tradicionais (Madigan *et al.*, 2011).

Além do potencial uso como antibióticos alternativos (Sang e Blecha, 2008), as bacteriocinas já foram estabelecidas como moléculas efetoras na competitividade bacteriana. Através de uma série de estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* ficou evidente que estas proteínas participam de interações dinâmicas que atuam em comunidades e populações e que, juntamente com outros fatores, determinam a composição e a frequência das espécies ali contidas (Riley, 2011).

1.2.1. Diversidade e virulência promovidas pelas bacteriocinas

As bactérias competem entre si por nutrientes e pelo espaço em um determinado nicho, e para isso fazem uso de uma verdadeira "armaria biológica". Dada a frequência e diversidade de produção que foram encontradas em populações naturais, pensa-se que as bacteriocinas sejam responsáveis por uma grande fatia deste arsenal. Estudos com *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* revelaram que suas bacteriocinas são encontradas na frequência de 3 a 26% dos isolados, enquanto que para *Pseudomonas aeruginosa* mais de 90% produziam bacteriocinas (Riley, 2011).

Ao contrário do que a função antibiótica parece sugerir, a produção das bacteriocinas promove diversidade em determinados ambientes (Czárán *et al.*, 2002), tanto ao nível de população (dentro de espécies), quanto de comunidade (entre espécies) (Rebuffat, 2011b). Quando consideramos uma espécie em cultura líquida *in vitro* apenas um fenótipo é detectado graças a estrutura espacial indeterminada do cultivo. Mas estudos recentes mostram a existência de ao menos três fenótipos da mesma linhagem de *E. coli* quando *in natura* ou em meio sólido – ambientes ditos estruturados. Nestes, são encontradas células bacteriocinogênicas, sensíveis e resistentes. A coexistência destes fenótipos lembra o clássico jogo de tesoura, pedra e papel, onde (1) a célula bacteriocinogênica vence a sensível, dada a atividade tóxica sobre a última; (2) a sensível vence a resistente, porque apenas esta última precisa arcar com os custos da produção da antitoxina; (3) a resistente ganha da bacteriocinogênica, porque esta tem o dispêndio metabólico da produção da toxina, além da antitoxina. Observa-se experimentalmente que existe uma espécie de equilíbrio dinâmico entre os fenótipos em um ambiente estruturado (Kirkup e Riley, 2004).

A variação fenotípica não aparece em ambientes desestruturados porque, por exemplo, um pequeno número de células bacteriocinogênicas não conseguiria invadir uma população estabelecida de células sensíveis, já que os produtores pagam um preço pela produção da toxina, enquanto que os benefícios obtidos (gerados pelas células aniquiladas) são distribuídos de forma randômica (Durrett e Levin, 1997). Por outro lado, em um ambiente estruturado, como numa placa de meio sólido, uma pequena população de células produtoras

de toxinas poderia se estabelecer como dominante, já que as linhagens crescem em colônias separadas e a toxina se difundiria da colônia produtora para uma próxima que seja sensível, e os recursos disponibilizados pela morte de algumas células ficariam disponíveis para as produtoras, estruturalmente mais próximas (Riley, 2011).

Além de que a diversidade fenotípica, de forma geral, seja um fator importante para a sobrevivência de uma determinada linhagem perante variações ambientais (Veening *et al.*, 2008), a produção de bacteriocinas já ficou estabelecida como relevante fator na invasão de nichos, não apenas no quesito “obtenção de nutrientes” (Brown *et al.*, 2009), ao contrário do que se pensava anteriormente (Riley e Gordon, 1992).

Além de sua relevância em infecções em mamíferos (Padilla *et al.*, 2004; Cascales *et al.*, 2007; Gillor *et al.*, 2009; Inglis *et al.*, 2009; Smajs *et al.*, 2010), temos relatos da importância das bacteriocinas em linhagens presentes em plantas. Uma cepa de *Agrobacterium radiobacter* que produz a agrocina 84 é utilizada como agente de biocontrole contra a “galha da coroa”, a doença causada por cepas virulentas de *Agrobacterium* em algumas dicotiledôneas (Penyalver e Lopez, 1999). Outro exemplo é uma cepa de *Rhizobium etli* produzindo a bacteriocina trifolitoxina, o que fez o micro-organismo exibir no campo uma maior ocupação dos nódulos da planta, órgãos onde ocorre a fixação simbiótica de nitrogênio (Robledo *et al.*, 1998). A aparente abundância de genes de bacteriocinas em gamaproteobactérias sugere que essas toxinas sejam efetivas na competição em determinados nichos (Parret e De Mot, 2002).

Também já foi observada uma bacteriocina produzida por *Erwinia herbicola* que é ativa contra o fitopatógeno generalista *E. carotovora*. Esta bactéria, por sua vez, produz pelo menos três bacteriocinas com atividade contra outras cepas da mesma espécie (Chuang *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2007; Roh *et al.*, 2010). Ainda, *Xanthomonas perforans* produz uma bacteriocina que afeta o crescimento de *X. euvesicatoria*, um patógeno de tomateiros (Hert *et al.*, 2005; Hert *et al.*, 2009). Outros exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas incluem a glicinecina, produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Heu *et al.*, 2001), e a ipomicina, por *Streptomyces ipomoea* (Zhang *et al.*, 2003).

1.2.2. Classificação das bacteriocinas e mecanismos gerais

Por razões históricas e econômicas, as bacteriocinas mais estudadas são os lantibióticos de bactérias produtoras de ácido láctico (LAB, *latic acid bacteria*) e as colicinas de enterobactérias (Rebuffat, 2011a). Mas uma heterogeneidade de moléculas com diferentes tamanhos, características bioquímicas, alvos microbianos, modos de ação, mecanismos de imunidade e translocação compõem a família das bacteriocinas. Mesmo com tamanha variabilidade, os mecanismos de ação mais comuns incluem a despolarização da membrana e a degradação de material nucleico (DNA ou RNA) dos alvos (Cascales *et al.*, 2007).

As bacteriocinas são inicialmente divididas entre aquelas produzidas por Gram-positivas e Gram-negativas (Tabelas 1 e 2), sendo que as subdivisões são constantemente aprimoradas enquanto mais estudos são descritos. A forma de categorizá-las também difere: aquelas produzidas por Gram-positivas são divididas de acordo com características estruturais das toxinas, enquanto que as oriundas de Gram-negativas são classificadas funcionalmente, de acordo com a maquinaria de importação e modo de ação na célula-alvo.

Excelentes revisões para os grupos de bacteriocinas podem ser encontradas na literatura (Braun *et al.*, 2002; Pons *et al.*, 2002a; Chatterjee *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Cascales *et al.*, 2007; Duquesne *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007; Oppegard *et al.*, 2007; Willey e van der Donk, 2007; Bierbaum e Sahl, 2009; Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

1.2.3. Microcinas de Classe II em *X. fastidiosa*

Tais como as bacteriocinas em geral, as microcinas são moléculas mediadoras das interações intra e interespecíficas que mantêm a diversidade e a estabilidade de comunidades microbianas (Rebuffat, 2011b). Elas constituem uma classe de bacteriocinas com massa molecular inferior a 10 kDa, com poucos representantes descritos, produzidos por espécies das Enterobacteriaceae quando as células são submetidas a estresses ou carência nutricional (Duquesne *et al.*, 2007), sendo proteínas geralmente resistentes a degradação e extremos de pH e temperatura, contendo ou não modificações pós-traducionais (Rebuffat, 2011a). As concentrações inibitórias mínimas das microcinas de enterobactérias frequentemente são abaixo de 0,1 μ M, o que as torna toxinas muito potentes (Vassiliadis *et al.*, 2011).

Tabela 1. Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.

Classe	Subclasses e características	Exemplos
I. Proteínas com modificações pós-traducionais	Ia. Lantibióticos Contêm os aminoácidos modificados lantionina ou metil-lantionina ou ainda outros desidrogenados, <5 kDa. São subdivididos em ainda 12 subclasses. Frequentemente possuem sequência sinal de dupla glicina.	Nisina A (<i>Lactococcus lactis</i>), subtilina (<i>Bacillus subtilis</i>), epidermina (<i>Staphylococcus epidermidis</i>), mutacina II (<i>Streptococcus mutans</i>), mersacidina (<i>Bacillus sp.</i>).
	Ib. Labirintopeptinas Contêm labionina, um aminoácido cíclico.	Labirintopeptinas A1, A2 (<i>Actinomadura namibiensis</i>).
	Ic. Sactibióticos Seus resíduos de aminoácidos fazem uma ligação incomum do enxofre das cisteínas ao carbono alfa das fenilalaninas ou treoninas.	Subtilosina A (<i>Bacillus subtilis</i>), turicina CD (<i>Bacillus thuringiensis</i>).
II. Proteínas sem modificações	IIa. Tipo pediocina Possuem atividade anti- <i>Listeria</i> . Contêm o box pediocina (YGNGVXCXK/NXXC). Possuem sequência sinal dupla glicina no pró-peptídeo.	Carnobacteriocina B2 (<i>Carnobacterium piscicola</i>), curvacina A (<i>Lactobacillus curvatus</i>), leucocina A (<i>Leuconostoc gelidum</i>), enterocina A (<i>Enterococcus faecium</i>).
	IIb. Bacteriocinas de dois peptídeos Os componentes sozinhos não possuem atividade, mas em conjunto se ligam à membrana do alvo e despolarizam-no.	Termofilina 13 (<i>Streptococcus thermophilus</i>), plantaricina S (<i>Lactobacillus plantarum</i>), lactococinas G, Q (<i>Lactococcus lactis</i>).
	IIc. Circulares Termoestáveis, resistentes a proteases, anti- <i>Listeria</i> .	Carnociclina A (<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>), gassericina A (<i>Lactobacillus gasseri</i>).
	IIId. Outras Lineares, não parecidas com pediocina e de apenas um peptídeo, sem modificações.	Lactococina A (<i>Lactococcus lactis</i>).

Fonte: Rea *et al.* (2011).

Tabela 2. Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas.

Classe	Características e subclasses	Exemplos
Bacteriocinas de alta massa molecular	<p>Massa molecular até 80 kDa, relacionadas ao sistema de reparo SOS. Sua produção frequentemente requer a lise da célula para liberação das toxinas.</p> <p>Classe A. Translocação via sistema Tol (TolA, TolB, TolQ, TolR). Codificadas em plasmídeos pequenos.</p>	<p>Colicinas A, K (<i>Escherichia coli</i>), alveicina A, B (<i>Hafnia alvei</i>).</p>
	<p>Classe B. Translocação via sistema TonB/ExbB/ExbD. Codificadas em plasmídeos grandes.</p>	<p>Colicinas B, Ia, Ib (<i>E. coli</i>), pesticina (<i>Yersinia pestis</i>).</p>
Microcinas	<p>Massa molecular <10 kDa, sua síntese não é relacionada com o sistema SOS, e sua produção não requer a lise da célula produtora. Resistentes a proteases, pHs e temperaturas extremos.</p>	
	<p>Classe I. Massa molecular <5 kDa, com modificações pós-traducionais e alvos intracelulares.</p>	<p>Microcinas B17, C7, J25 (<i>E. coli</i>).</p>
	<p>Classe II. Massa molecular entre 5 e 10 kDa. Geralmente afetam a membrana do alvo e são proteínas negativamente carregadas. Possuem sequência sinal contendo duas glicinas e possivelmente uma ponte dissulfeto.</p>	
	<p>Classe IIa. Sem modificações pós-traducionais.</p> <p>Classe IIb. Sofre adição pós-traducional de um sideróforo.</p>	<p>Microcinas V, L, 24 (<i>E. coli</i>).</p> <p>Microcinas E492 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>), M, H47 (<i>E. coli</i>).</p>

Fonte: informações compiladas de Cascales *et al.* (2007) e Rebuffat (2011a).

O sequenciamento do genoma de *X. fastidiosa* (cepa 9a5c) revelou a existência de três genes cromossomais parálogos que codificam proteínas similares à microcina V de *E. coli*: CDS (*Coding Sequences*) XF0262, XF0263 e XF0264 (Simpson *et al.*, 2000; Van Sluys *et al.*, 2003; Pashalidis *et al.*, 2005) (Figura 4).

Enquanto que em *E. coli* os genes de produção da microcina V estão agrupados em dois operons contidos no plasmídeo pColV (Boyer e Tai, 1998), os genes necessários para a produção e a secreção das microcinas de *X. fastidiosa* estão presentes de forma distribuída pelo cromossomo (Simpson *et al.*, 2000; Van Sluys *et al.*, 2003; Pashalidis *et al.*, 2005). Os componentes da maquinaria de exportação de *X. fastidiosa* 9a5c são codificados pelas CDS XF1216, XF1220 e XF2586, cujas proteínas deduzidas apresentam similaridade com CvaA, CvaB e TolC de *E. coli*, respectivamente (Figura 5). CvaB é o transportador ABC (*ATP-binding cassette*) presente na membrana interna da bactéria, possivelmente responsável por reconhecer e clivar as pró-bacteriocinas, enquanto TolC é um transportador geral da membrana externa, conectado a CvaB pela proteína de interação CvaA (Cascales *et al.*, 2007).

Além dos genes que codificam os componentes do transportador, o genoma de *X. fastidiosa* apresenta genes com similaridade à *cvpA* e *cvi* de *E. coli*, sendo este o que possivelmente codifica a proteína que confere imunidade ao produtor (Boyer e Tai, 1998; Pashalidis *et al.*, 2005), e aquele com função desconhecida mas necessário à produção e secreção das toxinas putativas (Gerard *et al.*, 2005).

Não se sabe se os mecanismos de internalização e de secreção das microcinas tipo V de *X. fastidiosa* acontecem da mesma forma que em *E. coli*. De toda forma, para a enterobactéria, a ação da microcina V inclui seu reconhecimento por um receptor de sideróforos TonB-dependente denominado Cir, que se encontra na membrana das células-alvo. A proteína de membrana SdaC, envolvida na internalização de serina, também participa do processo, ainda que seu papel não esteja elucidado (Vassiliadis *et al.*, 2011). Ligada à célula-alvo, a toxina deve sofrer uma série de mudanças conformacionais até que o poro na membrana seja formado, causando a despolarização e inviabilidade da célula.

```

XF0262  MRELTLTEIDNVSGADLGSRLSAAIVGGVAAFFAGSIWGGTRGGDGGGILGVGSIGQG-V 59
XF0264  MRELTSIEMNNVSGGDFATRLEASIVGGIAAFFAGSIWGGTRGGDGGGVLGIGSIGQG-V 59
XF0263  MRELTSIEMNNVSGGDLATRIEASIVFGVSAFFAGSIWGGTRGGDGGGILGVGSIAQG-V 59
MccV    MRTLTLLNELDSVSGGASGRDIAMAIGTLSGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHKPNP 60

```

** ** *:..***. . : :* . *.***. *: * **: . . * :


```

XF0262  GMVYGGIAGAIGGAIAGFVLDDKVIYSYTNMGFMSSIFNGTFAK--- 102
XF0264  GMVYGGIAGAIGGAIAGCFVLDDKVTYSYTTGFMNSLFSGNFAK--- 102
XF0263  GMVYGGIVGGIGGLIAGFVLDDKNVTYNYAVGFYNSLFNGTFTK--- 102
MccV    AMSPSGLGGTIKQKPEGIPSEA---WNYAAGRLCNWSPNNLSDVCL 103

```

. * .*: * * : : :*: * . .:..

Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos da microcina V de *E. coli* e das 3 microcinas de *X. fastidiosa* similares àquela. As CDS XF0262 e XF0263 estão anotadas no genoma de *X. fastidiosa* cepa 9a5c como precursores de microcina-V e a CDS XF0264 está anotada como proteína hipotética (Simpson *et al.*, 2000). MccV de *E. coli* foi recuperada do GenBank sob código de acesso CAQ87179. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW. (*) indica resíduos idênticos, (:) indica substituição conservativa e (.) indica substituição semi-conservativa. A caixa destaca o peptídeo sinal de exportação de bacteriocinas.

Figura 5: Provável sistema de processamento e exportação de microcinas em *X. fastidiosa*, a partir de semelhanças com o sistema de produção de microcina V de *E. coli*. Esquema adaptado de Pashalidis *et al.* (2005).

De uma forma ou outra, as microcinas da Classe II contêm uma mescla de características entre as encontradas nos lantibióticos, produzidos pelas bactérias produtoras de ácido láctico, e nas colicinas, produzidas por *E. coli*. Sequências sinalizadoras de clivagem e exportação aparecem na porção N-terminal das proteínas precursoras, sendo a mais comum a sequência sinal com duas glicinas (M[R/K]ELXXE[I/L]XX[I/V]XG[G/A]), que aparece não só nas microcinas de Classe II, mas também em lantibióticos e bacteriocinas similares às pediocinas, de Gram-positivas (Michiels *et al.*, 2001; Rebuffat, 2011b).

A função regulatória de peptídeos contendo esta sequência sinal em proteínas de bactérias Gram-positivas traz implicações curiosas para a comunicação celular em bactérias Gram-negativas. É bem descrito na literatura que a síntese de bacteriocinas só se inicia a partir de uma densidade celular mínima nas bactérias produtoras de ácido láctico, de forma que a concentração da toxina seja suficiente para exercer seus efeitos. Este processo é sinalizado por peptídeos autoindutores que possuem características bioquímicas das microcinas de Classe II, além da mesma sequência sinal de dupla glicina quando em sua forma precursora. Um exemplo é o feromônio de competência de *Streptococcus pneumoniae* (Michiels *et al.*, 2001). Ainda que para as bactérias Gram-negativas esteja bem estabelecida a comunicação célula-célula através de acil-homoserina lactonas (AHL) e de fatores difusíveis de sinalização (DSF, *diffusible signaling factors*), a possibilidade de os peptídeos similares às bacteriocinas atuarem no mecanismo de percepção de *Quorum* (*Quorum sensing*), como acontece em Gram-positivas, não pode ser excluída. Além do mais, o mesmo transportador que realiza o processamento e a exportação dos peptídeos, sejam microcinas ou autoindutores, já foram encontrados em várias espécies de Gram-negativas, incluindo *X. fastidiosa* – a proteína CvaB (Dirix *et al.*, 2004).

