



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(IMUNOLOGIA & DIP/GENÉTICA & BIOTECNOLOGIA)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Autor: Fabiano Touzjdjian P. K. Távora**

Dissertação de Mestrado intitulada:

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* CONTRASTANTES EM VIRULÊNCIA**

JUIZ DE FORA - MG

2017

**FABIANO TOUZDJIAN PINHEIRO KOHLRAUSCH TÁVORA**

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* CONTRASTANTES EM VIRULÊNCIA**

Dissertação Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Octávio L. Franco  
Coorientadora: Dra. Angela Mehta**

JUIZ DE FORA - MG

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Távora, Fabiano Touzджian Pinheiro kohlrausch.

Proteômica comparativa de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* contrastantes em virulência / Fabiano Touzджian Pinheiro kohlrausch Távora. -- 2017.

106 f. : il.

Orientador: Octávio Luiz Franco

Coorientador: Angela Mehta

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Proteômica. 2. Interação planta-patógeno. 3. *Xanthomonas*. 4. *Brassica*. 5. Virulência. I. Franco, Octávio Luiz, orient. II. Mehta, Angela, coorient. III. Título.

Dissertação de autoria de **Fabiano Touzjian P. K. Távora**, intitulada: **PROTEÔMICA COMPARATIVA DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris pv. campestris* CONTRASTANTES EM VIRULÊNCIA**, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, em 03/03/2017, definida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

---

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco  
Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciência Genômicas e Biotecnologia – UCB

---

Dra. Angela Mehta dos Reis  
Coorientadora

Embrapa/Cenargen – Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos  
Examinador Interno

---

Prof. Dr. Magno Rodrigues Junqueira  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse estudo, fruto de dois anos de muito trabalho, pesquisa, entrega e dedicação, aos meus pais, alicerces de minha vida, e a minha querida esposa, pessoa que soube compreender minha ausência em virtude das demandas e exigências inerentes à pesquisa científica.*

*A vocês, do fundo do meu coração.*

## AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos:

À Dr<sup>a</sup>. Angela Mehta pela clareza, orientação e todo o apoio neste período;

Ao Dr. Octávio Luiz Franco, pelo dom de ouvir e compreender, por ter apostado e me concedido essa oportunidade única;

Aos sábios e dignos Professores com os quais tive a oportunidade de aprender, atores protagonistas de todas as minhas conquistas pessoais, acadêmicas e profissionais;

Aos meus estimados colegas do Laboratório de Genômica e Proteômica, especialmente à doutoranda Cristiane dos Santos, pelos ensinamentos e ajuda nos finais de semana e feriados; à mestranda Daiane Ribeiro, ao aluno de pós-doutorado Esaú Megias e à aluna de iniciação científica Pollyana Nobrega, por todo o auxílio e atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biológicas (Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG – UFJF, em especial ao Coordenador do Programa, o Dr. Cláudio Galuppo, por todo suporte prestado, em tempos tão difíceis;

Aos Pesquisadores e colaboradores da EMBRAPA/CENARGEN de Brasília-DF, em especial aos Pesquisadores André Murad, pela presteza nas análises proteômicas; Luciano Paulino, pela gentil colaboração na parte de análise envolvendo nano biotecnologia; ao Engenheiro agrônomo Osmundo Brilhante, pelo plantio cuidadoso de nossos cultivares;

À EMBRAPA – recursos genéticos e biotecnológicos, por todo apoio e colaboração;

À CAPES, pelo financiamento acadêmico e do projeto.

## RESUMO

A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) consiste no agente causal da podridão negra que acomete todas as variedades comerciais do gênero *Brassica*, sendo responsável por perdas significativas na brassicultura nacional e mundial. O objetivo deste trabalho consistiu em traçar o perfil proteômico de dois isolados de *Xcc*, distintos quanto à virulência, utilizando um sistema *in vitro* para a identificação de proteínas diferencialmente abundantes relacionadas aos mecanismos de virulência. Inicialmente, curvas de crescimento bacteriano foram desenvolvidas afim de se determinar o momento apropriado para a coleta e extração de proteínas. Os isolados *Xcc*51 e *Xcc*Y21 foram cultivados em dois meios de cultura distintos, sendo um nutricionalmente rico (NYG) e outro capaz de induzir a transcrição de genes relacionados à virulência (meio mínimo – *XVM1*), até atingirem a fase exponencial máxima de crescimento bacteriano ( $OD_{600nm} = 0,8$  em meio NYG e  $OD_{600nm} = 0,58$  em meio *XVM1*). As proteínas totais dos isolados foram extraídas usando fenol, precipitadas com acetato de amônio em metanol, digeridas com tripsina e analisadas pela técnica 2D-nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, utilizando a plataforma de identificação e quantificação de proteínas *Protein Lynx Global Server* (PLGS). Os dados obtidos foram comparados com sequências depositadas no banco de dados *XGB* (The *Xanthomonas* Genome Browser). Foram identificadas mais de 600 proteínas no proteoma total de ambos os isolados de *Xcc*, revelando a expressão de proteínas exclusivas, bem como um perfil diverso de proteínas aumentadas e diminuídas entre os isolados durante o cultivo nos dois meios. Com o auxílio do software *BLAST2GO*, foi realizada uma análise baseada na ontologia dos produtos gênicos. Os resultados obtidos evidenciam que durante a condição de indução de genes de patogenicidade, o isolado mais virulento *Xcc*51 se destacou pela abundância de importantes proteínas relacionadas à infecção bacteriana, como *bfeA*, *TonB*, *ompP6*, *clpB*, *tig*, *acvB*, quando comparado à quantidade exibida no isolado *Xcc*Y21. Os dados proteômicos gerados pelo presente estudo apresentaram um interessante rol de proteínas diferencialmente aumentadas e supostamente relacionadas à patogenicidade e virulência de *Xcc*, o qual poderá nortear futuras investigações quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dessa fitobactéria.

Palavras-chave: Meio mínimo. Patogenicidade. Perfil proteômico. Podridão negra. 2D-nanoUPLC/MS<sup>E</sup>.

## ABSTRACT

The phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) consist in the black rot disease causal agent, which affects all Brassica genus commercial varieties. This disease results in significant losses for brassicultures worldwide. The present study aimed to analyze the proteomic profile of two distinct *Xcc* isolates, employing an *in vitro* system for the identification of differentially abundant proteins, related to pathogenicity and virulence mechanisms. Initially, bacterial growth curves were assessed to determine the appropriate stage for protein extraction. *Xanthomonas* isolates *Xcc*51 and *Xcc*Y21 were cultured in two distinct mediums, a nutritionally rich medium (*NYG*) and a minimal medium - *XVM1*, capable of inducing the transcription of pathogenicity genes, until they reached maximum exponential growth phase ( $OD_{600nm} = 0.8$  A. and  $OD_{600nm} = 0.52$  A., respectively). Total proteins were extracted using phenol/ammonium acetate, trypsin digested and analyzed by 2D-nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, coupled with Protein Lynx Global Server (PLGS). *Xanthomonas* Genome Browser database was used, leading to the identification of more than 600 proteins and revealing the expression of unique proteins as well as diverse profiles of increased and decreased proteins. Blast2GO software was applied to analyze gene ontology. Results suggest that during pathogenicity inducing condition, the isolate *Xcc*51 increases the abundance of crucial infection-related proteins such as *bfeA*, *TonB*, *ompP6*, *clpB*, *acvB*, when compared to *Xcc*Y21 which could explain its higher virulence. The proteomic data showed by the present study delivered a list of interesting proteins presumably related with pathogenicity and virulence of *Xcc*, which could guide future investigations on molecular mechanisms involved in this phyto bacterium pathogenesis.

Keywords: Black rot. Minimal medium. Pathogenicity. Proteomic profile. 2D-nanoUPLC/ MS<sup>E</sup>.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) sintomas da doença podridão negra em cultivar híbrida de *Brassica*, **Veloce F1**, evidenciando típica lesão em formato de “V” nas folhas do vegetal. (B) uma cultivar de *Brassica* com sintomas de infecção sistêmica após infiltração de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (C) uma amostra controle, do cultivar saudável ..... 2
- Figura 2 – Morfotipos de *B. oleracea*; as duas primeiras linhas da esquerda para a direita: repolho cabeça, couve de bruxelas, brócolis, couve-flor, repolho roxo, couve-flor roxa e couve galega. (Adaptado de F. Cheng et. al., 2014)..... 4
- Figura 3 - em (A) Eletromicrografia de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) evidenciando seu formato característico e flagelo polar único (Adaptado de Vicente & Holub, 2013); (B e C) cultura dos isolados de *Xcc51* e *XccY21* em meio *NYG* após 72h de cultivo, mantida sob a temperatura de 28°C, destacando-se a diferença na quantidade produzida do exopolissacarídeo xantana, por ambos os isolados, respectivamente. .... 6
- Figura 4 - Desenho experimental evidenciando o **cultivo de ambos os isolados bacterianos** (*XccY21* e *Xcc51*) em meio nutricionalmente rico (*NYG*) e em meio indutor de genes de patogenicidade (*XVM1*) e o preparo para a extração e análise proteômica das proteínas totais. .... 21
- Figura 5 - Esquema do **teste de sintomas**, in planta. A suspensão dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em solução salina (NaCl 0.85%), foi inoculada em dois pontos por limbo foliar nas duas cultivares de *B. oleracea*....25
- Figura 6 - Esquema evidenciando a **execução da dinâmica bacteriana**. A) cultivar resistente de *B. oleracea* com 45 dias de cultivo; B) infiltração da suspensão bacteriana no limbo foliar; C) obtenção do disco foliar da região infiltrada; D) plaqueamento das diluições; E - G) cultivo das diluições após 48h. .... 26
- Figura 7 - **Amplificação do gene 16S rRNA**. [M]: Marcador (1 kb); [C- e C+]: controle negativo e positivo; [1]: *Xcc51* – origem; [2] *XccY21* – origem; [3 e 5]: réplicas de *Xcc51*; [4 e 6]: réplicas de *XccY21*. .... 30
- Figura 8 - **Sequências dos genes 16S rRNA**, referente aos isolados bacterianos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc51* e *XccY21*. Estando representado somente as sequências nucleotídicas de uma réplica biológica para cada isolado.....31
- Figura 9 - Painéis da **avaliação de sintomas** na planta. Uma suspensão dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em solução salina (NaCl 0.85%), foi inoculada em dois pontos por limbo foliar, nas duas cultivares de *B. oleracea*. Os sintomas gerados foram observados por 5 dias após a infiltração e seguidos até o decesso das cultivares. O experimento foi realizado em triplicata, com resultados visualmente similares, para cada uma das condições.... 33
- Figura 10 - **Dinâmica bacteriana**: comparação das dinâmicas (em  $CFU.cm^{-2}$ ) entre os isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, aferida em 5 tempos após infiltração em folhas da cultivar híbrida (***Astrus plus***) de *B. oleracea*. As diluições foram realizadas em triplicatas, com resultados similares entre as réplicas. A barra de erro representa o desvio padrão da média..... 35
- Figura 11 - **Dinâmica bacteriana**: representação do crescimento (em  $CFU.cm^{-2}$ ) entre três réplicas de cada isolado bacteriano (RB1, RB2 e RB3), nos cinco tempos pós infiltração em folhas da cultivar híbrida (***Astrus plus***) de *B. oleracea*. A barra de erro representa o desvio padrão da média.....35
- Figura 12 - Aferição das **curvas de crescimento** ( $\log_{10}CFU.ml^{-1}$ ) dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em meio *NYG*. O experimento foi realizado em triplicata, com resultados similares entre as réplicas. A barra de erro representa o desvio padrão da média.....37
- Figura 13 - Aferição das **curvas de crescimento** ( $\log_{10}CFU.ml^{-1}$ ) dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em meio *XVM1*. O experimento foi realizado em triplicata, com resultados similares entre as réplicas. A barra de erro representa o desvio padrão da média.....38
- Figura 14 - Esquema experimental da **filtragem** a que os dados proteômicos gerados foram submetidos, visando garantir a reprodutibilidade da análise. Somente as proteínas presentes em ao menos quatro réplicas técnicas e validadas estatisticamente foram selecionadas. Estando representado apenas uma das quatro condições.....39
- Figura 15 - Quantificação das **proteínas totais** presentes nos proteomas dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* quando cultivados em meio mínimo – *XVM1* (A) e em meio nutricionalmente rico – *NYG* (B) .....40

- Figura 16 – Quantificação das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21, quando cultivados em meio mínimo - *NYG*.....41
- Figura 17 – Quantificação das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21, quando cultivados em meio mínimo - *XVM1*.....41
- Figura 18 – Identificação das **proteínas diferencialmente abundantes** no proteoma dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21, quando cultivados em meio mínimo - *XVM1*, em função de sua quantidade relativa. Proteínas diferencialmente aumentadas (A) e diminuídas (B) na relação Xcc51/XccY21.....42
- Figura 19 – Quantificação e **categorização funcional** das **proteínas totais** identificadas no proteoma dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21 quando cultivados em *NYG*, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional.....43
- Figura 20 – Quantificação e **categorização funcional** das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21, quando cultivados em *NYG*, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional. Proteínas diferencialmente aumentadas (A) e diminuídas (B) no proteoma do isolado Xcc51, em relação ao isolado XccY21.....43
- Figura 21 – Quantificação e **categorização funcional** das **proteínas totais** identificadas no proteoma dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21 quando cultivados em meio mínimo – *XVM1*, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional.....44
- Figura 22 – Quantificação e **categorização funcional** das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21, quando cultivados em meio mínimo – *XVM1*, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional. Proteínas diferencialmente aumentadas (A) e diminuídas (B) no proteoma do isolado Xcc51, em relação ao isolado XccY21.....44
- Figura 23 – **Modelo simplificado ilustrativo da virulência** do isolado bacteriano Xcc51, com base nas proteínas diferencialmente aumentadas e funcionalmente categorizadas em seu proteoma. As categorias funcionais estão evidenciadas em negrito e sublinhadas, estando as proteínas identificadas dentro de caixas brancas. As setas indicam as proteínas diferencialmente aumentadas EPS – exopolissacarídeo; ROS – espécies reativas de oxigênio.....46
- Figura 24 – Representação esquemática da **incorporação do elemento ferro** pela bactéria fitopatogênica *X. campestris pv. campestris*. Evidenciando-se (em vermelho) algumas das proteínas diferencialmente aumentadas no proteoma do isolado bacteriano Xcc51, identificadas pelo presente estudo.....51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da Análise de Variância (ANOVA) referente aos valores médios (CFU.cm <sup>-2</sup> ) das dinâmicas bacterianas entre os isolados Xcc51 e XccY21.....	30
Tabela 2 - <b>Blastn</b> das sequências parciais das porções 5' e 3' do gene 16S <i>rRNA</i> do isolado Xcc51, revelando o nível de identidade dessas sequências com àquelas constantes do banco de dados do <i>GenBank</i> .....	32
Tabela 3 - <b>Blastn</b> das sequências parciais das porções 5' e 3' do gene 16S <i>rRNA</i> do isolado XccY21, revelando o nível de identidade dessas sequências com àquelas constantes do banco de dados do <i>GenBank</i> .....	32
Tabela 4 - Resultado do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey referente aos valores médios (CFU.cm <sup>-2</sup> ) das dinâmicas bacterianas entre os isolados Xcc51 e XccY21. ....	36
Tabela 5 - Grau de pureza e quantificação das amostras de <i>DNA</i> genômico das amostras 'origens' dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21 e de suas respectivas réplicas. [1]: Xcc51 – origem; [2] XccY21 – origem; [3]: réplica de Xcc51; [4]: réplica de XccY21. ....	36

## LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1 - <b>Proteínas totais</b> expressas por ambos os isolados bacterianos <b>Xcc51 e XccY21</b> , identificadas na condição de cultivo em meio nutricionalmente rico - <b>NYG</b> (condição controle).....	64
Tabela suplementar 2 - <b>Proteínas totais</b> expressas por ambos os isolados bacterianos <b>Xcc51 e XccY21</b> , identificadas na condição de cultivo em meio mínimo – <b>XVM1</b> (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).....	74
Tabela suplementar 3 - <b>Proteínas únicas (exclusivas)</b> identificadas no proteoma dos isolados Xcc51 e XccY21, na condição de cultivo em <b>NYG</b> .....	85
Tabela suplementar 4 - <b>Proteínas únicas (exclusivas)</b> identificadas no proteoma dos isolados Xcc51 e XccY21, na condição de cultivo em meio mínimo - <b>XVM1</b> (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).....	85
Tabela suplementar 5 - <b>Proteínas diferencialmente aumentadas</b> identificadas no proteoma do isolado Xcc51 a partir da razão <b>XccY21/Xcc51</b> (< 0,66), na condição de cultivo em meio mínimo – <b>XVM1</b> (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).....	86
Tabela suplementar 6 - <b>Proteínas diferencialmente diminuídas</b> identificadas no proteoma do isolado Xcc51 a partir da razão <b>XccY21/Xcc51</b> (> 1,5), na condição de cultivo em meio mínimo – <b>XVM1</b> (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência) .....	88
Tabela suplementar 7 - <b>Categorização funcional</b> das proteínas diferencialmente abundantes ( <b>aumentadas</b> ) identificadas no proteoma do isolado Xcc51, na condição de cultivo em meio mínimo – <b>XVM1</b> . <b>Ontologia Gênica (GO)</b> baseada em análise utilizando o software <i>Blast2GO</i> <sup>®</sup> .....	88
Tabela suplementar 8 - <b>Categorização funcional</b> das proteínas diferencialmente abundantes ( <b>diminuídas</b> ) identificadas no proteoma do isolado Xcc51, na condição de cultivo em meio mínimo – <b>XVM1</b> . <b>Ontologia Gênica (GO)</b> baseada em análise utilizando o software <i>Blast2GO</i> <sup>®</sup> .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ATCC	“ <i>American Type Culture Collections</i> ” (Coleção de culturas americanas)
<i>avr</i>	Gene de avirulência
BSA	“ <i>Bovine Serum Albumin</i> ” (Albumina Sérica Bovina)
CFU.cm <sup>2</sup>	“ <i>Colony Forming Units per square centimeter</i> ” (Unidades formadoras de colônia por centímetro quadrado)
CFU.mL <sup>-1</sup>	“ <i>Colony Forming Units per milliliter</i> ” (Unidades formadoras de colônia por mililitro)
DNA	“ <i>Desoxyribonucleic Acid</i> ” (Ácido desoxiribonucleico)
DSF	“ <i>Diffusible Signaling Factor</i> ” (Fator de sinalização difusível)
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Di-tiotreitol
EDTA	“ <i>Ethylene-Diamine Tetraacetic Acid</i> ” (Ácido tetra acético di-amino etileno)
EPS	“ <i>Extracellular Polymeric Substance</i> ” (Exopolissacarídeo)
HAI	Horas Após Inoculação
<i>hpa</i>	Gene <i>hrp</i> associado
HR	“ <i>Hypersensitivity Response</i> ” (Resposta de Hipersensibilidade)
<i>hrc</i>	Gene <i>hrp</i> conservado
<i>hrp</i>	“ <i>Hypersensitivity Response and Pathogenicity</i> ” (Genes da resposta de hipersensibilidade e patogenicidade)
kDa	Unidade de massa atômica – kiloDalton
LPS	Lipopolissacarídeo
m/z	Razão massa/carga
MS	“ <i>Mass Spectrometry</i> ” (Espectrometria de Massa)
MS/MS	Espectrômetro de massas em série
MS <sup>E</sup>	Método de fragmentação em espectrometria de massa

<i>nLC-MS/MS</i>	Cromatografia líquida capilar acoplada a espectrometria de massa em série
NYG	“ <i>Nutrient Yeast Glycerol</i> ” (Meio nutriente de cultura)
OD	“ <i>Optical Density</i> ” (Densidade óptica)
PM	Peso molecular
R	Gene de resistência
<i>rpf</i>	“ <i>Regulation of Pathogenicity Factors</i> ” (Fatores reguladores de patogenicidade)
SSTD	Sistema de Secreção Tipo II
SSTQ	Sistema de Secreção Tipo IV
SSTT	Sistema de Secreção Tipo III
TFA	“ <i>Trifluoroacetic Acid</i> ” (Ácido trifluoroacético)
UPLC	“ <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> ” (Cromatografia líquida de ultra performance)
XVM	“ <i>Xanthomonas Vincent Minimal Medium</i> ” (Meio mínimo de cultivo bacteriano)
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
XVM1	“ <i>Xanthomonas Vincent Modified Minimal Medium</i> ” (Meio mínimo de cultivo bacteriano)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Podridão negra – A doença das crucíferas.....	1
1.2 O gênero <i>Brassica</i> .....	3
1.3 O agente etiológico: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	5
1.4 Mecanismos moleculares da interação planta-patógeno.....	7
1.5 Era pós-genômica e a análise proteômica.....	11
1.6 Proteômica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
3.1 Isolados bacterianos, condição de cultivo e curvas de crescimento <i>in vitro</i> .....	20
3.2 Identificação dos isolados bacterianos.....	21
3.2.1 Extração e quantificação do DNA.....	22
3.2.2 Amplificação do gene rRNA 16S.....	22
3.2.3 Sequenciamento gênico.....	23
3.3 Avaliação da virulência de <i>Xcc51</i> e <i>XccY21</i> <i>in planta</i> .....	24
3.4 Dinâmica bacteriana <i>in planta</i> .....	25
3.5 Extração proteica.....	26
3.6 Preparo das amostras e análise dos peptídeos.....	27
3.7 Identificação das proteínas a partir dos espectros gerados por LC-MS/MS.....	29
3.8 Análise das proteínas quanto a suas funções no genoma.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
4.1 Identificação dos isolados bacterianos.....	30
4.1.1 Extração do DNA, amplificação do gene 16S e sequenciamento.....	30
4.2 Avaliação da virulência de <i>Xcc51</i> e <i>XccY21</i> <i>in planta</i> .....	32
4.3 Dinâmica bacteriana <i>in planta</i> .....	34
4.4 Curvas de crescimento bacteriano <i>in vitro</i> .....	37

4.5 Análise proteômica .....	38
4.6 Categorização funcional das proteínas identificadas .....	42
4.7 Análise das proteínas diferencialmente abundantes associadas à virulência, identificadas em <i>XVM1</i> .....	47
4.7.1 Processamento da informação genética.....	47
4.7.2 Receptores de membrana .....	49
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>91</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PODRIDÃO NEGRA – A DOENÇA DAS CRUCÍFERAS

A agricultura brasileira e mundial tem sido bastante afetada por várias doenças causadas por espécies bacterianas do gênero *Xanthomonas*, ocasionando assim perdas substanciais em várias culturas de grande importância econômica. A podridão negra, primeiramente descrita como a doença do repolho (Garman, 1894), possui como agente causador uma bactéria, nomeada à época como *Bacillus campestris*, com colônias de pigmento amarelo quando em cultura (Pammel, 1895a; Russel; Smith, 1898). Atualmente, tem-se identificado a podridão negra em todos os continentes onde acontece o cultivo de Brassicaceae, sendo esta considerada uma das doenças mais destrutivas de crucíferas (Vicente & Holub, 2013).

O fitopatógeno causador da podridão negra, a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, pode sobreviver em sementes, alojando-se na sua superfície e/ou no seu interior, em restos culturais fibrosos de plantas doentes, em plantas daninhas e em plantas doentes remanescentes no campo. A disseminação desse patógeno a longas distâncias pode ser realizada através de sementes ou de mudas doentes e a curtas distâncias por respingos de água de chuva ou de irrigação, geralmente na direção dos ventos predominantes, podendo, ainda, ser disseminado durante os tratos culturais. Temperaturas entre 28°C e 30°C e a presença de água de irrigação, chuva ou condensação são favoráveis para a penetração da bactéria, que ocorre através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou por ferimentos provocados na superfície da parte aérea (Siqueira *et al.*, 1985).

Em condições ideais, o surgimento dos sintomas da podridão negra pode ocorrer de 10 a 14 dias após a penetração do patógeno. Os sintomas podem ser observados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. No campo, são comuns lesões amarelas em forma de “V”, com o vértice voltado para o centro da folha (Cook *et al.*, 1952). A característica típica dessa lesão pode se dar em virtude da principal porta de entrada do patógeno em plantas provenientes de sementes sadias, os hidatódios, aberturas nas margens da folha que desempenham importante papel na gutação, um dos processos por meio do qual ocorre a eliminação de água pela



planta. À medida que o patógeno coloniza os tecidos da folha, a lesão vai sendo formada e delimitada pelas nervuras secundárias, adquirindo tal formato característico. A bactéria pode também colonizar os vasos do xilema da planta, escurecendo-os. Com o desenvolvimento da doença, as folhas tornam-se amarelas e podem apresentar necrose (Mansfield *et al.*, 2012). Em alguns casos, observa-se subdesenvolvimento, murcha, queda prematura de folhas e apodrecimento das plantas afetadas (Figura 1).

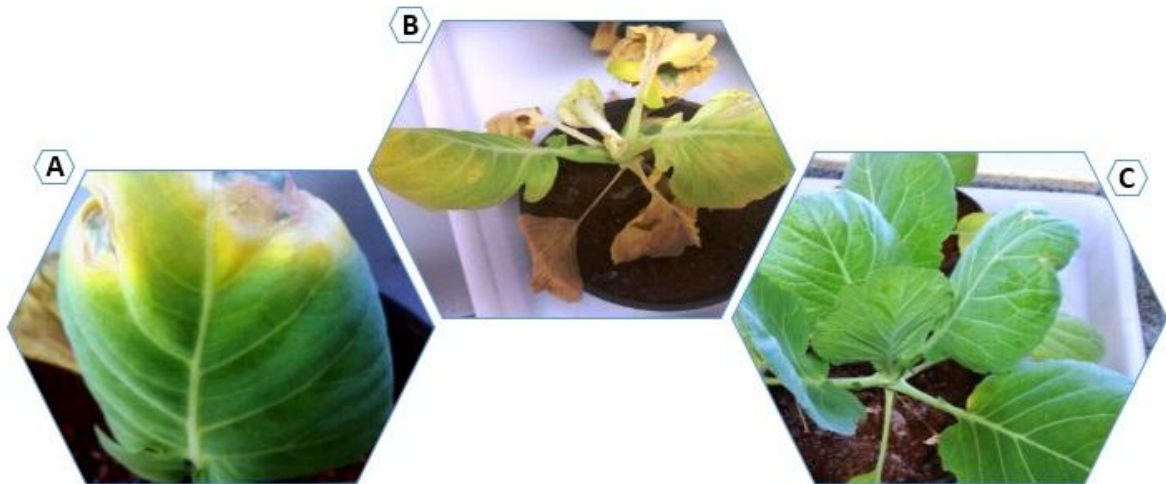


Figura 1 - (A) sintomas da doença podridão negra em cultivar híbrido de Brassica, **Veloce F1**, evidenciando típica lesão em formato de “V” nas folhas; (B) cultivar de *Brassica oleracea* var. *capitata* com sintomas de infecção sistêmica após infiltração de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; (C) amostra controle da cultivar saudável.

A prevenção consiste na principal medida de controle da podridão negra, uma vez instalada no campo, o controle torna-se difícil por se tratar de uma doença sistêmica. O emprego de sementes sadias mostra-se também indispensável para controle dessa bacteriose. Pesquisas têm demonstrado que a infecção máxima tolerável em sementes de brócolis, nos EUA, tem sido de 0,01%. O tratamento térmico de sementes de repolho e de couve-de-Bruxelas (imersão em água a 50°C, durante 25 min) e de sementes de brócolis na mesma temperatura, durante 20 min, tem sido indicado. Trabalhos desenvolvidos no Brasil demonstram a eficácia do tratamento com água a 50°C por 30 min para erradicação de *Xcc* de sementes de repolho. Sementes tratadas nessas condições deram origem a menos de 2 % de plantas doentes, enquanto que sementes controle originaram 70 % de plantas com sintomas de podridão negra. Outra possibilidade de controle consiste no tratamento de sementes com antibióticos. Pode-se usar imersão por 30 min em solução de aureomicina ou terramicina, na dosagem de 1 a 3 g do antibiótico por litro de água. O excesso do

antibiótico pode ser neutralizado imergindo-se as sementes por 30 min em salmoura (15 g de sal de cozinha por litro de água) (Kimati *et al.*, 2005).