Seja qual for sua função, a suposição de que a produção de bacteriocinas participe dos mecanismos de colonização e patogenicidade em hospedeiros suscetíveis faz do seu estudo uma abordagem promissora para auxiliar no entendimento e no controle das doenças causadas em plantas. Como acontece com outras bactérias, é plausível esperar que a produção de bacteriocinas constitua uma estratégia importante para a sobrevivência de *X. fastidiosa* no hospedeiro vegetal ou no inseto, assegurando a colonização e sua perpetuação. Postulamos também que um verdadeiro arsenal de bacteriocinas esteja presente no genoma

das diversas cepas de *X. fastidiosa*, tomando como referência a observação de que mais de 30 bacteriocinas já foram detectadas em diferentes combinações nos isolados estudados de *E. coli* (Gordon e O'Brien, 2006). Além disso, já foram detectadas espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* e *Curtobacterium* co-habitando o xilema de citros com *X. fastidiosa* (Araujo *et al.*, 2002) e o aparelho bucal da cigarrinha (Lacava *et al.*, 2007), porém o grau e os mecanismos de interação destas microbiotas com *X. fastidiosa* ainda são desconhecidos.

2. Objetivos

O intuito deste trabalho é iniciar a caracterização bioquímica e funcional das bacteriocinas produzidas por *Xylella fastidiosa*. Para isso, buscamos:

- Varrer o genoma deste fitopatógeno em busca de sequências relacionadas à síntese desta classe de antibióticos, utilizando ferramentas de bioinformática.
- Definir, através de genômica comparativa, o arsenal de bacteriocinas de cada cepa com genoma conhecido.
- Inspeccionar computacionalmente a região promotora dos genes das bacteriocinas putativas de uma cepa quanto à existência de possíveis motivos que sugiram um modo de regulação da expressão destes genes.
- Estudar a regulação da expressão das bacteriocinas propostas de forma a definir quando ou como estes genes são importantes para a fisiologia da bactéria perante estresses, fazendo uso de PCR quantitativa ou semi-quantitativa precedida por Transcrição Reversa (RT-qPCR ou RT-PCR, respectivamente), em duas cepas de *X. fastidiosa* – uma virulenta e outra avirulenta para citros – submetidas a choque térmico e à carência ou excesso de ferro.
- Detectar bacteriocinas no sobrenadante de cultura ou no extrato celular de *X. fastidiosa* crescida em meio mínimo através de sequenciamento de polipeptídeos por espectrometria de massas.

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Análises *in silico* do genoma de *X. fastidiosa*

3.1.1. Predição de genes codificadores de bacteriocinas

As CDS preditas no cromossomo e nos plasmídeos pXF1.3 e pXF51 de *X. fastidiosa* cepa 9a5c (Simpson *et al.*, 2000) (códigos de acesso no NCBI, respectivamente, NC_002488, NC_002489 e NC_002490) foram analisadas pelas ferramentas Bagel (de Jong *et al.*, 2006), utilizando-se parâmetros *default*, com tamanho máximo das proteínas analisadas ajustado em 105 aminoácidos, e Bagel2 (de Jong *et al.*, 2010), na busca de produtos gênicos potencialmente envolvidos com a produção de bacteriocinas. Os candidatos foram verificados computacionalmente quanto à possibilidade de se encontrarem em operons através da ferramenta DOOR v2.0 (Dam *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2009), levando em conta a anotação do genoma de 9a5c disponível no NCBI. Inspeção manual foi realizada no genoma de 9a5c reanotado nos servidores RAST (Aziz *et al.*, 2008) e IMG/ER (Markowitz *et al.*, 2009). O fluxograma que descreve a varredura encontra-se na Figura 6.

Figura 6: Representação das análises bioinformáticas realizadas na varredura pelas bacteriocinas no genoma de *X. fastidiosa*.

3.1.2. Análise das regiões promotoras dos genes das bacteriocinas putativas

Um motivo superrepresentado nos promotores de genes das bacteriocinas putativas foi definido e buscado nos demais promotores gênicos de *X. fastidiosa*, com o intuito de descrevermos um regulon putativo de genes coregulados com as bacteriocinas. Os promotores dos genes de bacteriocinas da cepa 9a5c foram analisados com a ferramenta MEME v4.6.1 (Bailey e Elkan, 1994) e fixados arbitrariamente como sendo a região de até 350 pb (pares de base) à montante em relação ao códon de iniciação predito, com tamanho mínimo fixado em 50 pb. Caso a região intergênica entre o gene de bacteriocina e o gene vizinho fosse menor do que 350 pb, a região promotora foi definida como a sequência entre os genes. A ferramenta foi configurada para identificar em ambas as fitas motivos comuns ou não a todos os promotores, de tamanho entre 8 e 30 pb. O motivo mais significativo gerado na análise com o MEME foi utilizado para varrer os promotores das unidades transcricionais de 9a5c (conforme predito pelo programa DOOR v2.0) com a ferramenta MAST v4.6.1 (Bailey e Gribskov, 1998), na busca de um regulon putativo. Como controle negativo desta análise, as regiões codificantes de proteínas, excluindo-se as de proteínas hipotéticas, foram varridas na busca de instâncias do motivo selecionado.

3.1.3. Genômica comparativa

Análises comparativas *in silico* dos grupos de bacteriocinas preditas no genoma de *X. fastidiosa* cepa 9a5c foram realizadas com as demais cepas deste fitopatógeno com genomas sequenciados até o presente (genomas publicamente disponíveis no NCBI e recentemente sequenciados em nosso grupo de pesquisa, Tabela 3). As análises comparativas foram baseadas tanto em anotações de genomas publicamente disponíveis como na reanotação de todos os genomas de *X. fastidiosa* realizada nos servidores RAST e IMG/ER e ainda de uso restrito ao nosso grupo de pesquisa. A presença de proteínas hipotéticas contendo sequência sinal de bacteriocinas permitiu definir o arsenal próprio de cada cepa, tomando as cepas 9a5c e J1a12 como referência.

Tabela 3. Genomas utilizados nas análises *in silico*.

Norte-Americanas								Sul-Americanas						
Cepas	Dixon	Ann1	M23	M12	Temecula1	EB92-1	GB514	9a5c	J1a12	U24d	3124	Fb7	Pr8x	Hib4
Código de acesso NCBI	NC_002723	NC_002722	NC_010577.1	NC_010513.1	NC_004556.1	AFDJ 00000000	NC_017562.1	NC_002488.3	#	#	#	#	#	#
Origem	Amendoeira	Espirradeira	Amendoeira	Amendoeira	Videira	Sabugueiro	Videira	Laranjeira	Laranjeira	Laranjeira	Cafeeiro	Laranjeira	Ameixeira	Hibisco
Local do isolamento	Coleção da Universidade da Califórnia (Berkeley)	Coleção da Universidade da Califórnia (Berkeley)	Califórnia, EUA	Califórnia, EUA	Califórnia, EUA	Virgínia, EUA	Texas, EUA	São Paulo, BR	São Paulo, BR	São Paulo, BR	São Paulo, BR	Corrientes, AR	São Paulo, BR	São Paulo, BR
Doença causada	Escaldadura da folha da amendoeira	Escaldadura da folha da espirradeira	Escaldadura da folha da amendoeira	Escaldadura da folha da amendoeira	Doença de Pierce	Não-virulenta*	Doença de Pierce	Clorose Variegada do Citros	Não-virulenta**	Clorose Variegada do Citros	Escaldadura da folha do cafeeiro	Clorose Variegada do Citros	Escaldadura da folha da ameixeira	Escaldadura da folha do hibisco
Referência	Bhattacharyya <i>et al.</i> (2002)	Bhattacharyya <i>et al.</i> (2002)	Chen <i>et al.</i> (2010)	Chen <i>et al.</i> (2010)	Van Sluys <i>et al.</i> (2003)	Zhang <i>et al.</i> (2011)	Schreiber <i>et al.</i> (2010)	Simpson <i>et al.</i> (2000)	Pierry (2012)	Santana (2012)	Santana (2012)	Santana (2012)	Pierry (2012)	Pierry (2012)

Anotação ainda não está publicamente disponível (Pierry, 2012; Santana, 2012).

* EB92-1 é utilizada no biocontrole da Doença de Pierce (Zhang *et al.*, 2011).

** J1a12 foi originalmente isolada de plantas com CVC, porém posteriormente demonstrada como cepa não-virulenta em citros (Koide *et al.*, 2004).

Para definir a presença de um gene nas cepas analisadas, levamos em consideração, arbitrariamente, similaridades superiores a 90% com as respectivas sequências proteicas preditas em 9a5c ou J1a12. Além disso, os genomas foram varridos em busca das proteínas responsáveis pela maturação e exportação das pró-bacteriocinas, XF1948/cvpA, XF1216/cvaA e XF1220/cvaB, previamente anotadas no genoma da cepa 9a5c (Simpson *et al.*, 2000).

3.2. Validação da presença de genes de bacteriocinas nos diferentes genomas de *X. fastidiosa*

3.2.1. Cepas e condições de cultivo

As cepas 9a5c (Li *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2000) e J1a12 (Monteiro *et al.*, 2001; Koide *et al.*, 2004) de *X. fastidiosa* foram cedidas pelo Fundecitrus (Araraquara, SP). As cepas U24d, Fb7, 3124, Hib4 e Pr8x foram cedidas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira (Cordeirópolis, SP). O cultivo destas cepas foi realizado a 28°C por 7 dias com agitação orbital de 100 rpm em meio PW líquido (Davis *et al.*, 1981) contendo glicose (PWG), que consiste em fitona peptona 4 g/L; peptona de caseína com digestão trípica 1 g/L; cloreto de hemina 0,001%; K₂HPO₄ 1,2 g/L; KH₂PO₄ 1 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,4 g/L; glutamina 0,4% e glicose 0,5%.

Estoques de células foram mantidos em PWG contendo 50% de glicerol em freezer a -80°C. A manutenção das culturas foi feita em placas de meio PWG-água com repiques semanais e incubação a 28°C, sendo o número de passagens controlado. Após 30 passagens, novos cultivos foram iniciados a partir de estoques congelados a -80°C.

A autenticidade das cepas utilizadas neste trabalho foi periodicamente verificada por genotipagem em reações de PCR utilizando conjuntos de oligonucleotídeos específicos (Koide *et al.*, 2004; Pierry, 2012; Santana, 2012).

3.2.2. Isolamento de DNA genômico

Para extração de DNA das cepas utilizamos o “Wizard Genomic DNA Kit” (Promega), seguindo-se o protocolo padrão do fabricante, com o volume de solução de lise das células aumentado em 6 vezes o valor recomendado para garantir completa desconstrução do biofilme produzido por *X. fastidiosa*.

3.2.3. Reações de PCR e sequenciamento

Os grupos de genes de bacteriocinas preditos *in silico* nos novos genomas sequenciados em nosso grupo foram verificados por PCR utilizando-se DNA genômico das respectivas cepas. Os oligonucleotídeos foram planejados para anelarem em regiões conservadas entre as cepas, à montante e à jusante da região contendo o grupo de genes preditos. A sequência de oligonucleotídeos e o tamanho dos amplicons esperados para as cepas constam na Tabela 4. Para os ensaios de PCR, 100 ng de DNA isolado das cepas de interesse foram misturados com 1 µL de solução de dNTPs 10 mM (Prodinol), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 5 µL de tampão 10x da Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1 µL de cada oligonucleotídeo na concentração de 10 pmol/µL e água MilliQ estéril para o volume final da reação de 50 µL. As reações para os grupos II, III e IV foram submetidas à desnaturação a 95°C por 5 min e a 30 ciclos de 95°C por 45 seg, 60°C por 45 seg, 72°C por 4 min. Para o grupo I, as reações foram submetidas à desnaturação a 95°C por 5 min e a 30 ciclos de 95°C por 45 seg e 72°C por 4 min, uma vez que devido ao baixo conteúdo GC e grande número de repetições nesta região, foram planejados oligonucleotídeos mais longos e com temperatura de anelamento de 72°C. Ao final destes ciclos, as reações foram incubadas a 72°C por 10 min e armazenadas a 4°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose 1%. O controle da reação de PCR foi realizado substituindo-se a quantidade de DNA molde por água mili-Q. As PCRs foram realizadas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e os produtos obtidos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% e, em alguns casos, sequenciamento de DNA, como descrito a seguir.

Tabela 4. Lista dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

	Genes parcial ou totalmente incluídos no amplicon	Oligonucleotídeo direto (5' – 3')	Oligonucleotídeo reverso (5' – 3')	Tamanho do amplicon esperado (pb)						
				9a5c	J1a12	U24d	3124	Pr8x	Hib4	Fb7
Grupo I	XF0261 a XF0265	GCAACAGCATCGCGGATTGTGAA	GATGGTTCAAGCCGACAGCACAACC	3395	2549	3395	2260	3457	3459	3361
Grupo II	XF1216 a XF1220	GGCACCCTCCAAATCAAACA	GGCGTTGGTAACCTTGGTAG	3674	3674	3674	3676	3676	3665	3673
Grupo III	XF1304 a XF1309	CGTGGATTTATGGATGTAGTTGAAC	GGACAGATCATTAGAAAACATACCG	3708	4296	3708	4295	3708	3678	4305
Grupo IV*	XF1693 a XF1694	GGTGGTCTTATTGCTGAAGTACC	ACCACCTACCGTACCCAGAG	298	298	298	-	-	-	298

* Região de profago ausente em algumas cepas.

Os Grupos I e III de J1a12 foram sequenciados pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) utilizando *Big Dye Terminator Mix* (Perkin Elmer) e o aparelho ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) no serviço de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. No sequenciamento dos amplicons do Grupo I foram utilizados os oligonucleotídeos XF0261SEQ_F (5'-GGGTATTAGGTTCTCTTGGTCG-3') e XF0265SEQ_R (5'-ATGCTTCAACAGCGACATGA-3'). No sequenciamento dos amplicons do Grupo II, apenas seus 2 kpb (kilo pares de base) iniciais – região onde se encontram as bacteriocinas – foram sequenciados com o oligo direto deste Grupo (Tabela 4) e ainda com J1peg1332F (5'-TACCGTCTTTCGTTGGTTTACAG-3') e J1peg1332R (5'-GCCGCAATCACTTTACTAGCC-3'), planejados a partir da região interna destes 2 kpb.

3.3. Análise de expressão de genes de bacteriocinas em 9a5c e J1a12

3.3.1. Cepas e condições de cultivo

As cepas 9a5c (Li *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2000) e J1a12 (Monteiro *et al.*, 2001; Koide *et al.*, 2004) de *X. fastidiosa* foram crescidas a 28°C em meio PWG líquido (item 3.2.1), com agitação a 100 rpm. Para cepa 9a5c, culturas de 7 dias tiveram seu volume dobrado com a adição de meio estéril e incubadas por mais 2 dias. Para cepa J1a12, as culturas foram crescidas por 3,5 dias. As culturas assim obtidas foram submetidas aos tratamentos indicados (choque térmico ou exposição a carência ou excesso de ferro) e em seguida o RNA total foi extraído.

Em alguns experimentos, as cepas foram cultivadas por 4, 5 ou 7 dias em meio PIM-6, um novo meio de cultivo recentemente desenvolvido para *X. fastidiosa* e que mimetiza a seiva do xilema (Michele Igo, University of California, Davis, dados não publicados).

As culturas de J1a12 e 9a5c foram submetidas a estresses como choque térmico e alta e baixa concentração de ferro. O choque de temperatura se deu com a incubação das culturas a 40°C por 45 min, a 150 rpm (Koide *et al.*, 2006). Excesso e carência de ferro foram atingidos com a adição de pirofosfato férrico e 2,2'-dipiridil, respectivamente, para concentrações finais de 100 µM e 200 µM por 30 minutos (Zaini *et al.*, 2008).

3.3.2. PCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR)

Para isolamento do RNA total, as culturas bacterianas foram centrifugadas em temperatura ambiente por 2 minutos a 3220 xg e o precipitado de células obtido foi homogeneizado em TRIzol (Invitrogen). Após centrifugação, de acordo com o protocolo do fabricante, a fase aquosa foi diluída em álcool 70% em 1:1, e o RNA total contido nesta solução foi isolado com o PureLink RNA Minikit (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA total foi avaliada através de visualização das bandas dos rRNAs 16S e 23S em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído, ou por eletroforese capilar no BioAnalyzer (Agilent Technologies). Absorbâncias e quantificações das preparações de RNA total foram obtidas em um espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase RQ1 RNase-free (Promega) e submetidas à transcrição reversa com SuperScript III RT (Invitrogen) e hexâmeros randômicos. Os oligonucleotídeos utilizados na PCR quantitativa foram planejados com o programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) e seis pares deles foram aleatoriamente escolhidos para otimização quanto à proporção de oligos:cDNA. Com a otimização, cada reação ficou definida para conter 50 ng de cDNA, 700 nM dos oligonucleotídeos direto e reverso (sequências mostradas na Tabela 5) e *SYBR Green Master Mix* 2x para uma reação com volume final de 20 µL.

A presença de DNA genômico residual foi checada por reações controle de amplificação contendo RNA tratado com DNase. Os ensaios de RT-PCR em tempo real foram realizados em um termociclador GeneAmp 7300 (Applied Biosystems) com o programa padrão. A especificidade das reações foi avaliada pela análise dos produtos de amplificação em eletroforese em gel de agarose e das curvas de dissociação ao final de cada ensaio de RT-qPCR. Os ensaios foram realizados em triplicata a partir de amostras de três réplicas biológicas (cultivos e tratamentos independentes de células de diversas passagens). A razão de expressão foi calculada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001), normalizada pelo gene XF2157 (*dnaQ*) (Zaini *et al.*, 2008). Os resultados obtidos foram submetidos a ANOVA de um ou dois fatores (dependendo se o gene estava presente em uma ou em ambas as cepas) e ao pós-teste de Bonferroni, no *software* GraphPad Prism v5.0.

Tabela 5. Lista de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de RT-qPCR.

	Gene de interesse	Oligonucleotídeo direto (5' – 3')	Oligonucleotídeo reverso (5' – 3')	Tamanho do amplicon
9a5c	XF0262	TGACAACGTATCCGGTGC	ACCTACAATAGCTGCGCTAAGC	55
	XF0263	GACAAAAATGTGACCTACAACCTAC	CGTTAAACAGGGAGTTATAAAATCC	55
	XF0264 *	TTCCTACACCACTGGATTTATGAA	TCGCGAAGTTACCACTAAACAG	50
	XF1217	CATCAAGCCGACACTCAATATC	GTACTTCCTGGGTGATGCTTG	59
	XF1218	GTTGCCAGACCCTGTTGTC	TCCTTAAAAATCCAGTGCCAG	77
	XF1219	GGATCAAATGTAAGCCTTCTGG	CACTTCGGACATAAAAAATCTTGG	70
	XF1219_2	GGTTGCTGCTGCGAAATTAT	GACCTATAGCCACAGCTCCAA	61
	XF1305	ACTGCTGTTTCTCAGGTGTCC	ACCCCTGATTAAAGCCCTTC	90
	XF1306 *	TACCGTCTTTCGTTGGTTTACAG	GCCGCAATCACTTTACTAGCC	90
	XF1307_2 *	TGCTGCTACTAGTTCTGCTACTCC	CAACCCCTAACACATCACTTCA	86
	XF1307_3 *	TGCGCATATTATCTGTTAGTGAGG	GATCATTACCTCCCGAAATCTCT	51
	XF1693_2	CTTGACTGGTGTGGAAGTCTG	ACAACAGCGCCTGGTACTTC	66
	XF1694	GCTGGCTACATATTCTTTGGC	ACCACCTACCGTACCCAGAG	54
J1a12⁺	mccV1 = XF0262	GAGCAAAGAGAAATTATGCGTGA	GGATACGTTGTTGATTCGGTC	54
	mccV2 = XF0263	GACAAAAATGTGACCTACAACCTAC	CGTTAAACAGGGAGTTATAAAATCC	55
	XfmA = XF1217	CATCAAGCCGACACTCAATATC	GTACTTCCTGGGTGATGCTTG	59
	XfMB = XF1218	GTTGCCAGACCCTGTTGTC	TCCTTAAAAATCCAGTGCCAG	77
	XfMC = XF1219	GGATCAAATGTAAGCCTTCTGG	CACTTCGGACATAAAAAATCTTGG	70
	XfMD = XF1219_2	GGTTGCTGCTGCGAAATTAT	GACCTATAGCCACAGCTCCAA	61
	XfME = XF1305	ACTGCTGTTTCTCAGGTGTCC	ACCCCTGATTAAAGCCCTTC	90
	XfMI *	ATTCCGTTGGATTCAGACAGT	TGTGGTAAGGCCACCACTAAATA	55
	XfMJ *	GGTGCGAGTACGAGTACGACTAT	GTCACAAGCCCACTCCAAATAC	74
	XfML *	TACCGTCTTTCGTTGGTTTACAG	GCCGCAATCACTTTACTAGCC	82
	XfMM *	TGTCAACACAGTGTTTAATTGGG	CAGACCGGTTGAAAACAATGA	61
	XfMN = XF1693_2	CTTGACTGGTGTGGAAGTCTG	ACAACAGCGCCTGGTACTTC	66
	XfMO = XF1694	GCTGGCTACATATTCTTTGGC	ACCACCTACCGTACCCAGAG	54

* Genes exclusivos da cepa.

[†] Anotação pelo servidor RAST.

3.3.3. PCR precedida de transcrição reversa (RT-PCR)

As amostras de RNA total da cepa 9a5c crescida em meio mínimo PIM-6 foram tratadas com DNase RQ1 RNase-free (Promega) e submetidas a transcrição reversa com ImProm-II RT System (Promega) e PCR utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 6. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e visualizados pela coloração com brometo de etídio. Para controle da ausência de contaminação por DNA, foram realizadas PCR com RNA total tratado com DNase.

Tabela 6. Lista de oligonucleotídeos utilizados nas análises de RT-PCR.

Grupo de bacteriocinas	Oligonucleotídeo direto (5' – 3')	Oligonucleotídeo reverso (5' – 3')	Tamanho do amplicon
Grupo II	XF1217F CATCAAGCCGACACTCAATATC	XF1219_R GACCTATAGCCACAGCTCCAA	1250
Grupo III.1	XF1305F ACTGCTGTTTCTCAGGTGTCC	XF1307_2R CAACCCCTAACACATCACTTCA	645
Grupo III.2	XF1307_2F TGCTGCTACTAGTTCTGCTACTCC	XF1307_3R GATCATTACCTCCCAGAAATCTCT	621
Grupo IV	XF1693_2F CTTGACTGGTGCTGGAAGTCTG	XF1694R ACCACCTACCGTACCCAGAG	298

3.4. Sequenciamento *shotgun* de proteínas para detecção das bacteriocinas

3.4.1. Cepas e condições de cultivo

Para ensaios de purificação e detecção de bacteriocinas em culturas de *X. fastidiosa* utilizamos culturas de 100 mL da cepa 9a5c (<15 passagens) crescida em meio mínimo PIM-6 por 4 dias a 28° C, com agitação orbital de 100 rpm.

3.4.2. Concentração e fracionamento das proteínas do sobrenatante e do extrato celular de *X. fastidiosa*

Após incubação, a cultura de 9a5c foi centrifugada a 4°C por 10 min, a 3220 xg. O precipitado celular foi congelado a -80°C e o sobrenadante novamente centrifugado e armazenado a -20°C até sua utilização.

O precipitado de células foi submetido a lise por sonicação (3 ciclos de 30 segundos de sonicação a 30% de potência com a amostra mantida em gelo, seguidos de 30 segundos de repouso) em ácido trifluoroacético aquoso (TFA) 0,05% contendo coquetel inibidor de proteases. O lisado foi submetido a cromatografia manual de fase reversa Sep-Pak C18. A coluna foi lavada com acetonitrila (ACN) 5% em TFA 0,05% e as eluições foram realizadas com frações de ACN 20%, 40%, 60% e 80% em TFA 0,05%. As amostras foram secas em *speed-vac* refrigerado e armazenadas a -20°C.

Alíquotas do sobrenadante da cultura foram concentradas em tubos de ultrafiltração Amicon Ultra (Millipore) com *cut-off* de 3 kDa para um volume final de ~100 µL. O concentrado obtido foi transferido para microtubo, seco em *speed-vac* refrigerado e armazenado a -20°C.

3.4.3. Redução, alquilação, tripsinização e dessalinização das amostras

As amostras do fracionamento do extrato celular e do sobrenatante foram reduzidas, alquiladas e tripsinizadas para análise por HPLC-MS/MS (cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa em tandem), conforme Stone e Williams (1996). Inicialmente, as amostras foram ressuspensas em NH_4HCO_3 0,4 M e uréia 8 M, quando então ditiotretol (DTT) foi adicionado à concentração final de 9 mM. Transcorridos 15 min da incubação a 50°C com DTT, iodoacetamida foi adicionada para uma concentração de 17 mM e as soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 15 min em temperatura ambiente. Seguiu-se com a diluição das amostras de modo que a concentração final de uréia ficasse 1M e tripsina (grau de sequenciamento) foi adicionada na proporção aproximada de 1:50 (massa tripsina/massa de proteína total), com incubação por 24 horas a 37°C. As reações foram

interrompidas com a adição de ácido fórmico para concentração final de 1%, e as amostras foram secas em *speed vac* refrigerado e ressuspendidas em TFA 0,05% para purificação em colunas Zip Tip C18. As minicolunas foram lavadas com TFA 0,05%, eluídas com ACN, e as amostras secas.

3.4.4. Análise dos fragmentos trípticos por HPLC-MS/MS

A análise por HPLC-MS/MS foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o equipamento de cromatografia líquida de alta performance (nanoHPLC, Acatech) acoplado *in line* a um espectrômetro de massas (MS) LCQ Duo (ThermoFinnigan) com ionização por *electrospray* (ESI). Previamente às análises, o equipamento LCQ Duo foi calibrado com cafeína (195 Da; Sigma-Aldrich), um polímero (1.022, 1.122, 1.222, 1.322, 1.422, 1.522, 1.622, 1.722 e 1.822 Da, Ultramark) e um peptídeo contendo a sequência Met-Arg-Phe-Ala (523 Da).

Os fragmentos trípticos purificados anteriormente foram solubilizados em ácido fórmico (FA) 0,05% e aplicados em uma coluna capilar de fase reversa (RP) C18 acoplada ao cromatógrafo, sendo a eluição realizada com ACN 50% contendo FA 0,05% sob um fluxo de 2,5 μ L/min. Os peptídeos eluídos foram automaticamente aplicados no espectrômetro de massas em sequência, utilizando uma nanofonte para ionização e o programa Xcalibur (ThermoFinnigan) para a operação do sistema. Os espectros da relação massa/carga (m/z) foram obtidos no modo positivo e as sequências de aminoácidos foram determinadas após a dissociação induzida por colisão.

As sequências de aminoácidos dos fragmentos trípticos foram determinadas pelo programa Sequest (ThermoFinnigan) e utilizadas para a identificação das respectivas proteínas. Para tal, um banco de dados contendo as sequências deduzidas de aminoácidos das CDS identificadas pelo sequenciamento completo do genoma de *X. fastidiosa* 9a5c (Simpson *et al.*, 2000) foi previamente montado e disponibilizado ao programa. As proteínas não anotadas (ver sessão 4.1.1) foram adicionadas manualmente ao banco de dados.

3.4.5. SDS-PAGE em sistema tricina para proteínas pequenas

As amostras proteicas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em tampão tricina, conforme descrito por Judd (1996), para resolução aprimorada de peptídeos/proteínas entre 1 e 40 kDa. Para uma corrida mais eficiente, conforme proposto pelo autor, foi utilizada uma camada de gel entre o de empilhamento e o de corrida que continha metade do *cross-linker* utilizado no gel de corrida. A porosidade do gel de corrida foi determinada por T=17% (massa total de acrilamida e bisacrilamida) e C=3% (massa do *cross-linker* bisacrilamida). Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue G ou AgNO₃ (Ausubel *et al.*, 1994).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise *in silico* de genes de bacteriocinas em *X. fastidiosa*

4.1.1. Predição de genes relacionados à síntese de bacteriocinas

A busca por genes de bacteriocinas em *X. fastidiosa* foi inicialmente realizada no genoma da cepa 9a5c, cepa virulenta e agente causal da Clorose Variegada do Citros. A compilação manual dos resultados do processamento do genoma de 9a5c na sua anotação original (Simpson *et al.*, 2000) em duas versões disponíveis do programa Bagel revelou 9 CDS (*Coding Sequences*) potencialmente codificadoras de bacteriocinas, incluindo as 3 CDS que codificam as microcinas tipo V (mccV) previamente anotadas (Simpson *et al.*, 2000; Pashalidis *et al.*, 2005). Elas estão agrupadas em quatro *loci*: XF0262, XF0263 e XF0264 (que codificam as microcinas V) no Grupo I; XF1217, XF1218 e XF1219 no Grupo II; XF1305 e XF1306 no III; e apenas XF1694 no Grupo IV.

Todos esses genes codificam proteínas contendo uma sequência sinalizadora de exportação do tipo dupla glicina, na qual os dois últimos resíduos de aminoácidos são glicinas ou, frequentemente, uma glicina e uma alanina (Michiels *et al.*, 2001). Como acontece com *E. coli*, este motivo sinalizador (M[R/K]ELXXE[I/L]XX[I/V]XG[G/A]) deve ser reconhecido e

clivado pela porção N-terminal do transportador ABC (*ATP-Binding Cassette*) CvaB, em 9a5c codificado por XF1220, que deve estar localizado na membrana interna da célula, conectado a TolC (XF2586, transportador de membrana externa) pela proteína de interação CvaA (XF1216). Juntas, as proteínas formam o transportador que faz uso de trifosfato de adenosina (ATP) para energizar o processamento e a externalização das bacteriocinas (Meidanis *et al.*, 2002; Cascales *et al.*, 2007).

Analisando em maior detalhe estes quatro *loci* gênicos, observamos que os grupos II e III também incluíam CDS adicionais, que não estão anotadas no genoma público de *X. fastidiosa* 9a5c. Tais CDS codificam proteínas hipotéticas com a sequência sinal de dupla glicina mencionada acima e foram denominadas XF1219_2 (posição genômica: 1167885..1168085, fita U), XF1307_2 (1256105..1256353, fita U) e XF1307_3 (1256805..1256999, fita U).

Observamos também que a CDS previamente anotada como XF1693 (não apontada pelo BAGEL como codificadora de bacteriocina) possui no meio de sua sequência predita de proteína uma sequência sinalizadora do tipo dupla glicina, indicativo de possível erro na anotação do códon de início de tradução para este gene. Desta forma, chamaremos de XF1693_2 a CDS cuja proteína predita se inicia com a sequência sinal (1620190..1620366, fita U), para distingui-la da anotação original (XF1693).

Os programas mais recentes de anotação automática de genomas disponíveis nos servidores RAST e IMG/ER confirmaram nossos achados. O genoma da cepa 9a5c foi reanotado em ambos os servidores (dados não publicados), confirmando a inspeção manual que realizamos. A Figura 7 resume a estrutura dos *loci* codificadores de bacteriocinas em *X. fastidiosa* cepa 9a5c antes e após as análises descritas neste trabalho.

As duas versões da ferramenta Bagel não foram capazes de indicar todos os genes que apontamos neste estudo como potenciais produtores de bacteriocinas, mas foram fundamentais para localizarmos os *loci* onde estão codificadas no genoma de *X. fastidiosa*. Enquanto a primeira versão apresentou vários falsos-positivos, a segunda gerou apenas 4 CDS como *hits* significativos das análises: as 3 microcinas V (XF0262, XF0263 e XF0264) anotadas no genoma (Simpson *et al.*, 2000; Zaini *et al.*, 2008), além de uma CDS hipotética do plasmídeo menor, XFb0002, a qual desconsideramos neste estudo.

A.

B.

Figura 7: Situação dos *loci* codificadores de bacteriocinas em *X. fastidiosa* 9a5c antes (A) e depois (B) das análises realizadas neste trabalho. Setas em cinza, CDS codificando proteínas com função irrelevante para a produção de bacteriocinas; em vermelho, CDS da possível proteína de imunidade (Pashalidis et al., 2005); em preto, proteínas de processamento e secreção de bacteriocinas; em azul escuro, bacteriocinas putativas; em azul claro, CDS discrepantes com a anotação original de 9a5c, mas que codificam possíveis bacteriocinas. Os números superiores às setas são os identificadores das CDS; os números abaixo mostram a posição genômica inicial e final do grupo de genes.

O plasmídeo menor (pXF1.3) possui apenas outra CDS, que codifica uma proteína de replicação, além do gene apontado por BAGEL2. Segundo a ferramenta, a proteína indicada apresenta motivos comuns de bacteriocinas, o que torna plausível que a proteína seja uma toxina. Entretanto, dado que não existem outros genes no plasmídeo, aliado ao fato de que nenhuma sequência de exportação foi detectada na proteína hipotética (SignalP v4, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), hipotetizamos que essa CDS codifique uma toxina de manutenção do plasmídeo. Como aparentemente não existem outras CDS codificadas em pXF1.3, é razoável supor que a antitoxina seja um RNA antisense que impeça a tradução do mRNA da toxina. Como a antitoxina de RNA é lábil, caso alguma célula fique sem plasmídeo durante a divisão celular, o RNA antitoxina seria eventualmente degradado, possibilitando a tradução da toxina e eliminando a célula livre de plasmídeo (Hayes, 2003).

Em nossas varreduras realizadas em *X. fastidiosa* 9a5c não identificamos nenhuma bacteriocina de alto peso molecular. Inicialmente, deparamo-nos com XF2407, CDS anotada como "bacteriocina" e que teria 219 kDa. Contudo, classicamente, as maiores bacteriocinas de Gram-negativas possuem até 80 kDa. Análises de XF2407 por BLASTp e Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) indicam a presença de várias repetições ligantes de cálcio, que são domínios típicos de hemolisinas (Economou *et al.*, 1990). Além disso, a vizinhança de XF2407 está repleta de genes relacionados a secreção dessa classe de exotoxinas (dados não mostrados). Assim, propomos sua renomeação para "toxina do tipo hemolisina".

Uma vez identificadas as CDS potencialmente produtoras de bacteriocinas, buscamos evidências de sua função na fisiologia de *X. fastidiosa*. Utilizamos a ferramenta DOOR v2.0 para prever a existência de operons, tendo em vista que os genes de um RNA mensageiro policistrônico geralmente possuem função relacionada. O programa apontou apenas um operon que inclui os genes XF1693 e XF1694. Contudo, não descartamos a possibilidade de que XF1305, XF1306 e XF1307_2 também sejam expressas como operon (Figura 7).

Não realizamos a busca por proteínas de imunidade para as bacteriocinas apontadas neste trabalho. Até o presente, apenas a CDS XF0261 foi predita como proteína de imunidade contra as microcinas tipo V (Pashalidis *et al.*, 2005).

A predição computacional realizada utilizando o genoma de várias bactérias fitopatogênicas apontou um grande potencial para a descoberta de novas bacteriocinas, ainda

que pouca experimentação bioquímica lhes tenha sido dirigida (Holtmark *et al.*, 2008). Em *E. coli*, por outro lado, mais de 20 bacteriocinas de alto peso molecular (colicinas, no caso) e mais de 10 microcinas foram caracterizadas até o momento, sendo seus genes encontrados em diferentes combinações e frequências nas diversas comunidades que a bactéria faz parte (Gordon e O'Brien, 2006). Nosso estudo propõe a existência de 13 CDS codificando microcinas no cromossomo de *X. fastidiosa* 9a5c, indicando uma razoável diversidade no seu arsenal de bacteriocinas.