Atualmente, o desenvolvimento e a utilização de cultivares híbridos de Brassica, mais resistentes, tem gerado resultados satisfatórios quanto à redução dos riscos de contaminação tanto das próprias cultivares, como também, indiretamente, da água, ar, solo e seus lençóis freáticos, devido a substituição no uso de produtos químicos nocivos como pesticidas, fungicidas e antibióticos, além de contribuir para mitigar os danos à saúde humana e animal (Makishima, 1993; Staskawicz *et al.*, 1995). Entretanto, ainda é um desafio a obtenção de cultivares resistentes a patógenos que apresentem também características agronômicas desejáveis.

## 1.2 O GÊNERO *Brassica*

A família Brassicaceae (ex. Cruciferae) compreende 3.500 espécies agrupadas em 350 gêneros. Nativos do Oeste da Europa, do Mediterrâneo e regiões temperadas da Ásia. Em relação ao seu valor comercial, as mais importantes pertencem ao gênero *Brassica*: *B. oleracea*; *B. napus*; *B. juncea* e *B. rapa* (Warwick *et al.*, 2009) (Figura 2). Esse gênero inclui uma grande variedade de hortaliças de alto valor nutricional e econômico, tais como o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*), couve de Bruxelas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), mostarda (*Brassica juncea*), nabo (*Brassica rapa* var. *rapa*), agrião (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), rabanete (*Raphanus sativus*) e rúcula (*Eruca sativa*), sendo utilizadas também como adubo verde, forrageiras, condimentos, na produção de óleo a partir das sementes e até mesmo como plantas ornamentais (Vilela, 1983).

No Brasil, os cultivos de Brassica têm maior expressão na região Centro-Sul, notadamente em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Siqueira, 1981; Vilela, 1983). Dentre as Brassicas, o repolho, a couve comum, a couve-flor, o rabanete e o brócolis têm se expandido consideravelmente nos últimos anos. Segundo dados obtidos a partir de uma análise conjuntural realizada em setembro de 2015, por técnicos da CEASA - MG, somente o repolho comercializado nas Centrais de

Abastecimento de Minas Gerais movimentou a soma de R\$ 756.000,00, no mesmo ano (CEASA - Minas Gerais/MG, 2015).



Figura 2 – Morfotipos de *B. oleracea*; as duas primeiras linhas da esquerda para a direita: **repolho cabeça**, couve de bruxelas, brócolis, couve-flor, repolho roxo, couve-flor roxa e couve galega. (Adaptado de Cheng *et. al.*, 2014).

Segundo um estudo realizado por Lagercrantz e colaboradores (1996), três são as espécies de Brassica que merecem destaque, *B. nigra* (portando oito cromossomos em seu genoma,  $n=8$ ), *B. oleracea* ( $n=9$ ), *B. rapa* ( $n=10$ ), em virtude de provavelmente formarem a base para o desenvolvimento de muitas outras culturas importantes. O mesmo grupo de pesquisadores supracitado, ao comparar os genomas de tais espécies, observaram um alto grau de conservação do conteúdo genético dessas espécies, sugerindo o fato dos três genomas terem herdado cópias inteiras, embora rearranjadas, do genoma de um mesmo ancestral, sendo a diferença no número de cromossomos explicada pela ocorrência de fissão e/ou fusão dos mesmos.

Há décadas, busca-se desenvolver cultivares e híbridos de repolho resistentes à podridão negra. No Brasil, diversos desses produtos já foram testados quanto a sua resistência. Em estudo realizado por Galli *et al.* (2001) foi constatado que o repolho híbrido denominado “*Matsukase*” foi moderadamente resistente ao fitopatógeno *Xanthomonas campestris*. Maringoni *et al.* (1997) observou resistência em cultivares de repolho “Saikô”.

Todavia, em virtude dos poucos estudos e da escassez de informações quanto a caracterização dos diferentes isolados de *Xcc* ocorrentes no Brasil, os programas de melhoramento de Brassicas ainda enfrentam o desafio de se obter cultivares mais resistentes a *Xcc*. Sendo assim, o sucesso do melhoramento desses

cultivares visando resistência a doenças depende diretamente da melhor caracterização e conhecimento prévio sobre a variabilidade do agente causador da doença.

### **1.3 O AGENTE ETIOLÓGICO: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

*Xanthomonas* (do grego 'xanthos', significa amarelo, e 'monadas', significa unidade) compreende um vasto gênero de bactérias Gram-negativas, medindo cerca de 0,4 – 0,7 µm x 0,7 -1,6 µm, aeróbicas estritas, baciliformes, com flagelo polar único e que vivem em associação com vegetais. O gênero, o qual reside na base das Gammaproteobacterias (Jun *et al.*, 2010), compreende 27 espécies que, coletivamente, causam serias doenças em aproximadamente 400 hospedeiros vegetais, incluindo uma grande variedade de culturas como o arroz, limão, banana, repolho, tomate, pimenta e feijão. Com exceção da bactéria *Xanthomonas* (*Stenotrophomonas*) *maltophilia*, todos os outros microrganismos desse gênero são fitopatogênicos (Vauterin *et al.*, 1996a). Espécies individuais podem compreender múltiplos patovares, isto é, variantes patogênicos dentro da mesma espécie e que são definidos de acordo com a sua especificidade de hospedeiro e, ou, pelo tecido vegetal que colonizam.

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são cosmopolitas, com duas características morfológicas comumente presentes: 1) a produção de goma xantana (exopolissacarídeo que auxilia na dispersão e sobrevivência do patógeno, além de ser uma importante matéria prima nas indústrias de alimentos e petrolífera (Büttner & Bonas, 2010), conferindo à suas colônias um aspecto mucoide e 2) a coloração amarelada de suas colônias, quando cultivadas em meio nutriente NYG, após 2 ou 3 dias de incubação a 28°C, devido à produção de pigmentos, principalmente xantomonadina (Vauterin *et al.*, 1995).

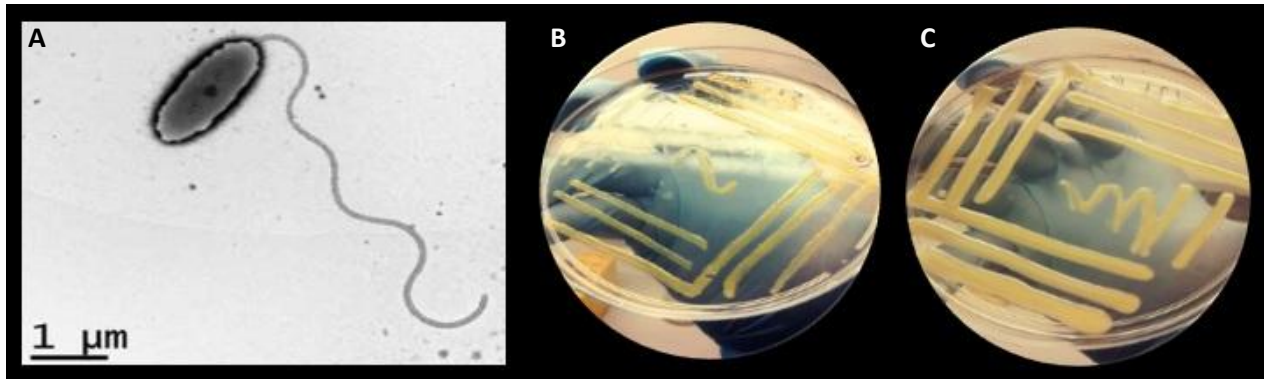


Figura 3 - (A) eletromicrografia de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) evidenciando seu formato característico e flagelo polar único (Adaptado de Vicente G. & Holub B., 2013); (B e C) cultura dos isolados de Xcc 51 e Xcc Y21 em meio NYG após 72h de cultivo, mantida sob a temperatura de 28°C, destacando-se a diferença na quantidade produzida do exopolissacarídeo xantana, por ambos os isolados, respectivamente.

A taxonomia desse gênero foi inicialmente determinada de acordo com a preferência de seu hospedeiro (tipicamente seu hospedeiro de origem) e, conseqüentemente, um vasto número de espécies e patovares foram assim definidos (Burkholder, 1957). Subseqüentemente, as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas foram usadas para classificar os isolados de *Xanthomonas* em oito grupos fenotípicos (Den Mooter & Swings, 1990). Mais tarde, as espécies de *Xanthomonas* foram reclassificadas com base na técnica de hibridização DNA – DNA (Vauterin *et al.*, 1995), revelando um total de vinte e uma espécies restringidas a seis patovares, a saber: *X. c. pv. aberrans*; *X. c. pv. armoraceae*; *X. c. pv. barbareae*; *X. c. pv. campestris*; *X. c. pv. incanae* e *X. c. pv. raphani*. A partir do trabalho de Vicente & Holub, 2013, o patógeno vascular *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc) (Figura 3), foi designado como sendo o único responsável pela podridão negra das Brassicaceae, tornando-a uma bactéria-modelo para estudos relacionados à interação planta-bactéria fitopatogênica.

Recentes estudos genômicos comparativos e funcionais estão servindo para aprimorar o entendimento sobre este grupo de bactérias, no que tange a seus mecanismos de patogenicidade, identificação de novos fatores envolvidos em sua virulência e assim, revelar os passos de como as *Xanthomonas* spp. têm evoluído e se adaptado aos mais diversos microambientes em que são encontradas. Até o presente momento, três linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* tiveram seus genomas sequenciados por completo, revelando que a maioria das bactérias do gênero possui um genoma composto de um único cromossomo circular de tamanho aproximado entre 4.6 Mb e 5.3 Mb (Da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005). Apesar da similaridade gênica em todas os isolados, o alinhamento completo desses genomas

de *Xcc* possibilitou a descoberta de um grande número de inversões gênicas, translocações, inserções e deleções. A sequência gênica típica de *Xanthomonas* sp. previu a codificação de mais de 4000 tipos de proteínas, uma parte das quais é comumente responsável pela aquisição de energia e maioria das funções celulares (Vorhölter *et al.*, 2008). Quatro grupamentos gênicos associados à patogenicidade estão presentes no genoma de todas as *Xanthomonas* spp. : *xps* (*xcs*), o qual codifica o sistema de secreção do tipo II (*T2SS*); *rpf*, grupamento regulador dos fatores de patogenicidade, atuante na regulação da síntese desses fatores; *hrp*, genes da resposta de hipersensibilidade e patogenicidade, os quais codificam o sistema de secreção do tipo III (*T3SS*) e os genes do grupamento *gum*, os quais codificam as enzimas da síntese de xantana, um polissacarídeo extracelular que auxilia na dispersão e sobrevivência do patógeno. Um dado curioso a respeito do genoma das *Xanthomonas* spp. é que ele consiste de aproximadamente o mesmo número de genes das alfa-proteobactérias e beta-proteobactérias, sendo os genes remanescentes, compartilhados com grupos filogeneticamente distantes, como *Archaea*, *Eukarya* e vírus, levando a crer, portanto, que a presença de alguns desses genes em *Xanthomonas* spp. podem ser resultado de um processo de transferência horizontal de genes (Comas *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2008).

Embora a sequência do genoma de *X. campestris* pv. *campestris* esteja disponível, apenas informações concernentes aos genes não são capazes de prever o funcionamento da bactéria como um todo. O estudo do seu perfil de expressão proteica, bem como das proteínas extracelulares presentes em seu secretoma devem ser investigados. Ademais, face às escassas informações acerca da variabilidade e especificidade patogênica de isolados brasileiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é fundamental que se amplie o escopo da atual discussão, incorporando-se novas abordagens visando ao entendimento mais amplo dos aspectos da patogenicidade e virulência microbiana e das respostas associadas ao hospedeiro.

#### **1.4 MECANISMOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO**

Há tempos que a interação planta-patógeno tem sido alvo de pesquisas científicas em todo o mundo. Frente à colossal complexidade molecular dessa interação, torna-se necessário a investigação de como plantas e patógenos

reconhecem uns aos outros, estabelecendo algum tipo de relação. Constantemente expostas a microrganismos, as plantas reagem de ativando uma resposta imune inata, incluindo mecanismos de resistência basal e patógeno-específicos, desencadeados de forma extremamente rápida e precisa, que evoluem continuamente e fazem parte de sua estratégia de sobrevivência ao ataque de fitopatógenos. Uma visão contemporânea da imunidade vegetal propõe um modelo onde, a primeira linha de defesa ativa da planta envolve o reconhecimento do microrganismo, desencadeado por um estímulo em receptores específicos, como por exemplo, nos receptores de reconhecimento de padrões (*PRRs*), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs*). A esse mecanismo de resposta é dado o nome de imunidade desencadeada por *PAMP* (*PTI*). Constituem exemplos clássicos de *PAMPs* bacterianos, moléculas estruturais como flagelina, peptidoglicanos e lipopolissacarídeo (Jones & Dangl, 2006; Felix *et al.*, 1999; Erbs *et al.*, 2010) A imunidade desencadeada por *PAMP* envolve diversas vias de sinalização, podendo atuar através de mensageiros secundários (cGMP) (Ma *et al.*, 2010; Qia *et al.*, 2010), proteínas quinases (MAPKs), influxo de íons ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$ ), acúmulo precoce de espécies reativas de oxigênio (*ROS*), espessamento da parede celular e por último, porém, não menos importante, pela expressão alterada de genes relacionados à patogenicidade (*PR*) (Jones & Dangl, 2006; Chisholm *et al.*, 2006). Esse mecanismo genérico e basal de defesa tem sido observado em diversas interações planta-patógeno, corroborando a ideia de que a maioria das plantas é resistente à invasão da maioria dos patógenos. As plantas possuem ainda outro tipo de defesa, mais específica, que consiste na expressão de proteínas de resistência (*R proteins*) que atuam após alguma interferência na homeostasia de seu sistema, desencadeando uma resposta de hipersensibilidade (*HR*) e, subsequentemente, a morte celular programada (*PCD*). Objetivando a contenção e prevenção do desenvolvimento da doença ocasionado pelo patógeno, a *HR* caracteriza-se por uma série de perturbações bioquímicas, bem descritas na literatura, incluindo mudanças nos fluxos iônicos, hiperperoxidação de lipídeos, fosforilação proteica, geração de óxido nítrico e uma explosão na produção de *ROS* e compostos antimicrobianos (revisado em: Mehta, *et al.*, 2008).

Por sua vez, muitos fitopatógenos, como por exemplo, bactérias Gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, após invadir com sucesso o tecido hospedeiro, precisam se adaptar a um novo ambiente totalmente diferente do ambiente ao qual

estavam expostos. Em geral, o ambiente apoplástico dentro do hospedeiro pode ser hostil para a bactéria, pois, além de carecer de nutrientes, pode ainda conter substâncias químicas altamente nocivas como peptídeos antimicrobianos, superóxidos, fitoalexinas, polifenóis e taninos, os quais são produzidos defensivamente pelo hospedeiro (Chiang *et al.*, 1999; Clatworthy *et al.*, 2007). Por conseguinte, a patogenicidade e virulência do microrganismo estão, em grande parte, diretamente relacionados à integridade de seus sistemas de secreção.

As bactérias do gênero *Xanthomonas*, desenvolveram mecanismos que as tornaram capazes de sobrepujar a *PTI* por meio da secreção de fatores que suprimem essa resposta de defesa do vegetal, resultando em um quadro conhecido como suscetibilidade desencadeada por efetor (*ETS*). Esses efetores podem ser injetados pelo fitopatógeno dentro do citoplasma do hospedeiro por meio do sistema de secreção proteica do tipo III (*TTSS*) (Mukhtar, 2013). Essencial para a promoção da patogenicidade e a multiplicação bacteriana, a ação conjunta do *TTSS* pode ser capaz de alterar o estado homeostático em hospedeiros vegetais suscetíveis e com isso sustentar o crescimento bacteriano (Lewis *et al.*, 2009). Amplamente descrito na literatura, o efetor proteico bacteriano AvrBs3, membro de uma família de efetores descritos para o gênero *Xanthomonas*, pode ser conhecido por ativar em plantas a transcrição de genes relacionados à resistência (Zhu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Da mesma forma, as proteínas efetoras AvrB, Avr- Rpt2, AvrPphB, HopPtoK, e AvrPphE, têm demonstrado atuar na modulação da sinalização do hospedeiro via ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), e etileno, substâncias essas que possuem papel significativo no disparo das respostas imunes da planta (He *et al.*, 2004; Nafisi, 2015). Uma pertinente consideração a ser feita inclui que nem todos os efetores são reconhecidos no interior das células do hospedeiro, bem como, nem todos os receptores extracelulares reconhecem os *PAMPs* através da interação física direta (Dodds & Rathjen, 2010).

De acordo com a teoria da interação “gene-a-gene” (Flor, 1971), bactérias do gênero *Xanthomonas* desenvolveram uma relação altamente específica com certos cultivares. Flor demonstrou que a habilidade do hospedeiro, herdada geneticamente, em resistir ao patógeno é controlada por pares de genes complementares. O gene vegetal foi denominado gene de resistência (*R*) e o gene do patógeno denominado gene de avirulência (*Avr*). Portanto, plantas que produzem produtos específicos do gene *R*, são resistentes frente a patógenos que produzem produtos gênicos *Avr*



correspondentes (Flor, 1971). Em publicações mais recentes o sequenciamento do genoma de três diferentes isolados de *Xcc* possibilitaram uma compreensão mais profunda em relação a forma com que essas bactérias moldam sua expressão gênica após o disparo do sistema imune do hospedeiro, evidenciando que um único locus-*Avr* pode reconhecer múltiplos genes-*R*, bem como um *cluster* gênico-*R* pode controlar a resistência para diversas espécies de patógenos e, dessa forma, influenciar evolutivamente a dinâmica da resistência (de Meaux, & Mitchell-Olds, 2003).

Uma característica sensitiva-regulatória ubíqua entre as bactérias patogênicas consiste no denominado *quorum sensing* (QS), o qual permite à colônia bacteriana monitorar e regular sua densidade populacional. Alguns trabalhos sustentam que uma pequena molécula sinal (*DSF* - *diffusible signal-factor*), atua regulando diversas funções celulares incluindo a expressão de enzimas degradativas, produção de exopolissacarídeo, motilidade e dispersão de biofilmes (Barber *et al.*, 1997; Fouhy *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006). Ademais, esse sistema regulatório pode ser capaz de sentir o ambiente ao entorno da colônia e assegurar que os genes de patogenicidade somente sejam ativados e transcritos quando o ambiente apresentar características análogas ao espaço interno do hospedeiro. Um estímulo, capaz de disparar esse mecanismo de virulência bacteriana, constitui-se da presença de polissacarídeos na parede celular vegetal, que podem levar a indução da secreção de enzimas degradativas como celulases e pectatolases.

Meios de cultivo sintéticos, como por exemplo, o *MM1* (Schulte & Bonas, 1992), utilizado nos experimentos do presente estudo, têm sido estabelecidos para diferentes patovares de bactérias do gênero *Xanthomonas*, sendo capazes de induzir a síntese de fatores de virulência secretados pelo *TTSS*. Desse modo, esses meios basais são utilizados no intuito de mimetizar o microambiente apoplástico no interior do tecido vegetal, contendo em sua composição alguma fonte de carbono e aminoácido, concentrações ajustadas de sais metálicos, valores compatíveis de pH e de osmolaridade (Wengelnik *et al.*, 1996a; Seo *et al.*, 2008), tornando-se, portanto, uma importante ferramenta para estudos de interação planta-patógeno.

## 1.5 ERA PÓS-GENÔMICA E A ANÁLISE PROTEÔMICA

A proteômica, ou análise dos complementos proteicos do genoma de um organismo, permite uma continuidade experimental entre informações contidas na sequência genômica e o perfil proteico de uma célula, compartimento celular ou tecido específico, em diferentes condições biológicas. Objetiva-se através de suas múltiplas abordagens, estruturais e funcionais, prever sistematicamente quanto à identidade, estruturas, abundância, propriedades químicas, locais de atuação, regulação e funções desempenhadas pelas proteínas – elementos executores das funções biológicas.

Neste âmbito, o estudo de proteomas representa um grande desafio devido à alta complexidade, por exemplo, de uma célula eucariota, que pode encerrar milhares de diferentes tipos de proteínas, sendo, portanto, de extrema importância o desenvolvimento de métodos sensíveis de análise (Aebersold & Goodlett, 2001; Aebersold & Mann, 2003). Constituindo etapa crucial no processo de análise do proteoma, o fracionamento de proteínas, com o objetivo de se obter frações mais simples, pode ser alcançado através do emprego de métodos e técnicas diversos. As proteínas podem ser separadas em diferentes grupos com propriedades físicas e químicas similares, como tamanho, hidrofobicidade, carga, ponto isoelétrico ou afinidade, utilizando-se técnicas como eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE* do inglês *Sodium Dodecil Sulfate – Poliacrylamide Gel Electrophoresis*) e a cromatografia líquida (Westermeyer & Schickle, 2009).

Em decorrência dos recentes avanços tecnológicos no que tange as abordagens proteômicas, com destaque à técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massa - *UPLC-MS* (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*), experimentou-se uma considerável expansão dos estudos das proteínas, dos complexos e dinâmicos processos fisiológicos, como também das publicações científicas relacionadas a proteômica de plantas e bactérias. (Jorrín-Novo *et al.*, 2009).

Em proteômica, duas metodologias são comumente empregadas, a do tipo *top-down*, que consiste na análise por espectrometria de massa – *MS* (do inglês, *Mass spectrometry*) da proteína intacta (sem fragmentá-la em peptídeos) e a *bottom-up*, também denominada *shotgun*, uma metodologia que submete a solução complexa de proteínas a uma digestão trípica e posterior separação, por cromatografia líquida, dos

fragmentos peptídicos obtidos antes da análise por *MS* (Barbosa *et al.*, 2012). O padrão de fragmentação, revelado por *MS*, é então validado por comparação de sequências proteicas disponibilizadas em banco de dados (Yates *et al.*, 2002). Essa abordagem proporciona melhor resolução dos proteomas, favorecendo a identificação de proteínas menores e menos abundantes na amostra. Em contrapartida, nas técnicas dependentes de gel, proteínas menos abundantes podem ser perdidas (Washburn; Wolters; Yates III, 2001).

A aplicação da espectrometria de massa para análise de aminoácidos e peptídeos foi primeiramente reportada por Carl Ove Anderson (Anderson, 1958). Em *MS*, as amostras são convertidas em íons gasosos que são separados de acordo com suas razões massa-carga ( $m/z$ ) e detectados. Proteínas ou peptídeos podem ser fragmentados utilizando enzimas do tipo peptidases (ex. tripsina), sendo os fragmentos resultantes separados com o auxílio da técnica cromatografia líquida e então ionizados com a utilização de duas técnicas já bem estabelecidas, conhecidas pelas siglas *MALDI* (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), e *ESI* (do inglês *Electron Spray Ionization*), quando então, são convertidos à sua fase gasosa. A invenção da técnica *TOF-MS* (do inglês *Time of Flight - Mass Spectrometry*) e de métodos não destrutivos de conversão proteica em íons voláteis, provocaram uma revolução na espectrometria de massas (Anderson, 1958). Os íons gasosos são separados no analisador de massa. Peptídeos são fragmentados por dissociação induzida por colisão e guiados a um segundo *MS* o qual gera um conjunto de picos formados pelos fragmentos, dos quais a sequência de aminoácido de um peptídeo é inferida.

A associação do *MS* com a técnica de cromatografia líquida possibilitou uma aplicação ainda mais ampla desse equipamento, trazendo novas perspectivas ao desenvolvimento biotecnológico, às descobertas na indústria farmacêutica, aos testes clínicos, bem como, à análise ambiental (Lodha *et al.*, 2013).

Por sua vez, a cromatografia surgiu como uma estratégia de separar moléculas para seu melhor entendimento funcional. Inicialmente criada para a separação de pigmentos, a técnica de cromatografia foi evoluindo com o passar dos anos, aumentando sua precisão, velocidade e eficiência. Neste sentido, foram criados os *HPLCs* (do inglês *High Performance Liquid Chromatographers*), sendo utilizados para a separação de inúmeras moléculas, dentre elas carboidratos, compostos secundários e, em grande parte das vezes, proteínas e peptídeos (revisado em:

Franco & Gomes, 2014). As colunas cromatográficas de alto desempenho (como os conhecidos *UPLCs* de fase reversa), podem possuir resinas variáveis que permitem a separação de moléculas por hidrofobicidade, cationicidade, exclusão molecular, entre outras. A técnica *UPLC* tem o objetivo de melhorar a resolução dos espectros (velocidade, análise e sensibilidade), em relação aos dados obtidos por *HPLC*. As análises cromatográficas por *UPLC* utilizam uma fase estacionária com partículas menores que 2 µm, uma clara vantagem frente às análises por *HPLC*, onde as colunas são preenchidas com partículas de 3-5 µm. Essa característica resulta em uma série de vantagens, como: maior velocidade e capacidade de pico (número de picos por unidade de tempo), fato este que remete ao nome “ultra performance”; economia de tempo; redução de solventes, além de aumentar a eficiência do processo. Ademais, as cromatografias líquidas podem ainda ter sua eficiência de purificação melhorada através do uso de nanocapilares, transformando-as em nanocromatografias, como por exemplo o *nanoUPLC* que, com o advento de sua conjugação à técnica de espectrometria de massa, hoje conhecida como *nanoUPLC-MS* (do inglês *nano-Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*), elevou consideravelmente os níveis de detecção proteica.

Atualmente, novas abordagens quantitativas vêm ganhando espaço. Técnicas conhecidas como *label-free*, além de serem mais simples, podem resultar em custos menores ao processo. Um dos métodos de análise utilizados em abordagens *label-free* é o *MS<sup>E</sup>*, um processo de quantificação relativa sem marcação (do inglês *label-free quantification*), baseada na aquisição independente de dados. Em tal abordagem, as amostras são analisadas separadamente, ou seja, a aquisição por *LC-MS/MS* pode se dar de forma individual. *MS<sup>E</sup>* possui um método de alternância de energia, havendo, portanto, duas condições sequenciais de energia de colisão: na condição de baixa energia de colisão, o peptídeo intacto é detectado e, a partir de então, os fragmentos provenientes desse peptídeo precursor são gerados em uma segunda condição, a de alta energia de colisão. Dessa forma, para obtenção dos fragmentos iônicos correspondentes ao peptídeo precursor, é considerada, além do tempo de retenção e da relação massa/carga, a propriedade físico-química dos mesmos, como polaridade e pKa (Murad *et al.*, 2011).

## 1.6 PROTEÔMICA DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Nos últimos anos, a proteômica tem sido utilizada para aprofundar a compreensão sobre muitos aspectos da defesa de plantas frente ao ataque por microrganismos, assim como, dos mecanismos de patogenicidade e virulência de bactérias fitopatogênicas, permitindo o monitoramento de diferenças na abundância de proteínas, dos processos pós-transcricionais, pós-traducionais, da ativação/inativação proteica, *turnover* e o tráfego dessas proteínas. Neste contexto, vários estudos têm sido conduzidos para compreender os mecanismos de patogenicidade de *X. campestris* pv. *campestris*.

Em geral, mutações em genes responsáveis pela síntese de aminoácidos aromáticos, metabolismo de ácidos graxos, síntese de biotina, gliconeogênese e metabolismo energético, acarretam a atenuação da virulência, sugerindo que essas vias são cruciais para a sobrevivência bacteriana *in vivo* (Rediers *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008). A biossíntese *de novo* de purina consiste em uma das vias metabólicas que participam nos mecanismos de virulência bacteriana, onde *purC*, *purM*, *purH* e *purD* são responsáveis por catalisar os primeiros passos na geração de IMP - Inosina monofosfato.

A partir desses fatos, Wei Qian e colaboradores (2013) conduziram um estudo com base em análise proteômica comparativa, utilizando as técnicas 2-DE, MALDI e MS-TOF, com o objetivo de se examinar o impacto molecular da síntese de purina na virulência bacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, analisando as diferenças entre linhagens *purC* mutantes e selvagens, crescidas *in vitro* em meio rico e mínimo. O grupo constatou que a inativação de *purC* interrompe a via de síntese de purina, levando a uma mudança global na expressão de várias proteínas envolvidas na absorção de ferro, síntese de RNA, metabolismo de carbono, transporte de elétrons, síntese do sistema de secreção do tipo IV e na transdução de sinais, acarretando na perda completa da virulência de *Xcc* (Qian *et al.*, 2013).

Em outro interessante estudo de análise proteômica comparativa, um método de expressão proteica, previamente desenvolvido para *X. axonopodis* pv. *Citri*, foi empregado para análise proteica de *X. campestris* pv. *campestris* durante a interação com a planta hospedeira, *Brassica oleracea*. Com auxílio da técnica proteômica 2-DE associada a MS (MALDI-TOF/TOF), o perfil proteico da bactéria recuperada de folhas do hospedeiro no sexto dia da infiltração bacteriana, foi

comparado ao perfil proteico obtido do cultivo bacteriano em meio NYG, no mesmo estágio de crescimento, revelando um total de 118 e 210 proteínas exclusivas das condições *in vivo* e *in vitro*, respectivamente (Mehta, *et al.*, 2008). Em relação ao perfil de expressão das proteínas *in vivo*, diversas proteínas identificadas revelaram a participação no metabolismo celular. De maneira semelhante, Wei Qian e colaboradores (2005), reportaram um aumento na expressão de diversas enzimas metabólicas durante a interação hospedeiro-patógeno, indicando que muitos dos genes envolvidos com o metabolismo são ativados após a infecção pela bactéria (Qian, *et al.*, 2005).

Em um estudo inovador, VILLETH e colaboradores (2009) utilizaram a proteômica para comparar o perfil das proteínas de *X. campestris pv. campestris* durante a interação com as variantes suscetível e resistente de seu hospedeiro *B. oleracea*. A partir dessa abordagem *in vivo*, foi possível a detecção de proteínas diferencialmente abundantes durante ambas as interações. Foi interessante observar a presença de isoformas da mesma proteína em ambas as interações, indicando que uma mesma proteína pode assumir diferentes papéis dependendo do tipo de interação; o alto número de proteínas exclusivas observadas nos perfis resistente e suscetível, *in vivo* (105 e 79 proteínas, respectivamente); e, por fim, o montante de 73 proteínas em comum, ou seja, presente em ambos os perfis, totalizando 45% das proteínas totais obtidas em cada mapa 2D.

A partir de uma análise proteômica *in vitro*, Chung e equipe (2007) obtiveram, aproximadamente, 800 “spots” proteicos em mapa 2D, em estudo realizado com duas linhagens, virulenta e não-virulenta, de *X. campestris pv. campestris*. Esses “spots” foram excisados do gel e analisados por MS, revelando a identidade de 282 proteínas, representando 6,7% do proteoma total. Dentre essas proteínas, 35 foram ainda classificadas como sendo extracelulares, 24 como sendo proteínas citosólicas e 35 como proteínas periplasmáticas, fato esse também corroborado por estudo realizado por Watt e colaboradores (2005). Outro fato interessante revelado pelo estudo, diz respeito aos sistemas de secreção de Xcc. Embora esses sistemas sejam conhecidos por desempenharem relevante função na patogenicidade, incluindo o transporte de proteínas de virulência para o interior de seus hospedeiros, nenhuma proteína dos sistemas de secreção foi identificada. Tal ausência foi atribuída a uma série de fatores, como por exemplo, ao fato de todos os componentes dos diferentes sistemas de secreção estarem localizados na membrana bacteriana ou extra célula, à

característica insolúvel de tais proteínas, bem como, devido a indução do sistema de secreção do tipo III (SSTIII) se dar somente após a interação da bactéria com seu hospedeiro/extrato vegetal ou pelo contato com um meio indutor do tipo *MM1* ou *XVM2*. Não obstante, o estudo identificou uma proporção significativa de proteínas pertencentes a categoria das chaperonas, comprovadamente, por prévio estudo realizado por Hueck (1998), requisitadas por proteínas do SSTIII para auxiliar na secreção e estabilidade de seus produtos.

Na contramão do fato de pouco se conhecer a respeito dos padrões da expressão diferencial do genoma de *Xcc*, cultivadas *in vitro*, Liu e equipe (2013) utilizaram a técnica de sequenciamento de *RNA* (*RNA-Seq*) para explorar o perfil de transcritos desse fitopatógeno, cultivando-os nos meios *NYG* e *MMX*. Os genes diferencialmente expressos (*DEGs*) foram validados pela análise dos transcritos selecionados utilizando a técnica semiquantitativa *RT-PCR*. De um total de 629 genes de *Xcc* com expressão diferenciada, 495 e 134 se mostraram induzidos e reprimidos pelo meio mínimo *MMX*, respectivamente. Em consonância com outros estudos empreendidos com *Xcc* 8004 (He *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2005), esses *DEGs* foram assinalados em 18 categorias funcionais, incluindo biossíntese de aminoácidos; metabolismo energético e de carbono; funções regulatórias; transporte celular; replicação e transcrição do DNA; síntese proteica; elementos genéticos móveis; adaptação e patogenicidade. Interessantemente, 65 genes relacionados à patogenicidade e adaptação, somando 16.6% dessa categoria funcional, tiveram sua expressão aumentada quando do cultivo de *Xcc* em meio *MMX*.

Outro fato relevante desse estudo é que, muito embora o meio mínimo utilizado seja desprovido de moléculas de alto peso molecular como peptídeos, proteínas e celulose, genes da bactéria responsáveis por codificar enzimas degradativas de parede celular tiveram sua expressão aumentada. No entanto, os mecanismos para tal indução ainda são desconhecidos e o estímulo responsável ainda não foi identificado.

Abordagens complementares para a melhor compreensão da interação planta-patógeno, como a análise do perfil de proteínas extracelulares constituintes do secretoma bacteriano, são importantes para que se tenha uma imagem mais integral de todos os elementos proteicos envolvidos no processo. Neste contexto, Watt e colaboradores (2009), ao pesquisar os efeitos de componentes de baixo peso molecular (<10 kDa) integrantes do extrato vegetal, na interação *Brassica-Xcc*,

evidenciaram a indução de mudanças metabólicas e a secreção de enzimas extracelulares bacterianas, não obstante tenham reportado um efeito negativo na expressão do sistema de secreção do tipo III (SSTIII) dessa mesma bactéria. O estudo do secretoma de *Xcc*, quando cultivada em meio mínimo (*VMX*) suplementado com extrato vegetal de *Brassica*, revelou a preferência de tal bactéria por dissacarídeos como a sacarose e malato, em detrimento da glicose. Essa observação indica que uma ou mais moléculas sinais de baixo peso molecular devem ser suficientes para *Xcc* regular a assimilação de fontes de carbono e seu catabolismo. Ademais, através da análise proteômica comparativa de *Xcc* cultivadas no meio *VMX*, na ausência e presença do extrato vegetal, os pesquisadores puderam constatar ainda que as moléculas da planta presentes no meio suplementado foram capazes de induzir na bactéria, a secreção das enzimas degradativas de ácidos nucléicos, nucleases e ribonucleases, bem como enzimas degradativas da parede celular da célula vegetal, como celulase, pectatolases e poligalacturonases. Todavia, a análise da expressão gênica, desempenhada com o auxílio da técnica de *PCR* em tempo real (do inglês, *quantitative RT-PCR*), feita a partir da seleção de genes *hrp*, conhecidamente envolvidos na patogenicidade, mostrou que o meio mínimo *VMX* suplementado com extrato vegetal de *Brassica*, não induziu efeito nos genes *hrcX* e *hrpU*, essenciais para ativação do operon-*hrp* e completa montagem do SSTIII, respectivamente. Por fim, essa última observação levou a crer na possibilidade de fatores adicionais, de maior peso molecular, se fazerem necessários para a indução de genes de *Xcc* associados à virulência.

Em relação à análise da interação planta-bactéria, *in vitro*, faz-se pertinente destacar alguns dos clássicos experimentos que serviram para demonstrar que os sistemas regulatórios bacterianos, no intuito de assegurar que os seus genes promotores de virulência sejam expressos exclusivamente diante de condições específicas, são capazes de sentir e interpretar, não somente os estímulos advindos do ambiente, quando no interior de seu hospedeiro, mas também, quando expostos a meios de cultura sintéticos. Tais meios de cultivo têm sido estabelecidos para diferentes patovares de *Xanthomonas*, os quais induzem a síntese de fatores de virulência, incluindo o SSTT, por mimetizarem o ambiente dentro do tecido do vegetal, em relação a fonte de carbono, concentração de ferro, osmolaridade, valores de pH e aminoácidos, entre outros elementos (Wengelnick *et al.*, 1996a; Seo *et al.*, 2008). Sendo usada como modelo bacteriano para se estudar a interação planta-bactéria



(Meyer *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2005), na maioria dos casos, *Xcc* é cultivada em dois meios frequentemente utilizados, o meio mínimo *MMX* (do inglês, minimal medium for *Xanthomonas*) (Daniels *et al.*, 1984a), e o meio nutricionalmente rico, *NYG* (do inglês, *peptone yeast glycerol medium*) (Daniels *et al.*, 1984b). O *MMX* é um meio definido quimicamente por conter compostos puramente inorgânicos e alguns simples compostos orgânicos, os quais têm sido utilizados em estudos nutricionais, de adaptação ao estresse, patogenicidade de *Xcc* e, especialmente, usado como meio indutor de *Hrp/TTSS* (do inglês, *hypersensitive reaction and pathogenicity/type III secretion system*) (Chao *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 1984a; Tang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2007). Já o meio *NYG*, que contém peptona, extrato de levedura e glicerol, tem sido amplamente empregado nos estudos de morfologia, biologia e preservação de *Xcc* (Daniels *et al.*, 1984b; Dow *et al.*, 1990, 2003; Ryan *et al.*, 2006).

Em outro importante experimento, Schulte e Bonas (1992b) demonstraram que o *locus* referente à patogenicidade em *Xcc* poderia ser induzido *in vitro*, no meio *XVM1*, pela adição de sacarose e aminoácidos contendo enxofre (Schulte & Bonas, 1992b). Acredita-se, pois, que a composição do meio mínimo mimetiza o ambiente apoplástico foliar, cujo local foi atribuído a indução de *Hrp* genes e onde presumiu-se funcionar o TTSS. (Schulte & Bonas, 1992a).

Não obstante a proteômica tenha desempenhado um papel fundamental na identificação de mudanças do perfil proteico em hospedeiros vegetais durante a infecção por microrganismos patogênicos e na caracterização dos fatores de virulência e patogenicidade, celulares e extracelulares, produzidos por patógenos, restam por revelar desmedidas questões fundamentais sobre o tema. Segundo Lodha (2013), constitui-se tarefa hercúlea, mesmo dentro dos grandes laboratórios de pesquisa, predizer com segurança a identidade e/ou função de algumas proteínas, uma vez que se trata de moléculas altamente interativas, dinâmicas e com uma capacidade extrema de sofrer mudanças conformacionais.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas potencialmente envolvidas com a virulência de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) pela análise dos perfis proteicos dos isolados – *Xcc51* e *XccY1*, contrastantes em virulência, cultivados em meio *NYG* e em meio *XVM1*, utilizando *2D-nanoUPLC/MS<sup>E</sup>*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar avaliação de virulência, a partir da infiltração dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em duas diferentes cultivares híbridas de *Brassica oleracea*;
- II. Estabelecer a dinâmica bacteriana *in planta*, de ambos os isolados bacterianos;
- III. Categorizar funcionalmente as proteínas identificadas no proteoma de ambos os isolados bacterianos, buscando estabelecer diferenças em relação aos seus mecanismos de virulência;

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram analisadas quatro condições *in vitro*: *Xcc51* cultivada em meio líquido nutricionalmente rico – *NYG* (controle); *Xcc51* cultivada em meio líquido mínimo - *XVM1* (indutor de genes de patogenicidade); *XccY21* cultivada em meio *NYG*; *XccY21* cultivada em meio *XVM1*. O experimento foi realizado em triplicata biológica para cada interação, sendo processadas para análise proteômica três réplicas técnicas de cada uma das réplicas biológicas.

### 3.1 ISOLADOS BACTERIANOS, CONDIÇÃO DE CULTIVO E CURVAS DE CRESCIMENTO *IN VITRO*

O isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - Xcc51 (CNPH), obtido da coleção de cultura de bactérias fitopatogênicas da EMBRAPA - Hortaliças, bem como a linhagem tipo XccY21 (ATCC 33913), obtida da coleção BCCM (do inglês, *Belgium Coordinated Collections of Microorganisms*), foram cultivados, sob agitação de 200 rpm, a 28°C, em meio NYG (*Nitrogen Yeast Glycerol*: 5,0 g/L de peptona; 3,0 g/L de extrato de levedura; 20,0 ml de glicerol) (Daniels *et al.*, 1984b) e em meio mínimo XVM1 (*MM1-modified minimal medium*: NaCl 20 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,16 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,32 mM; Sacarose 10 mM; 2 µg Metionina) (Schulte & Bonas, 1992), até atingirem a OD<sub>600nm</sub> = 0,8 em NYG e OD<sub>600nm</sub> = 0,58 em XVM1 (aproximadamente 8x10<sup>7</sup> CFU. ml<sup>-1</sup> e 6x10<sup>7</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>, respectivamente), aferida no espectrofotômetro *BioPhotometer*<sup>TM</sup> (Eppendorf®).

Com o intuito de se estabelecer uma curva padrão de crescimento para os dois diferentes isolados de Xcc cultivados em ambos os meios NYG e XVM1, foram realizados, em triplicata técnica, pré-inóculos dos isolados bacterianos em 5 ml de meio NYG em tubos *Falcon* de 15 ml, até que atingissem a OD<sub>600nm</sub> = 1,2. Partindo-se de uma OD<sub>600nm</sub> = 0,01 para os isolados cultivados em meio NYG e da OD<sub>600nm</sub> = 0,3 para os isolados cultivados em XVM1, os inóculos foram submetidos à análise espectrofotométrica a cada quatro horas e coletados para a subsequente extração de proteínas quando atingiram a fase exponencial máxima de crescimento, caracterizada pela OD<sub>600nm</sub> = 0,8 e 0,58 para os cultivos em NYG e XVM1, respectivamente. O desenho experimental está ilustrado na Figura 4.

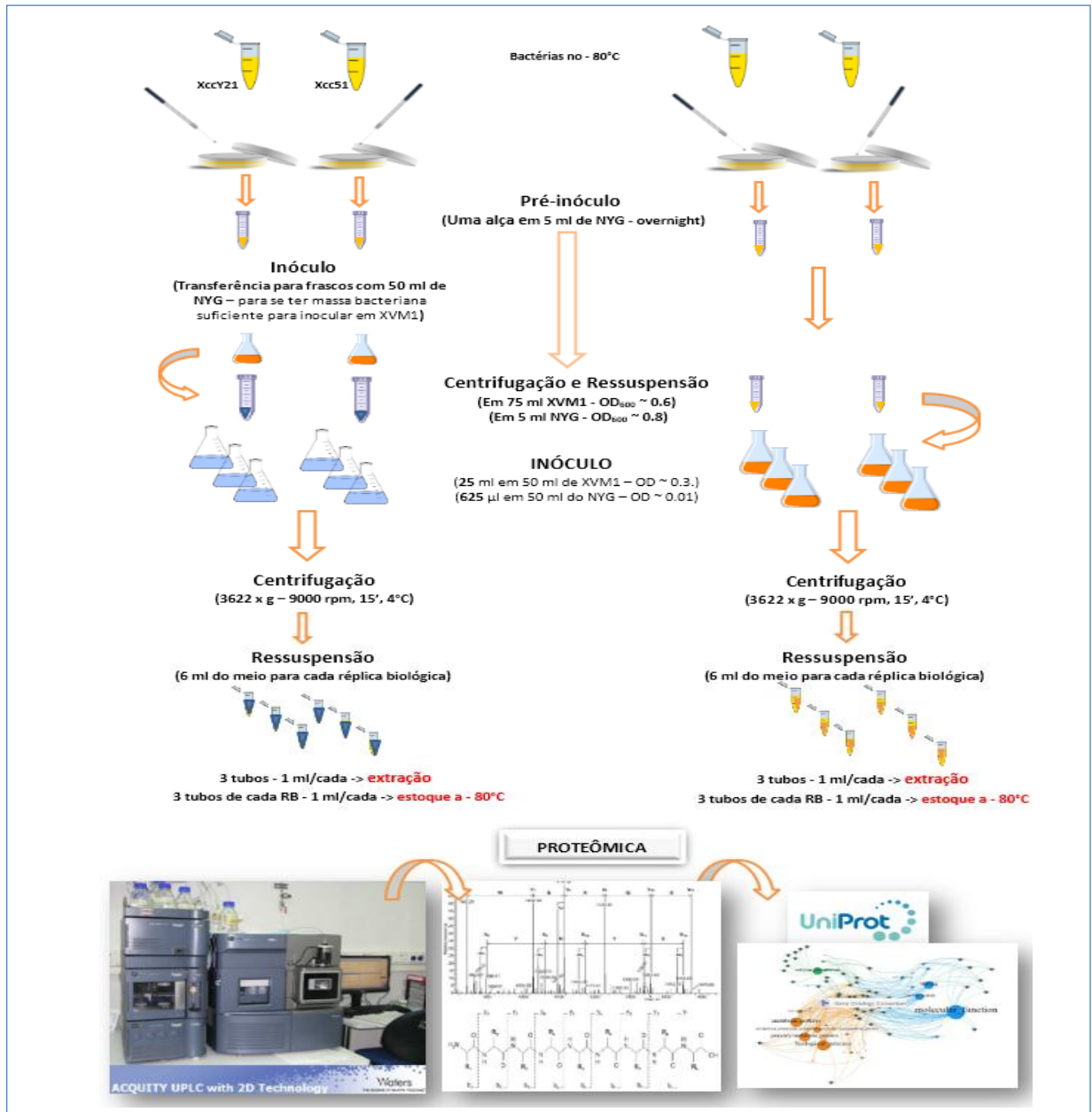


Figura 4 - Desenho experimental evidenciando o cultivo de ambos os isolados bacterianos (*XccY21* e *Xcc51*) em meio nutricionalmente rico (NYG) e indutor de genes de patogenicidade (XVM1) e o preparo para a extração e análise proteômica das proteínas totais.

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Visando certificar a identidade dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, bem como verificar possível contaminação das amostras, foi realizado o sequenciamento do gene 16S *rRNA* de ambos os isolados utilizados no estudo.

### 3.2.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A extração do *DNA* genômico dos isolados bacterianos foi realizada conforme descrito por Sambrook (1989), com modificações. Ambos os isolados foram inoculados em 5 mL de meio *NYG* e incubados a 28°C, sob agitação de 150 rpm, por 24 h. Uma alíquota de 2 mL de cada cultura foi centrifugada a 3622 x g por 15 min, a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* das células foram suspensos em 450 µL de tampão TAS (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0). Foi adicionado, em seguida, *SDS* (concentração final de 1%) e *Proteinase K* (150 µg.mL<sup>-1</sup>) e as amostras foram novamente incubadas por 1 h à 50°C. Posteriormente, o *debris* celular foi removido adicionando-se 500 µL de fenol e centrifugando a suspensão por 5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e foram adicionados 500 µL de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados por mais 5 min, os sobrenadantes transferidos para novos tubos e suspensos em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8). As amostras de *DNA* foram quantificadas utilizando espectrofotômetro – *Spectrophotometer ND1000™* (*Nanodrop®*). A leitura foi realizada através de 1 µL da solução de *DNA*, obtendo-se a concentração de *DNA* em ng.µL<sup>-1</sup>, no comprimento de onda 260 nm, e o grau de pureza pela razão entre os valores de comprimentos de onda 260 nm/280 nm. Após a leitura, as amostras com maior grau de pureza foram selecionadas e diluídas a uma concentração padrão de 100 ng.µL<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S *rRNA*

O gene 16S *rRNA* dos isolados bacterianos foi amplificado utilizando os seguintes conjuntos de iniciadores (*GE Healthcare®*) universais: 27F: **5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3'** e 1525R: **5'AAG GAG GTG WTC CAR CC3'** (Lane, 1991). Cada reação da PCR foi composta por: 3 U (unidades) de *Taq DNA* polimerase; tampão de reação 10X (Tris HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM); MgCl<sub>2</sub> 3 mM; dNTP's 0,2 mM; 0,4 pmol de cada iniciador e água ultrapura estéril para um volume final de 40 µL. A amplificação ocorreu em termociclador *Veriti™* (*Applied Biosystems®*) com as seguintes etapas: 94°C por 2 min; 30 ciclos (94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C

por 1 min) e extensão final a 72°C por 10 min. Após a amplificação, as amostras foram estocadas a -20°C. O DNA amplificado foi avaliado após eletroforese em gel agarose 1,5% submerso em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), contendo brometo de etídio (0,5 µL.mL<sup>-1</sup>). O gel foi polimerizado a temperatura ambiente e, para a corrida das amostras, aplicou-se uma voltagem de 85 V/cm<sup>2</sup> por 30 a 40 min. Foi utilizado um padrão de peso molecular de 1 Kb (*Invitrogen*<sup>®</sup>) e as bandas amplificadas, correspondentes a aproximadamente 1600 bp foram reveladas pelo equipamento Gel Doc<sup>™</sup> XR+ (*BioRad*<sup>®</sup>).

### 3.2.3 SEQUENCIAMENTO GÊNICO

As amostras foram purificadas utilizando o kit *Wizard SV*<sup>™</sup> (*Promega*<sup>®</sup>) de acordo com as especificações do fabricante. A reação para a PCR de sequenciamento foi realizada em microtubos de 200 µL, em duplicata e separadamente para cada iniciador, utilizando o kit *DNA sequencing-Big-Dye Terminator Cycle Ready ABI Prism*, versão 3, nas seguintes concentrações: 1 µL de *BigDye Terminator* (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>); 1 µL do iniciador 27F ou 1525R (5 pmoles); 2 µL do tampão 5X (Tris-HCl 400 mM, pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM); 5 µL do DNA purificado (80 ng/µL); 1 µL de água ultra pura (Mili-Q) estéril, para um volume final em 10 µL. A reação ocorreu em termociclador *Veriti*<sup>™</sup> (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) com programa específico: 1 ciclo de 94°C por 3 min; 35 ciclos (94°C por 10 s, 58°C por 20 s e 60°C por 4 min). Ao final da reação, as mostras permaneceram em 4°C até o sequenciamento. Os produtos amplificados foram retirados dos microtubos e repassados para microplacas de 96 poços. Posteriormente, adicionou-se 80 µL de isopropanol 75%, deixou-se em repouso por 15 min a temperatura ambiente e centrifugou-se a 1900 x g por 60 min. Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados e as placas permaneceram invertidas por 5 min em papel absorvente. Acrescentou-se 150 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 3.000 x g por 30 min. Os sobrenadantes foram novamente descartados e as placas colocadas em cabines de fluxo laminar por cerca de 1 h, protegidas da luz. Em seguida, as amostras foram suspensas em 10 µL de *Hi-Di* formamida (*ABI Prism*<sup>®</sup>), desnaturadas a 95°C por 5 min, em termociclador de placa (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) e conduzidas ao sequenciador

automático, *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer™* (*Applied Biosystems®*), etapa realizada no Laboratório de Biotecnologia da pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília – UCB. Após o sequenciamento das amostras, os eletroferogramas foram submetidos a análises no programa *CLC Main Workbench 6.7*. As sequências *FASTA* obtidas foram comparadas com as do banco de dados do *GenBank* (disponível no *National Center for Biotechnology – NCBI*).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *Xcc51* E *XccY21* IN PLANTA

Com a intenção de verificar diferenças na virulência entre os isolados bacterianos, foi realizada uma avaliação dos sintomas na planta. Vasos contendo substrato (*Plantmax®*) receberam as sementes das cultivares híbridas de *Brassica oleracea* – *Astrus Plus* (cultivar resistente, de origem Chilena - *Seminis®*) e *Veloce F1* (cultivar suscetível, de origem Brasileira - *Agristar®*). Após quarenta e cinco dias de cultivo em ambiente controlado em casa-de-vegetação, as cultivares tiveram suas folhas infiltradas com suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) pelo método de infiltração por pressão mecânica, com auxílio de seringa hipodérmica *Plastpack™* (*BD®*), sem agulha, em dois pontos da parte abaxial do limbo foliar. Para a condição controle, folhas foram infiltradas apenas com solução salina. Para o preparo do inóculo, os isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* foram cultivados em *NYG*, a 28°C por 24 h. Após centrifugação (3622 x g, a 4°C por 15 min.), células bacterianas foram suspendidas em aproximadamente 10 mL de solução salina gerando uma suspensão concentrada. Uma alíquota dessa suspensão foi transferida para novos tubos e com o auxílio do espectrofotômetro *BioPhotometer™* (*Eppendor®*), ajustou-se a concentração dessa suspensão para a  $OD_{600nm} = 0,6$ . O experimento foi realizado em triplicata biológica (Figura 5) e os sintomas gerados foram observados durante o período de cinco dias após a infiltração e acompanhados até aproximadamente trinta dias.

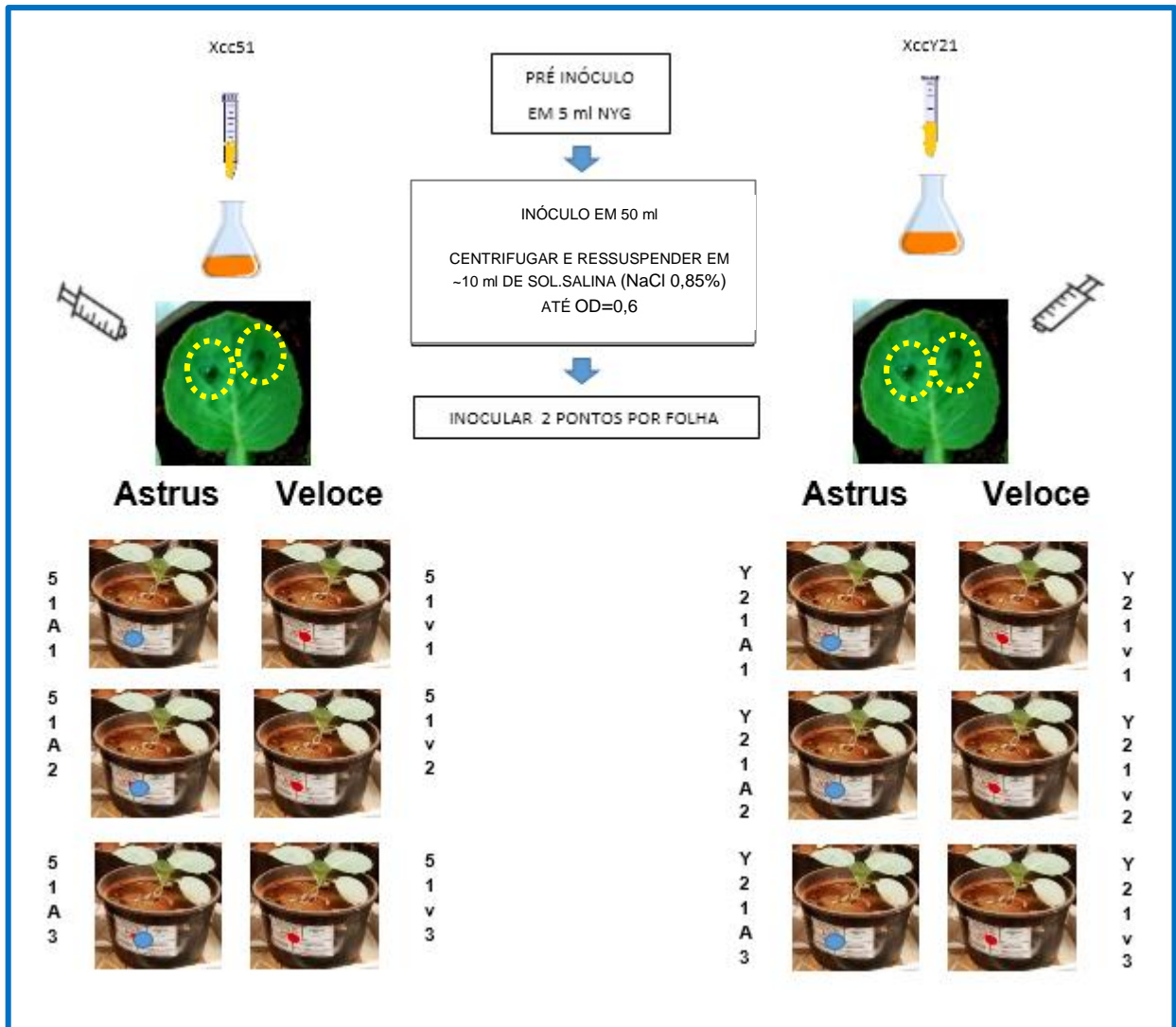


Figura 5 - Esquema do teste de sintomas, in planta. A suspensão dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21, em solução salina (NaCl 0,85%), foi inoculada em dois pontos por limbo foliar nas duas cultivares de *B. oleracea*

### 3.4 DINÂMICA BACTERIANA *IN PLANTA*

Com o intuito de se verificar diferenças no crescimento dos dois isolados na planta foi analisada a dinâmica de população bacteriana *in planta*, utilizando a cultivar resistente - *Astrus plus*. Folhas de plantas com 45 dias de cultivo foram infiltradas com suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%), em  $OD_{600nm} = 0,6$ . A dinâmica do crescimento foi acompanhada durante cinco dias nos tempos 0 h (momento da infiltração), 24 h, 48 h, 72 h e 120 horas após a infiltração (HAI). Uma área de aproximadamente  $1,5 \text{ cm}^2$  por folha foi infiltrada com a suspensão bacteriana. Com o auxílio de um perfurador de 8 mm de diâmetro, discos foliares foram obtidos e



macerados em 1 mL de água destilada estéril. Foram realizadas cinco diluições e 100  $\mu$ L das três últimas diluições foram plaqueados para a contagem de unidades formadoras de colônia (CFU, do inglês *colony forming unit*) de *Xcc* (Figura 6). O experimento foi realizado em triplicata biológica com três réplicas técnicas por diluição e as placas foram armazenadas a 28 °C por 48 h. Objetivando-se investigar diferenças estatisticamente significativas no comportamento das dinâmicas bacterianas *in planta*, utilizou-se o teste paramétrico ANOVA. Nos casos em que foram encontradas diferenças significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ), foi aplicado o teste pós-hoc de comparações múltiplas de *Tukey-HSD*. Para tais análises estatísticas, foi utilizado o software *Statgraphics Centurion XV™* (Statgraphics®).