4.1.2. Análise das regiões promotoras das bacteriocinas putativas

A ferramenta MEME é utilizada na identificação de subsequências superrepresentadas em um conjunto *input* de sequências de DNA, onde podem indicar a presença de motivos regulatórios *in vivo* (Bailey e Elkan, 1994). O motivo mais significativo encontrado com MEME nos promotores das bacteriocinas está representado na Figura 8. Com o intuito de definir um regulon putativo referente ao motivo identificado, fizemos uma busca ao longo dos promotores de genes de *X. fastidiosa* 9a5c com a ferramenta MAST (Bailey e Gribskov, 1998).

O motivo foi encontrado na região que definimos como promotora (critérios descritos na sessão 3.1.2) dos genes de bacteriocinas putativas codificadas por XF0264, XF1217, XF1219, XF1305, XF1306, XF1693 e XF1694, entre outros genes de função hipotética, possivelmente coregulados com as bacteriocinas (Tabela 7). Esta análise utilizou o genoma público de *X. fastidiosa* 9a5c (Simpson *et al.*, 2000), e portanto não considerou as CDS não anotadas que propomos como codificadoras de bacteriocinas (XF1219_2, XF1307_2, XF1307_3). O motivo foi encontrado em um número variável de vezes nos promotores dos genes analisados, tendo sido identificado 4 vezes no promotor de XF0264 e de XF1217, 3 vezes no de XF1219, 2 vezes no de XF1305 e uma única vez no de XF1306 e no promotor do operon XF1693-XF1694. Salientamos que a instância encontrada em XF1306 não corresponde a nenhuma das encontradas no promotor de XF1305. O mesmo aconteceu para XF1219, onde os motivos significativos encontrados em sua região promotora não correspondem àqueles contidos no promotor de XF1217, apesar da proximidade. É importante lembrar também que XF1693 e XF1694 constituem um operon de acordo com a ferramenta DOOR v2.0, e portanto a ferramenta MAST utilizou apenas o promotor de XF1693 para esta análise.

Figura 8: Representação do motivo encontrado nos promotores das bacteriocinas putativas.

Tabela 7. CDS de função desconhecida incluídas no regulon definido a partir do motivo encontrado nos promotores de bacteriocinas.

Número de acesso	Identificador	Número de acesso	Identificador
15836689	XF0084	15837906	XF1305
77747491	XF0167	15837907	XF1306
15836823	XF0218	15837994	XF1393
15836869	XF0264	15837995	XF1394
15836939	XF0337	15838032	XF1431
15836959	XF0357	15838144	XF1543
15836960	XF0358	15838145	XF1544
15837004	XF0402	15838163	XF1562
77747500	XF0403	15838164	XF1563
15837006	XF0404	15838242	XF1641
15837012	XF0410	15838294	XF1693
15837026	XF0424	15838295	XF1694
15837042	XF0440	15838388	XF1788
15837051	XF0449	15838390	XF1790
15837133	XF0531	15838506	XF1908
15837136	XF0534	15838665	XF2074
15837389	XF0787	15838666	XF2075
15837736	XF1134	15838667	XF2076
15837737	XF1135	15838700	XF2109
15837819	XF1217	15838742	XF2151
15837821	XF1219	15838791	XF2200
15837828	XF1226	15838911	XF2320
15837829	XF1227	15838913	XF2322
15837869	XF1268	15838962	XF2371
15837880	XF1279	15839358	XF2769

Em cinza: bacteriocinas putativas.

Os genes de função conhecida possivelmente coregulados com as bacteriocinas estão listados na Tabela 8. A lista inclui genes associados a virulência, tais como *GumH* (XF2364, relacionado à biosíntese do exopolissacarídeo que compõe o biofilme), superóxido dismutase e catalase/peroxidase (XF1921 e XF2232, que conferem defesa ao estresse oxidativo que as células podem sofrer dentro de seus hospedeiros), receptor de enterobactina férrica (XF2137, responsável pela captação de ferro em ambientes onde o metal é escasso, possibilitando a propagação da bactéria em um ambiente desfavorável), celobiosidade (XF1267, capaz de degradar as pontuações existentes entre os vasos do xilema, favorecendo a colonização), *PilY1* (XF1224, adesina do *pilus* tipo IV responsável pela motilidade do tipo *twitching*, que permite a bactéria se movimentar ao longo do xilema) e um precursor de adesina de fímbria (XF0083, responsável pela agregação das células e maturação do biofilme). O receptor de enterobactina férrica incluído na lista de genes possivelmente coregulados com as bacteriocinas, XF2137, foi anotado na plataforma IMG/ER como “receptor de enteroquelinas e bacteriocinas”. As bacteriocinas utilizam mecanismos ditos parasíticos para entrar nas células-alvo, em geral fazendo o uso de receptores tonB-dependentes que são utilizados para captação de sideróforos, vitamina B12 e outros nutrientes (Cascales et al., 2007). Se a coregulação predita é verdadeira e se a internalização de bacteriocinas acontece utilizando este receptor, ou ainda outros, são questões interessantes para investigação. Uma evidência da robustez desta análise é que apenas quatro *hits* foram detectados quando o motivo foi varrido em regiões codificantes do genoma. Tendo a premissa de que a maioria dos sítios de ligação de fatores transcricionais estão em regiões intergênicas, isto é um indicativo da funcionalidade biológica do motivo.

Correlações entre a produção de bacteriocinas e a fisiologia ou patologia de bactérias já se provaram interessantes. Em *Lactobacillus plantarus* C11, a produção de bacteriocinas é ativada quando uma certa densidade celular é atingida. A busca experimental do regulon da plantaricina A (Diep et al., 1996) deixou claro que a presença da bacteriocina causa a ativação de uma cascata molecular que induz a produção de mais bacteriocinas e do seu aparato de transporte e processamento. Para *Bacillus cereus*, o regulon putativo do regulador transcricional PlcR inclui genes de bacteriocinas bem como de proteínas relacionadas à proteção celular, nutrição e ainda sensores ambientais (Gohar et al., 2008).

Tabela 8. Regulon predito para o motivo encontrado nos promotores de bacteriocinas.

Número de acesso	Identificador	Produto
gi 15836607	XF0002	DNA polimerase III, subunidade beta
gi 15836688	XF0083	Precursor fimbrial
gi 15836771	XF0166	Ácido anidro-N-acetilmurâmico quinase
gi 15836774	XF0169	Tirosil-tRNA sintetase
gi 15836942	XF0340	Proteína de formação de ligações dissulfeto
gi 15836994	XF0392	S-adenosilmetionina sintetase
gi 15837007	XF0405	ErpA
gi 77747501	XF0408	Transportador de aminoácido
gi 15837022	XF0420	Proteína de tolerância a tolueno
gi 15837023	XF0421	Proteína de tolerância a tolueno
gi 15837024	XF0422	Exodeoxirribonuclease V, cadeia gama
gi 15837025	XF0423	Exodeoxirribonuclease V, cadeia beta
gi 15837027	XF0425	Exodeoxirribonuclease V, cadeia alfa
gi 15837048	XF0446	Proteína ligadora de DNA
gi 15837391	XF0789	MraZ (proteína de divisão celular)
gi 15837392	XF0790	MraW (S-adenosil-metiltransferase)
gi 15837393	XF0791	Proteína de divisão celular
gi 15837394	XF0792	Proteína ligadora de penicilina 3
gi 15837395	XF0793	UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato-2, 6-diaminopimelato ligase
gi 15837396	XF0794	UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamil-2, 6-diaminopimelato-D-alanyl-D-alanil ligase
gi 15837397	XF0795	Fosfo-N-acetilmuramoil-pentapeptídeo transferase
gi 15837398	XF0796	Proteína de divisão celular
gi 15837399	XF0797	Undecaprenildifosfo-muramoilpentapeptídeo beta-N-acetilglucosaminiltransferase
gi 15837400	XF0798	UDP-N-acetilmuramato-L-alanine ligase
gi 15837401	XF0799	D-alanina-D-alanina ligase
gi 15837402	XF0800	Proteína de divisão celular
gi 15837403	XF0801	Proteína de divisão celular
gi 15837734	XF1132	LysR (regulador transcricional)
gi 15837735	XF1133	Proteína repressora ligadora de triptofano
gi 15837826	XF1224	PilY1
gi 15837868	XF1267	1,4-beta-celobiosidase
gi 15837999	XF1398	Proteína de troca $\text{Na}^{+2}/\text{H}^{+}$
gi 15838031	XF1430	YsxC
gi 15838117	XF1516	Proteína de membrana externa
gi 15838495	XF1897	TolB
gi 15838507	XF1909	Adenina glicosilase
gi 15838508	XF1910	Proteína de divisão celular
gi 15838518	XF1920	Repressor transcricional do operon Trp
gi 15838519	XF1921	Superóxido dismutase precursora
gi 15838539	XF1945	VirK
gi 15838728	XF2137	Receptor de enterobactina férrica
gi 77747588	XF2232	Catalase/peroxidase
gi 15838955	XF2364	GumH

4.1.3. Predição do arsenal de bacteriocinas em diversas cepas de *X. fastidiosa*

As análises comparativas *in silico* dos quatro grupos de genes de bacteriocinas identificados na cepa 9a5c foram realizadas nos genomas disponíveis de outras cepas de *X. fastidiosa*, todos reanotados nos servidores IMG/ER e RAST. As comparações realizadas estão resumidas nas Tabelas 9 e 10 e mostram que cada cepa apresenta um arsenal de bacteriocinas similar mas não idêntico ao das outras. A similaridade das sequências de aminoácidos das bacteriocinas foi de no mínimo 90% com suas ortólogas em 9a5c ou J1a12.

Verificamos que o primeiro grupo de bacteriocinas, que compreende os parálogos codificados pelas CDS XF0262, XF0263 e XF0264, está presente em todas as cepas, sendo que esses genes são similares à microcina V de *E. coli* (Figura 4). As análises revelaram que todas as cepas apresentam duas ou três cópias desse gene. Em 9a5c, já foi verificado que os níveis dos transcritos deste grupo de bacteriocinas sofrem modulação por estresses variados. O nível de expressão destas três microcinas é negativamente modulado no choque térmico (Koide *et al.*, 2006). Além disso, variações na concentração de ferro resultam no aumento dos níveis de transcritos de XF0262, XF0263 e XF0264 (Zaini *et al.*, 2008). A exposição das células a alta concentração de glicose modula positivamente o nível dos transcritos de XF0262 e XF0264 (Pashalidis *et al.*, 2005). Também já foram detectados transcritos de XF0263 por RT-PCR em plantas infectadas por 9a5c e sintomáticas para CVC até 90 dias depois da inoculação de bactéria na planta, evidenciando a importância da microcina tipo V na colonização da planta por *X. fastidiosa* (de Souza *et al.*, 2005). Na cepa Temecula, as CDS ortólogas de XF0262 e de XF0264 são componentes do regulon de GacA (Shi *et al.*, 2009).

Quanto ao Grupo II, é o menos variável e quase todas as cepas apresentam os quatro genes. Este nos parece um grupo muito interessante por apresentar todas as CDS na mesma orientação (Figura 7), com um espaço intergênico relativamente pequeno, sendo que estão localizadas entre *cvaA* (XF1216) e *cvaB* (XF1220), os quais codificam as proteínas necessárias ao reconhecimento e clivagem da sequência sinal de dupla glicina e à externalização da bacteriocina madura. Não detectamos *in silico* um operon para esta região, mas será importante a verificação de uma unidade policistônica utilizando RT-PCR.

Tabela 9. Distribuição das bacteriocinas de *X. fastidiosa* nas cepas sul-americanas sequenciadas.

Grupo de bacteriocinas	Nome	CDS em 9a5c	9a5c	U24d	Hib4	Pr8x	J1a12	3124	Fb7	Sequência do pró-peptídeo em 9a5c ou J1a12 ^Δ
I	MccV [†]	XF0262	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRELT</u> LTLEIDNVSGADLGSRLSAAIVGGVAAFFAGSIWGGTRGGDGGGILGVGSIGQGVGMVYGGIAGAIGGAIAGFVLDKDVIIY SYTNGFMSSIFNGTFAK
		XF0263	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRELT</u> SIEMNNVSGGDLATRIEASIVFGVSAFFAGSIWGGTRGGDGGGILGVGSIAQGVGMVYGGIVGGIGGLIAGFVLDKNVTY NYAVGFYNLSLFGTFTK
		XF0264	X	X	X	X			X	<u>MRELT</u> SIEMNNVSGGDFATRLIASIVGGIAAFFAGSIWGGTRGGDGGGVLGIGSIGQGVGMVYGGIAGAIGGAIGCFVLDKDVTY SYTTGFMNSLFSGNFAK
II	XFmA	XF1217	X	X	X	X	X	X	X	<u>MGIDK</u> VRELTVREIESVDGGVYFLNLNYSRLGGLIRAPMLTFFGIGNTAIAVNFGRGSSFYIKPTLNIDTVNATSITQEVHQGT
	XFmB	XF1218	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRELA</u> FQEIEIENVDSGAFFVYIPESFNGTVSSISFTTGSSVTGNSGSLTLPDPVSGPVLSGIGFFGTGTGFLRTSSRHVTIGTV NLNIIQKINL
	XFmC	XF1219	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRELV</u> IQEIESVDGGIFFVSPNISSSTSFDSFQTSALTPPFKHTGSNVLLGFNFWRIVSQDFYVRSVKIYNIQEVN
III	XFmD	XF1219_2*	X	X	X		X	X	X	<u>MREIT</u> VNEMENVHGGCCCEIIIGASIFIGAVAIGLLSLAAIGITVLAVTAIAVAMHNDASSISASQ
	XFmE	XF1305	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRTINA</u> AEMEVEVSGGVLGLAAVVSMLMVPVGSVAVIGTAVSQVSVLYNTVTAVYDAFNFSFMKGFNQGYNNKKS
	XFmF	XF1306	X	X	X	X				<u>MRELSK</u> VEIEQISGAGVWDDLGRNAGTVFRWFTDGLTLLFSNGLSSLFTAASKVIAANRANANTKY
	XFmG	XF1307_2*	X	X	X	X				<u>MRELSK</u> IEIEQVSGGCLSEVFTGVNTLFTWFTSGLRSLFSGIFGAATSSATPGTTTPTGTTTSSTN
	XFmH	XF1307_3*	X	X	X	X				<u>MRILSV</u> EVSEVSEISGGNDLTGHQLGWAQVLLWELWAVNVSWCICRRRGIDWCCLGRRLDGGNVYS
	XFmI	-					X	X	X	<u>MRELSK</u> VEIEQISGGCLSEIVTGVNTAFRWISDSLNTLFSGGLTFFGNTLSTLFNAATNVIAANAANKKS
	XFmJ	-					X	X	X	<u>MRELSK</u> VEIEQVSGASTSTTIWDDVVAATNGIWSGLVTATSNIFGGAVTATNNILGGTAAGTNNIFNQFINSYFFRNYISSSLF SNDSTVVDDKKS
	XFmK	-					X	X	X	<u>MRELSK</u> VEIEQVSGAGVWDDLGRNAGTVFRWFTDGLTSFLFDIFATASKVIAVNANKKS
	XFmL	-					X	X	X	<u>MRELSK</u> VEIEQISGGCLSEIVTGVNTVFNWVTTGLQSLFSTGLRSLFSSIFGATIKTGSTTTG
IV **	XFmM	-					X			<u>MCALSV</u> EVSEVSEVLGGNALTDSKISIGMDAGVFVGMVGFTSPMFLGAFAGAERLIGAAGWGGWMTGTFTIHKRFISMYPTIF
	XFmN	XF1693_2*	X	X			X		X	<u>MRELT</u> FEELKVDGQGWAGAFLTGAGTGAYAGGLIAEVPAGVAVGVGGVIGVIANLF
	XFmO	XF1694	X	X			X		X	<u>MRELEI</u> HEIESIGGADMHLVENLAAGVTAGATAGYIFFGPAGAALGTGGVAVGMWTSILGG

* Genes não anotados no genoma de 9a5c publicamente disponível, ou reanotados com novo códon de início (no caso de XF1693_2).

** Grupo contido em região de profago.

[†] São parálogos e cada X na coluna indica uma cópia presente no genoma.

^Δ Cada X na tabela é um resultado de BLAST com >90% de similaridade com as proteínas de 9a5c primariamente, ou de J1a12, quando ausente em 9a5c. A sequência sinal está sublinhada. Não utilizamos os identificadores dos genes nas outras cepas pois utilizamos anotações diferentes das disponíveis publicamente.

Tabela 10. Distribuição das bacteriocinas de *X. fastidiosa* 9a5c e J1a12 nas cepas norte-americanas.