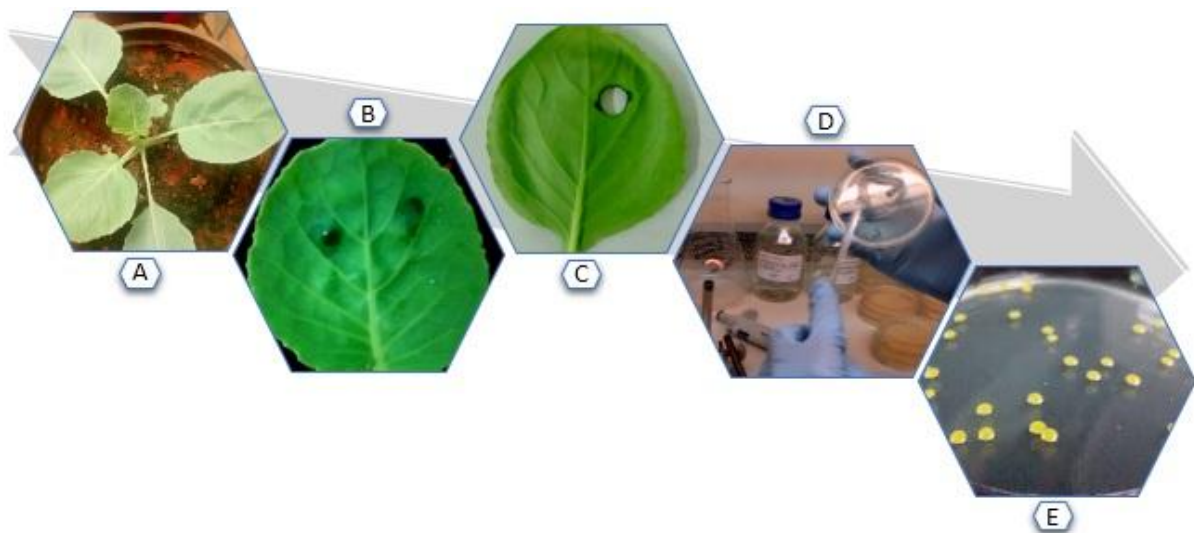


Figura 6 - Esquema evidenciando a execução da dinâmica bacteriana. A) cultivar resistente de *B. oleraceae* com 45 dias de cultivo; B) infiltração da suspensão bacteriana em dois pontos na face abaxial do limbo foliar; C) obtenção do disco foliar da região infiltrada; D) plaqueamento das diluições; E) cultivo dos isolados bacterianos e contagem das colônias após 48h.

### 3.5 EXTRAÇÃO PROTEICA

A extração das proteínas totais foi realizada conforme descrito por de Mot & Vanderleyden (1989), com modificações. Os isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, ao atingirem as suas fases exponenciais máximas de crescimento em ambos os meios de cultivo, *NYG* e *XVM1*, foram recuperados e as proteínas extraídas utilizando 0,75 mL de tampão de extração (sacarose 0,7 M, Tris-HCl 0,5 M, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0,1 M e DTT 40 mM), seguido de incubação por 15 min à temperatura ambiente. O mesmo volume de fenol foi adicionado, e após 15 min de agitação no

aparelho *Vortex-Genie2™* (*Scientific Industries®*), a fase fenólica foi recuperada após a suspensão ser centrifugada por 3 min a 14000 x g a 4°C. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. As proteínas foram precipitadas pela adição de 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de acetona 80%. Após secagem, o material foi estocado a temperatura de - 20°C.

### 3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS

O preparo das amostras para análise em *LC-MS – nanoAcquity UPLC System* foi realizado a partir do método proposto por Murad & Rech (2012) com modificações. As proteínas extraídas foram solubilizadas com 60 µL de bicarbonato de amônio 50 mM [ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5]. Em seguida, foram adicionados 25 µL de surfactante (*RapiGest™ SF – Waters®*) a 0,2% v/v e a amostra foi submetida a aquecimento (80°C) sob leve agitação por 15 min. Posteriormente, foram adicionados 2,5 µL de DTT 100 mM e a amostra foi homogeneizada com o auxílio do agitador (*Vortex-Genie2™ - Scientific Industries®*) em velocidade baixa e aquecida a 60 °C por 30 min. Foram adicionados 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM e a amostra foi mantida a temperatura ambiente por 30 min sob abrigo da luz. Visando evitar a perda das proteínas precipitadas, todo o material (precipitado e sobrenadante) foi submetido à digestão utilizando 2 µg de tripsina ( $0.05 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ ) (*Sigma Aldrich®*) por aproximadamente 19 h a 37 °C. Após a digestão, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5 % e a amostra foi incubada a 37 °C por 90 min e em seguida centrifugada a 14000 x g, a 10 °C, por 30 min. A suspensão foi transferida para um novo tubo. A amostra foi concentrada utilizando uma centrífuga à vácuo (*Vacufuge Plus Model 5305™ - Speed Vac®*), por um período de 1 h e 30 min. A amostra foi solubilizada com 50 µL de formato de amônio 20 mM e quantificado. A quantificação foi realizada utilizando o equipamento *Qubit Fluorometer™* (*Invitrogen®*) e os reagentes do *kit* de quantificação *Qubit Protein Reagent* (*Invitrogen-Molecular Process®*) de acordo com o manual do fabricante. Em um frasco de vidro de 12x32 mm (*Screw neck vial, Waters®*) foram adicionados 2,5 µL ( $50 \text{ fMol}.\mu\text{L}^{-1}$ ) de Albumina Sérica Bovina - BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) como padrão de digestão proteica (*MassPREP™ BSA Digestion Standard™ - Waters®*), 10 µg de proteína do

material digerido e formato de amônio a 20 mM em quantidade suficiente para completar o volume final de 50  $\mu$ L.

A análise foi realizada pelo grupo de pesquisa de Biologia Sintética da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sendo os peptídeos gerados após a digestão trípica das proteínas analisados pelo sistema *nanoACQUITY*<sup>™</sup> (*Waters Corp., USA*) com tecnologia 2D de fase reversa dupla (RP) acoplado ao espectrômetro de massa *Synapt G2 HDMS*<sup>™</sup> (*Waters, Manchester, UK*). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (*UPLC*) para a separação dos peptídeos trípticos. Na primeira dimensão (PD) foi usada uma coluna *XBridge*<sup>™</sup> 300  $\mu$ m x 50 mm *nanoEase*<sup>™</sup> *BEH130 C<sup>18</sup>* de partícula de 5  $\mu$ m; a fase móvel utilizada foi: A) formato de amônio 20 mM e B) acetonitrila. Na segunda dimensão (SD) foi usada uma pré-coluna (*Symmetry C<sup>18</sup>* – partícula de 5  $\mu$ m; 300  $\mu$ m x 5 mm) e uma coluna *HSST3 C<sup>18</sup>* - partícula de 1,8  $\mu$ m; 75  $\mu$ m x 150 mm de fase reversa (*Waters, USA*). Utilizou-se para a fase móvel A: ácido fórmico 0,1 % (aquoso) e para a fase móvel B: ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila. A correção das massas foi realizada utilizando o calibrante o *glufibrino peptide* (*Glu-Fib, Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>).

Para cada uma das três réplicas biológicas foram feitas triplicadas técnicas. Todo o processo de análise foi realizado em coluna mantida a uma temperatura de 35 °C. Todas as análises foram adquiridas em modo positivo utilizando um *nanoeletrospray*. Para todas as análises, o espectrômetro de massa foi operado em modo positivo com resolução de pelo menos 20.000 *FWHM* (*full-width half-maximum*) e em modo de aquisição independente de dados (Levin *et al.*, 2011). Os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 3 eV no modo *MS* de baixa energia; a energia de colisão foi rampeada de 27 a 50 eV a cada intervalo de 1,5 segundos do espectro no modo de alta energia. A radiofrequência aplicada ao analisador de massas do quadrupolo foi ajustada de forma que íons com *m/z* entre 200 e 2000 fossem eficientemente transmitidos, assim quaisquer íons com *m/z* menores que 200, que porventura fossem observados no *LC-MS*, seriam provenientes das dissociações geradas na célula de colisão *TRAP T-wave* do equipamento (Giles *et al.*, 2010).

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS A PARTIR DOS ESPECTROS GERADOS POR LC-MS/MS

Os espectros de massa obtidos do nanoUPLC-MS<sup>E</sup> foram processados utilizando o software *Protein Lynx Global Server (PLGS)* versão 2.5s para identificação e quantificação das proteínas expressas pelos isolados bacterianos em cada uma das condições. A quantificação e identificação das proteínas foram geradas por algoritmos específicos (Geromanos *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009). Para normalização dos dados foi utilizada *BSA* como padrão interno. A identificação de proteínas foi mediada pelo algoritmo de contabilização de íons do *software* e os espectros foram comparados com o banco de dados *Xanthomonas Genome Browser - XGB*. Para a análise de quantificação proteica, a medida da intensidade observada de três peptídeos próticos de cada proteína foi quantificada a partir da intensidade medida dos peptídeos próticos identificados do padrão externo utilizando os algoritmos dedicados. A análise é baseada no número de peptídeo e não no tamanho e/ou número de proteínas, ou seja, baseia-se na abundância do peptídeo para não favorecer a proteínas maiores. A análise dos espectros busca a diferença de m/z equivalente a um determinado resíduo de aminoácido, dessa forma permite conhecer a sequência do peptídeo, o qual foi originado da quebra da ligação peptídica que produziu fragmentos trípticos, apresentando, portanto, massas diferentes baseando-se no radical R de cada aminoácido (Li *et al.*, 2009). Os dados obtidos por 2D-LC/MS<sup>E</sup> foram processados e os parâmetros associados à busca foram os seguintes: Carbamidometil-C (modificação fixa), amidação C-terminal, deamidação N, deamidação Q, metilação N-terminal, metilação C-terminal, glicosilação N-Terminal, O-GlcNac ST e oxidação M (modificações variáveis); com pelo menos um fragmento por peptídeo, três fragmentos de íons por peptídeo e um fragmento de íon por proteína (parâmetro 1+3+1). Foi considerado perda de clivagem -1 e limite de falsos positivos menor que 1% (Hao *et al.*, 2013).

### 3.8 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS QUANTO A SUAS FUNÇÕES NO GENOMA

As proteínas identificadas a partir da relação *Xcc51/XccY21* quando cultivados em *NYG* e *XVM1*, foram classificadas de acordo com as suas ontologias

gênicas (*GO*, do inglês *Gene Ontology*), com o emprego do software *BLAST2GO*<sup>®</sup>. As categorias funcionais estão descritas na anotação do genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

#### 4.4.1 EXTRAÇÃO DE *DNA*, AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S *rRNA* E SEQUENCIAMENTO

Para confirmar a identidade dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, primeiramente foi realizada a extração do *DNA* genômico (Tabela 1) e amplificação do gene 16S *rRNA*. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 1500 pb (Figura 7).

Tabela 1 - Grau de pureza (qualidade) e quantificação das amostras de *DNA* genômico das amostras 'origens' dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* e de suas respectivas réplicas. [1]: *Xcc51* – origem; [2] *XccY21* – origem; [3]: réplica de *Xcc51*; [4]: réplica de *XccY21*.

AMOSTRA	260/280 nm	ng.µl <sup>-1</sup>
1	2,02	1945
2	1,99	1564
3	2,07	994
4	2,04	1025



Figura 7 - Amplificação do gene 16S *rRNA*. [M]: Marcador (1 kb); [C- e C+]: controle negativo e positivo; [1]: *Xcc51* – origem; [2] *XccY21* – origem; [3 e 5]: réplicas de *Xcc51*; [4 e 6]: réplicas de *XccY21*.

Os fragmentos amplificados do gene *16S rRNA* referente aos dois isolados bacterianos foram sequenciados e analisados pelo *software Sequence Scanner V1.0™ (Applied Biosystems®)* para a seleção das regiões de qualidade. Para o isolado *Xcc51*, obteve-se um fragmento de 727 pb na porção 5' e 697 pb na porção 3'. Para o isolado *XccY21*, obteve-se um fragmento de 713 pb na porção 5' e 800 pb na porção 3' (Figura 8).

#### Isolado *Xcc51*

```

5'GTAAAATCCCTAACTACTTCCCCGCGGGGAGAACTGGATGAAATCTTACTCTAATACCGCCACACTTCTACGGGTGAAAGTGGAAAGATCT
TCTCCCTTCTCGCAATTGAATGCTCCGATGTCCTATTACTTAGTTGGCGGGGTACCTGCCACCAAGGATACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGCCCTTTGTTGGGAAAGAAAAGCAGTCCGTTAATACCCGATTGTTCTGACGG
TACCCAAAGAATAACCACCGGCTAACTTCGTGCCGACGCGCGATAAATCGAAGGGTGCCAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTATAGCGT
GCGTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGTGCTACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA
GCGGAATCCCGGTGTAGCAGTGATATGCGTAGAGATCGGGAGGGACATCCGTGGCGAATGCGGGTACTCTGACCACACTGACACTGAGGC
ACGAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTATATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACCTGGAATGTTGGCGTGCAT
3'CGCCCCACCGTGGACAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
GACCGGGAACGTATCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTG
AGATAGGGTTCTGGGATTGGCTTACCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGTTCGTAAGGGCC
ATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACCA
ATCCATCTCTGGAAGTCCCGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAGTCTTGCAGCCGTAATCCCGAGCGGCAACTAACCGGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCAC
CCAACATCCAGTTCCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC

```

#### Isolado *XccY21*

```

5'TTTAATTGCGGGTAGGCCGCCCTTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCCCGGGGGATAACGTAGGGAACTTACG
CTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCGGAGGACCTTCCGGCTTCGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGG
GTAAGGCCCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAAGCCCTTTTG
TTGGGAAAGAAAAGCAGTCCGTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTGGTTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCT
GGGGAATTGCAGTGGATACTGGGTCACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGA
ACATCCGTGGGAAAGGCGGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATG
3'ATTGGGGTGGAGTAAAAAAGTCCAGCTCCAACGGGTGCACAGTAACTAGCTTGGCTGTAAGAAAGTCCCCTGGCGTAAACGGGGGGTGTG
TATCGGACCGGCAACCCCTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACAATAGATTCCGACTTCATGGAGTCAAGTTGGAGACTCCTATCCGT
ACTGAGAAAAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTATTACGTGTGTAGCCCTGGTTCGTAAGG
GCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGAC
AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAGGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCA
CCAATCCATCTCTGAAAGTTCGTTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCG
GGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAGTCTTGCAGCCGTAATCCCGAGCGGCGAACTTAACCGGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTG
CACCCAACATCCAGTTCCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTTCTGTCCTCAGTGTCAAGT
TTGGTCCAGGTAGCCGCTTCCGACGGATGTTCTCCCGAACCTCTATGGCATTCCC

```

Figura 8 - Sequências dos genes *16S rRNA*, referente aos isolados bacterianos de *X. campestris* pv. *campestris*, *Xcc51* e *XccY21*. Representação apenas das sequências nucleotídicas de uma réplica biológica para cada isolado.

As análises de *Blastn* das sequências de ambos os isolados revelou 94% a 99% de identidade com diversas linhagens do gênero *Xanthomonas* spp. (Tabela 2 e 3), confirmando assim a sua identidade e a ausência de contaminação nas amostras por bactérias de outros gêneros.

Tabela 2 - *Blastn* das sequências parciais das porções 5' e 3' do gene *16S rRNA* do isolado **Xcc51**, revelando o nível de identidade dessas sequências com àquelas constantes do banco de dados do *GenBank*.

ISOLADO	DESCRIÇÃO	SCORE TOTAL	% IDENTIDADE	ACESSO GENE BANK
PORÇÃO 5' <b>Xcc51</b>	Sequência parcial do gene <i>16s rRNA</i> de <i>X. campestris pv. campestris</i> . Linhagem CA3103	1018	<b>94%</b>	KU997693.1

ISOLADO	DESCRIÇÃO	SCORE TOTAL	% IDENTIDADE	ACESSO GENE BANK
PORÇÃO 3' <b>Xcc51</b>	Sequência parcial do gene <i>16s rRNA</i> de <i>X. campestris pv. campestris</i> . Linhagem 17	2528	<b>99%</b>	CP011946.1

Tabela 3 - *Blastn* das sequências parciais das porções 5' e 3' do gene *16S rRNA* do isolado **XccY21**, revelando o nível de identidade dessas sequências com àquelas constantes do banco de dados do *GenBank*.

ISOLADO	DESCRIÇÃO	SCORE TOTAL	% IDENTIDADE	ACESSO GENE BANK
PORÇÃO 5' <b>XccY21</b>	Sequência parcial do gene <i>16s rRNA</i> de <i>X. campestris pv. campestris</i> . Linhagem TXC	1230	<b>99%</b>	KU728642.1

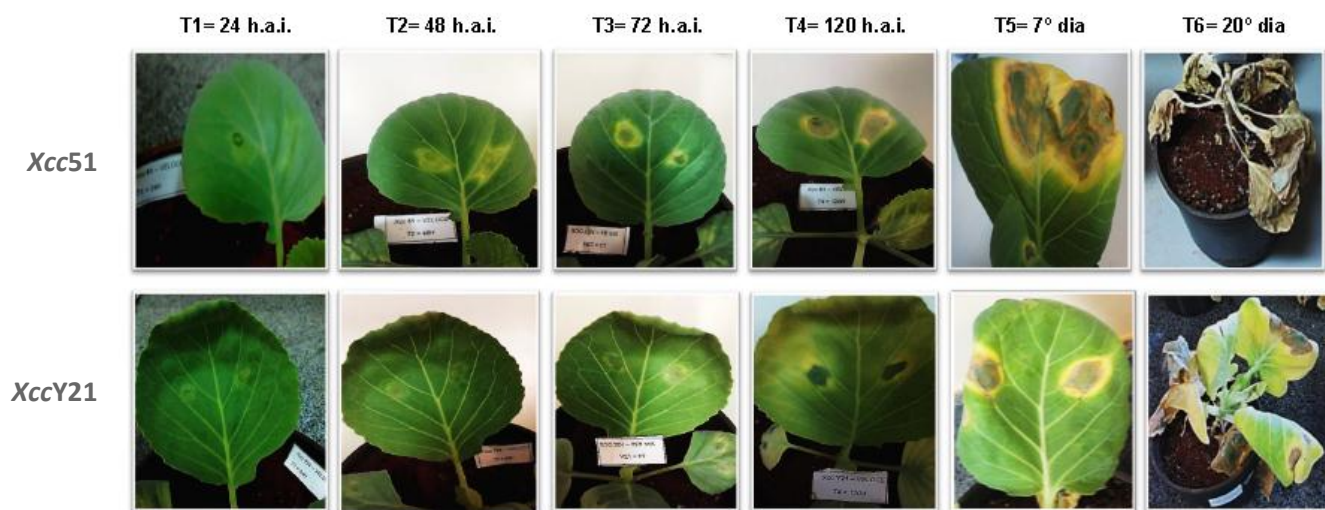
ISOLADO	DESCRIÇÃO	SCORE TOTAL	% IDENTIDADE	ACESSO GENE BANK
PORÇÃO 5' <b>XccY21</b>	Sequência parcial do gene <i>16s rRNA</i> de <i>X. campestris pv. campestris</i> . Isolado Xcc 3	1199	<b>96%</b>	JQ698514.1

## 4.2 AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *Xcc51* E *XccY21* IN PLANTA

Resultados preliminares anteriormente obtidos pelo nosso grupo indicaram que o isolado *Xcc51* apresentava maior virulência quando comparado ao isolado *XccY21*. Visando confirmar esses resultados, foi avaliado o desenvolvimento de sintomas nas cultivares híbridas de *Brassica oleracea* – *Astrus Plus* (resistente) e *Veloce F1* (suscetível). Foi possível observar o início do aparecimento dos sintomas da podridão negra entre 24 a 48 horas após inoculação da suspensão bacteriana em ambas as cultivares (Figura 9). Comparando-se os dois isolados bacterianos, o isolado *Xcc51* mostrou maior virulência frente a ambos os híbridos de *Brassica Veloce F1* e *Astrus Plus*. Este isolado provocou um início mais rápido do aparecimento dos sintomas da podridão negra, bem como as impeliu mais rapidamente ao decesso. Os sintomas mais comuns observados, em maior ou menor grau, foram: clorose foliar, escurecimento de nervuras, lesões necróticas extensas e restritas às áreas das lesões, perda de turgidez do limbo foliar e o apodrecimento de pedúnculo e caule. Em

virtude do comportamento do híbrido *Astrus Plus* frente à virulência do isolado *Xcc51*, aquele foi revisto quanto a sua capacidade de conter a infecção bacteriana, sendo, portanto, reavaliado como parcialmente resistente. Um interessante dado observado foi o fato do isolado *XccY21* não obter êxito em se disseminar através do limbo foliar do híbrido de *Brassica Astrus Plus*. Nessa interação, observou-se uma resistência maior por parte da cultivar, sugerindo uma resposta análoga à reação de hipersensibilidade (*HR*), a qual restringiu o isolado bacteriano a uma limitada e necrosada área foliar (Figura 9 – painel B).

Painel (A): *B.oleracea* (híbrido **suscetível** – *Veloce F1*) infiltrada com *Xcc51* e *XccY21*



Painel (B): *B.oleracea* (híbrido **resistente** – *Astrus Plus*) infiltrada com *Xcc51* e *XccY21*

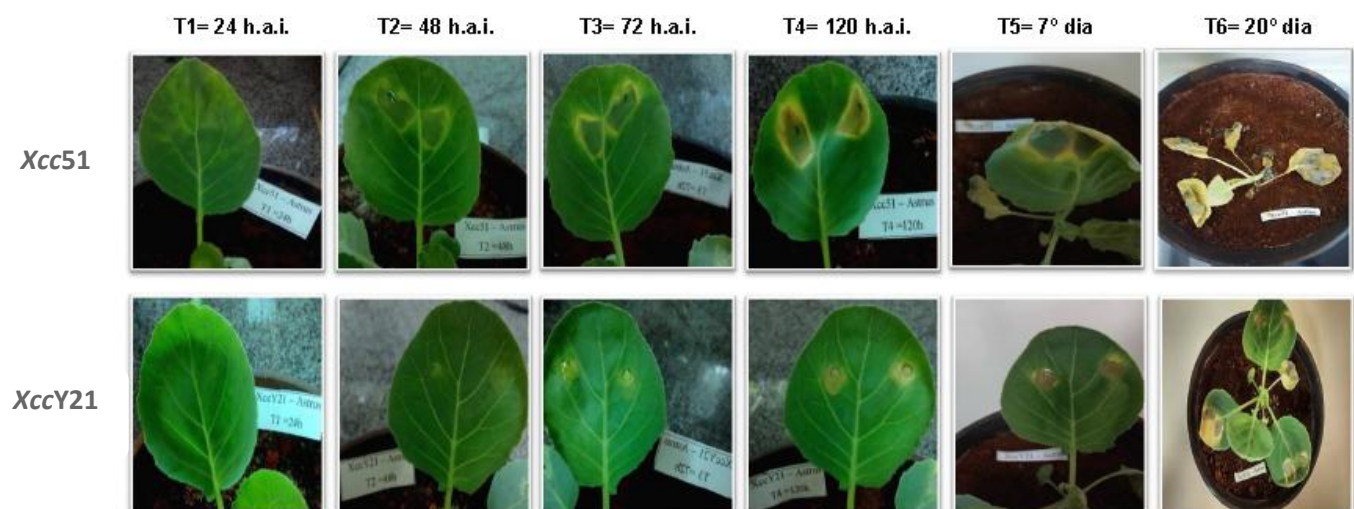


Figura 9 - Painéis (A e B) da avaliação de sintomas na planta. Suspensão dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em solução salina (NaCl 0,85%) a OD= 0,6 inoculada em dois pontos por limbo foliar nos híbridos de *B. oleracea* – *Veloce F1* e *Astrus Plus* (susceptível e resistente, respectivamente). Os sintomas gerados foram observados por 5 dias após a infiltração e seguidos até o decesso das cultivares. O experimento foi realizado em triplicata, com resultados visualmente similares, para cada uma das condições.



Os resultados obtidos validam a maior virulência de *Xcc51* quando comparado a *XccY21*. Uma análise do perfil do crescimento desses isolados na planta, através da dinâmica populacional bacteriana, foi também realizada na intenção de se traçar um paralelo entre esses resultados (virulência – crescimento).

### 4.3 DINÂMICA BACTERIANA IN PLANTA

Visando analisar o crescimento dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* frente aos mecanismos de resistência da cultivar *B. oleracea*, foi realizada uma avaliação da dinâmica populacional bacteriana in planta utilizando o híbrido *Astrus plus*. O experimento, realizado em triplicata biológica, foi acompanhado durante cinco dias, desde o tempo zero (momento da infiltração), até 120 horas após a infiltração (hai). Imediatamente após a infiltração da suspensão bacteriana nas folhas (T= 0 h), foram aferidos os valores de  $3,47 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup> e  $2,06 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup> para os isolados *Xcc51* e *XccY21*, respectivamente. Nos tempos subsequentes, observou-se uma diferença acentuada na dinâmica bacteriana entre as médias das réplicas biológicas dos isolados, em virtude do comportamento antagônico dos mesmos. O isolado *Xcc51* apresentou crescimento entre 24 e 72 hai, saltando de  $7,32 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup> para  $1,02 \times 10^{10}$  CFU.cm<sup>-2</sup>, seguindo com posterior queda entre 72 e 120 hai, chegando a atingir ao final deste período  $5,47 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup>. Em contrapartida, o isolado *XccY21* apresentou uma forte queda em seu crescimento entre 24 e 72 hai, passando de  $4,33 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup> para  $1,33 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup>. A partir desse momento foi observada uma estabilização de seu crescimento, entre 72 e 120 hai, variando de  $1,33 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup> para  $1,31 \times 10^9$  CFU.cm<sup>-2</sup> (Figura 10 e Figura 11).

Em consonância com o observado na avaliação de sintomas na planta, a dinâmica bacteriana sugere uma maior virulência por parte do isolado bacteriano *Xcc51*, como reflexo do aumento da população bacteriana no decorrer da infecção, sugerindo que o mesmo seria capaz de suplantar os mecanismos de resposta rápida de defesa, desencadeados pela planta.

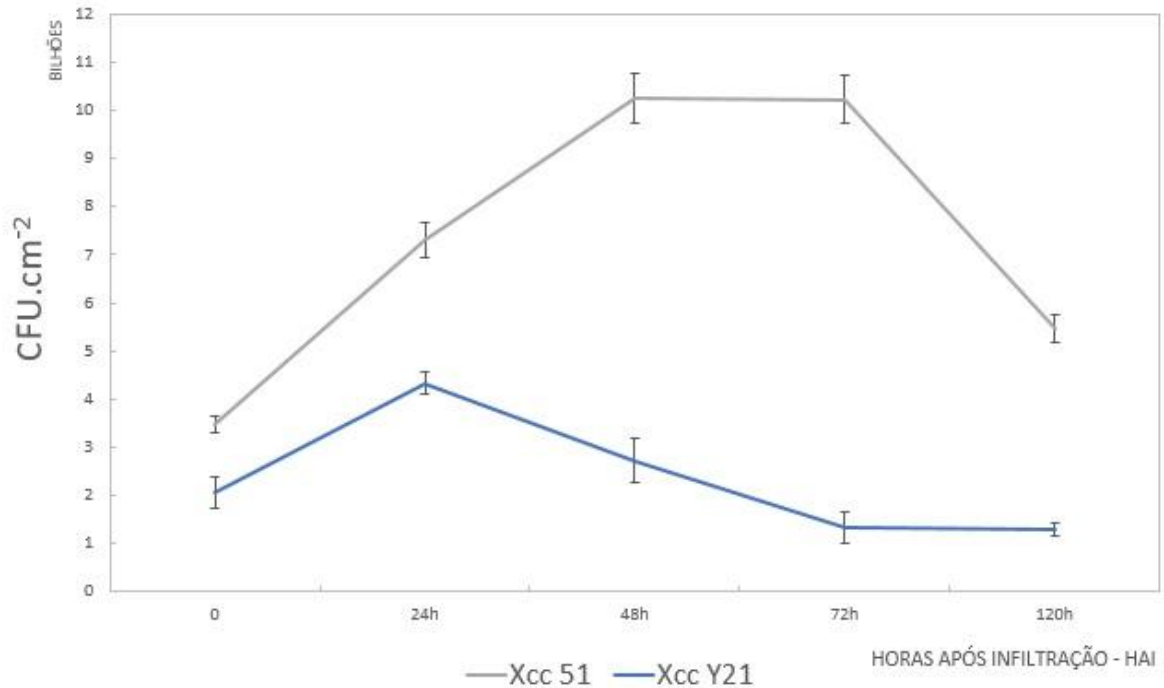


Figura 10 - Dinâmica bacteriana: comparação das dinâmicas (em  $CFU.cm^{-2}$ ) entre os isolados bacterianos Xcc51 e XccY21, aferida em 5 tempos após infiltração em folhas da cultivar híbrida (Astrus plus) de *B. oleracea*. As diluições foram realizadas em triplicatas, com resultados similares entre as réplicas. A barra de erro representa o desvio padrão da média.

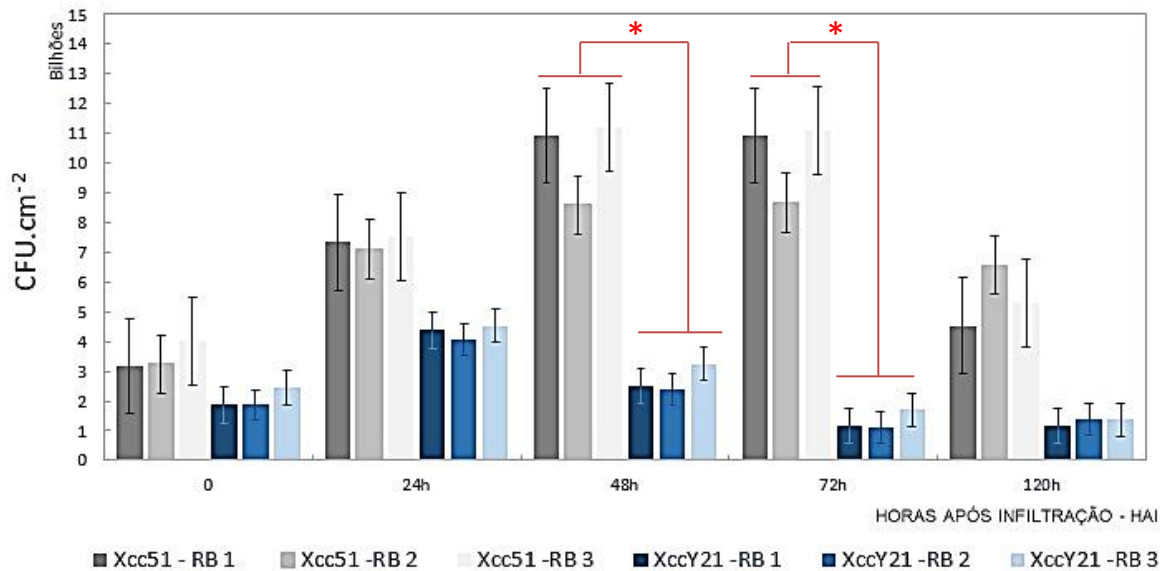


Figura 11 - Dinâmica bacteriana: representação do crescimento (em  $CFU.cm^{-2}$ ) entre três réplicas (RB1, RB2 e RB3) de cada um dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21, nos cinco tempos pós infiltração em folhas da cultivar híbrida (Astrus plus) de *B. oleracea*. A barra de erro representa o desvio padrão da média (\* = significância estatística,  $p \leq 0,05$ ).

Em razão das diferenças constatadas na dinâmica do crescimento *in planta* entre os isolados bacterianos, foram propostos os testes estatísticos ANOVA e *pós-hoc* de comparações múltiplas de Tukey - HSD, a fim de se inferir a significância estatística da comparação entre as médias de crescimento dos isolados, para cada um dos diferentes tempos após inoculação (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Resultado da Análise de Variância (ANOVA) referente aos valores médios (CFU.cm<sup>-2</sup>) das dinâmicas bacterianas entre os isolados Xcc51 e XccY21.

Tabela ANOVA						
Fonte	Variância observada	total	GL <sup>a</sup>	Variância entre as médias	F-Ratio <sup>b</sup>	P-Value <sup>c</sup>
Entre grupos	2,76E+13		1	2,76E+13	18,28	0,0052
Intra grupos	9,04E+12		6	1,51E+12		
Total (Corr.)	3,66E+13		7			

a – Graus de Liberdade; b – Razão da variância; c – Valor da probabilidade ( $\leq 0.05$ , rejeita-se a hipótese nula)

Tabela 5 - Pós-teste das comparações múltiplas de Tukey referente aos valores médios (CFU.cm<sup>-2</sup>) das dinâmicas bacterianas entre os isolados Xcc51 e XccY21. O asterisco (\*) denota uma diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias.

Tukey HSD - Multiple Range Tests (método 95%)			
	Amostras	Média	Grupos Homogêneos
Valores médios da Dinâmica de XccY21	4	1,53E+06	X
Valores médios da Dinâmica de Xcc51	4	5,24E+06	X
Contraste	Sig.	Diferença	+/- Limites
Valores de Xcc51 - Valores de XccY21	*	3,71E+06	2,12E+06

As expressivas diferenças observadas na dinâmica bacteriana *in planta* entre as médias do crescimento dos isolados Xcc51 e XccY21, mostraram-se estatisticamente significativas quando submetidas ao rigor dos testes empregados, em específico nos tempos 48h e 72h após a infiltração (Figura 11). Considerando as observações de diferenças na virulência e crescimento dos dois isolados de Xcc *in planta*, foi realizada a análise proteômica através da técnica 2D-nanoUPLC/MS<sup>E</sup> visando, a partir dos perfis dos proteomas gerados, para melhor compreender os mecanismos envolvidos na virulência de ambos os isolados bacterianos.

#### 4.4 CURVAS DE CRESCIMENTO BACTERIANO *IN VITRO*

No presente estudo, foram analisadas quatro condições envolvendo dois isolados distintos da bactéria *Xcc* e dois diferentes meios de cultivo (meio *NYG* como controle e *XVM1*, capaz de induzir a transcrição de genes relacionados à virulência): *Xcc51* – *NYG*; *Xcc51* – *XVM1*; *XccY21* – *NYG*; *XccY21* – *XVM1*. Os perfis proteicos, produtos das expressões gênicas resultantes dessas interações, foram investigados utilizando-se a técnica *2D-nanoUPLC/MS<sup>E</sup>* e a plataforma *PLGS*. Inicialmente, foi preciso estabelecer quatro curvas de crescimento a fim de se obter a fase exponencial máxima do crescimento bacteriano, momento exato para proceder com a extração proteica e a posterior análise proteômica. Os inóculos foram submetidos a análise espectrofotométrica, partindo-se de uma  $OD_{600nm} = 0,01$  para os isolados cultivados em meio *NYG* e  $OD_{600nm} = 0,3$  para os isolados cultivados em *XVM1*, sendo aferida a absorbância em intervalos de quatro horas para os cultivos em meio *NYG* e a cada doze horas para os cultivos em meio *XVM1*.

Foi possível constatar que os isolados de *Xcc*, quando cultivados em meio *NYG*, alcançaram a fase exponencial máxima de crescimento em tempos similares, tendo o isolado bacteriano *Xcc51* atingido  $8,25$  ( $\log_{10}$ ) *CFU.ml<sup>-1</sup>*, na 14<sup>a</sup> hora de medição, enquanto o isolado *XccY21* que, aparentemente obteve um maior crescimento, alcançou  $8,49$  ( $\log_{10}$ ) *CFU.ml<sup>-1</sup>* na 13<sup>a</sup> hora após inoculado ao meio de cultivo (Figura 12).

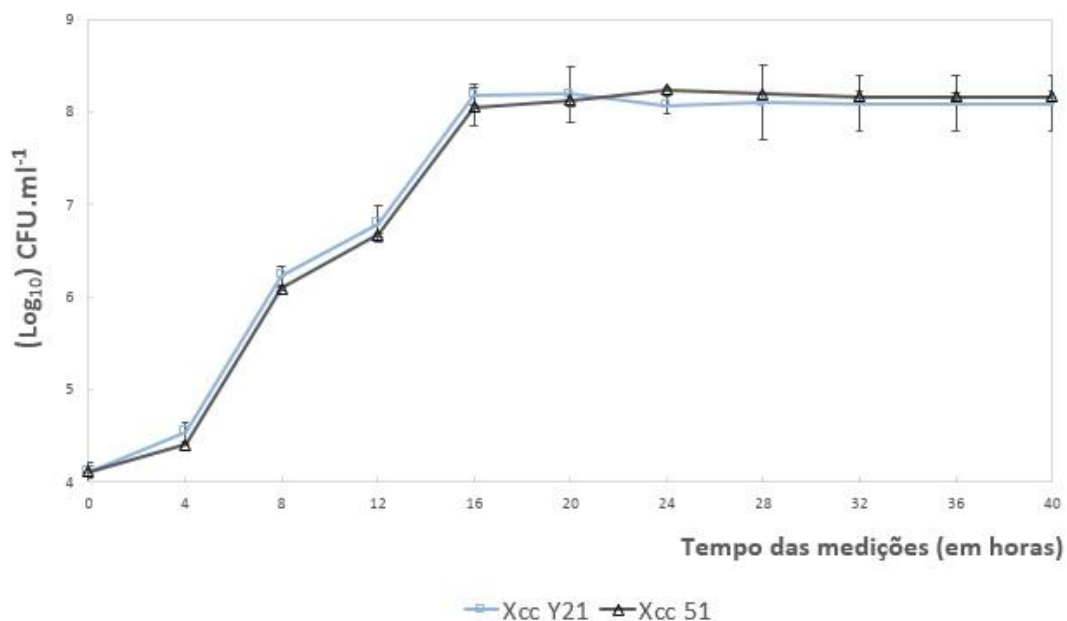


Figura 12 - Aferição das curvas de crescimento ( $\log_{10}$  *CFU.ml<sup>-1</sup>*) dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em meio *NYG*. O experimento foi realizado em triplicata, com resultados similares entre as réplicas. A barra de erro representa o desvio padrão da média.

Quanto ao perfil de crescimento bacteriano em meio *XVM1*, notou-se, conforme esperado devido à escassez de nutrientes na composição do meio, um crescimento mais lento e menor de ambos os isolados, onde *Xcc51* e *XccY21* atingiram a fase exponencial máxima de crescimento com 5,72 ( $\log_{10}$ )CFU.ml<sup>-1</sup> e 5,69 ( $\log_{10}$ )CFU.ml<sup>-1</sup>, na 23<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> hora de medição da curva, respectivamente (Figura 13).

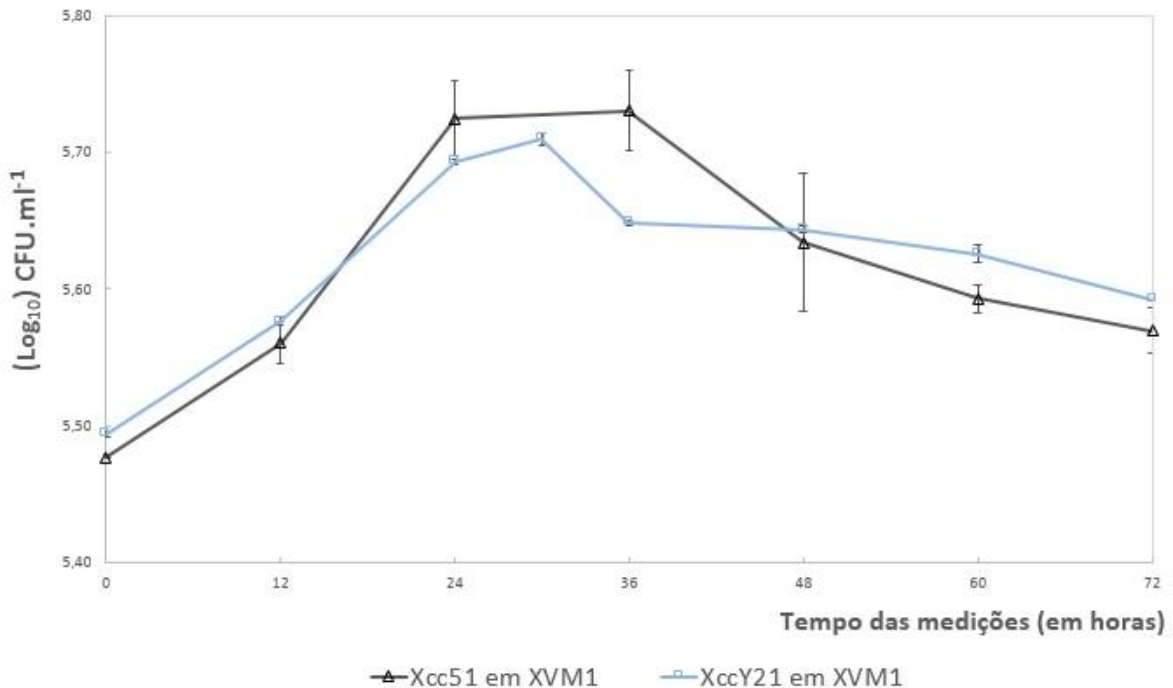


Figura 13 - Aferição das curvas de crescimento ( $\log_{10}$ CFU.ml<sup>-1</sup>) dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21*, em meio *XVM1*. O experimento foi realizado em triplicata, com resultados similares entre as réplicas. A barra de erro representa o desvio padrão da média.

#### 4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

Os dados obtidos pela análise proteômica foram processados utilizando a plataforma *PLGS*. As informações obtidas pelos espectros foram comparadas com informações do genoma de *Xanthomonas spp.*, registradas no banco de dados *XGB*. Após a identificação das proteínas, foram obtidas informações sobre a ontologia e identificação dos genes, informações estas geradas com o emprego do software *BLAST2GO*®.

Devido não constar na literatura uma padronização de quais parâmetros utilizar na identificação das proteínas para esse tipo de análise (Murad & Rech, 2012; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2013) e, após estudo prévio realizado por nosso grupo, do

qual se obteve resultados satisfatórios na identificação de proteínas, foi utilizado o parâmetro mínimo recomendado pelo fabricante (*Waters*<sup>®</sup>) que consiste em considerar pelo menos um fragmento por peptídeo, três fragmentos de íons por peptídeo e um fragmento de íon por proteína (1+3+1). Embora este parâmetro considere o mínimo de 1 peptídeo por proteína, as proteínas na presente análise foram identificadas baseadas em pelo menos cinco peptídeos (exceto proteínas com função não conhecida). Por fim, a análise foi submetida a uma última condição, na qual os dados gerados passaram por uma filtragem, a fim de se aceitar proteínas presentes em pelo menos quatro réplicas técnicas (RT), visando garantir que as proteínas estivessem presentes ao menos em duas réplicas biológicas (RB), para cada condição (Figura 14).

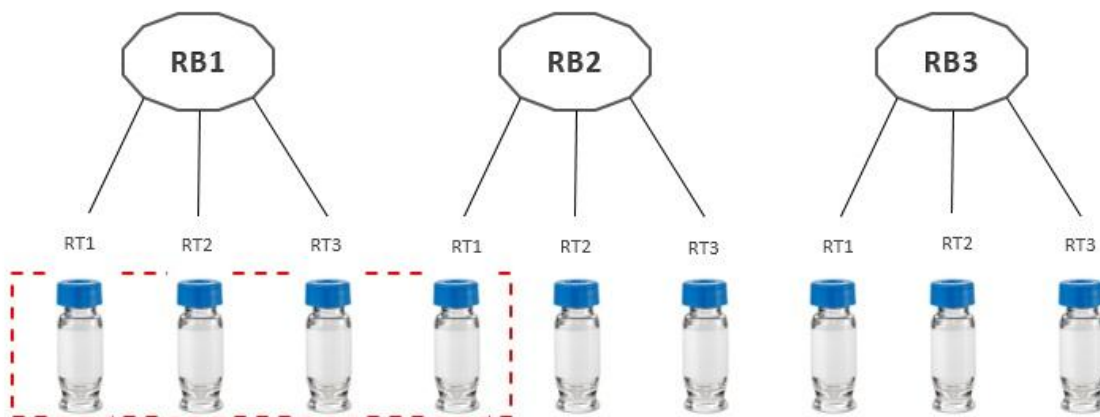


Figura 14 - Esquema experimental da filtragem a que os dados proteômicos gerados foram submetidos, visando garantir a reprodutibilidade da análise. Somente as proteínas presentes em ao menos quatro RT e validadas estatisticamente foram selecionadas. O retângulo tracejado (vermelho) representando apenas uma das possibilidades de filtragem.

Dessa forma, foram identificados um total de 519 proteínas, sendo 244 identificadas quando do cultivo dos isolados bacterianos em meio *NYG* (Tabela suplementar 1) e 275 em meio *XVM1* (Tabela Suplementar 2). Dentre as proteínas totais identificadas no proteoma dos isolados bacterianos, quando cultivados em meio *NYG*, 237 proteínas se mostraram comuns aos dois proteomas e 5 e 2 proteínas foram exclusivas dos isolados *Xcc51* e *XccY21*, respectivamente (Figura 15; Tabela Suplementar 3). Ao passo que quando o cultivo se deu em meio indutor da expressão de genes relacionados à virulência, 267 proteínas se mostraram comuns aos dois proteomas e 5 e 3 proteínas foram exclusivas dos isolados *Xcc51* e *XccY21*, respectivamente (Figura 15; Tabela Suplementar 4).

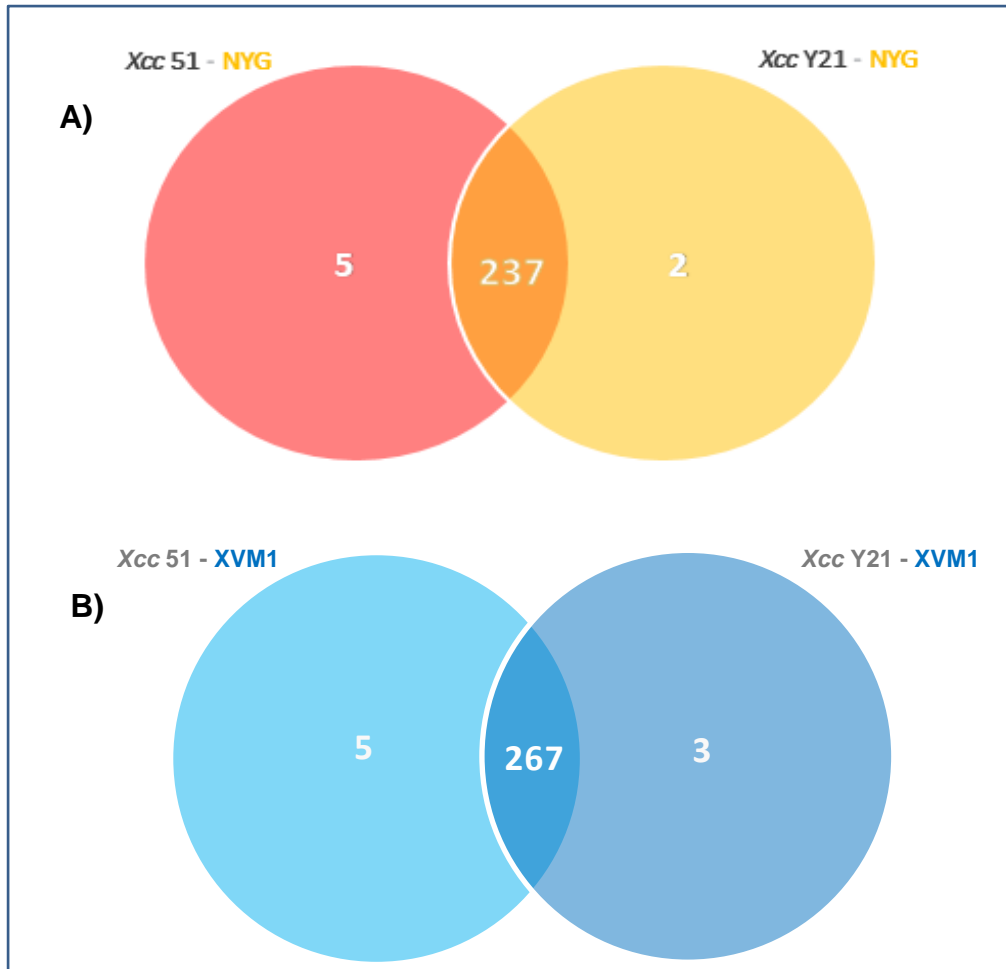


Figura 15 - Quantificação das **proteínas totais (comuns e exclusivas)** presentes nos proteomas dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21 quando cultivados em meio nutricionalmente rico – NYG (A) e em meio mínimo – XVM1 (B).

Em relação à quantificação das proteínas diferencialmente abundantes, observou-se um expressivo contraste entre os proteomas dos isolados bacterianos em ambos os meios de cultivo. Contabilizou-se 3 e 103 proteínas diferencialmente aumentadas e diminuídas, respectivamente, na relação Xcc51/XccY21, quando do cultivo em NYG (Figura 16), ao passo que 40 e 8 proteínas diferencialmente aumentadas e diminuídas, respectivamente, no cultivo em XVM1 (Figura 17; Tabela Suplementar 5 e 6). Foi proposto uma representação gráfica das proteínas diferenciais reveladas no cultivo dos isolados em meio indutor de virulência, evidenciando a sua identidade e quantidade em relação ao seu aumento e/ou diminuição (Figura 18).

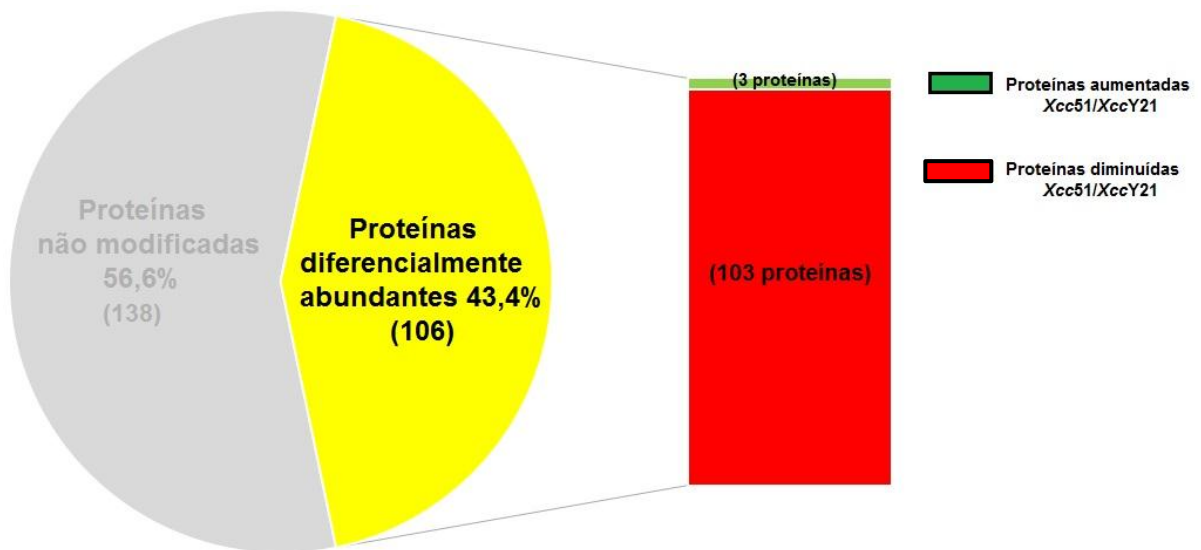


Figura 16 – Quantificação das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21, quando cultivados em meio **NYG**.

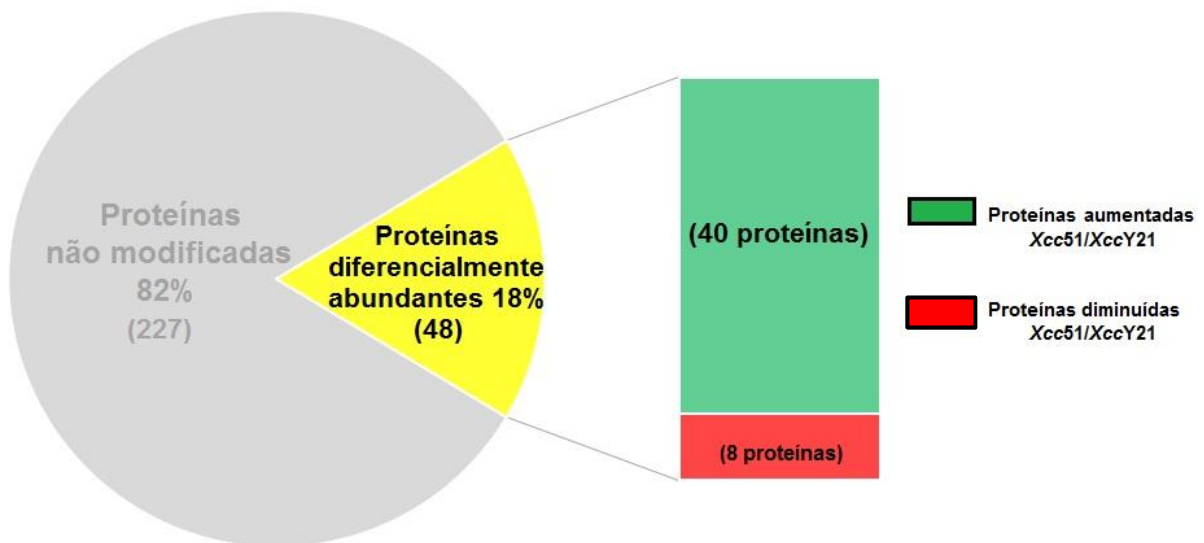


Figura 17 – Quantificação das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21, quando cultivados em meio mínimo – **XVM1**.