Grupo de bacteriocinas	Nome	CDS em 9a5c	9a5c	J1a12	Temecula1	Ann-1	Dixon	M12	M23	GB514	EB92-1	Sequência do pró-peptídeo em 9a5c ou J1a12 ^Δ
I	MccV [†]	XF0262	X	X	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRELTLEIDNVSGADLGSRLSAAIVGGVAAFFAGSIWGGTRGGDGGGILGVGSIGQGVGMVYGGIAGAIGGAI</u> AGFVLDKDVISYTNMGFMSSIFNGTFAK
		XF0263 [†]	X	X	X	X	X	X	X	X	X	<u>MRELTSIEMNNVSGGDLATRIEASIVFGVSAFFAGSIWGGTRGGDGGGILGVGSIAQGVGMVYGGIAGGIGLIA</u> GFVLDKNVTYNYAVGFYNSLFNGTFTK
		XF0264	X		X		X		X	X	X	<u>MRELTSIEMNNVSGGDFATRIEASIVGGIAAFFAGSIWGGTRGGDGGGVLGIGSIGQGVGMVYGGIAGAIGGAI</u> GCFVLDKDVTSYTTGFMNSLFSGNFAK
II	XFmA	XF1217	X	X	X		X	X	X	X	X	<u>MGIDKVRRELVREIESVDGGVYFLNLNYSRLGGLIRAPMLTFFGIGNTAIAVNFGRGSSFYIKPTLNIDTVNATSITQ</u> EVHQGT
	XFmB	XF1218	X	X	X	X	X	X	X		X	<u>MRELAFOEINVDGAFFFVIYSPESFNGTVSSISFTTGSSVTGNSGSLTLPDPVSGPVLGIGFFGTGTGFLRTSS</u> RHHVTIGTVNLYNIQKINL
	XFmC	XF1219	X	X	X	X	X	X	X		X	<u>MRELVIOEIESVDGGIFFVSPNISSTSFDSFQTSALTPPKHTGSNVSLGFGNFWRIVSQDFYVRSVKIYNIIQEVN</u>
III	XFmD	XF1219_2*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	<u>MREITVNEMENVHGGCCCEIIIGASIFIGAVAIGLLSLAAIGITVLAVTAIAVAMHNDASSISASQ</u>
	XFmE	XF1305	X	X	X				X	X	X	<u>MRTINAAEMEEVSGGVLGLAAVSLMVPVGSVAIVAIGTAVSQVSVLYNTVAVYDAFNSFMKGFGNQYNNKKS</u>
	XFmF	XF1306	X			X						<u>MRELSKVEIEQISGAGVWDDLGRNAGTVFRWFTDGLTLLFSNGLSSLFTAASKVIAANRANANTKY</u>
	XFmG	XF1307_2*	X			X						<u>MRELSKIEIEQVSGGCLSEVFTGVNTLFTWFTSGLRSLFSGIFGAATSSATPGTTTPTGTTTSSSTN</u>
	XFmH	XF1307_3*	X									<u>MRLSVSEVSEISGGNDLTGHQLGWAQVLLWELWAVNVSWCICRRRGIDWCCLGRRLDGGNVYS</u>
	XFmI	-		X	X		X	X	X	X	X	<u>MRELSKVEIEQISGGCLSEIVTGVNTAFRWISDSLNTLFSGGLTTFFGNTLSTLFNAATNVIAANAANKKS</u>
	XFmJ	-		X								<u>MRELSKVEIEQVSGASTSTTIWDDVVAATNGIWSGLVTATSNIFGAVTATNNILGGTAAGTNNIFNQFINSYFFR</u> NYISSLSFSDSTVVDKKS
	XFmK	-		X								<u>MRELSKVEIEQVSGAGVWDDLGRNAGTVFRWFTDGLTSLFDIFATASKVIAVNANKKS</u>
	XFmL	-		X	X		X	X	X	X	X	<u>MRELSKVEIEQISGGCLSEIVTGVNTVFNWVTTGLQSLFSTGLRSLFSSIFGATIKTGSTTTG</u>
IV**	XFmM	-		X	X				X	X	X	<u>MCALSVSEVSEVLGGNALTDSKISGMDAGVFGVMDGFTSPMFLGAFAGAERLIGAAWGGGWMGTGTIHKRFIS</u> MYPTIF
	XFmN	XF1693_2*	X	X								<u>MRELTFFEEALKVDGQGWAGAFLTGAGTGAYAGGLIAEVPAGVAVGVGGVIGVIANLF</u>
	XFmO	XF1694	X	X								<u>MRELEIHEIESIGGADMHLVENLAAGVTAGATAGYIFFGPAGAALGTVGGVAGMWTSILGG</u>

* Genes não anotados no genoma de 9a5c publicamente disponível, ou reanotados com novo códon de início (no caso de XF1693_2).

** Grupo contido em região de profago exclusivo de algumas cepas sul-americanas.

[†] São parálogos e cada X na coluna indica uma cópia presente no genoma.

^Δ Cada X nesta tabela é um resultado de BLAST com >90% de similaridade com as proteínas de 9a5c primariamente, ou de J1a12, quando ausente em 9a5c. A sequência sinal está sublinhada. Não utilizamos os identificadores dos genes nas outras cepas pois utilizamos anotações diferentes das disponíveis publicamente.

Em cinza: exclusivas de cepas sul-americanas.

O Grupo III de bacteriocinas é o mais variável entre as cepas e parece se dividir em dois subgrupos. Arbitrariamente tomamos como base as cepas 9a5c e J1a12 pois todas as outras, com relação a este grupo, assemelham-se a esta ou aquela linhagem. Neste *cluster* existe apenas uma bacteriocina compartilhada a todas as cepas sul-americanas e a quase todas as norte-americanas: aquela codificada por XF1305. As bacteriocinas adjacentes em 9a5c (XF1306, XF1307_2 e XF1307_3) estão presentes com similaridade >90% nas cepas sul-americanas U24d, Hib4 e Pr8x, sendo que Ann-1 é a única do grupo das norte-americanas que apresenta duas dessas microcinas. Por outro lado, as demais cepas sul-americanas (J1a12, 3124 e Fb7) compartilham do mesmo subgrupo que as norte-americanas Temecula, Dixon, M12, M23, GB514 e EB92. Isso pode indicar que os subgrupos de bacteriocinas do Grupo III se diferenciaram anteriormente ao isolamento geográfico.

O Grupo IV, contido em uma região de profago que apenas as cepas sul-americanas isoladas de laranjeiras possuem (9a5c, U24d, J1a12, Fb7), contém genes interessantes que são diferencialmente modulados por choque térmico e concentrações de ferro na cepa 9a5c (Koide *et al.*, 2006; Zaini *et al.*, 2008). As regiões de profagos de *X. fastidiosa* contêm vários genes relacionados à adaptação da bactéria, incluindo toxinas e outros associados à virulência (de Mello Varani *et al.*, 2008). Crescente número de trabalhos comprovam a importância destas regiões virais para a progressão da infecção e causa da doença em animais (Figueroa-Bossi e Bossi, 1999; Banks *et al.*, 2003) e plantas (Evans *et al.*, 2010).

Uma análise de distância (Figura 9) utilizando apenas os genes de bacteriocinas comuns a todas as cepas sul-americanas (que em 9a5c são as CDS XF0262, XF0263, XF0264, XF1217, XF1218, XF1219 e XF1305) reforça o grau de proximidade entre as cepas que encontramos em agrupamentos extraídos visualmente da Tabela 9, levando em consideração todas as bacteriocinas apresentadas. Assim, o cladograma e a tabela mostram de forma paralela que 9a5c e U24d são cepas mais próximas (com arsenal idêntico, inclusive), assim como são Hib4 e Pr8x, e J1a12 e 3124. Ainda que nossa análise calcule apenas a proximidade entre as cepas, uma filogenia de diferentes linhagens já foi realizada com gamaproteobactérias utilizando apenas os domínios catalíticos de suas bacteriocinas com atividade DNase (Parret e De Mot, 2002). As cepas norte-americanas não foram incluídas em nossa análise visto que não possuem todas as CDS utilizadas no alinhamento.

Figura 9: Cladograma gerado com o software MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando os métodos de *neighbor-joining* (Atteson, 1999) e *Kimura 3-parameter* (Kimura, 1981) com os genes de bacteriocinas comuns à todas as cepas su-americanas (CDS XF0262, XF0263, XF0264, XF1217, XF1218, XF1219 e XF1305 de 9a5c e seus ortólogos nas demais cepas). As sequências foram recuperadas de bases de dados públicas (NCBI) e do nosso acervo genômico privado. O alinhamento das sequências concatenadas foi utilizado para gerar o cladograma com 1000 réplicas de *bootstrapping*.

Verificamos ainda a situação dos genes essenciais à exportação e processamento das bacteriocinas em todas as cepas (*cvaA*, *cvaB*, *tolC* e *cvpA*, respectivamente XF1216, XF1220, XF2586 e XF1948 em 9a5c). Esta análise revelou que todos os genomas apresentaram cópias íntegras de *cvaA*, *tolC* e *cvpA*, enquanto que as cepas U24d, Ann-1, Dixon e GB514 possuem um *frameshift* no gene que codifica CvaB (Figura 10). Assim, ainda que 9a5c e U24d tenham um arsenal de bacteriocinas idêntico, esta última não seria capaz de exportá-las.

A proteína CvaB de *E. coli* se divide em três porções: uma região N-terminal responsável pelo processamento das pró-bacteriocinas, que envolve o reconhecimento e clivagem da sequência sinal nelas contida através da atividade proteásica altamente específica para sequências de dupla glicina; uma região C-terminal típica de transportadores ABC, que liga nucleotídeos (ATP); e uma porção central que se insere na membrana interna (Braun *et al.*, 2002; Vassiliadis *et al.*, 2011).

A.

B.

Figura 10: Estado das proteínas CvaB em algumas cepas de *X. fastidiosa*. CvaB é a CDS XF1220 em 9a5c e é componente do transportador que reconhece, cliva e inicia a exportação das pró-bacteriocinas produzidas na célula. (A) Alinhamento múltiplo gerado na plataforma IMG/ER com as cepas de referência (9a5c e Temecula1) e as cepas que possuem o *frameshift* (Ann1, GB514, U24d e Dixon). O gene está indicado em marrom dentro do quadro. (B) Representação das proteínas geradas nas cepas que contem o *frameshift* em CvaB. *X. fastidiosa* Dixon possui a mutação no início do gene, o que não a enquadra no diagrama apresentado. Esquema gerado pelo Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>).

Salvo algum evento de correção destes *frameshifts*, as cepas que apresentam esses transportadores incompletos devem ser incapazes de processar e exportar suas bacteriocinas, já que análises por BLASTp no servidor IMG/ER revelam que nenhuma cepa de *X. fastidiosa* possui outro transportador ABC contendo os 150 aminoácidos N-terminais característicos da atividade proteásica que atua no sinal de dupla glicina. Contudo, tais mutações requerem futura verificação experimental para assegurar nossas hipóteses.

Estudos recentes mostram que genes que conferem adaptação à bactéria são relativamente instáveis em culturas laboratoriais, como foi demonstrado para certos genes de *E. coli* (Naas *et al.*, 1994; Spira *et al.*, 2011) e de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Klockgether *et al.*, 2010). Ainda reforçando essa suscetibilidade a modificações, já foi reportado que genes relacionados à competição microbiana e virulência contra hospedeiros são alvos frequentes de transferência lateral (Vassiliadis *et al.*, 2011).

Não apenas a composição dos arsenais de toxinas que as bactérias possuem mas também a situação dos transportadores dessas toxinas devem influenciar a diversidade e estrutura da população co-habitante com *X. fastidiosa*, seja nos insetos vetores, resultando nas diferentes taxas de transmissão da bactéria observadas entre diferentes espécies de cigarrinhas (Molina *et al.*, 2010), seja nas plantas, ditando sua existência como bactéria endofítica ou patogênica (Janse e Obradovic, 2010). Será conveniente analisar a situação desses transportadores em cepas recém isoladas de plantas infectadas e sintomáticas, para garantir que as células não tenham passado por um possível processo de atenuação.

Não encontramos bacteriocinas putativas exclusivas às cepas norte-americanas após análise dos genomas das cepas GB514, M12, M23 e Temecula no Bagel2. Entretanto, salientamos que podem existir ainda outras bacteriocinas nas diversas cepas estudadas, já que a variedade das sequências e dos mecanismos das toxinas dificultam a predição computacional de tais genes. Análises adicionais dos genomas das cepas norte-americanas estão em andamento para verificar a possível existência de bacteriocinas codificadas nos genomas destas cepas, sem ortólogos nos genomas de 9a5c ou J1a12.

Permanecem desconhecidas as implicações fisiológicas para as diferenças observadas entre esses verdadeiros arsenais de cada cepa, e são necessários experimentos para confirmar estes achados *in silico*. Buscaremos, portanto, evidências de que estas regiões

refletem peculiaridades das cepas e não meros artefatos de sequenciamento. Além disso, será fundamental a detecção dessas proteínas em culturas laboratoriais e *in planta* para confirmarmos esses achados e elucidarmos os caminhos utilizados por *X. fastidiosa* durante sua infecção.

4.2. Avaliação dos grupos de genes de bacteriocinas por PCR

Uma vez que inserções ou deleções significativas foram detectadas nos grupos das bacteriocinas putativas entre as diversas cepas, fizemos o uso de ensaios de PCR para comparar o tamanho dos produtos amplificados com os tamanhos preditos computacionalmente para os grupos de bacteriocinas nas diversas cepas. Salientamos a nossa preocupação com a confirmação da montagem dos genomas das cepas recém sequenciados por nosso grupo, buscando evidências de que estas regiões refletem peculiaridades das cepas e não artefatos de montagem ou sequenciamento.

Como mostrado na Tabela 9, as análises comparativas mostraram diferenças nos grupos de bacteriocinas I e III entre as cepas 9a5c e J1a12. Para confirmar as alterações preditas, as regiões genômicas destes dois grupos foram amplificadas por PCR e sequenciadas com a metodologia de Sanger. Obtivemos sequências perfeitamente compatíveis com as sequências utilizadas nas predições bioinformáticas (dados não mostrados), validando assim a montagem do genoma de J1a12 nessas regiões. Portanto, as diferenças encontradas entre as cepas nestes dois grupos não são artefatos de montagem. Como próximo passo, realizamos reações de PCR para avaliar as diferenças preditas em todas as cepas sul-americanas. Observamos que, como esperado, as PCRs geraram amplicons de tamanhos compatíveis com os tamanhos preditos *in silico* para as cepas, em praticamente todos os grupos avaliados (Figura 11).

Figura 11: Géis de agarose 1% dos produtos de PCR dos grupos de bacteriocinas das cepas sul-americanas. As bandas correspondem ao tamanho esperado para cada cepa, com exceção do Grupo I para Fb7, marcada com interrogação (?). Marcadores de tamanho (L) utilizados são o GeneRuler 100 bp Plus ou 1 kb (Fermentas), conforme indicado em cada gel.

O Grupo I de bacteriocinas em Fb7 é o único que não se comportou como esperado. Enquanto que o tamanho predito computacionalmente para o amplicon seria de 3,3 kpb, o padrão de bandas apresentado é similar ao de J1a12 e 3124 (com a banda mais forte indicando amplicon de aproximadamente 2,4 kpb). A sequência de nucleotídeos deste Grupo possui uma série de repetições (sendo, por sinal, onde se encontram as cópias dos genes *mccV*), e mesmo com um desenho cuidadoso de oligonucleotídeos, não conseguimos evitar a inespecificidade das reações de PCR em algumas cepas. De toda forma, no caso da cepa Fb7 não foi possível confirmar as diferenças preditas para o Grupo I de bacteriocinas.

Ainda que experimentos adicionais sejam necessários para confirmarmos a efetiva produção das bacteriocinas por *X. fastidiosa*, é válido especular que as diferenças encontradas entre as cepas possam refletir o fato de que esses genes dizem, pelo menos em parte, a adaptabilidade do organismo aos nichos que ele habita (Parret e De Mot, 2002). A heterogeneidade existente nos *loci* analisados poderia explicar vários dados reportados na literatura. Por exemplo, as diferentes taxas de transmissão de *X. fastidiosa* por diferentes insetos vetores (Molina *et al.*, 2010) poderiam ser explicadas pela existência de microbiotas diferentes no aparato bucal das diferentes espécies de cigarrinhas, sendo que nestes nichos a diversidade microbiana e a frequência de *X. fastidiosa* com relação à comunidade total seriam ditadas pelo conjunto de toxinas de todos os micro-organismos.

Assim, é possível que as bacteriocinas e também outros sistemas de exotoxinas contribuam para nortear a estrutura da microbiota no cibário do inseto vetor, e o estado desta população, como proposto por Backus e Morgan (2011), seria responsável pela severidade das infecções subsequentes nas plantas. E da mesma forma, o estado prévio da microbiota dentro do xilema, que é sabidamente variada de espécie para espécie, remeteria à suscetibilidade do hospedeiro vegetal ao desenvolvimento da doença ou à latência de *X. fastidiosa*, governando, desse modo, a especificidade do fitopatógeno. Portanto, postulamos que o arsenal de toxinas de uma cepa poderia promover uma efetiva colonização no xilema de laranjeira, mas o mesmo arsenal não seria eficaz contra endofíticos da videira, e a infecção não seria estabelecida nesta.

Vale ressaltar que vários gêneros de bactérias já foram detectados coinfectando com *X. fastidiosa* o xilema de laranjeira doce, como *Nocardia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Methylobacterium* e *Xanthomonas* (Araujo *et al.*, 2002), e o aparelho bucal da cigarrinha norte-americana *Homalodisca vitripennis*, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Methylobacterium* e *Curtobacterium* (Lacava *et al.*, 2007). Contudo, não se sabe como se dá a interação entre *X. fastidiosa* com essas espécies bacterianas e tampouco se as bacteriocinas tem participação na estruturação destas microbiotas.

4.3. Análise da expressão de bacteriocinas de 9a5c e J1a12

4.3.1. Avaliação do nível dos transcritos de bacteriocinas em culturas submetidas a estresses

Os genes que codificam possíveis bacteriocinas em duas cepas de *X. fastidiosa* foram avaliados quanto à sua expressão em culturas submetidas a estresses tais como choque térmico, excesso e carência de ferro, que são condições em que supostamente se verifica a modulação da expressão de genes associados a virulência. É sabido que a disponibilidade de ferro é um sinal ambiental que as bactérias evoluíram para responder não apenas para regular a concentração deste elemento no espaço intercelular, mas também para modular a expressão de fatores de virulência e patogenicidade (Boughammoura *et al.*, 2008; Zaini *et al.*, 2008). Choque térmico, por sua vez, foi um tratamento escolhido dado que os sintomas da CVC são mais severos durante o verão, além de que a temperatura é um fator que sabidamente modula genes importantes para a patogenia de bactérias (Smirnova *et al.*, 2001), incluindo *X. fastidiosa* (Koide *et al.*, 2006).