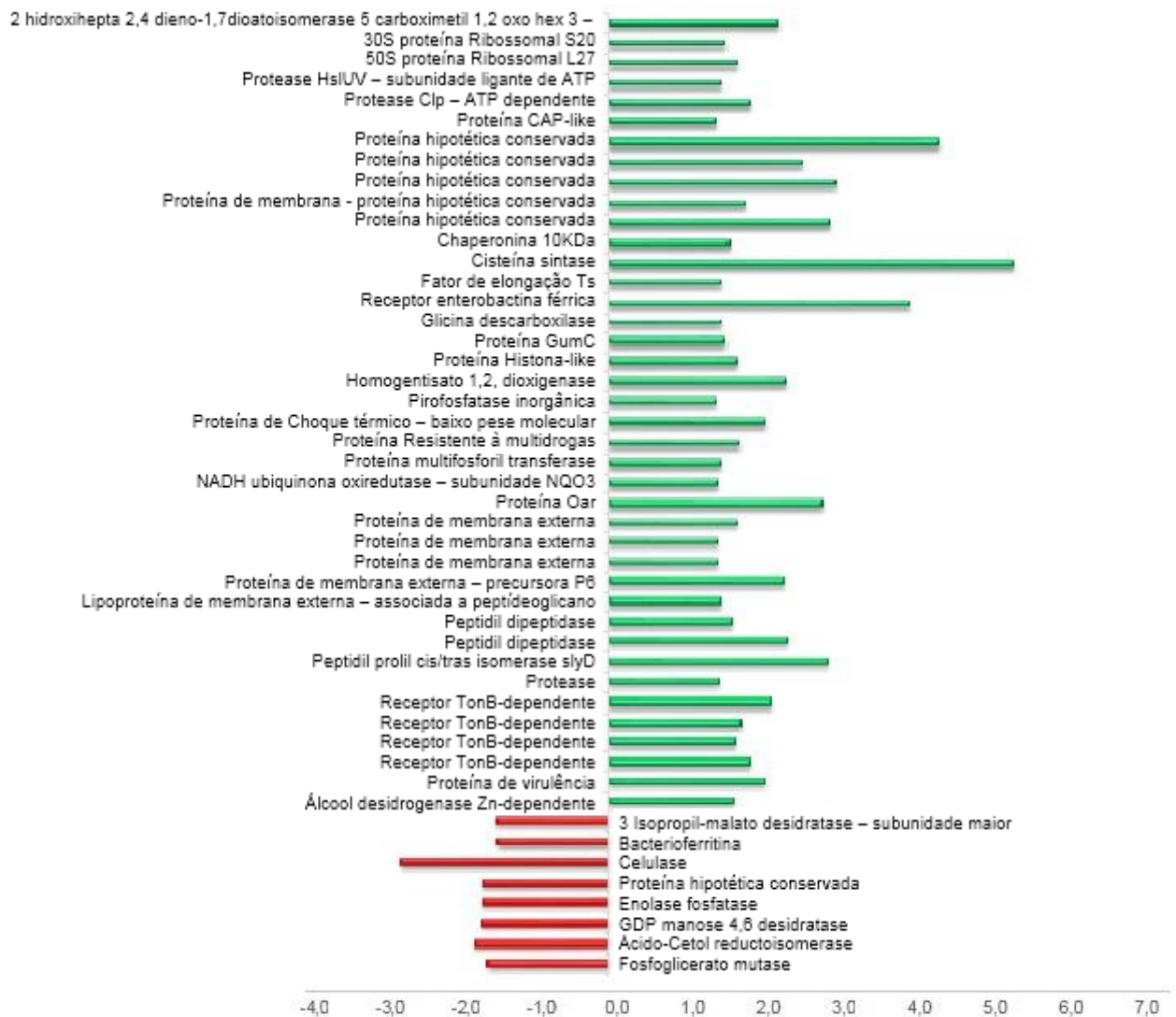


Figura 18 – Identificação das **proteínas diferencialmente abundantes** no proteoma dos isolados bacterianos Xcc51 e XccY21, quando cultivados em meio mínimo - *XVM1*, em função de sua quantidade relativa ( $\log_{10}$  fold change ratio). Proteínas diferencialmente aumentadas (verde) e diminuídas (vermelho) no proteoma do isolado Xcc51, em relação ao isolado XccY21.

## 4.6 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

As proteínas totais (Figura 19; Figura 21) e as diferencialmente abundantes (Figura 20; Figura 22), identificadas a partir da relação Xcc51/XccY21 quando cultivados em *NYG* e *XVM1*, foram classificadas de acordo com as suas ontologias gênicas (*GO*, do inglês *Gene Ontology*). As categorias funcionais estão descritas na anotação do genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002) e os resultados apresentados foram gerados com o emprego do software *BLAST2GO*®.

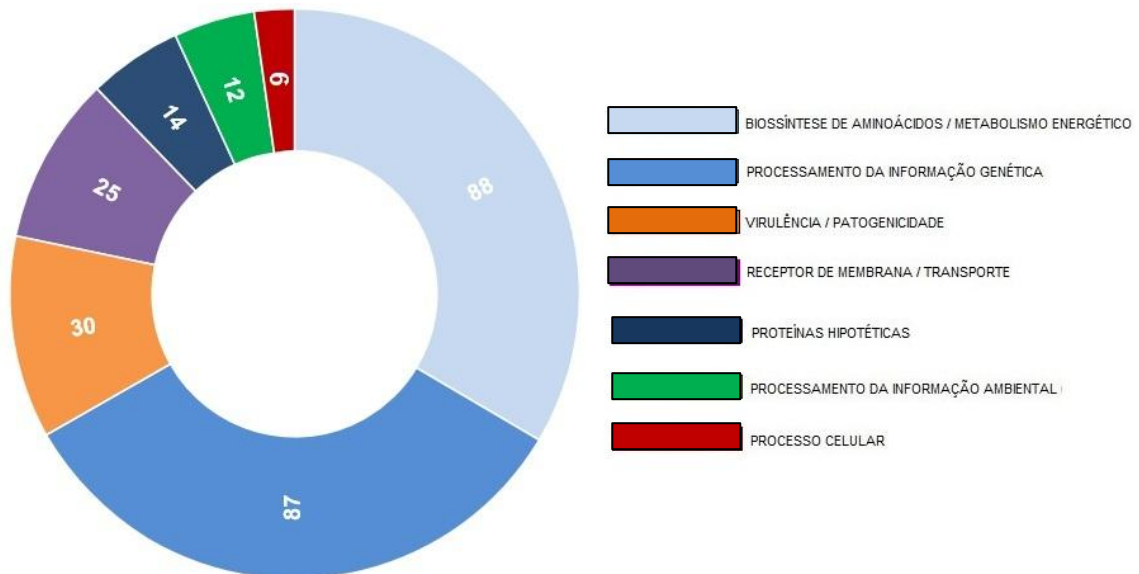


Figura 19 – Quantificação e categorização funcional das **proteínas totais** identificadas no proteoma dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* quando cultivados em meio **NYG**, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional.

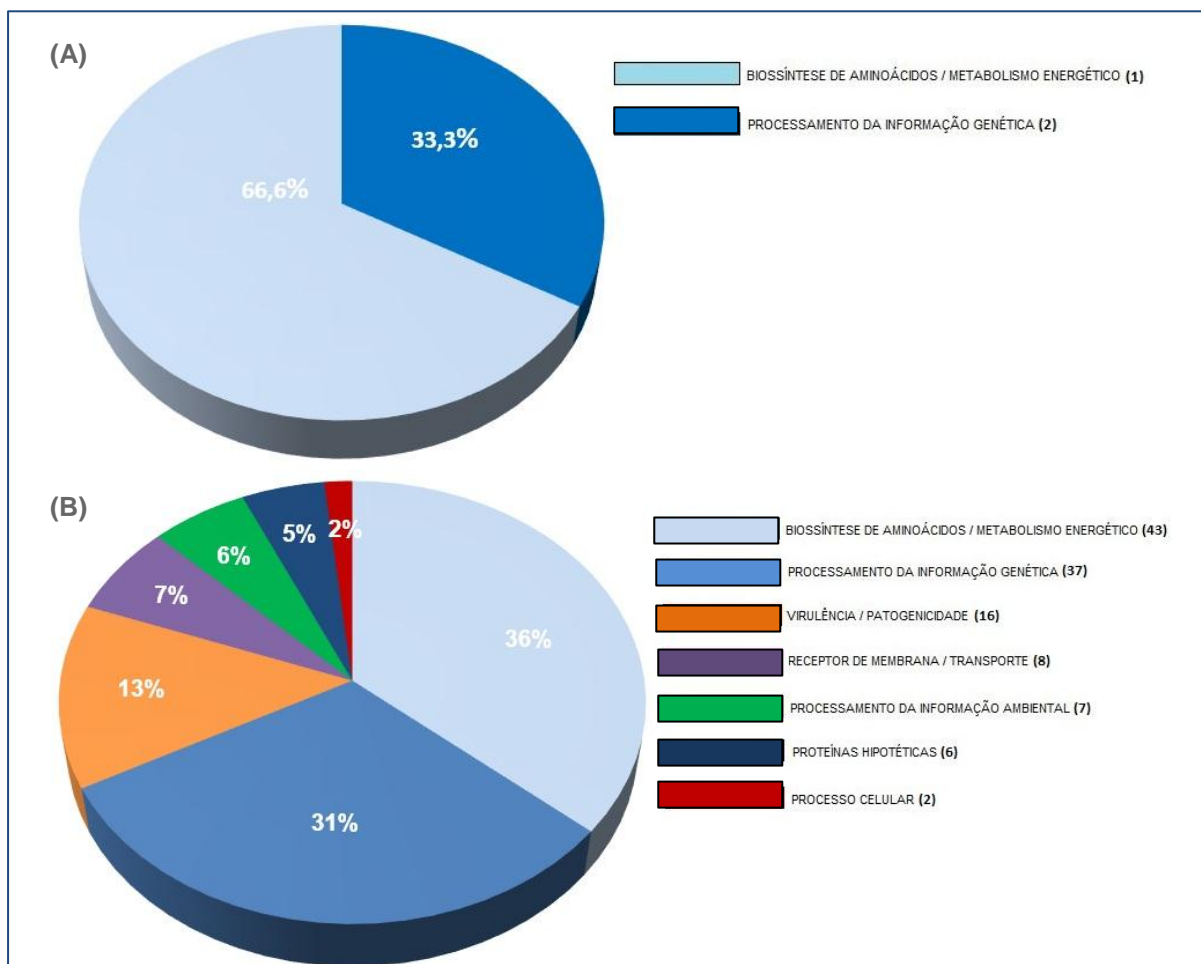


Figura 20 – Quantificação e categorização funcional das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação *Xcc51/XccY21*, quando cultivados em meio **NYG**, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Proteínas diferencialmente aumentadas (A) e diminuídas (B) no proteoma do isolado *Xcc51*, em relação ao isolado *XccY21*. Os números entre parênteses representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional.

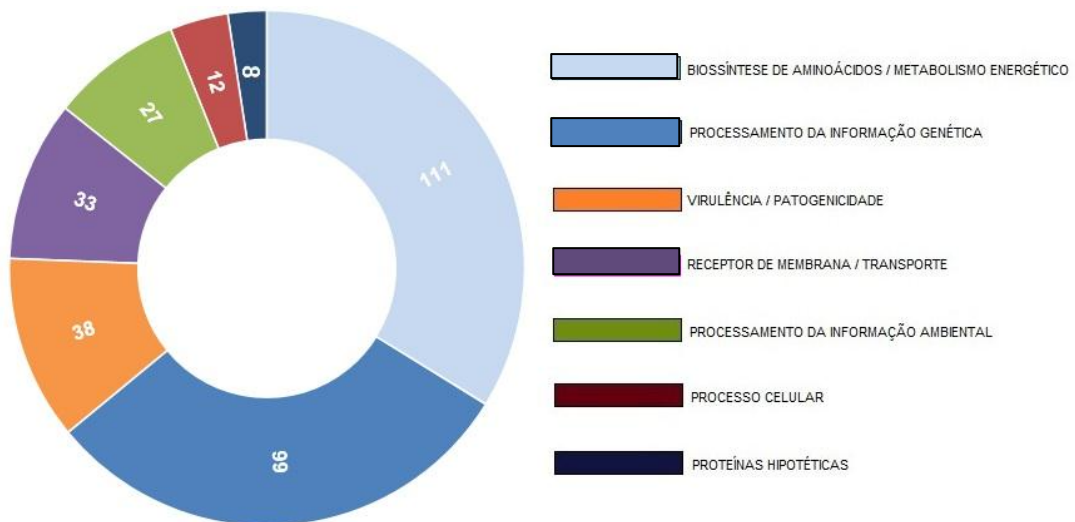


Figura 21 – Quantificação e categorização funcional das **proteínas totais** identificadas no proteoma dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* quando cultivados em meio mínimo - *XVM1*, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional.

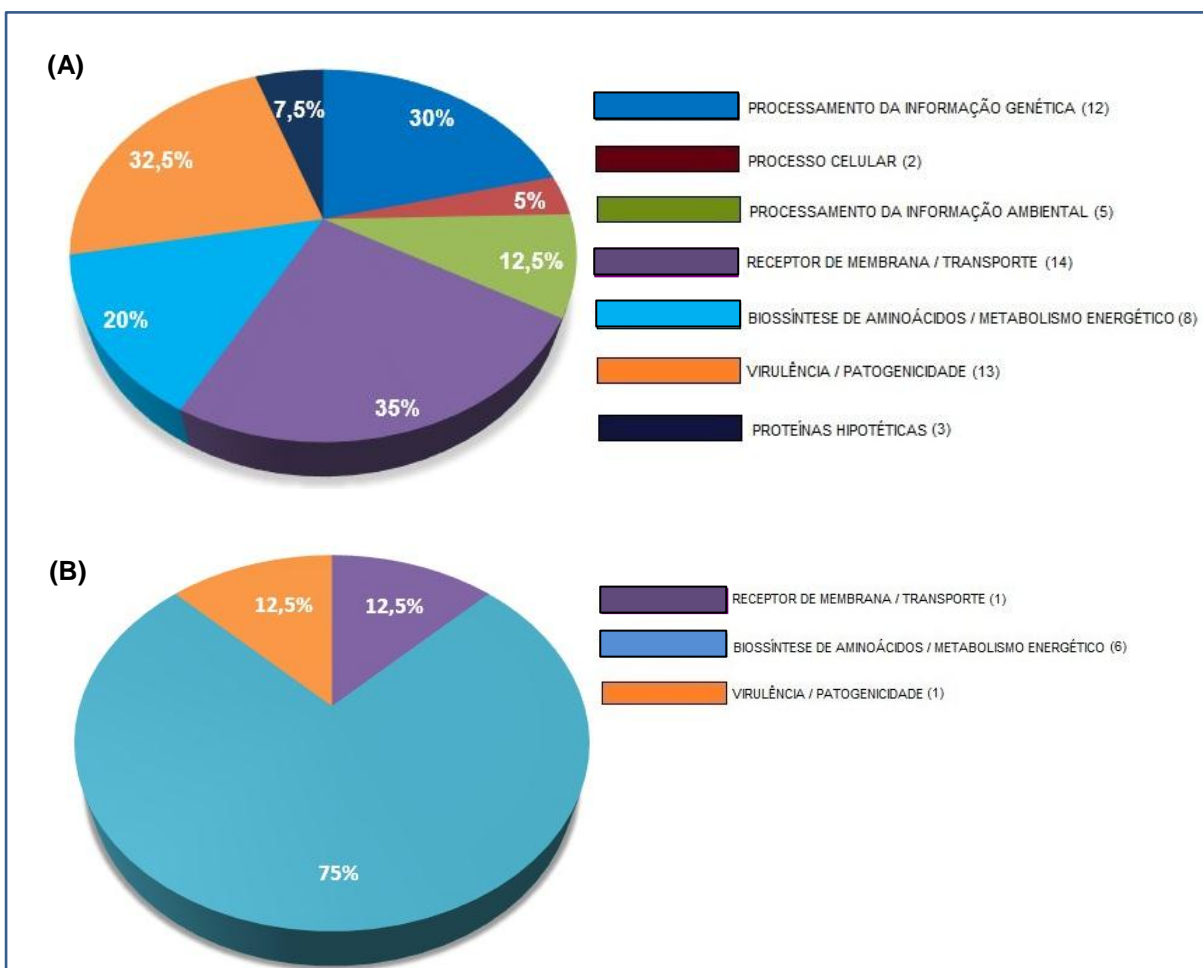


Figura 22 – Quantificação e categorização funcional das **proteínas diferencialmente abundantes** identificadas a partir da relação *Xcc51/XccY21*, quando cultivados em meio mínimo - *XVM1*, utilizando a ferramenta *BLAST2GO*®. Proteínas diferencialmente aumentadas (A) e diminuídas (B) no proteoma do isolado *Xcc51*, em relação ao isolado *XccY21*. Os números entre parênteses representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional. Algumas das proteínas foram classificadas em mais de uma categoria funcional.

A análise baseada em GO das proteínas totais identificadas a partir do cultivo dos isolados bacterianos em meio nutricionalmente rico – *NYG*, revelou um proteoma constitutivo bastante complexo e heterogêneo, incluindo 7 categorias funcionais. Conforme destacado na figura 19, as duas categorias mais expressivas estão relacionadas à biossíntese de aminoácidos/metabolismo energético (33,6%) e ao processamento da informação genética (33,2%). Em relação as proteínas totais identificadas em meio *XVM1*, a figura 21 evidencia que a maior parte dessas, 111 (40,65%) está comprometida com a biossíntese de aminoácidos e metabolismo energético; a segunda maior categoria funcional representada por proteínas associadas ao processamento da informação genética, 99 (36,26%); 38 proteínas (13,91%) estando diretamente relacionadas com mecanismos de virulência e adaptação; 33 proteínas (12,08%) com funções relativas a receptores de membrana e/ou transporte de íons metálicos; 27 proteínas (9,9%) comprometidas como processamento da informação ambiental e/ou transdução de sinais; 12 proteínas (4,4%) desempenhando funções ligadas a processos celulares e, por fim, 8 proteínas (2,93%) hipotéticas, com funções desconhecidas ou ainda não descritas.

Quanto as proteínas diferencialmente abundantes, identificadas e quantificadas em função da razão estabelecida entre os proteomas dos dois isolados bacterianos quando cultivados em meio *XVM1*, a categorização funcional das mesmas (Figura 22; Tabela Suplementar 7 e 8) revelou que as 40 proteínas aumentadas no proteoma do isolado *Xcc51* se mostraram comprometidas com 7 categorias funcionais, havendo proteínas distribuídas em mais de uma categoria, a saber: receptores de membrana/transporte e transdução de sinais (14); virulência e adaptação (13); processamento da informação genética (12); biossíntese de aminoácidos/metabolismo energético (8); processamento da informação ambiental (5); proteínas hipotéticas (3) e processo celular (2). Ao passo que as proteínas diminuídas, identificadas no proteoma do mesmo isolado, foram categorizadas funcionalmente em 3 categorias, a saber: biossíntese de aminoácidos/metabolismo energético (6), receptores de membrana/transporte (1) e virulência/adaptação (1).

Um dado interessante foi observado em relação ao comportamento dos isolados bacterianos *Xcc51* e *XccY21* quanto à expressão de seus produtos gênicos em *NYG* e *XVM1*. De acordo com as figuras 20 e 22, a comparação entre o perfil das proteínas diferencialmente abundantes, sugere maior resiliência e habilidade por parte do isolado *Xcc51* na resposta aos diferentes meios de cultivo, uma vez que esse é

capaz de diminuir a quantidade de proteínas dispensáveis à condição fisiológica (cultivo em meio NYG) e aumentar a expressão de proteínas fundamentais à sobrevivência, sob a condição de estresse imposta pelo cultivo em meio XVM1.

Com base nesses achados, foi proposto um modelo, parcialmente hipotético, da virulência do isolado bacteriano Xcc51, com a intenção de ilustrar o seu comportamento diferencial, reflexo, supostamente, das proteínas diferencialmente aumentadas (Figura 23).

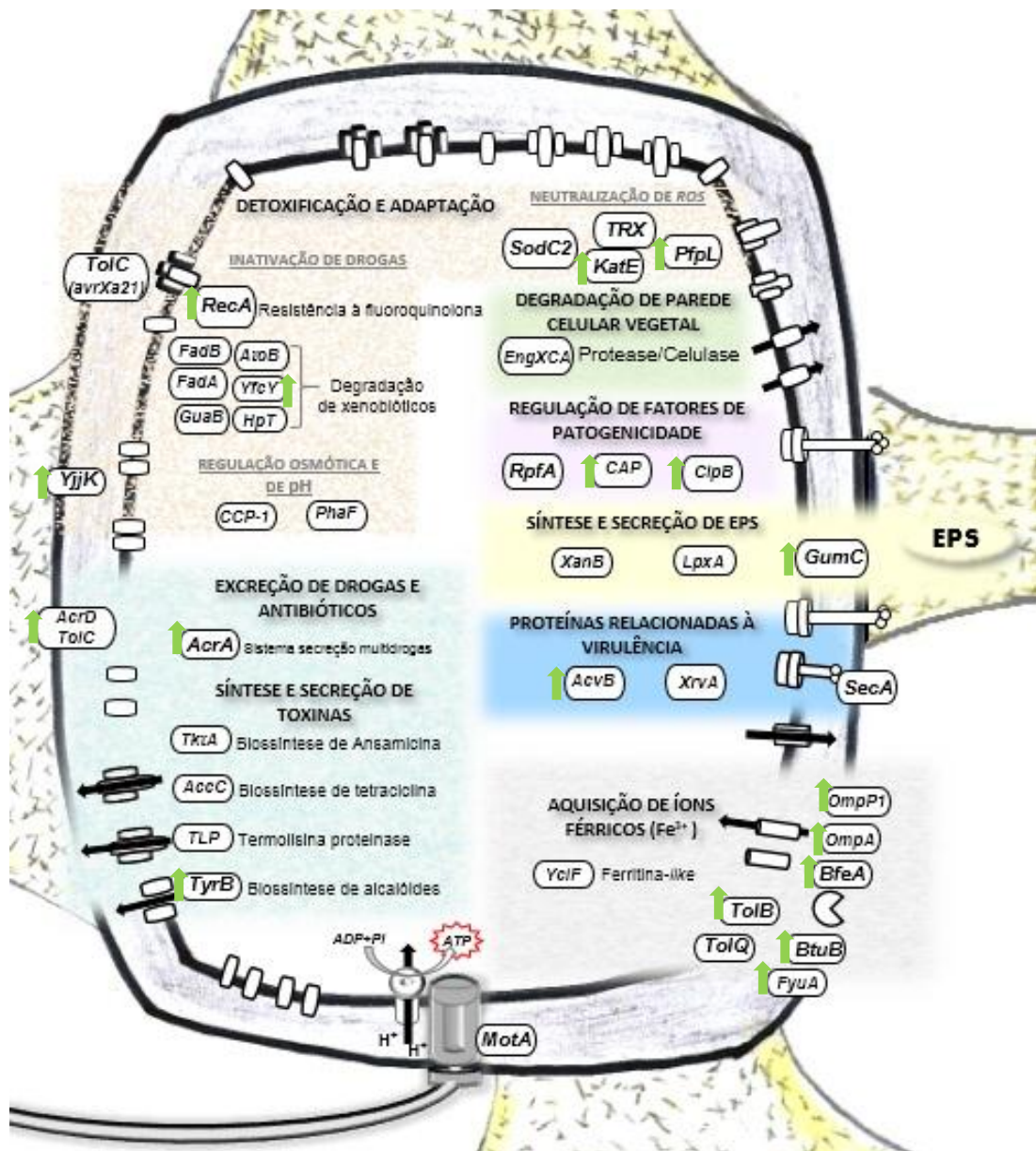


Figura 23 – Modelo simplificado ilustrativo da virulência do isolado bacteriano Xcc51, com base nas proteínas diferencialmente aumentadas e funcionalmente categorizadas em seu proteoma. As categorias funcionais estão evidenciadas em negrito e sublinhadas, estando as proteínas identificadas dentro de caixas brancas; as setas (↑) indicam as proteínas diferencialmente aumentadas; EPS – exopolissacarídeo; ROS – espécies reativas de oxigênio.

#### 4.7 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE AUMENTADAS ASSOCIADAS À VIRULÊNCIA, IDENTIFICADAS EM MEIO XVM1

Foi identificado um total de 48 proteínas diferencialmente abundantes na relação *Xcc51/XccY21*. A partir da categorização funcional de acordo com a ontologia dos produtos gênicos, revelou-se dentre as proteínas diferencialmente aumentadas no proteoma do isolado *Xcc51*, diversas proteínas comprometidas direta ou indiretamente com os mecanismos de virulência e patogenicidade, sugerindo um substancial contraste, em nível proteômico, entre a virulência dos isolados bacterianos. Dentre as categorias funcionais analisadas, duas delas merecem destaques em virtude de sua relevância na virulência e são descritas a seguir:

### 3.7.1 PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA

Em relação as 40 proteínas diferencialmente aumentadas identificadas no proteoma do isolado *Xcc51*, 30% dessas estão comprometidas com o processamento da informação genética, mais especificamente com fatores de transcrição, síntese proteica, modificações pós-traducionais, e *turnover* de proteínas. Nesta categoria, merecem destaque quanto ao seu envolvimento nos mecanismos de virulência de *Xcc* as proteínas encontradas com função de chaperona, a saber: *HslU*, *ClpB*, *Clp*, *GroEs*, *HspA*, *Dcp* e *Tig*.

Um princípio vital compartilhado por todos os organismos vivos consiste na conversão da informação genética em proteínas funcionais. Isso envolve a biossíntese, mediada por ribossomos, de cadeias lineares de polipeptídios onde, para a maioria das proteínas, faz-se crucial um dobramento (*fold*ing) da cadeia linear em uma conformação tridimensional específica, para que se atinja a maturidade funcional da proteína recém-sintetizada. De forma geral, esse dobramento conformacional é auxiliado por proteínas conhecidas como chaperonas. Ademais, as chaperonas desempenham ainda a notável função de controle de qualidade das proteínas, atuando em diversos processos celulares, como no redobramento (*refold*ing) de proteínas agregadas e/ou desnaturadas devido a algum estresse, na montagem de proteínas oligoméricas, transporte de proteínas, degradação proteolítica e até mesmo controlando a atividade proteica (Hoffmann, *et al.*, 2010). Dependendo da sua respectiva função, algumas chaperonas são expressas constitutivamente, enquanto

outras são induzidas por estresse, como por exemplo, quando o organismo é exposto a alguma situação que perturbe a homeostase proteica (Mayer, *et al.*, 2005).

Frente ao estresse imposto por mudanças na temperatura, ou mesmo devido ao acúmulo de peptídeos anormais no citoplasma, bactérias do gênero *Xanthomonas* sintetizam proteínas de choque térmico - *Hsp* (do inglês, *heat shock proteins*), capazes de corrigir possíveis danos causados em seu proteoma celular, como por exemplo, agregação de proteínas recém-sintetizadas e/ou desnaturação de proteínas compactadas (Missiakas *et al.*, 1998). Neste estudo, a proteína *HslU* (*ClpY*), membro da família *clp\_hsp100*, foi identificada. Esta proteína é uma protease com atividade *ATPase* e conhecida também por possuir função de chaperona, uma vez que constitui a subunidade de um proteossomo, complexo responsável pela degradação de proteínas (Rohrwild *et al.*, 1996). A ligação de ATP (trifosfato de adenosina) e sua subsequente hidrólise pela *HslU* são essenciais para a descompactação de proteínas e posterior hidrólise pela *HslV* (*ClpQ*), outra proteína do complexo proteossomo. A *HslU* age reconhecendo a porção N-terminal das proteínas, descompactando-as antes de serem conduzidas para a hidrólise por *HslV* (Schirmer *et al.*, 1996). Outro membro da família *clp\_hsp100*, a proteína, *ClpB*, bem como as proteínas *GroEs* e *Tig*, também foram identificadas no presente estudo e se apresentaram diferencialmente aumentadas no proteoma de *Xcc51*.

Dentre essas, a proteína *Tig* chamou atenção devido a sua maior abundância em *Xcc51* (Figura 17). Mais conhecida como *TF* (do inglês, *Trigger Factor*), esse fator representa a única chaperona associada a ribossomo descrita na literatura. Trata-se de uma chaperona ATP-independente, que opera num ciclo dinâmico de reações envolvendo eventos de ligação e liberação de proteínas recém-sintetizadas. É responsável pelo *foldings* “*co-traducional*”, ou seja, dobramento da proteína ainda durante a sua síntese, propiciando uma maior estabilidade aos novos polipeptídeos.