Utilizando ensaios de RT-qPCR, avaliamos diferenças na expressão dos genes de bacteriocinas nas cepas J1a12 (avirulenta para laranjeiras) e 9a5c (virulenta em laranjeiras) expostas aos estresses. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras de 12 a 15. Não encontramos padrões de expressão comuns às duas cepas nem diferenças estatisticamente significativas na expressão da maioria dos genes em resposta aos tratamentos aplicados, ainda que algumas condições tenham suprimido ou estimulado moderadamente a expressão de um ou outro gene.

Análise de expressão: Grupo I

Figura 12: Expressão relativa dos genes de bacteriocinas do primeiro grupo, parálogos que codificam a microcina tipo V (MccV) de *X. fastidiosa*. Os identificadores se referem ao genoma de 9a5c disponível no NCBI, lembrando que J1a12 possui apenas duas cópias. As barras representam a razão de expressão ($2^{\Delta\Delta CT}$) de culturas tratadas referente às culturas controles (CTRL, sem tratamento). Três réplicas biológicas foram utilizadas nos cálculos. Asterisco indica significância estatística por ANOVA e pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0.05$). ANOVA dos resultados de expressão de XF0262 e XF0264 mostrou que as réplicas biológicas se repetiram ao longo dos nossos experimentos. HIC = alta concentração de ferro, LIC = baixa concentração de ferro, HS = choque térmico.

Análise de expressão: Grupo II

Figura 13: Expressão relativa dos genes de bacteriocinas do segundo grupo. Os nomes das microcinas e os identificadores referentes à cepa 9a5c estão listados na Tabela 9. As barras representam a razão de expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de culturas tratadas referente às culturas controles (CTRL, sem tratamento). Três réplicas biológicas foram utilizadas nos cálculos. Nenhum gene apresentou expressão estatisticamente significativa nas condições aplicadas, com relação às culturas controle. ANOVA dos resultados de expressão de XF1217 e XF1218 mostrou que as réplicas biológicas se repetiram ao longo dos nossos experimentos. HIC = alta concentração de ferro, LIC = baixa concentração de ferro, HS = choque térmico.

Análise de expressão: Grupo III

Figura 14: Expressão relativa dos genes de bacteriocinas do terceiro grupo. Os nomes das microcinas e os identificadores referentes à cepa 9a5c estão listados na Tabela 9. Asterisco indica bacteriocinas exclusivas de uma ou outra cepa. As barras representam a razão de expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de culturas tratadas referente às culturas controles (CTRL, sem tratamento). Três réplicas biológicas foram utilizadas nos cálculos. Nenhum gene apresentou expressão estatisticamente significativa nas condições aplicadas, com relação às culturas controle. ANOVA dos resultados de expressão mostrou que as réplicas biológicas apenas de XFmJ se repetiram ao longo dos experimentos. HIC = alta concentração de ferro, LIC = baixa concentração de ferro, HS = choque térmico.

Análise de expressão: Grupo IV

Figura 15: Expressão relativa dos genes de bacteriocinas do quarto grupo. Os nomes das microcinas e os identificadores referentes à cepa 9a5c estão listados na Tabela 9. As barras representam a razão de expressão ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de culturas tratadas referente às culturas controles (CTRL, sem tratamento). Três réplicas biológicas foram utilizadas nos cálculos. Apesar da tendência de indução de expressão dos genes nas culturas submetidas a choque térmico, a variação encontrada entre as réplicas biológicas invalidou estatisticamente essa modulação aparente. HIC = alta concentração de ferro, LIC = baixa concentração de ferro, HS = choque térmico.

A modulação negativa de XF0263 e XF0264 em culturas de 9a5c submetidas a choque térmico, e a modulação positiva de XF0263 na exposição da cultura a alta concentração de ferro são dados já reportados na literatura (Koide *et al.*, 2006; Zaini *et al.*, 2008). Demais dados de expressão dos genes desse grupo em culturas sob as mesmas condições parecem discordar com os apresentados pelos referidos autores. Acreditamos que a repetição de bases e o baixo conteúdo GC da região tenham causado um viés nos resultados. De toda forma, ainda que os genes sejam parálogos, acreditamos que cada um sofra regulação própria dada a orientação que cada CDS apresenta (Figura 7).

Observamos também que o nível dos transcritos do gene ortólogo de XF0263 em J1a12 é muito baixo (100x menor) em comparação a 9a5c (dados não apresentados). Ainda que a comparação da expressão de um gene entre cepas diferentes possa ser enviesada, já que o estado fisiológico das cepas pode ser discordante, consideramos este dado (normalizado com a expressão de um gene *housekeeping*) interessante e que deve ser futuramente explorado.

Do grupo II, observamos que todos os genes foram inibidos por choque térmico, como já previamente reportado para XF1217, XF1218 e XF1219 (Koide *et al.*, 2006). A alta concentração de ferro parece estimular a expressão de XF1218 e XF1219, como já também encontrado (Zaini *et al.*, 2008), enquanto que a depleção do metal não parece exercer efeitos na expressão dos genes deste grupo.

Já quanto ao terceiro grupo, existem dados na literatura apenas para XF1305 e XF1306, sendo que os trabalhos concordam no que diz respeito à alta concentração de ferro favorecendo a detecção desses transcritos. O silenciamento de XF1305 que detectamos em resposta ao choque térmico ainda confirma dados anteriores (Koide *et al.*, 2006). Verificamos também que o conjunto de genes de bacteriocinas presentes em J1a12 mas não em 9a5c (XFmI a XFmM, de acordo com a Tabela 9) também mostrou níveis de transcritos aumentados em resposta ao choque térmico (Figura 14). Vale destacar que estas microcinas também estão codificadas no genoma das cepas 3124 e Fb7, mas não são encontradas nos demais genomas conhecidos.

Outro resultado interessante foi a tendência de maior expressão dos genes XF1693_2 e XF1694 nas culturas submetidas a choque térmico (Figura 15), como já verificado por Koide *et al.* (2006), enquanto que a concentração de ferro não parece ter influenciado sua expressão. O software DOOR v2.0 detecta esta região como um pequeno operon, e os níveis de transcrição destes genes nos diversos estresses condizem com a estrutura de unidade transcricional. A modulação encontrada chama a atenção, apesar de não ter sido considerada estatisticamente significativa em virtude da variação obtida em réplicas biológicas. Além do mais, estes genes estão contidos dentro de uma região de profago, e estas regiões já foram associadas à virulência de outras bactérias (Figueroa-Bossi e Bossi, 1999; Banks *et al.*, 2003; Koide *et al.*, 2006; de Mello Varani *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2010).

Embora nossos dados não permitam conclusões definitivas sobre a modulação na expressão dos genes avaliados, eles mostram claramente que eles são expressos em níveis detectáveis por RT-qPCR, o que traz credibilidade à predição computacional de genes de bacteriocinas que realizamos neste trabalho, incluindo aquelas CDS não anotadas anteriormente (no caso, XF1219_2, XF1307_2 e XF1307_3).

4.3.2. Detecção de mRNAs policistrônicos de grupos de bacteriocinas

Ensaio de PCR precedida de transcrição reversa confirmaram a predição computacional de que três dos quatro grupos de bacteriocinas estão organizados como operons. Na Figura 16 observa-se o resultado de RT-PCR do transcrito contendo XF1693_2 e XF1694 (Grupo IV), predito pelo DOOR v2.0 como operon. Este transcrito policistrônico foi detectado em todas as amostras de RNA total da cepa 9a5c obtidas em meio PIM-6 por 4, 5 e 7 dias – amostras 1, 2 e 3, respectivamente – e em meio PWG por 7 dias – amostra 4. Optamos por utilizar amostras de RNA total de células em diferentes estágios e meios de crescimento para ampliarmos as chances de detecção dos transcritos policistrônicos. A amplificação do transcrito de XF1693_2 e XF1694 foi utilizada como nosso controle positivo de transcrição reversa nos experimentos subsequentes.

Figura 16: Gel de agarose 1% mostrando amplicons referente ao Grupo IV de bacteriocinas, na cepa 9a5c. A primeira canaleta contém o produto de PCR com DNA genômico, mostrando o padrão esperado para o par de oligonucleotídeos utilizado. As demais canaletas mostram RT-PCR de quatro amostras de RNA total, obtidas de *X. fastidiosa* 9a5c crescida em meio PIM-6 por 4, 5 e 7 dias – amostras 1, 2 e 3 – e em meio PWG líquido modificado por 7 dias – amostra 4. O controle negativo (C-) indica a ausência de DNAg nas amostras de RNA utilizadas para transcrição reversa. Marcador de tamanho na última canaleta é o GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas).

A esquematização dos resultados para os demais grupos está mostrada na Figura 17, onde observamos que transcritos policistrônicos dos grupos GII, GIII.1 e GIII.2 foram detectados. Estes transcritos não foram detectados em todas as amostras de RNA total avaliadas, sendo que GII foi positivo nas amostras 2 e 3, GIII.1 nas amostras 1, 2 e 3, e GIII.2 na amostra 1 (dados não mostrados). A detecção dos transcritos apenas em certas amostras pode refletir a diferença dos estados fisiológicos das culturas ou a natureza instável e suscetível à degradação das moléculas de RNA durante a manipulação. Para afirmar um ou outro caso, mais réplicas biológicas serão necessárias. Entretanto, os resultados que obtivemos, com os controles que utilizamos, mostram que estes genes são transcritos em operons, o que é indicativo da importância desses genes para a fisiologia de *X. fastidiosa*, ainda que *in vitro*.

Figura 17: Esquematização dos grupos de bacteriocinas e os géis de agarose dos produtos de RT-PCR que indicam a transcrição policistônica nesses grupos. Diversas combinações e ainda outros pares de primers foram testados nestas regiões, mas não resultaram em amplificação em quatro amostras biológicas. O controle de amplificação de RNA total com os oligonucleotídeos dos grupos foi omitido da figura. Marcadores de tamanho (L) utilizados são o GeneRuler 100 bp Plus ou 1 kb (Fermentas), conforme indicado em cada gel.

Em *E. coli*, genes codificadores de bacteriocinas não estão no cromossomo, mas sim nos plasmídeos pCol (pColE1, pColV, pColH), que conferem maior virulência às cepas contra seus hospedeiros mamíferos (Riley e Gordon, 1992; Smarda e Obdržálek, 2001). Os genes estão geralmente em dois operons que contêm a sequência que codifica a bacteriocina em si, além de componentes do transportador e a proteína de imunidade. Em *X. fastidiosa* os componentes da maquinaria de síntese e processamento de bacteriocinas estão codificados em *loci* dispersos pelo cromossomo. Por exemplo, a proteína de imunidade putativa (XF0261) (Pashalidis *et al.*, 2005) está próxima das microcinas tipo V (XF0262, XF263, XF0264), os transportadores CvaA (XF1216) e CvaB (XF1220) estão na vizinhança do operon contendo XF1217, XF1218, XF1219 e XF1219_2, e CvpA (XF1948) em ainda outro *locus*. Mas é sabido que a dispersão de sistemas em *X. fastidiosa* não é um evento incomum. Um exemplo seria o sistema *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*), onde *rpfA* e *rpfB* estão localizados em um locus genômico à parte do cluster contendo *rpfF*, *rpfC*, *rpfG* e *rpfE* (Chatterjee *et al.*, 2008a).

Várias outras combinações de primers foram utilizadas nestas reações de RT-PCR para os grupos (como por exemplos primers de XF1216 (CvaA) a XF1217 e de XF1219_2 a XF1220 (CvaB)), mas apresentamos aqui apenas os pares que foram efetivos na detecção de transcritos policistrônicos.

4.4. Proteômica *shotgun* para a detecção de bacteriocinas

Visando a detecção das bacteriocinas potencialmente expressas por *X. fastidiosa* no cultivo *in vitro*, iniciamos ensaios de sequenciamento *shotgun* de proteínas (Marcotte, 2007; Chao e Hansmeier, 2012) para análise do secretoma e do proteoma de *X. fastidiosa* 9a5c. Esta estratégia utiliza cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS) e vem ocupando o lugar das convencionais eletroforeses bidimensionais em géis de poliacrilamida/SDS ao fazer uso de uma ou mais colunas de purificação acopladas sequencialmente ao espectrômetro de massas, visando a detecção de proteínas em misturas complexas (Washburn *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2010). A seguir descreveremos os resultados iniciais das análises

de proteínas do precipitado celular e do sobrenadante de culturas de *X. fastidiosa* 9a5c obtidas em meio PIM-6.

As quatro frações do lisado celular de *X. fastidiosa* 9a5c, obtidas por cromatografia de fase reversa em coluna Sep-Pak C18 com eluições com acetonitrila em diferentes concentrações – conforme observado em géis tricina-SDS na Figura 18 –, foram analisadas por espectrometria de massas utilizando ionização dos fragmentos trípticos por *electrospray* (ESI). As amostras foram preparadas de forma que os fragmentos obtidos ao final das reações de tripsinização fossem purificados em Zip Tip C18 e submetidos à análise por HPLC-MS/MS. Para a identificação das proteínas de *X. fastidiosa*, os espectrogramas foram analisados pelo programa Sequest (ThermoFinnigan) utilizando um banco de dados com as sequências de aminoácidos deduzidas das CDS da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000), mais as sequências de proteínas preditas para os genes previamente não anotados.

Esta metodologia em geral favorece as proteínas mais abundantes nas amostras, o que causou a considerável diferença entre a quantidade de bandas observadas no gel (Figura 18) e o que foi detectado no experimento (Tabela 11). Portanto, as próximas corridas no espectrômetro de massas deverão ser prolongadas, bem como devem ser consideradas etapas de pré-purificação. A utilização de resina C18 já foi reportada no isolamento das microcinas MccM, MccH47 (Vassiliadis *et al.*, 2010), E492 (Pons *et al.*, 2002b) e MccV (Fath *et al.*, 1994), devendo ser mantida.

A comparação de nossos resultados com o proteoma de *X. fastidiosa* publicado por Smolka *et al.* (2003) revelou que dentre as que identificamos estão as proteínas TolC (XF2586), uma similar a histona (XF1190) e a hipotética XF1287, cujas não haviam sido previamente reportadas. As sequências destas proteínas possuem cerca de 50% de aminoácidos apolares, o que deve ter tornado estas proteínas abundantes nas amostras que tratamos, dada a técnica cromatográfica utilizada. Este motivo, além da utilização da técnica de ESI (que beneficia a detecção de proteínas superrepresentadas) parece ter favorecido a detecção de várias proteínas de membrana, embora a finalidade fosse a detecção das microcinas, que também são proteínas hidrofóbicas.

Tabela 11. Análise de proteínas do lisado celular de *X. fastidiosa* 9a5c submetido à cromatografia manual de fase reversa (Sep-Pak C18) e sequenciamento através de HPLC-MS/MS.

Eluições com ACN	Identificador das proteínas	Tamanho esperado (kDa)	Produto	Número de acesso	Fragmentos tripticos identificados	Valor P
20%	XF1287	15,2	proteína hipotética	gi 15837888	3	6.05E-07
	XF0343	42,2	ompA, proteína de membrana externa	gi 15836945	16	3.72E-13
	XF0615	57,8	chaperona molecular GroEL	gi 15837217	9	3.03E-08
40%	XF0616	10,1	chaperona molecular GroES	gi 15837218	5	1.81E-09
	XF0644	24,9	peptidil-prolil cis-trans isomerase	gi 15837246	4	1.30E-09
	XF1803	21,2	proteína hipotética	gi 15838403	4	4.55E-11
	XF1896	20,4	proteína P6 de membrana externa	gi 15838494	2	1.08E-06
	XF2622	9,4	proteína de aclimação B	gi 15839211	2	5.82E-07
	XF0196	19,9	proteína hipotética	gi 15836801	6	2.98E-05
60%	XF0284	12,6	proteína hipotética	gi 15836889	3	7.79E-04
	XF0343	42,2	ompA, proteína de membrana externa	gi 9105169	14	3.11E-10
	XF0395	17,9	Bacterioferritina	gi 15836997	4	2.90E-12
	XF0615	57,8	chaperona molecular GroEL	gi 15837217	8	1.77E-09
	XF0616	10,1	chaperona molecular GroES	gi 15837218	3	1.15E-07
	XF1133	20,5	repressor ligador de triptofano	gi 15837735	2	1.09E-11
	XF1190	9,8	proteína similar a histonas	gi 15837792	2	3.95E-08
	XF1803	21,2	proteína hipotética	gi 15838403	3	8.70E-11
	XF2586	49,5	tolC, proteína de membrana externa	gi 15839175	4	3.16E-08
	XF2640	42,9	fator de elongação Tu	gi 15839229	2	8.34E-06
80%	XF1803	21,2	proteína hipotética	gi 15838403	3	1.45E-12
	XF0196	19,9	proteína hipotética	gi 15836801	3	8.19E-06
	XF0284	12,6	proteína hipotética	gi 9105103	2	7.98E-06
	XF0343	42,2	ompA, proteína de membrana externa	gi 15836945	12	1.28E-09
	XF0395	17,9	bacterioferritina	gi 15836997	5	3.95E-10
	XF1896	20,4	precursor de proteína da membrana externa	gi 9106989	2	7.71E-05

* Resultados significativos foram considerados para proteínas identificadas cujo valor $P \leq E-04$ e dois ou mais peptídeos detectados por proteína.

Figura 18: Tricina-SDS-PAGE (T=17%, C=3%) de frações do extrato celular de *X. fastidiosa*, corado com Comassie Brilliant Blue G. Lisado celular foi submetido à cromatografia manual de fase reversa em Sep-Pak C18, lavada com 5% de ACN em TFA 0,05% e eluída em frações de ACN 20%, 40%, 60% e 80% em TFA 0,05% (canaletas 2 a 5, respectivamente). Na canaleta 1 foi aplicado marcador de massa molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific).