Ainda dentro dessa mesma categoria funcional, a proteína *Cap* (do inglês, *Catabolite activation protein*) constitui outra importante proteína que se mostrou diferencialmente aumentada no proteoma do isolado bacteriano *Xcc51* e que, segundo a literatura, está fortemente atrelada à regulação da fitopatogenicidade em *Xanthomonas spp.* (de Crecy-Lagard *et al.*, 1990). Em procariotos, onde a atividade gênica é controlada principalmente no nível da transcrição do *RNA* (*Ribonucleic Acid*), a proteína *Cap* atua como receptora do mensageiro secundário *cAMP* (do inglês, *cyclic*

*Adenosine MonoPhosphate*), formando um complexo capaz de modular o início e o término da transcrição de inúmeros genes, regulando, pois, diversas funções como a indução da síntese de enzimas catabólicas, como, por exemplo, a enzima extracelular endoglucanase, repressão de genes em *operons* (conjunto de genes contíguos, controlados de forma coordenada por um mesmo promotor-operador) relacionados com vias biossintéticas e a síntese de componentes estruturais do envelope celular (Lawson *et al.*, 2004). Estudos realizados com linhagens de *Xcc* incapazes de sintetizar a proteína *Cap*, obtidas através de técnicas de genética reversa, revelaram uma expressiva atenuação de sua fitopatogenicidade, provavelmente relacionada a redução na síntese de xantana, proteases, poligalacturonato liases, as quais são conhecidas por desempenharem fundamental papel na patogenicidade e virulência (Gough *et al.*, 1988).

### 3.7.2 RECEPTORES DE MEMBRANA

Outra importante categoria funcional identificada entre as proteínas diferencialmente aumentadas no proteoma do isolado bacteriano *Xcc51*, com grande relevância e atuação nos mecanismos de virulência e patogenicidade de *Xcc*, diz respeito a receptores de membrana envolvidos na aquisição/transporte de íons metálicos. Dentre as proteínas identificadas nessa categoria (14/40, 35%), merecem destaque: *BfeA*, *FyuA*, *BtuB*, *IroN*, *OmpP6* e *Oar*.

Apresentando o segundo maior aumento diferencial (4,26x *fold increase*) no proteoma do isolado *Xcc51*, a proteína receptora de enterobactina férrica (*BfeA*), pertencente à família *cirA* (assim como as outras proteínas diferencialmente encontradas, *FyuA*, *BtuB* e *IroN*), consiste em um receptor de membrana externa (*Outer Membrane Protein – OM*), comprometido em grande parte com a aquisição/internalização de íons metálicos inorgânicos (e.g.:  $Fe^{3+}$ ) e assim, de vital importância para o crescimento, sobrevivência e patogenicidade bacteriana.

Para que haja uma efetiva patogênese bacteriana, o microrganismo deve ser apto em reconhecer uma série de fatores ambientais, incluindo pH, osmolaridade, temperatura, concentração de aminoácidos e, de forma acurada, responder através de uma coordenada expressão de seus genes de virulência (Miller, *et al.*, 1989). Uma vez que o ambiente no interior do hospedeiro (e.g.: ambiente apoplástico foliar de plantas do gênero *Brassica*) pode ser extremamente limitado quanto a



disponibilidade de íons férricos livres ( $\text{Fe}^{3+}$ ), a simples mudança de um meio com alta concentração para outro escasso quanto a esse metal, consiste em um importante sinal do ambiente, suficiente para a bactéria coordenar a regulação da expressão de seus genes.

O ferro é um elemento crucial para o crescimento de quase todos os organismos vivos e essencial para o pleno funcionamento de diversas funções celulares como, por exemplo, o transporte e armazenamento de oxigênio (Neilands, 1972). No caso de bactérias fitopatogênicas aeróbias estritas (e.g.: gênero *Xanthomonas*), na presença de oxigênio o ferro é oxidado ao seu estado férrico, podendo gerar hidróxido de ferro, o qual é insolúvel em solução aquosa de pH neutro ou alcalino e, portanto, não acessível para essas bactérias (Neilands, 1981). Portanto, o crescimento e a sobrevivência do fitopatógeno em seu hospedeiro requer diversas respostas adaptativas por parte da bactéria, sendo a aquisição de ferro uma das mais importantes dessas respostas para a patogênese bacteriana. Na outra ponta dessa interação, proteínas da planta hospedeira com alta afinidade para o ferro, como os fitosideróforos (*PS*), proteínas transportadoras de ferro (*ITP*), transportador nicotianamina (*NA*), ferritina/frataxina (*FER1-3*) e fitato, causam à bactéria uma severa deficiência de ferro, *in vivo* (Morrissey & Lou Guerinot, 2009). Essa hostil competição por ferro entre o hospedeiro e o patógeno, acarretou na seleção de eficientes quelantes de ferro bacterianos, chamados de sideróforos, secretados em resposta ao estresse por ferro e capazes de solubilizar o ferro a partir de minerais complexos ou de proteínas do hospedeiro (Neilands, 1990). Estudos em *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*), revelaram que a eficiência na internalização celular desses complexos sideróforos, em resposta ao estresse por ferro, está fortemente relacionada à capacidade de infecção e virulência desse fitopatógeno (Pandey & Sonti, 2010; Chatterjee & Sonti, 2002).

Essa internalização, ou seja, o subsequente transporte do complexo formado ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) – sideróforo para dentro da célula bacteriana, requer receptores de superfície específicos para cada complexo sideróforo. No presente estudo, a análise proteômica do fitopatógeno *X. campestris* pv. *campestris* revelou a presença de proteínas receptoras de membrana externa (*BfeA*, *FyuA*, *BtuB*), relacionadas especificamente com a aquisição/internalização de complexos ferro-sideróforo e todas elas dependentes do sistema *TonB-ExbB/ExbD*. Esse, por sua vez, compreende proteínas da membrana citoplasmática que permitem a passagem do complexo ferro-

sideróforo para o interior do periplasma ao fornecer a energia requerida para esse transporte ativo de membrana (Eisenhauer *et al.*, 2005). No presente estudo, foi proposto um modelo representativo das proteínas identificadas e funcionalmente categorizadas, envolvidas com a aquisição e incorporação do elemento ferro pelo fitopatógeno, o isolado bacteriano *Xcc51* (Figura 24). Em suma, a ligação do complexo ferro-sideróforo à proteína receptora *bfeA*, induz nessa uma mudança conformacional expondo domínios que permitem sua ligação à proteína *TonB*, permitindo assim a incorporação do complexo ao espaço periplasmático bacteriano e posteriormente ao citoplasma via proteínas transportadoras do tipo ABC (do inglês, *ATP-Binding Cassette*). E, por fim, através da redução do ferro, de seu estado férrico ao ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o complexo sideróforo é desfeito, devido à baixa afinidade do sideróforo ao metal nesse estado de oxidação, o qual é então diretamente utilizado no metabolismo e processos fisiológicos bacterianos (Lin *et al.*, 2005).

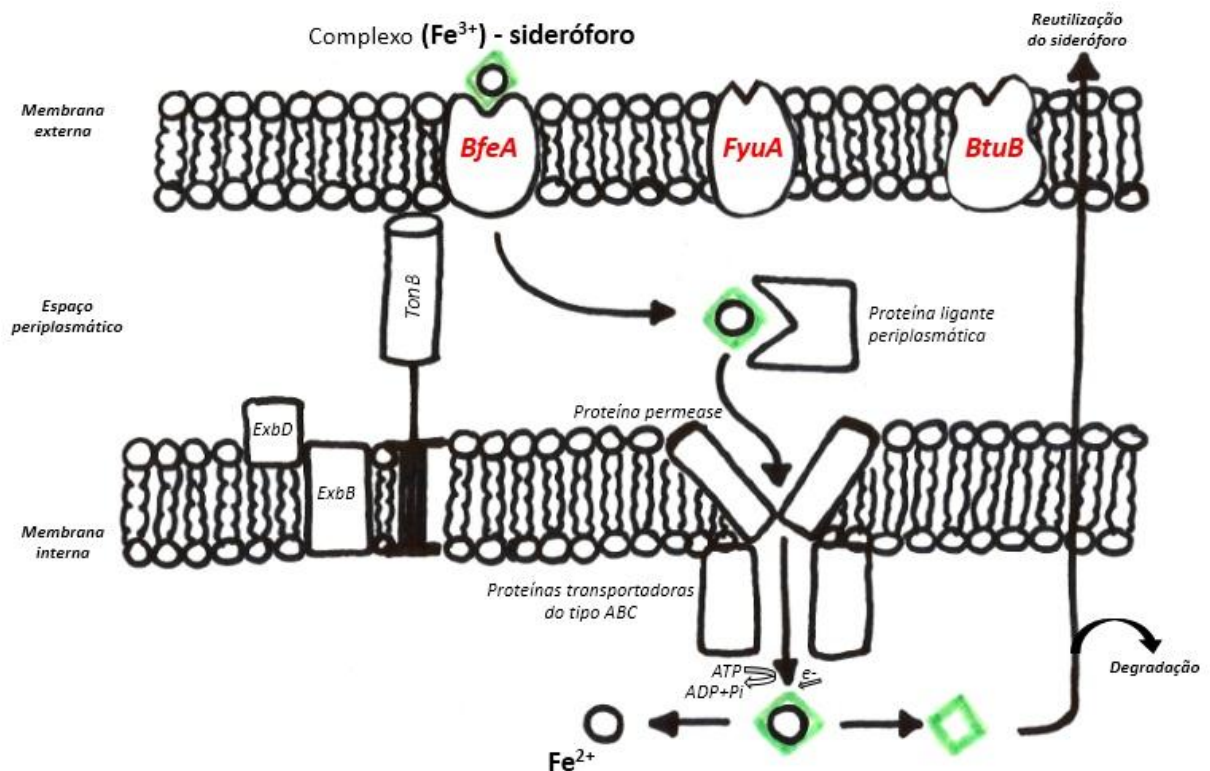


Figura 24 – Representação esquemática da incorporação do elemento ferro pela bactéria fitopatogênica *X. campestris* pv. *campestris*. Evidenciando-se (em **vermelho**) algumas das proteínas diferencialmente aumentadas no proteoma do isolado bacteriano *Xcc51*, identificadas pelo presente estudo.

Ainda em relação às proteínas receptoras de membrana externa - *TonB* dependentes (*do inglês, TBDRs*), Blanvillain *et al.* (2007) realizaram um estudo sistemático feito a partir da análise do genoma da bactéria fitopatogênica *Xcc* (linhagem ATCC 33913), onde identificaram um total de 72 *TBDRs*, apontando para outras funções além do seu envolvimento na internalização de ferro para o interior da célula bacteriana. O mesmo estudo, revelou um alto comprometimento de um *TBDR* de *Xcc* com o transporte de glicose, sugerindo se tratar de um *scavenger* (capturador) de glicose, definindo assim um novo tipo de locus gênico envolvido na captação/utilização de carboidratos (*CUT locus*), sendo este requerido para a completa patogenicidade de *Xcc* quando da interação com o hospedeiro vegetal *Arabidopsis thaliana*.

Outras proteínas identificadas no proteoma do isolado *Xcc51* e que merecem destaque quanto ao papel que exercem no contraste da virulência entre os isolados bacterianos, diz respeito às proteínas *AcvB* e *YpeB* (*XCC0025*). Primeiramente identificada em *Agrobacterium tumefaciens*, a proteína de virulência *AcvB* (*Agrobacterium chromosomal virulence protein B*) se mostrou diferencialmente aumentada no proteoma do isolado *Xcc51* (2,25x *fold increase*). Devido ter sua função complementada pelo produto do gene *virJ* - cluster gênico responsável pela expressão de diversas proteínas de virulência bacteriana envolvidas com o sistema de secreção do tipo IV, foi funcionalmente categorizada como pertencente ao grupo das proteínas relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação (da Silva, *et al.*, 2002). A infecção de plantas pela *A. tumefaciens* provoca a formação de tumores (galhas) devido a transferência de um complexo núcleo-proteico até o interior da célula hospedeira (célula vegetal), mediado por um sistema de transporte codificado por uma região de virulência que contém os genes *vir* e *acvB*, relacionando-os dessa forma a habilidade da *A. tumefaciens* em transferir o T-DNA (oncogene) para o interior da célula vegetal (Pan *et al.*, 1995). A partir de estudos envolvendo mutações induzidas por inserção de transposons (Tn5) no gene *acvB* de *A. tumefaciens*, constatou-se a perda total de virulência dessa bactéria quando da interação com os hospedeiros *Nicotiana tobaccum* e *Nicotiana glauca* (Dale, *et al.*, 1993; Melchers, *et al.*, 1990).

Via de regra, as bactérias fitopatogênicas são expostas a condições de estresse quando da interação com seu hospedeiro, sendo o baixo pH do ambiente um dos “sinais” que favorecem a expressão de fatores de virulência. Sendo assim, outro dado interessante em relação ao gene *acvB* é o fato desse se expressar com maior

eficiência quando a bactéria *A. tumefaciens* se encontra em meio ácido (Li *et al.*, 2002). Por conseguinte, a presença da proteína *AcvB*, diferencialmente aumentada no proteoma de *Xcc51*, sugere a maior capacidade deste isolado bacteriano em identificar uma situação de estresse e codificar proteínas relacionadas à virulência, as quais são secretadas ao meio externo através do sistema de secreção do tipo IV, cruciais ao sucesso da colonização de seu hospedeiro.

O presente estudo revelou ainda 5 proteínas anotadas como hipotéticas conservadas, dentre as diferencialmente aumentadas no proteoma de *Xcc51*. Objetivando-se encontrar sequências de aminoácidos com grau de similaridade a essas proteínas, utilizou-se de ferramentas computacionais, como o programa *Blastp* (Altschul *et al.*, 1990), com o intuito de se designar potenciais funções a essa classe de proteínas. A partir desta análise, a proteína hipotética conservada identificada e codificada por *XCC0025*, além de apresentar um *fold change* considerável de 2,77x, mostrou 99% de similaridade com a proteína *YpeB*, uma reguladora de atividade peptidase no ambiente microbiano, atuando possivelmente na proteção da parede celular bacteriana.

Os resultados apresentados corroboram os dados obtidos à priori pelo nosso grupo onde, a partir de um teste de sintomas, atribuiu-se maior virulência ao isolado bacteriano *Xcc51*. Ademais, a partir do exposto, foi possível formular a hipótese de que o perfil diferencial das proteínas identificadas no proteoma do isolado bacteriano *Xcc51* o confere maior virulência, sugerindo mecanismos de controle da expressão gênica mais refinados, regulados talvez por eventos pós-transcricionais, ensejando uma maior habilidade desse isolado bacteriano na tolerância ao estresse quando submetido às adversidades impostas pelo meio de cultivo *XVM1*, condição essa análoga ao ambiente apoplástico foliar de seu hospedeiro (Schulte & Bonas, 1992b). Ademais, os dados proteômicos gerados pelo presente estudo apresentam um interessante rol de proteínas supostamente relacionadas à patogenicidade e virulência de *Xcc*, o qual poderá nortear futuras investigações quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dessa fitobactéria.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, a partir de uma análise proteômica comparativa de dois isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, buscou-se identificar proteínas potencialmente envolvidas no contraste de suas virulências. A partir do exposto, concluímos que:

- I. O perfil diferencial das proteínas identificadas no proteoma do isolado bacteriano Xcc51 o confere maior virulência em relação ao patotipo XccY21;
- II. Revelou-se um substancial contraste, em nível proteômico, entre a virulência dos isolados bacterianos, uma vez que foram identificadas inúmeras proteínas direta ou indiretamente cruciais para a maior agressividade do isolado Xcc51;
- III. Atestou-se a utilização do meio sintético XVM1 como um satisfatório sistema *in vitro* para a identificação de proteínas candidatas envolvidas na virulência de Xcc;
- IV. Os dados proteômicos gerados pelo presente estudo apresentam um interessante rol de proteínas supostamente relacionadas à virulência de Xcc, o qual poderá nortear futuras investigações quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na virulência dessa fitobactéria, conhecimento essencial para o desenvolvimento de estratégias mais profícuas no combate a podridão negra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVITCH, R. B. *et al.* Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 7, p. 601–611, 2006;
- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.*, v.101, n. 2, p. 269-295, 2001;
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003;
- ALFANO, J.R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Rev. Phytol.*, v. 42, p. 385–414, 2004;
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol, London*, v. 215, n.3, p. 403-410, 1990;
- ANDERSON, O. C. Mass Spectrometric Studies on Amino Acid and Peptide Derivatives. *Acta Chemica Scandinavia*, v. 12, n. 353, p. 1353, 1958;
- BLANVILLAIN, S. *et al.* Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLoS ONE*, v. 2, n. 2, p. 224, 2007;
- BURKHOLDER, W. H. Genus II. *Xanthomonas* Dowson. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, v. 7, p. 152–183, 1939;
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 34, p. 107–133, 2010;
- CEASAMINAS: Análise conjuntural de janeiro de 2015. Disponível em: <[http://200.198.51.71/ceasainternet/\\_lib/file/docconjuntura/Jan2015.pdf](http://200.198.51.71/ceasainternet/_lib/file/docconjuntura/Jan2015.pdf)>. Acesso em: janeiro de 2016;
- CHATTERJEE, S.; SONTI, R. V. *RpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Mol. Plant Microbe Interact*, v. 15: p. 463–471, 2002;
- CHENG, F. *et al.* Genome triplication drove the diversification of *Brassica* plants. *Horticulture research*, v.1, p. 14-24, 2014;
- CHIANG, SU L. *et al.* In vivo genetic analysis of bacterial virulence. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 53, p. 129–154, 1999;
- CHISHOLM, S. T. *et al.* Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 803–814, 2006;
- CHUNG, W. J. *et al.* Qualitative and comparative proteomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17. *Proteomics*, v. 7, p. 2047–2058, 2007;

CLATWORTHY, A. E. *et al.* Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.*, v. 3, n. 9, p. 541-548, 2007;

COMAS, I. *et al.* The evolutionary origin of *Xanthomonadales* genomes and the nature of the horizontal gene transfer process. *Mol. Biol. Evol.*, v. 23, p. 2049–2057, 2006;

COOK, A. *et al.* Relation of black rot pathogen to cabbage seed. *Phytopathology*, v. 42, p. 316-320, 1952;

COX, B. *et al.* Integrated proteomic and transcriptomic profiling of mouse lung development and *Nmyc* target genes. *Mol. Syst. Biol.*, v. 3, p. 109, 2007;

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? *Cell*, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007;

DA SILVA, A. C. R. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002;

DALE, E. M.; BINNS, A. N.; WARD, J. E. J. Construction and characterization of Tn5virB, a transposon that generates nonpolar mutations, and its use to define virB8 as an essential virulence gene in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, v.175, p. 887-891, 1993;

DANIELS, M. J. *et al.* Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* using the broad host range *cosmid* pLAFR1. *EMBO J.*, v.3, p. 3323-3328, 1984b;

de CRECY-LAGARD, V. *et al.* A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *Journal Bacteriology*, v. 172, n. 10, p. 5877-5883, 1990;

de MEAUX, J.; MITCHELL-OLDS, T. Evolution of plant resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. *Heredity*, v. 91 (4), p. 345-52, 2003;

de MOT, R.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* spp. *Can. J. Microbiol.*, v. 35, p. 960–967, 1989;

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 8, p. 539–548, 2010;

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nature Biotechnology*, v. 28, p. 710-721, 2010;

DZHALILOV, F. S.; TIWARI, R. D. Soil and cabbage plant debris as infection source of black rot. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 29, p. 383-386, 1995;

- EISENHAUER, H. A. *et al.* Siderophore transport through *Escherichia coli* outer membrane receptor *FhuA* with disulfide-tethered cork and barrel domains. *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 30574–30580, 2005;
- ERBS, G. *et al.* Lipopolysaccharides and plant innate immunity. *Sub-Cellular Biochemistry*, v. 53, p. 387–403, 2010;
- ESALQ/USP. Boletim PIB: julho 2016. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: setembro de 2016;
- FARGIER, E.; MANCEAU, C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.*, v. 56, p. 805–818, 2007;
- FELIX, G. *et al.* Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, v. 18, n. 3, p. 265–276, 1999;
- FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, v. 9, p. 275-296, 1971;
- FOUHY, Y. *et al.* Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res. Microbiol.*, v. 157, n.10, p. 899–904, 2006;
- FRANCO, O. L. *et al.* Manual para estudo de proteínas. Santa Catarina. Bookess editora, 2014;
- GALLI, J. A. *et al.* Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. *Revista brasileira de sementes*, v. 23 (2), p.171-176, 2001;
- GARBUTT, C. C. *et al.* Getting to the edge: protein dynamical networks as a new frontier in plant-microbe interactions. *Front. Plant Sci.*, v. 5, p. 312, 2014;
- GARMAN, H. A bacterial disease of cabbage. *Kentucky Agr. Exp.*, v. 3, p. 43–46, 1894;
- GÖRG, A. *et al.* 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*, v. 30, p. 122-132, 2009;
- GOUGH, C. L. *et al.* Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v. 1, p. 275-281, 1988;
- GYGI, S. P. *et al.* Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.*, v.19, n. 3, p.1720-1730, 1999;
- HE, P. *et al.* Activation of a COI1- dependent pathway in Arabidopsis by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *The Plant Journal*, v. 37, n. 4, p. 589–602, 2004;



- HENZ, G. P. *et al.* Identificação de fontes de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Horticultura Brasileira*, v.5, n. 2, p. 18-20, 1987;
- HOFFMANN, A, BUKAU, B, KRAMER, G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1803, p. 650–661, 2010;
- IGNATOV, A. *et al.* Race-specific reaction of resistance to black rot in *Brassica oleracea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, v. 104, p. 821–827, 1998b;
- JONES, A. M. *et al.* Specific changes in the Arabidopsis proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1805–1816, 2004;
- JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006;
- JORRÍN-NOVO, J. V. *et al.* Plant proteomics update (2007-2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill *MIAPE* standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics*, v. 72, p. 285-314, 2009;
- JUN, S-R. *et al.* Whole-proteome phylogeny of prokaryotes by feature frequency profiles: an alignment-free method with optimal feature resolution. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v.107, p. 133–138, 2010;
- JUNGBLUT, P. & WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. *Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 111-20, 1995;
- KIMATI, H. *et al.* Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas, 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 31, p. 300-315.
- KISLINGER, T. *et al.* Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling. *Cell*, v. 125, n. 1, p. 173-186, 2006;
- LAWSON, C. L. *et al.* Catabolite activator protein (CAP): DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 14, n. 1, p. 10–20, 2004;
- LEÓN, I. R. *et al.* Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unibased protein analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 12, n. 10, p. 2992-3005, 2013;
- LEWIS, J. D. *et al.* The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 20, n.9, p.1055–1063, 2009;
- LI, L. *et al.* A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, n.19, p.12369-12374, 2002;

- LI, R. X. *et al.* Prefractionation of proteome by liquid isoelectric focusing prior to two-dimensional liquid chromatography mass spectrometric identification. *Journal of proteome research*, v. 4, n. 4, p.1256-1264, 2005;
- LIMA, W. C. *et al.* Laterally transferred genomic islands in *Xanthomonadales* related to pathogenicity and primary metabolism. *FEMS Microbiol. Letters*, v. 281, p. 87–97, 2008;
- LIN, H. *et al.* *In vitro* characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 127, p. 11075–11084, 2005;
- LODHA, T. D. *et al.* Proteomics: A Successful Approach to Understand the Molecular Mechanism of Plant-Pathogen Interaction. *American Journal of Plant Sciences*, v. 4, p. 1212-1226, 2013;
- MACKEY, D. *et al.* Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 1372-1381, 2006;
- MAKISHIMA, N. Coleção Criar e Plantar. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/112928>>. Acesso em: janeiro de 2016;
- MANSFIELD, J. *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012;
- MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas: brócolis, couve, couve chinesa, rabanete, repolho e rúcula. In: KIMATI H. *et al.* Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. cap. 10, p. 150-160.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*; 62, n. 6, p. 670–684, 2005;
- MAYR, M. *et al.* Proteomics and metabolomics combined in cardiovascular research. *Trends Cardiovasc. Med.*, v. 17, n. 2, p. 43-48, 2007;
- MEHTA, A. *et al.* Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *FEBS Journal*, v. 275, p. 3731–3746, 2008;
- MELCHERS, L. S. *et al.* Octopine and nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence; molecular characterization of the virF locus. *Plant Mol. Biol.*, v.14, p:249–259, 1990;
- MILLER, J. F. *et al.* Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science*, v. 243, p. 916-922, 1989;
- MISSIAKAS, D.; RAINA, S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.*, v. 28, p. 1059-1066, 1998;
- MORRISSEY, J.; LOU-GUERINOT, M. Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev.*, v. 109, n. 10, p. 4553–4567, 2009;

- MUKHTAR, M. S. Engineering *NLR* immune receptors for broad-spectrum disease resistance. *Trends Plant Sci.*, v. 18, p. 469–472, 2013;
- MURAD, A. M.; RECH, E. *NanoUPLC-MS<sup>E</sup>* proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnology*, v. 12, n. 82, p. 1-17, 2012;  
MURAD, A. M. *et al.* Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using *nanoUPLC-MS<sup>E</sup>*. *Journal Spectrometry Science*, v. 34, n. 19, p. 2618-2630, 2011;
- MUTURI, P. W. *et al.* A Perspective on Proteomics: Current Applications, Challenges and Potential Uses. *Agriculture and Biology Journal of North America*, v. 1, n. 5, p. 916-918, 2010;
- NAFISI, M. *et al.* Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*, v. 112, p. 63-71, 2015;
- NEILANDS, J. B. Evolution of biological iron binding centers. *Struct. Bond.*, v. 11, p. 145-170, 1972;
- NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 50, p. 715-731, 1981;
- NEILANDS, J. B. Molecular biology and regulation of iron acquisition by *Escherichia coli* K12. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 110, p. 205-223, 1990;
- PAMMEL, L. H. Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n sp.). *Am. Mon. Microsc. Journal.*, v. 16, p. 145–151, 1895a;
- PAN, S. Q. *et al.* An *Agrobacterium* virulence factor encoded by a Ti plasmid gene or a chromosomal gene is required for T-DNA transfer into plants. *Mol. Microbiol.* v.17, p. 259–269, 1995;
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000;
- PANDEY, A., SONTI, R.V. Role of the *FeoB* protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 12, 3187–3203, 2010;
- QI, Z. *et al.* Ca<sup>2+</sup> signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on *AtPepR1*, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 49, pp. 21193–21198, 2010;
- QIAN, W. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.*, v. 15, p. 757–767, 2005;
- RADEMAKER, J. L. W. *et al.* A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v. 95, p. 1098–1111, 2005;

- RADEMAKER, J. L. W. *et al.* Comparison of *AFLP* and *rep-PCR* genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 665–77, 2000;
- ROHRWILD, M. *et al.* HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 93, n. 12, p. 5808-13, 1996;
- RUSSELL, H. L. A bacterial rot of cabbage and allied plants. *Wis. Agric. Exp. Stn. Bull.*, v. 65, p. 1–39, 1898;
- RYAN, R. P. *et al.* Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 103, n. 17, p. 6712–6717, 2006;
- RYAN, R. P. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature reviews Microbiology*, v. 9, p. 344–355, 2011;
- SAMBROOK, J. *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 Ed. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989;
- SCHIRMER, E. C., GLOVER, J. R., SINGER, M. A. *et al.* HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, v. 21, p. 289 – 296, 1996.
- SCHULTE, R.; BONAS, U. A *Xanthomonas* Pathogenicity Locus 1s induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. *The Plant Cell*, v. 4, p. 79-86, 1992;
- SEO, Y. S. *et al.* A two-genome microarray for the rice pathogens *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* and its use in the discovery of a difference in their regulation of *hrp* genes. *BMC Microbiol.*, v. 8, p. 99, 2008;
- SIQUEIRA, C. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CORDEIRO, C.M.T. EMBRAPA: Índice de doenças de hortaliças no Brasil: bactérias e fungos, 2 ed. Brasília/DF: CNPH. 1997. cap. 10, p. 89-95, 1985;
- SIQUEIRA, T. S. *Cultura de Brassicas*. Imprensa Universitária. UFV. Viçosa, MG, p. 30-40, 1981;
- SMITH, E. F. The black rot of the cabbage. *USA Dep. Agric. Farmer's Bull.*, v. 68, p. 01–21, 1898;
- STASKAWICZ, B. J. *et al.* Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, v. 268, n. 5211, p. 661-700, 1995;
- VAN DEN MOOTER, M.; SWINGS, J. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 40, p. 348–369, 1990;

- VAN SLUYS, M. A. *et al.* Comparative genomic analysis of plant-bacteria association. *Annu. Rev. Phytol.*, v. 40, p. 169–189, 2002;
- VAUTERIN, L. *et al.* Identification of non-pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. *System. Appl. Microbiol.*, v. 19, p. 96-105, 1996a;
- VAUTERIN, L. *et al.* Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 45, p. 472–489, 1995;
- VAUTERIN, L. *et al.* Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46, p. 298–304, 1996;
- VICENTE, J. G.; Holub, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*, v.14, n. 1, p. 2–18, 2013;
- VICENTE, J. G. *et al.* Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race and related pathovars. *Phytopathology*, v. 91, p. 492–499, 2001;
- VICENTE, J. G. *et al.* Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology*, v. 96, p. 735–745, 2006;
- VILELA, M. R. Informe agropecuário: Brassicas, hortaliças de alto valor alimentício. Belo Horizonte, v.9, n. 98, p. 58-63, 1983;
- VILLETH, G. R. *et al.* Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 298, p. 260–266, 2009;
- VORHÖELTER, F. J. *et al.* The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B 100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J. Biotechnol.*, v. 134, p. 33–45, 2008;
- WANG, L. *et al.* *XerR*, a negative regulator of *XccR* in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, relieves its repressor function in planta. *Cell Research*, v. 21, n. 7, p. 1131-42, 2011;
- WARWICK, S. I. *et al.* Guide to the Wild Germplasm of Brassica and Allied Crops (tribe *Brassicaceae*) 3rd ed. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Ontario: Eastern Cereal and Oilseeds Research Centre, 2009. Disponível em: <[http://www.brassica.info/info/publications/guidewild/Guide\\_ed.3\\_Introd\\_16July2009.pdf](http://www.brassica.info/info/publications/guidewild/Guide_ed.3_Introd_16July2009.pdf)>. Acesso em: fevereiro de 2016;
- WENGELNIK, K. Expression and localization of *HarpA1*, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 1061–1069, 1996a;

WESTERMEIER, R.; SCHICKLE, H. The current state of the art in high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Archives of physiology and biochemistry*, v. 115, n. 5, p. 279-285, 2009;

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing. *Plant Disease*, v. 64, n. 8, p. 736-742, 1980;

YANG, B. *et al.* The virulence factor *AvrXa7* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double stranded DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 17, p. 9807–9812, 2000;

ZHU, M. *et al.* Analysis of Abscisic Acid Responsive Proteins in *Brassica Napus* Guard Cells by Multiplexed Isobaric Tagging. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 4, p. 790-805, 2010;

ZHU, W. *et al.* *AvrXa10* contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.11, n. 8, p. 824–832, 1998;

ZHU, W. *et al.* Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2009, p. 10-22, 2010;

ZIMARO, T. *et al.* Unraveling Plant Responses to Bacterial Pathogens through Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p. 01-12, 2011.