A análise do sobrenadante em eletroforese em gel de poliácridamida em tampão tricina (tricina-SDS-PAGE) confirmou a presença de bandas correspondentes a proteínas de menor massa molecular (Figura 19a), no gel corado pelo método de AgNO_3 . Ressaltamos que foram realizados ensaios de RT-qPCR para verificar a expressão de um gene de cada *cluster* de bacteriocinas em amostra de RNA total extraído da cepa 9a5c cultivada nas mesmas condições utilizadas para análise proteômica. Tendo detectado os transcritos de bacteriocinas (dados não mostrados), esperávamos a detecção dos produtos proteicos correspondentes. Mesmo com o tratamento da amostra de sobrenadante com dispositivos de ultrafiltração de outros tamanhos de corte, remoção de açúcares com metanol 80%, aplicação em coluna de fase reversa Sep-Pak C18 e eluições com diferentes concentrações de ACN, a única proteína que obtivemos após análise por HPLC-MS/MS foi a XF1287. Desta forma, a estratégia de proteômica *shotgun* diretamente do sobrenadante de *X. fastidiosa* precisará ser refinada para a detecção das bacteriocinas.

Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) de amostras do sobrenadante de cultura de *X. fastidiosa* crescida em *PIM-6*. Canaletas 1 e 3 contêm o marcador de massa molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific). Canaleta 2: amostra do sobrenadante de cultura de *X. fastidiosa* 9a5c crescida por 4 dias. Canaleta 4: amostra do sobrenadante de cultura mista de *X. fastidiosa* (cepas 9a5c e J1a12) crescida por 5 dias. Utilizamos o mesmo volume de pré-inóculo de 9a5c e de J1a12 com DOs similares para o cultivo misto. Os géis foram corados pelo método de AgNO_3 .

Por outro lado, vale ressaltar a detecção da proteína hipotética XF1287, encontrada aparentemente com abundância no sobrenadante e também no extrato celular. Esta proteína, originalmente anotada como polipeptídeo de 146 aminoácidos, foi reanotada na plataforma IMG/ER como um polipeptídeo de 99 aminoácidos que possui sequência sinalizadora de secreção. Trata-se de polipeptídeo com função desconhecida, existente em todas as cepas com genoma sequenciado e aparentemente exclusivo do gênero *Xylella*.

Além de questões associadas à metodologia empregada (como o limiar de detecção), temos que considerar que a não detecção das bacteriocinas no proteoma pode refletir um eventual silenciamento da sua expressão. Já foi reportado que os níveis de transcritos de XF0263 (microcina tipo V) são dramaticamente reduzidos após passagens sucessivas no cultivo *in vitro* (de Souza *et al.*, 2005). Embora em nossos experimentos tenhamos utilizado culturas com menos de 15 passagens, sugerimos que trabalhos futuros sejam realizados com culturas recém-isoladas de plantas.

Nossa última tentativa de detectar as bacteriocinas se deu com a análise dos géis das Figuras 18 e 19, de onde bandas na faixa de baixa massa molecular foram recortadas e submetidas ao sequenciamento de proteínas do Instituto Armand-Frappier (Laval, Canadá). Os resultados ainda deverão ser replicados, mas pelo menos três fragmentos correspondentes à XF1219 foram encontrados na amostra do lisado celular eluído da coluna C18 com 60% de acetonitrila (dados não mostrados). A detecção de uma proteína correspondente a uma bacteriocina em cultura de *X. fastidiosa* é um dado inédito na literatura e será fundamental para direcionar os próximos passos desta linha de pesquisa.

Para investigar as bacteriocinas no secretoma, tentamos crescer culturas mistas de *X. fastidiosa*, com base na hipótese de que a presença de uma cepa pudesse fazer uso do seu conjunto de bacteriocinas para inibir o crescimento da outra, como esperado para uma proteína com atividade antimicrobiana, ou atuando em processos dependentes da densidade celular, como acontece com autoindutores semelhantes às bacteriocinas de Gram-positivas (Michiels *et al.*, 2001; Dirix *et al.*, 2004). Para isso, avaliamos inicialmente em gel o sobrenadante de culturas mistas de *X. fastidiosa* (9a5c e J1a12) crescidas nos meios PIM-6 (meio mínimo) na expectativa de visualizar enriquecimento em proteína de menor massa molecular (Figura 19b). O mesmo foi realizado com o cultivo em meio PWG e observamos um rastro ao longo da canaleta que reflete a natureza complexa do meio PWG, descartando a possibilidade de uso deste meio para análises de secretoma (dados não mostrados). Em ambos os casos observamos o aparecimento de proteínas na faixa de baixa massa molecular, ainda que o perfil de proteínas pareça ter sido alterado.

Não tivemos sucesso na avaliação de uma potencial atividade anti-microbiana destes sobrenadantes e frações do extrato celular quando ensaiados contra *E. coli* DH5 α , conforme descrito na literatura (Pons *et al.*, 2002b). Embora os controles contendo estreptomicina 100 μ g/mL tenham mostrado o halo de inibição, não verificamos atividade inibitória de crescimento para as frações testadas (dados não mostrados). Nossa expectativa era de que pelo menos as microcinas tipo V de *X. fastidiosa* pudessem agir contra a enterobactéria, mas a concentração das nossas proteínas pode estar abaixo da mínima necessária para inibir o crescimento bacteriano, ou *E. coli* não faz parte dos alvos sensíveis às bacteriocinas de *X. fastidiosa*. Existem vários relatos de bacteriocinas inibindo cepas filogeneticamente distantes

(Rea *et al.*, 2011), mas em geral seus alvos são cepas mais próximas evolutivamente, o que confere vantagem à cepa bacteriocinogênica em nichos onde há competição por recursos utilizados em comum (Nes *et al.*, 1996).

Ainda que a detecção de XF1219 por espectrometria de massas tenha de ser replicada, os resultados obtidos são satisfatórios para guiar futuras análises no estudo das bacteriocinas de *X. fastidiosa*. Estas proteínas têm sido associadas à virulência de patógenos de animais e de plantas (Padilla *et al.*, 2004; Gillor *et al.*, 2009; Inglis *et al.*, 2009; Smajs *et al.*, 2010), além de que linhagens bacteriocinogênicas vem sendo consideradas como alternativa no controle microbiano (Walls *et al.*, 2003; Desriac *et al.*, 2010; Santagati *et al.*, 2012). Assim, avaliamos a continuidade deste projeto como importante para o entendimento das estratégias de colonização empregadas por *X. fastidiosa*.

5. Conclusões

Virtualmente todas as bactérias estudadas até o momento produzem compostos antimicrobianos proteicos denominados bacteriocinas. Estas toxinas influenciam a estrutura da microbiota em um determinado nicho e favorecem a diversidade de linhagens tanto ao nível de população quanto também de comunidade, podendo ainda apresentar um papel regulatório em funções dependentes de densidade celular, conforme descrito para algumas bactérias. Sua atividade antibiótica contra cepas filogeneticamente relacionadas pode ser interessante para aplicações como no uso de cepas bacteriocinogênicas atuando como probióticos, no biocontrole de doenças animais e vegetais, bem como a obtenção de novos compostos antimicrobianos. Ainda que a aplicação das bacteriocinas no controle de doenças causadas em plantas possa ser considerada uma alternativa, o estudo do desta classe de toxinas em fitopatógenos ainda é bastante restrito (Robledo *et al.*, 1998; Chuang *et al.*, 1999; Heu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Hert *et al.*, 2005; Pashalidis *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2007; Hert *et al.*, 2009; Roh *et al.*, 2010).

A varredura pelo genoma de *X. fastidiosa* revelou 13 bacteriocinas de baixo peso molecular (microcinas) produzidas por CDS organizadas em quatro *loci* ao longo do cromossomo de *X. fastidiosa* 9a5c, ainda que os plasmídeos varridos aparentemente não sintetizem bacteriocinas, como acontece frequentemente em outras bactérias. Um motivo extraído de sequências de promotores de genes de bacteriocinas foi varrido pelo genoma de *X. fastidiosa* e possibilitou a predição de um regulon, onde outros genes de patogenicidade e virulência estão inseridos. Uma análise comparativa dos *loci* de bacteriocinas de *X. fastidiosa* 9a5c no genoma de outras cepas de genoma conhecido revelou que cada uma apresenta peculiaridades com relação ao seu arsenal de bacteriocinas putativas.

Na literatura existe ainda dados de expressão da microcina tipo V codificada pela CDS XF0263 durante a infecção na planta, o que aponta a importância desta classe de toxinas. Verificamos que os *loci* em geral apresentam variabilidade nas cepas sequenciadas, fato esperado para genes que conferem adaptação e virulência à bactéria na invasão dos seus nichos. A detecção dos transcritos codificando bacteriocinas, em alguns casos policistrônicos, nos deram indícios de que elas são efetivamente produzidas e, por fim, relatamos a detecção de uma proteína correspondente a uma microcina hipotética (XF1219) em culturas laboratoriais de *X. fastidiosa*, o que garante que mais esforços serão direcionados para a caracterização dessa classe de toxinas.

6. Bibliografia

1. **Aguilar, E., Villalobos, W., Moreira, L., Rodríguez, C. M., Kitajima, E. W. e Rivera, C.** 2005. First Report of *Xylella fastidiosa* Infecting Citrus in Costa Rica. Plant Disease 89:687-687.
2. **Almeida, R. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. e Purcell, A.** 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. Annals of the Entomological Society of America 98:775-86.
3. **Almeida, R. P. e Purcell, A.** 2006. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization on the precibarium of sharpshooter vectors relative to transmission to plants. Ann. Entomol. Soc. Am. 99:884-90.
4. **Alves, E., Leite, B., Marucci, R., Pascholati, S., Lopes, J. e Andersen, P.** 2008. Retention sites for *Xylella fastidiosa* in four sharpshooter vectors (Hemiptera: Cicadellidae) analyzed by Scanning Electron Microscopy. Current Microbiology 56:531-538.

5. **Andersen, P. C., Brodbeck, B. V. e Mizell, R. F.** 1989. Metabolism of amino acids, organic acids and sugars extracted from the xylem fluid of four host plants by adult *Homalodisca coagulata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 50:149-159.
6. **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.
7. **Atteson, K.** 1999. The performance of neighbor-joining methods of phylogenetic reconstruction. *Algorithmica* 25:251-78.
8. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K.** 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
9. **Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T. et al.** 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.
10. **Backus, E. A., Andrews, K. B., Shugart, H. J., Carl Greve, L., Labavitch, J. M. e Alhaddad, H.** 2012. Salivary enzymes are injected into xylem by the glassy-winged sharpshooter, a vector of *Xylella fastidiosa*. *J Insect Physiol* 58:949-59.
11. **Backus, E. A. e Morgan, D. J.** 2011. Spatiotemporal colonization of *Xylella fastidiosa* in its vector supports the role of egestion in the inoculation mechanism of foregut-borne plant pathogens. *Phytopathology* 101:912-22.
12. **Bailey, T. L. e Elkan, C.** 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2:28-36.
13. **Bailey, T. L. e Gribskov, M.** 1998. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* 14:(48-54).
14. **Banks, D. J., Lei, B. e Musser, J. M.** 2003. Prophage induction and expression of prophage-encoded virulence factors in group A *Streptococcus serotype* M3 strain MGAS315. *Infect Immun* 71:7079-86.
15. **Bayer, E. M., Bottrill, A. R., Walshaw, J., Vigouroux, M., Naldrett, M. J., Thomas, C. L. e Maule, A. J.** 2006. *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* 6:301-11.
16. **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.
17. **Bierbaum, G. e Sahl, H. G.** 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* 10:2-18.
18. **Blua, M. J., Phillips, P. A. e Redak, R. A.** 1999. A new sharpshooter threatens both crops and ornamentals. *Calif. Agric.* 53:22-5.
19. **Boughammoura, A., Matzanke, B. F., Bottger, L., Reverchon, S., Lesuisse, E., Expert, D. e Franza, T.** 2008. Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* 190:1518-30.
20. **Bove, J. M. e Ayres, A. J.** 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* 59:346-54.
21. **Boyer, A. E. e Tai, P. C.** 1998. Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J Bacteriol* 180:1662-72.
22. **Braun, V., Patzer, S. I. e Hantke, K.** 2002. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* 84:365-80.

23. **Brown, S. P., Fredrik Inglis, R. e Taddei, F.** 2009. SYNTHESIS: Evolutionary ecology of microbial wars: within-host competition and (incidental) virulence. *Evolutionary Applications* 2:32-39.
24. **Cascales, E., Buchanan, S. K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. e Cavard, D.** 2007. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:158-229.
25. **Chao, T. C. e Hansmeier, N.** 2012. The current state of microbial proteomics: where we are and where we want to go. *Proteomics* 12:638-50.
26. **Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. e van der Donk, W. A.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev* 105:633-84.
27. **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.
28. **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.
29. **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. *J Bacteriol* 192:4534.
30. **Cho, W. K., Chen, X. Y., Rim, Y., Chu, H., Kim, S., Kim, S. W., Park, Z. Y. e Kim, J. Y.** 2010. Proteome study of the phloem sap of pumpkin using multidimensional protein identification technology. *J Plant Physiol* 167:771-8.
31. **Cho, W. K., Chen, X. Y., Uddin, N. M., Rim, Y., Moon, J., Jung, J. H., Shi, C., Chu, H., Kim, S., Kim, S. W., Park, Z. Y. e Kim, J. Y.** 2009. Comprehensive proteome analysis of lettuce latex using multidimensional protein-identification technology. *Phytochemistry* 70:570-8.
32. **Chuang, D. Y., Chien, Y. C. e Wu, H. P.** 2007. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *J Bacteriol* 189:620-6.
33. **Chuang, D. Y., Kyeremeh, A. G., Gunji, Y., Takahara, Y., Ehara, Y. e Kikumoto, T.** 1999. Identification and cloning of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* bacteriocin regulator gene by insertional mutagenesis. *J Bacteriol* 181:1953-7.
34. **Coletta-Filho, H. D. e Machado, M. A.** 2003. Geographical Genetic Structure of *Xylella fastidiosa* from Citrus in Sao Paulo State, Brazil. *Phytopathology* 93:28-34.
35. **Cotter, P. D., Hill, C. e Ross, R. P.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3:777-88.
36. **Czárán, T. L., Hoekstra, R. F. e Pagie, L.** 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:786-790.
37. **da Silva, F. R., Vettore, A. L., Kemper, E. L., Leite, A. e Arruda, P.** 2001. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters* 203:165-171.
38. **Dam, P., Oلمان, V., Harris, K., Su, Z. e Xu, Y.** 2007. Operon prediction using both genome-specific and general genomic information. *Nucleic Acids Res* 35:288-98.
39. **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. *Curr Microbiol* 6:309-14.
40. **Davis, M. J., Purcell, A. H. e Thomson, S. V.** 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science (New York, N.Y.)* 199:75-77.
41. **de Jong, A., van Heel, A. J., Kok, J. e Kuipers, O. P.** 2010. BAGEL2: mining for bacteriocins in genomic data. *Nucleic Acids Res* 38:W647-51.

42. **de Jong, A., van Hijum, S. A., Bijlsma, J. J., Kok, J. e Kuipers, O. P.** 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res* 34:W273-9.
43. **De La Fuente, L., Burr, T. J. e Hoch, H. C.** 2008. Autoaggregation of *Xylella fastidiosa* cells is influenced by type I and type IV pili. *Appl Environ Microbiol*.
44. **de Mello Varani, A., Souza, R. C., Nakaya, H. I., de Lima, W. C., Paula de Almeida, L. G., Kitajima, E. W., Chen, J., Civerolo, E., Vasconcelos, A. T. e Van Sluys, M. A.** 2008. Origins of the *Xylella fastidiosa* prophage-like regions and their impact in genome differentiation. *PLoS One* 3:e4059.
45. **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.
46. **Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P. e Fleury, Y.** 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine drugs* 8:1153-1177.
47. **Diep, D. B., Havarstein, L. S. e Nes, I. F.** 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol* 178:4472-83.
48. **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* 25:1425-40.
49. **Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M. e Prevost, H.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:564-82.
50. **Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J. e Rebuffat, S.** 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* 24:708-34.
51. **Durrett, R. e Levin, S.** 1997. Allelopathy in Spatially Distributed Populations. *J Theor Biol* 185:165-71.
52. **Economou, A., Hamilton, W. D., Johnston, A. W. e Downie, J. A.** 1990. The *Rhizobium* nodulation gene nodO encodes a Ca²⁺(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J* 9:349-54.
53. **Evans, T. J., Coulthurst, S. J., Komitopoulou, E. e Salmond, G. P.** 2010. Two mobile *Pectobacterium atrosepticum* prophages modulate virulence. *FEMS Microbiol Lett* 304:195-202.
54. **Fath, M. J., Zhang, L. H., Rush, J. e Kolter, R.** 1994. Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry* 33:6911-7.
55. **Figueroa-Bossi, N. e Bossi, L.** 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol Microbiol* 33:167-76.
56. **Gerard, F., Pradel, N. e Wu, L. F.** 2005. Bactericidal activity of colicin V is mediated by an inner membrane protein, SdaC, of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:1945-50.
57. **Gillor, O., Giladi, I. e Riley, M. A.** 2009. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiol* 9:165.

58. **Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., Kolsto, A. B. e Lereclus, D.** 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. PLoS One 3:e2793.
59. **Gordon, D., Oliver, E. e Littlefield-Wyer, J.** 2007. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria, p. 5-18. *In* Bacteriocins. Springer Berlin Heidelberg.
60. **Gordon, D. M. e O'Brien, C. L.** 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. Microbiology 152:3239-44.
61. **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.
62. **Hayes, F.** 2003. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. Science 301:1496-9.
63. **Hert, A. P., Marutani, M., Momol, M. T., Roberts, P. D., Olson, S. M. e Jones, J. B.** 2009. Suppression of the bacterial spot pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated mutant of *Xanthomonas perforans*. Appl Environ Microbiol 75:3323-30.
64. **Hert, A. P., Roberts, P. D., Momol, M. T., Minsavage, G. V., Tudor-Nelson, S. M. e Jones, J. B.** 2005. Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains. Appl Environ Microbiol 71:3581-8.
65. **Heu, S., Oh, J., Kang, Y., Ryu, S., Cho, S. K., Cho, Y. e Cho, M.** 2001. gly gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. Appl Environ Microbiol 67:4105-10.
66. **Hill, B. L. e Purcell, A. H.** 1994. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. Phytopathology 85:209-12.
67. **Hill, B. L. e Purcell, A. H.** 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in Plants Required for Transmission by an Efficient Vector. Phytopathology 87:1197-201.
68. **Holtmark, I., Eijsink, V. G. e Brurberg, M. B.** 2008. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Lett 280:1-7.
69. **Hopkins, D. L.** 1989. *Xylella Fastidiosa*: Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. Annual Review of Phytopathology 27:271-290.
70. **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.
71. **Inglis, R. F., Gardner, A., Cornelis, P. e Buckling, A.** 2009. Spite and virulence in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 106:5703-7.
72. **Janse, J. D. e Obradovic, A.** 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. Journal of Plant Pathology 92:S1.35-48.
73. **Jetter, K. M. e Morse, J. G.** 2010. The economics of Pierce's Disease in California. Presented at the Pierce's Disease Research Symposium, California, USA.
74. **Judd, R. C.** 1996. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Peptides, p. 101-107. *In* The Protein Protocols Handbook. Humana Press.
75. **Killiny, N. e Almeida, R.** 2008. Role of fimbrial and afimbrial adhesins and gum production on *Xylella fastidiosa* insect transmission. Phytopathology 98:S81-S81.
76. **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.

77. **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.
78. **Kimura, M.** 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78:454-458.
79. **Kirkup, B. C. e Riley, M. A.** 2004. Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature* 428:412-414.
80. **Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., Heeb, S., Schock, U., Pohl, T. M., Wiehlmann, L. e Tummeler, B.** 2010. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* 192:1113-21.
81. **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.
82. **Koide, T., Zaini, P. A., Moreira, L. M., Vencio, R. Z., Matsukuma, A. Y., Durham, A. M., Teixeira, D. C., El-Dorry, H., Monteiro, P. B., da Silva, A. C., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A. M. e Gomes, S. L.** 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J Bacteriol* 186:5442-9.
83. **Lacava, P. T., Parker, J., Andreote, F. D., Dini-Andreote, F., Ramirez, J. L. e Miller, T. A.** 2007. Analysis of the bacterial community in glassy-winged sharpshooter heads. *Entomological Research* 37:261-266.
84. **Leite, B., Ishida, M. L., Alves, E., Carrer, H., Pascholati, S. F. e Kitajima, E. W.** 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Braz J Med Biol Res* 35:645-50.
85. **Li, W. B., Pria, W. D., Lacava, P. M., Qin, X. e Hartung, J. S.** 2003. Presence of *Xylella fastidiosa* in Sweet Orange Fruit and Seeds and Its Transmission to Seedlings. *Phytopathology* 93:953-8.
86. **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.
87. **Li, Y., Hao, G., Galvani, C. D., Meng, Y., De La Fuente, L., Hoch, H. C. e Burr, T. J.** 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* 153:719-26.
88. **Livak, K. J. e Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 25:402-8.
89. **Lopes, F. F., Neves, M. F., Kalaki, R. B. e Trombin, V. G.** 2012. Competitiveness of the Orange Juice Chain in Brazil. Presented at the IFAMA 2012 Forum & Symposium, Shanghai, China.
90. **Lopes, J. R. S.** 1999. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da Clorose Variegada dos Citros. *Laranja* 20.
91. **Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. e Clark, D. P.** 2011. Microbial Growth Control. *In* Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education, Inc., San Francisco, CA.
92. **Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V. e Xu, Y.** 2009. DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* 37:D459-63.
93. **Marcotte, E. M.** 2007. How do shotgun proteomics algorithms identify proteins? *Nat Biotech* 25:755-757.

94. **Markowitz, V. M., Mavromatis, K., Ivanova, N. N., Chen, I. M., Chu, K. e Kyripides, N. C.** 2009. IMG ER: a system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics* 25:2271-8.
95. **McElrone, A. J., Sherald, J. L. e Forseth, I. N.** 2001. Effects of Water Stress on Symptomatology and Growth of *Parthenocissus quinquefolia* Infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease* 85:1160-1164.
96. **McElrone, A. J., Sherald, J. L. e Forseth, I. N.** 2003. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. *Journal of Experimental Botany* 54:419-430.
97. **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.
98. **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.
99. **Michiels, J., Dirix, G., Vanderleyden, J. e Xi, C.** 2001. Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 9:164-8.
100. **Milanez, J. M., Parra, J. R. P., Custódio, I. A., Magri, D. C., Cera, C. e Lopes, J. R. S.** 2003. Feeding and survival of citrus sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) on host plants. *Florida Entomologist* 86:154-7.
101. **Molina, R. O., Gonçalves, A. M. O., Zanutto, C. A. e Nunes, W. M. C.** 2010. Populational fluctuation of vectors of *Xylella fastidiosa*, wells in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties of northwest Paraná State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:549-554.
102. **Monteiro, P. B., Teixeira, D. C., Palma, R. R., Garnier, M., Bove, J. M. e Renaudin, J.** 2001. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. *Appl Environ Microbiol* 67:2263-9.
103. **Naas, T., Blot, M., Fitch, W. M. e Arber, W.** 1994. Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 136:721-30.
104. **Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. e Holo, H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:113-28.
105. **Nes, I. F., Diep, D. B. e Holo, H.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol* 189:1189-98.
106. **Neves, M. F., Trombin, V. G., Lopes, F. F., Kalaki, R. e Milan, P.** 2011. The Orange Juice Business: A Brazilian Perspective. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
107. **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.
108. **Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H. S. e Kristiansen, P. E.** 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 10:19-37.
109. **Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G. e Nissen-Meyer, J.** 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:210-9.

110. **Osiro, D., Colnago, L. A., Otoboni, A. M., Lemos, E. G., de Souza, A. A., Coletta Filho, H. D. e Machado, M. A.** 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiol Lett* 236:313-8.
111. **Padilla, C., Lobos, O. e Hubert, E.** 2004. *Shigella flexneri* strains produce bacteriocins active against members of the human microbial intestinal flora. *Rev Latinoam Microbiol* 46:85-8.
112. **Parret, A. H. A. e De Mot, R.** 2002. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends in Microbiology* 10:107-112.
113. **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. *Omic* 9:77-90.
114. **Penyalver, R. e Lopez, M. M.** 1999. Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. *Appl Environ Microbiol* 65:1936-40.
115. **Perring, T. M., Farrar, C. A. e Blua, M. J.** 2001. Proximity to citrus influences Pierce's disease in Temecula Valley vineyards. *Calif. Agric.* 55:13-8.
116. **Pierry, P. M.** 2012. Pirosequenciamento e análise comparativa de genomas do fitopatógeno *Xylella fastidiosa*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
117. **Pons, A. M., Laneluc, I., Cottenceau, G. e Sable, S.** 2002a. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84:531-7.
118. **Pons, A. M., Zorn, N., Vignon, D., Delalande, F., Van Dorselaer, A. e Cottenceau, G.** 2002b. Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob Agents Chemother* 46:229-30.
119. **Purcell, A. H. e Feil, H.** 2001. Glassy-winged sharpshooter. *Pesticide Outlook* 12:199-203.
120. **Purcell, A. H. e Hopkins, D. L.** 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34:131-151.
121. **Randall, J. J., Goldberg, N. P., Kemp, J. D., Radionenko, M., French, J. M., Olsen, M. W. e Hanson, S. F.** 2009. Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the southwestern United States. *Appl Environ Microbiol* 75:5631-8.
122. **Rea, M., Ross, R. P., Cotter, P. e Hill, C.** 2011. Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria, p. 29-53. *In* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer New York.
123. **Rebuffat, S.** 2011a. Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?, p. 55-72. *In* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer New York.
124. **Rebuffat, S.** 2011b. Microcins from Enterobacteria: On the Edge Between Gram-Positive Bacteriocins and Colicins, p. 333-349. *In* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer New York.
125. **Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R., Blua, M. J., Mizell, R. F., 3rd 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.
126. **Riley, M. A.** 2011. Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities, p. 13-26. *In* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer New York.

127. **Riley, M. A. e Chavan, M. A.** 2007. Introduction, p. 1-3. *In* Bacteriocins Ecology and Evolution. Springer Berlin Heidelberg.
128. **Riley, M. A. e Gordon, D. M.** 1992. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *J Gen Microbiol* 138:1345-52.
129. **Riley, M. A. e Wertz, J. E.** 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* 56:117-137.
130. **Robleto, E. A., Kmiecik, K., Oplinger, E. S., Nienhuis, J. e Triplett, E. W.** 1998. Trifolitoxin Production Increases Nodulation Competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under Agricultural Conditions. *Appl Environ Microbiol* 64:2630-3.
131. **Rodríguez, C. M., Obando, J. J., Villalobos, W., Moreira, L. e Rivera, C.** 2001. First Report of *Xylella fastidiosa* Infecting Coffee in Costa Rica. *Plant Disease* 85:1027-1027.
132. **Roh, E., Park, T. H., Kim, M. I., Lee, S., Ryu, S., Oh, C. S., Rhee, S., Kim, D. H., Park, B. S. e Heu, S.** 2010. Characterization of a new bacteriocin, Carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Appl Environ Microbiol* 76:7541-9.
133. **Roper, M. C., Greve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2007. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:411-419.
134. **Rossetti, V., Garnier, M., Bové, J. M., Beretta, M. J. G., Teixeira, A. R. R., Quaggio, J. A. e Negri, J. D. 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, Series 3, Sciences de la Vie* 310:345-9.
135. **Rozen, S. e Skaletsky, H.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-86.
136. **Sang, Y. e Blecha, F.** 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews* 9:227-235.
137. **Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
138. **Santagati, M., Scillato, M., Patane, F., Aiello, C. e Stefani, S.** 2012. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:23-31.
139. **Santana, W. O.** 2012. Genômica Comparativa de *Xylella fastidiosa*. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
140. **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.
141. **Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M. e Chang, C. J.** 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27:290-300.
142. **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.
143. **Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R. e Nunney, L.** 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol* 71:3832-9.

144. **Shi, X. Y., Dumenyo, C. K., Hernandez-Martinez, R., Azad, H. e Cooksey, D. A.** 2009. Characterization of regulatory pathways in *Xylella fastidiosa*: genes and phenotypes controlled by *gacA*. *Appl Environ Microbiol* 75:2275-83.
145. **Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T., Rodrigues, J. L., Carrilho, E. e Tsai, S. M.** 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol Res* 160:429-36.
146. **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.
147. **Smajs, D., Micenikova, L., Smarda, J., Vrba, M., Sevcikova, A., Valisova, Z. e Woznicova, V.** 2010. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol* 10:288.
148. **Smarda, J. e Obdržálek, V.** 2001. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* 41:367-74.
149. **Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K., Schenk, A. e Ullrich, M. S.** 2001. Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Arch Microbiol* 176:393-9.
150. **Smolka, M. B., Martins-de-Souza, D., Winck, F. V., Santoro, C. E., Castellari, R. R., Ferrari, F., Brum, I. J., Galembeck, E., Della Coletta Filho, H., 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* 3:224-37.
151. **Sorensen, J. T. e Gill, R. J.** 1996. A range extension of *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Clypeorrhyncha: Cicadellidae) to southern California. *Pan-Pacific Entomologist* 72:160-61.
152. **Spira, B., de Almeida Toledo, R., Maharjan, R. e Ferenci, T.** 2011. The uncertain consequences of transferring bacterial strains between laboratories - *rpoS* instability as an example. *BMC Microbiology* 11:248.
153. **Stone, K. e Williams, K.** 1996. Enzymatic Digestion of Proteins in Solution and in SDS Polyacrylamide Gels, p. 415-425. *In* The Protein Protocols Handbook. Humana Press.
154. **Studholme, D. J., Downie, J. A. e Preston, G. M.** 2005. Protein domains and architectural innovation in plant-associated Proteobacteria. *BMC Genomics* 6:17.
155. **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-9.
156. **Thorne, E. T., Stevenson, J. F., Rost, T. L., Labavitch, J. M. e Matthews, M. A.** 2006. Pierce's Disease Symptoms: Comparison with Symptoms of Water Deficit and the Impact of Water Deficits. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:1-11.
157. **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.
158. **Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzon, D., Lombard, C., Rebuffat, S. e Peduzzi, J.** 2010. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother* 54:288-97.
159. **Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzon, D. e Peduzzi, J.** 2011. Class II Microcins, p. 309-332. *In* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer New York.
160. **Veening, J.-W., Smits, W. K. e Kuipers, O. P.** 2008. Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 62:193-210.

161. **Walls, T., Power, D. e Tagg, J.** 2003. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by the normal flora of the nasopharynx: potential to protect against otitis media? *J Med Microbiol* 52:829-33.
162. **Warren, J. G. e Kirkpatrick, B. C.** 2009. Inhibition of *Xylella fastidiosa* polygalacturonase to produce Pierce's disease resistant grapevines. *Phytopathology* 99:S138-S138.
163. **Washburn, M. P., Wolters, D. e Yates, J. R., 3rd.** 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19:242-7.
164. **Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G. e Lowe, S. K.** 1981. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. *Appl Environ Microbiol* 42:357-63.
165. **Willey, J. M. e van der Donk, W. A.** 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 61:477-501.
166. **Williams, K. P., Gillespie, J. J., Sobral, B. W., Nordberg, E. K., Snyder, E. E., Shallom, J. M. e Dickerman, A. W.** 2010. Phylogeny of gammaproteobacteria. *J Bacteriol* 192:2305-14.
167. **Wulff, N. A., Carrer, H. e Pascholati, S. F.** 2006. Expression and purification of cellulase XF0818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 53:198-203.
168. **Yamada, K., Hirota, M., Niimi, Y., Nguyen, H. A., Takahara, Y., Kamio, Y. e Kaneko, J.** 2006. Nucleotide sequences and organization of the genes for carotovoricin (Ctv) from *Erwinia carotovora* indicate that Ctv evolved from the same ancestor as *Salmonella typhi* prophage. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:2236-47.
169. **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.
170. **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. *J Bacteriol* 193:5576-7.
171. **Zhang, X., Clark, C. A. e Pettis, G. S.** 2003. Interstrain inhibition in the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*: purification and characterization of a highly specific bacteriocin and cloning of its structural gene. *Appl Environ Microbiol* 69:2201-8.

Anexo A - Súmula curricular

Rodrigo Roberto Rafagnin Duarte

Nascimento: 30/01/1988
Foz do Iguaçu, PR, Brasil
Contato: rodrigo.duarte88@gmail.com

Formação acadêmica

2010 – 2012 Mestrado em Bioquímica	USP – Universidade de São Paulo Instituto de Química Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) São Paulo, SP, Brasil Orientação: Dra. Aline Maria da Silva Bolsista do CNPq
2006 – 2009 Bacharelado em Ciências Biológicas	UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Cascavel, PR, Brasil

Formação complementar

2011 Palestrante	USP – Universidade de São Paulo Instituto de Química, Departamento de Bioquímica VI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular São Paulo, SP, Brasil Minicurso sobre RT-PCR em tempo real e palestra intitulada "Desvendando os mecanismos de adaptação e virulência de <i>Xylella fastidiosa</i> "
2009 Iniciação científica Bolsista PIBITI	UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas Cascavel, PR, Brasil Orientação: Dra. Clarice Aoki Osaku "Produção, purificação e caracterização parciais das pectinases produzidas por <i>Aspergillus caesiellus</i> utilizando bagaço de cevada como fonte de carbono"
2008 Iniciação científica Bolsista PIBIC	UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Cascavel, PR, Brasil Orientação: Dra. Marina Kimiko Kadowaki "Seleção de enzimas de interesse industrial produzidas por <i>Aspergillus caesiellus</i> utilizando resíduos agroindustriais"

Publicações em eventos

DUARTE, R.R.R.; ZAINI, P.A.; da SILVA, A.M. Prediction of bacteriocin-encoding genes in *Xylella fastidiosa* and analysis of their transcript levels. XLI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2012.

ROCHA, S.D.; **DUARTE, R.R.R.**; OSAKU, C.A. Use of agroindustrial waste on the production of polygalacturonases by *Aspergillus caesiellus*. II Seminars on Technology Innovation, Cascavel, PR, Brasil, 2010.

ABRAHÃO, J.; ANDRADES, D.; **DUARTE, R.R.R.**; CUNHA, E.B.; KADOWAKI, M.K. Optimization of xylanases production by *Fusarium heterosporum* through Response Surface Methodology. I International Seminars in Science, Technology and Environment, Cascavel, PR, Brasil, 2009.

DUARTE, R.R.R.; OSAKU, C.A.; SIMÃO, R.C.G.; KADOWAKI, M.K. Hydrolases production by *Aspergillus caesiellus* under submerged and solid-state fermentation induced with agroindustrial sources. XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2009.

DUARTE, R.R.R.; ABRAHÃO, J.; SIMÃO, R.C.G.; OSAKU, C.O.; KADOWAKI, M.K. Production of xylanases by *Aspergillus caesiellus* grown in different agroindustrial sources under submerged and solid-state conditions. VIII Brazilian Seminars of Enzymatic Technologies, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

SILVA, G.R.; DAPPER, T.B.; ABRAHÃO, J.; **DUARTE, R.R.R.**; SIMÃO, R.C.G.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M.K. Invertase production by *Aspergillus caesiellus* under solid-state and submerged fermentation. III Convention of Pharmaceutical Sciences and III Symposium in Food Science and Technology from Mercosul, Cascavel, PR, Brasil, 2008.

DUARTE, R.R.R.; ABRAHÃO, J.; CUNHA, E.B.; SARTORI, P.R.; SIMÃO, R.C.G.; OSAKU, C.A.; KADOWAKI, M.K. Pectinolytic enzymes produced under submerged and solid-state fermentation by *Aspergillus caesiellus* with agroindustrial waste and by-products. III Convention from the Tri-national Science Academy, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2008.