## APÊNDICE – TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela 1 - **Proteínas totais** expressas por ambos os isolados bacterianos **Xcc51 e XccY21**, identificadas na condição de cultivo em meio nutricionalmente rico - **NYG** (condição controle).

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2963	<i>groES</i>	10kDa chaperonin	88573,33
SAMP_2631	<i>dapD</i>	2 3 4 5 tetrahydropyridine 2 carboxylate N succin	333,6
SAMP_3141	<i>kduD</i>	2 deoxy D gluconate 3 dehydrogenase	208,23
SAMP_3158	<i>leuB</i>	3 isopropylmalate dehydrogenase	491,07
SAMP_2741	<i>fadA</i>	3 ketoacyl CoA thiolase	402,74
SAMP_2736	<i>fabG</i>	3 oxoacyl ACP reductase	4898,04
SAMP_2734	<i>fabF</i>	3 oxoacyl ACP synthase II	2755,87
SAMP_2737	<i>fabH</i>	3 oxoacyl ACP synthase III	173,36
SAMP_3761	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	24345,36
SAMP_3770	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	2931,53
SAMP_512	<i>XCC0917</i>	30S ribosomal protein S11	4563,97
SAMP_3772	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	7845,27
SAMP_3775	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	20156,94
SAMP_3776	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	8860,19
SAMP_3777	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	14552,82
SAMP_3762	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	13250,29
SAMP_3779	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	3865,41
SAMP_3780	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	9219,66
SAMP_3763	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	10624,92
SAMP_3764	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein s4	20527,41

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3765	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	6895,98
SAMP_3766	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	8021,56
SAMP_3767	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	26191,48
SAMP_3768	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	20989,15
SAMP_3769	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	4784,17
SAMP_295	XCC0436	4 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	462,57
SAMP_3719	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	24043,71
SAMP_3727	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	9137,85
SAMP_319	XCC0476	50S ribosomal protein L13	11223,37
SAMP_3729	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	12701,87
SAMP_3730	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	8711,49
SAMP_3731	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	20754,03
SAMP_3732	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	11388,64
SAMP_3733	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	1210,62
SAMP_3734	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	14350,04
SAMP_3735	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	4171,5
SAMP_3736	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	10930,63
SAMP_3737	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	9768,7
SAMP_3738	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	10406,01
SAMP_3739	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	1104,07
SAMP_3740	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25	19981,32
SAMP_3741	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	8202,04
SAMP_3744	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	10070,42
SAMP_3745	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	5200,96
SAMP_3746	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	21303,57
SAMP_3722	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	15568,66
SAMP_3723	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	34310,8



ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3724	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	15037,87
SAMP_3728	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7 L12	6572,93
SAMP_3725	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	6201,82
SAMP_2962	<i>groEL</i>	60kDa chaperonin	40457,99
SAMP_2280	<i>XCC4240</i>	60kDa inner membrane protein	430,55
SAMP_4151	<i>yjJK</i>	ABC transporter ATP binding protein	1837
SAMP_2391	<i>atoB</i>	acetoacetyl CoA thiolase	1387,47
SAMP_2287	<i>accA</i>	acetyl coenzyme A carboxylase carboxyl transferase	3027,63
SAMP_3707	<i>rpfA</i>	aconitase	323,05
SAMP_2298	<i>acnB</i>	aconitate hydratase 2	1493,84
SAMP_2302	<i>acpP</i>	acyl carrier protein	24559,35
SAMP_2293	<i>acdA</i>	acyl CoA dehydrogenase	484,53
SAMP_4121	<i>yfcB</i>	adenine specific methylase	407,57
SAMP_3794	<i>sahH</i>	adenosylhomocysteinase	525,42
SAMP_2319	<i>adk</i>	adenylate kinase	3705,09
SAMP_3612	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	1537,5
SAMP_607	<i>XCC1105</i>	alanyl dipeptidyl peptidase	697,5
SAMP_1770	<i>XCC3389</i>	alcohol dehydrogenase C	994,03
SAMP_3460	<i>pepN</i>	aminopeptidase	2365,74
SAMP_1831	<i>XCC3517</i>	aminopeptidase	477,17
SAMP_3458	<i>pepA</i>	aminopeptidase A I	1472,44
SAMP_4028	<i>wxcK</i>	aminotransferase	723,35
SAMP_2370	<i>argI</i>	arginase	525,09
SAMP_2371	<i>argS</i>	arginyl tRNA synthetase	717,12
SAMP_3965	<i>tyrB</i>	aromatic amino acid aminotransferase	324,73
SAMP_3626	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	488,09
SAMP_2381	<i>asd</i>	aspartate semialdehyde dehydrogenase	2614,71

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2389	<i>aspS</i>	<i>aspartyl tRNA synthetase</i>	353,26
SAMP_2528	<i>clpX</i>	<i>ATP dependent Clp protease ATP binding subunit</i>	9826,97
SAMP_2527	<i>clpP</i>	<i>ATP dependent Clp protease proteolytic subunit</i>	514,69
SAMP_2009	<i>XCC3776</i>	<i>ATP dependent RNA helicase</i>	567,84
SAMP_2645	<i>deaD</i>	<i>ATP dependent RNA helicase</i>	1235,42
SAMP_3178	<i>lon</i>	<i>ATP dependent serine proteinase La</i>	533,91
SAMP_2392	<i>atpA</i>	<i>ATP synthase alpha chain</i>	6380,43
SAMP_2395	<i>atpD</i>	<i>ATP synthase beta chain</i>	10022,86
SAMP_2399	<i>atpH</i>	<i>ATP synthase delta chain</i>	326,7
SAMP_2429	<i>bfr</i>	<i>bacterioferritin</i>	1155,95
SAMP_2739	<i>fabH</i>	<i>beta ketoacyl ACP synthase III</i>	492,19
SAMP_3189	<i>lysA</i>	<i>bifunctional diaminopimelate decarboxylase aspartate kinase</i>	190,95
SAMP_3618	<i>purH</i>	<i>bifunctional purine biosynthesis protein</i>	337,73
SAMP_3624	<i>putA</i>	<i>bifunctional PutA protein</i>	1222,54
SAMP_2716	<i>exbB</i>	<i>biopolymer transport ExbB protein</i>	349,76
SAMP_2288	<i>accC</i>	<i>biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase</i>	768,04
SAMP_2524	<i>clp</i>	<i>CAP like protein</i>	997,47
SAMP_2469	<i>carB</i>	<i>carbamoyl phosphate synthase large chain</i>	494,62
SAMP_4179	<i>zipA</i>	<i>cell division protein</i>	244,37
SAMP_2702	<i>engXCA</i>	<i>cellulase</i>	471,73
SAMP_3425	<i>parB</i>	<i>chromosome partitioning protein</i>	357,85
SAMP_2942	<i>gltA</i>	<i>citrate synthase</i>	7939,04
SAMP_3592	<i>prpC</i>	<i>citrate synthase 2</i>	1283,67
SAMP_2551	<i>comL</i>	<i>competence lipoprotein</i>	585,03
SAMP_764	<i>XCC1428</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	799,05
SAMP_1904	<i>XCC3606</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	1422,67
SAMP_2197	<i>XCC4098</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	1493,91

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_622	XCC1129	<i>conserved hypothetical protein</i>	9685,81
SAMP_156	XCC0205	<i>conserved hypothetical protein</i>	27729,72
SAMP_102	XCC0115	<i>conserved hypothetical protein</i>	690,7
SAMP_426	XCC0711	<i>conserved hypothetical protein</i>	326,07
SAMP_2117	XCC3959	<i>conserved hypothetical protein</i>	411,13
SAMP_637	XCC1163	<i>conserved hypothetical protein</i>	850,67
SAMP_1997	XCC3750	<i>conserved hypothetical protein</i>	826,11
SAMP_1962	XCC3702	<i>conserved hypothetical protein</i>	124,0300
SAMP_1763	XCC3382	<i>conserved hypothetical protein</i>	256,1
SAMP_511	XCC0869	<i>conserved hypothetical protein</i>	120,85
SAMP_26	XCC0007	<i>conserved hypothetical protein</i>	389,45
SAMP_949	XCC1742	<i>conserved hypothetical protein</i>	1269,26
SAMP_764	XCC1428	<i>conserved hypothetical protein</i>	799,05
SAMP_1561	XCC3027	<i>conserved hypothetical protein</i>	379,83
SAMP_1230	XCC2390	<i>conserved hypothetical protein</i>	1673,78
SAMP_727	XCC1345	<i>conserved hypothetical protein</i>	266,58
SAMP_3631	<i>pyrG</i>	<i>CTP synthetase</i>	464,15
SAMP_2475	<i>cbpA</i>	<i>curved DNA binding protein</i>	369,99
SAMP_2604	<i>cysB</i>	<i>cystathionine beta synthase</i>	347,98
SAMP_2637	<i>dcd</i>	<i>deoxycytidine triphosphate deaminase</i>	397,42
SAMP_3490	<i>phdB</i>	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase</i>	1566,84
SAMP_3448	<i>pdhB</i>	<i>dihydrolipoamide acyltransferase</i>	1680,24
SAMP_3179	<i>lpdA</i>	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	2204,05
SAMP_3853	<i>sucB</i>	<i>dihydrolipoamide S succinyltransferase</i>	2616,76
SAMP_182	XCC0243	<i>dipeptidyl aminopeptidase</i>	433,45
SAMP_395	XCC0637	<i>DNA binding protein</i>	1508,99
SAMP_3000	<i>gyrB</i>	<i>DNA gyrase subunit B</i>	445,63

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2668	<i>dnaN</i>	<i>DNA polymerase III beta chain</i>	870,9
SAMP_2667	<i>dnaK</i>	<i>DnaK protein</i>	10280,11
SAMP_2710	<i>etfA</i>	<i>electron transfer flavoprotein alpha subunit</i>	1727,35
SAMP_2861	<i>fusA</i>	<i>elongation factor G</i>	17949,62
SAMP_4120	<i>yeiP</i>	<i>elongation factor P</i>	2676,27
SAMP_3944	<i>tsf</i>	<i>elongation factor Ts</i>	8773,71
SAMP_3961	<i>tufA</i>	<i>elongation factor Tu</i>	97762,23
SAMP_2703	<i>eno</i>	<i>enolase</i>	6319,86
SAMP_2657	<i>dhs1</i>	<i>family II 2 keto 3 deoxy D arabino heptulosonate 7 phosphate synthase</i>	504,88
SAMP_2426	<i>bfeA</i>	<i>ferric enterobactin receptor</i>	431,87
SAMP_2783	<i>fkpA</i>	<i>FKBP type peptidyl prolyl cis trans isomerase</i>	692,19
SAMP_1650	<i>XCC3185</i>	<i>fructose bisphosphate aldolase</i>	8080,5
SAMP_2858	<i>fumB</i>	<i>fumarate hydratase</i>	860,11
SAMP_3981	<i>uptA</i>	<i>fumarylacetoacetate hydrolase</i>	703,79
SAMP_384	<i>XCC0606</i>	<i>GDP mannose 4 6 dehydratase</i>	1042,37
SAMP_4057	<i>xpsJ</i>	<i>general secretion pathway protein J</i>	306,3100
SAMP_2485	<i>ceID</i>	<i>glucan 1 4 beta glucosidase</i>	445,66
SAMP_4181	<i>zwf</i>	<i>glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase</i>	459,15
SAMP_3471	<i>pgi</i>	<i>glucose 6 phosphate isomerase</i>	347,43
SAMP_2927	<i>glnA</i>	<i>glutamine synthetase</i>	940,74
SAMP_2967	<i>gshB</i>	<i>glutathione synthetase</i>	214,42
SAMP_2891	<i>gapA</i>	<i>glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>	5355,37
SAMP_2904	<i>gcvT</i>	<i>glycine cleavage T protein</i>	694,97
SAMP_2902	<i>gcvP</i>	<i>glycine decarboxylase</i>	419,89
SAMP_2952	<i>glyS</i>	<i>glycyl tRNA synthetase beta chain</i>	1284,17
SAMP_3963	<i>typA</i>	<i>GTP binding elongation factor protein</i>	2440,76
SAMP_3154	<i>lepA</i>	<i>GTP binding protein</i>	344,88

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2994	<i>gumK</i>	<i>gumK protein</i>	551,39
SAMP_3077	<i>htpG</i>	<i>heat shock protein G</i>	1254,45
SAMP_3083	<i>hupB</i>	<i>histone like protein</i>	8913,3
SAMP_3033	<i>hmgA</i>	<i>homogentisate 1 2 dioxygenase</i>	1002,77
SAMP_3042	<i>hpt</i>	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase</i>	2399,13
SAMP_3104	<i>infC</i>	<i>initiation factor IF 3</i>	1159,1
SAMP_3563	<i>ppa</i>	<i>inorganic pyrophosphatase</i>	1669,92
SAMP_3016	<i>hfIC</i>	<i>integral membrane proteinase subunit</i>	859,23
SAMP_3089	<i>icd</i>	<i>isocitrate dehydrogenase</i>	3207,57
SAMP_3095	<i>ileS</i>	<i>isoleucyl tRNA synthetase</i>	453,87
SAMP_835	<i>XCC1553</i>	<i>kynureninase</i>	387,06
SAMP_3442	<i>pcm</i>	<i>L isoaspartate protein carboxylmethyltransferase</i>	1221,16
SAMP_2707	<i>estA</i>	<i>lipase esterase</i>	1030,79
SAMP_3993	<i>vacJ</i>	<i>lipoprotein</i>	676,02
SAMP_2566	<i>cspA</i>	<i>major cold shock protein</i>	9592,98
SAMP_3213	<i>mdh</i>	<i>malate dehydrogenase</i>	5201,42
SAMP_2732	<i>fabD</i>	<i>malonyl CoA ACP transacylase</i>	493,3
SAMP_307	<i>XCC0456</i>	<i>membrane protein</i>	237,19
SAMP_3229	<i>metK</i>	<i>methionine adenosyltransferase</i>	1180,8
SAMP_3232	<i>metS</i>	<i>methionyl tRNA synthetase</i>	218,44
SAMP_3249	<i>mmsA</i>	<i>methylmalonate semialdehyde dehydrogenase</i>	433,27
SAMP_2304	<i>acrA</i>	<i>multidrug resistance protein</i>	2970,15
SAMP_3374	<i>nusA</i>	<i>N utilization substance protein A</i>	1099,78
SAMP_3365	<i>nuoF</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO1 subunit</i>	869,28
SAMP_3371	<i>nuoL</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit</i>	226,24
SAMP_3366	<i>nuoG</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO3 subunit</i>	1796,6
SAMP_3363	<i>nuoD</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO4 subunit</i>	3883,43

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3362	<i>nuoC</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO5 subunit</i>	2264,35
SAMP_3194	<i>maeB</i>	<i>NADP dependent malic enzyme</i>	415,85
SAMP_3330	<i>ndk</i>	<i>nucleoside diphosphate kinase</i>	1505,03
SAMP_3378	<i>oar</i>	<i>Oar protein</i>	2741,85
SAMP_2215	<i>XCC4132</i>	<i>OmpA related protein</i>	306,55
SAMP_3383	<i>ohr</i>	<i>organic hydroperoxide resistance protein</i>	934,33
SAMP_3269	<i>mopB</i>	<i>outer membrane protein</i>	59259,98
SAMP_3389	<i>ompW</i>	<i>outer membrane protein</i>	11516,68
SAMP_3388	<i>ompP6</i>	<i>outer membrane protein P6 precursor</i>	5412,42
SAMP_3820	<i>slp</i>	<i>outer membrane protein Slp</i>	1132,51
SAMP_2459	<i>btuB</i>	<i>outer membrane receptor for transport of vitamin B</i>	430,5
SAMP_3381	<i>odhA</i>	<i>oxoglutarate dehydrogenase</i>	2318,21
SAMP_3444	<i>pcp</i>	<i>peptidoglycan associated outer membrane lipoprotein</i>	2198,25
SAMP_2639	<i>dcp</i>	<i>peptidyl dipeptidase</i>	1541,12
SAMP_3824	<i>slyD</i>	<i>peptidyl prolyl cis trans isomerase</i>	9581,6
SAMP_3297	<i>mucD</i>	<i>periplasmic protease</i>	1342,26
SAMP_3494	<i>pheS</i>	<i>phenylalanyl tRNA synthetase alpha chain</i>	139,14
SAMP_3569	<i>ppsA</i>	<i>phosphoenolpyruvate synthase</i>	1767,54
SAMP_4035	<i>xanA</i>	<i>phosphoglucomutase</i>	2812,73
SAMP_3475	<i>pgmA</i>	<i>phosphoglycerate mutase</i>	1358,18
SAMP_4036	<i>xanB</i>	<i>phosphomannose isomerase GDP mannose pyrophosphorylase</i>	6900,23
SAMP_3614	<i>purC</i>	<i>phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamidesynthase</i>	850,98
SAMP_3622	<i>purT</i>	<i>phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2</i>	702,14
SAMP_3489	<i>phbC</i>	<i>poly 3 hydroxybutyric acid synthase</i>	158,9
SAMP_3550	<i>pnp</i>	<i>polynucleotide phosphorylase</i>	9575,3
SAMP_3538	<i>pip</i>	<i>proline iminopeptidase chain A</i>	212,92
SAMP_3079	<i>htrA</i>	<i>protease Do</i>	238,82

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3809	<i>secD</i>	<i>protein export membrane protein</i>	219,15
SAMP_2295	<i>aceE</i>	<i>pyruvate dehydrogenase</i>	2856,63
SAMP_3447	<i>pdhA</i>	<i>pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit</i>	587,95
SAMP_3449	<i>pdhB</i>	<i>pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit</i>	1941,26
SAMP_3625	<i>pykA</i>	<i>pyruvate kinase type II</i>	1347,99
SAMP_3648	<i>recA</i>	<i>RecA protein</i>	1310,8
SAMP_128	<i>XCC0154</i>	<i>rhamnogalacturonan acetyltransferase</i>	329,84
SAMP_3347	<i>nrdA</i>	<i>ribonucleoside diphosphate reductase alpha chain</i>	287,73
SAMP_3348	<i>nrdB</i>	<i>ribonucleoside diphosphate reductase beta chain</i>	635,5
SAMP_2839	<i>frr</i>	<i>ribosome recycling factor</i>	2339,9
SAMP_3751	<i>rpoA</i>	<i>RNA polymerase alpha subunit</i>	11307,51
SAMP_3752	<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase beta subunit</i>	6630,97
SAMP_3754	<i>rpoD</i>	<i>RNA polymerase sigma 70 factor</i>	2863,86
SAMP_3285	<i>mreB</i>	<i>rod shape determining protein</i>	1972,34
SAMP_3839	<i>speD</i>	<i>S adenosyl methionine decarboxylase proenzyme</i>	689,42
SAMP_3245	<i>minD</i>	<i>septum site determining protein</i>	3682,09
SAMP_3817	<i>serS</i>	<i>seryl tRNA synthetase</i>	1101,59
SAMP_3155	<i>lepB</i>	<i>signal peptidase I</i>	229,37
SAMP_3840	<i>speE</i>	<i>spermidine synthase</i>	664,25
SAMP_3803	<i>sdhA</i>	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</i>	1263,78
SAMP_3804	<i>sdhB</i>	<i>succinate dehydrogenase iron sulfur protein</i>	1312,62
SAMP_3855	<i>sucD</i>	<i>succinyl CoA synthetase alpha subunit</i>	9352,42
SAMP_3854	<i>sucC</i>	<i>succinyl CoA synthetase beta subunit</i>	8123,07
SAMP_1806	<i>XCC3471</i>	<i>sugar kinase</i>	250,06
SAMP_3575	<i>prc</i>	<i>tail specific protease</i>	255,12
SAMP_3895	<i>thrS</i>	<i>threonyl tRNA synthetase</i>	775,79
SAMP_3901	<i>tldD</i>	<i>TldD protein</i>	353,64

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3907	<i>tolB</i>	<i>TolB protein</i>	653,63
SAMP_3908	<i>tolC</i>	<i>TolC protein</i>	3053,7
SAMP_3909	<i>tolQ</i>	<i>TolQ protein</i>	713,2
SAMP_2457	<i>btuB</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	44972,7
SAMP_2122	<i>XCC3967</i>	<i>TonB like protein</i>	331,43
SAMP_3911	<i>tonB</i>	<i>TonB protein</i>	1601,25
SAMP_3427	<i>parE</i>	<i>topoisomerase IV subunit B</i>	152,71
SAMP_3864	<i>talB</i>	<i>transaldolase B</i>	1904,44
SAMP_3376	<i>nusG</i>	<i>transcription antitermination factor</i>	4733,85
SAMP_3885	<i>tex</i>	<i>transcription related protein</i>	431,45
SAMP_3672	<i>rho</i>	<i>transcription termination factor Rho</i>	2461,51
SAMP_3898	<i>tktA</i>	<i>transketolase 1</i>	640,71
SAMP_4150	<i>yjgF</i>	<i>translation initiation inhibitor</i>	277,9600
SAMP_3916	<i>tpiA</i>	<i>triosephosphate isomerase</i>	301,28
SAMP_3500	<i>phoP</i>	<i>two component system regulatory protein</i>	6388,43
SAMP_3972	<i>ugd</i>	<i>UDP glucose dehydrogenase</i>	834,27
SAMP_3298	<i>murA</i>	<i>UDP N acetylglucosamine 1 carboxyvinyltransferase</i>	469,96
SAMP_2890	<i>galU</i>	<i>UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase</i>	1693,78
SAMP_4062	<i>xrvA</i>	<i>virulence regulator</i>	3025,78
SAMP_2932	<i>prpC</i>	<i>X glutaminyl tRNA synthetase</i>	231,04
SAMP_2984	<i>mopB</i>	<i>X inosine 5 monophosphate dehydrogenase</i>	316,23
SAMP_1225	<i>XCC1163</i>	<i>x L lysine 6 aminotransferase</i>	680,59



Tabela 2 - **Proteínas totais** expressas por ambos os isolados bacterianos **Xcc51 e XccY21**, identificadas na condição de cultivo em meio mínimo – **XVM1** (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2963	<i>groES</i>	10 kDa chaperonin	120826,4
SAMP_2631	<i>dapD</i>	2 3 4 5 tetrahydropyridine 2 carboxylate N succin	157,95
SAMP_2181	<i>XCC4068</i>	2 hydroxyhepta 2 4 diene 1 7 dioateisomerase 5 carboxymethyl 2 oxo hex 3 ene 1 7	1726,44
SAMP_3157	<i>leuA</i>	2 isopropylmalate synthase	389,17
SAMP_2744	<i>fadB</i>	3 hydroxyacyl CoA dehydrogenase	181,22
SAMP_3159	<i>leuC</i>	3 isopropylmalate dehydratase large subunit	620,62
SAMP_2741	<i>fadA</i>	3 ketoacyl CoA thiolase	706,02
SAMP_2736	<i>fabG</i>	3 oxoacyl ACP reductase	4119,1
SAMP_2734	<i>fabF</i>	3 oxoacyl ACP synthase II	3731,07
SAMP_3114	<i>ipsI</i>	3 oxoadipate CoA succinyl transferase alpha subunit	345,21
SAMP_3761	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	13346,8
SAMP_512	<i>XCC0917</i>	30S ribosomal protein S11	3226,88
SAMP_3771	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	4927,87
SAMP_3772	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	2251,23
SAMP_3775	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	17411,5
SAMP_3776	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	4197,15
SAMP_3777	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	8986,16
SAMP_3778	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	3478,77
SAMP_3762	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	4129,5
SAMP_3779	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	12157,59
SAMP_3780	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21	4336,93
SAMP_3763	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	6446,22
SAMP_3764	<i>rpsD</i>	30S RIBOSOMAL PROTEIN S4	10150,47
SAMP_3765	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	2942,21

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3767	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	7270,2
SAMP_3768	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	26314,54
SAMP_3769	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	2274,79
SAMP_3224	<i>metE</i>	5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	252,6
SAMP_3719	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	7956,37
SAMP_3727	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	3918,21
SAMP_319	XCC0476	50S ribosomal protein L13	2551,87
SAMP_3729	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	4726,57
SAMP_3730	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	2924,6
SAMP_3731	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	6651,53
SAMP_3732	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	8557,8
SAMP_3733	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	490,96
SAMP_3734	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	12822,55
SAMP_3720	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	1972,97
SAMP_3736	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	3519,22
SAMP_3737	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	1482,05
SAMP_3738	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	6273,29
SAMP_3740	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25	2617,1
SAMP_3741	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	3991,09
SAMP_3721	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	5885,4
SAMP_3745	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	2884,47
SAMP_3746	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	10738,98
SAMP_3722	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	8892,09
SAMP_3723	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	9572,53
SAMP_3724	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	4170,12
SAMP_3728	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7 L12	833,96
SAMP_3725	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	1815,04

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2954	<i>gndA</i>	<i>6 phosphogluconate dehydrogenase</i>	339,55
SAMP_2962	<i>groEL</i>	<i>60kDa chaperonin</i>	83409,04
SAMP_2311	<i>acs</i>	<i>643 acetyl coenzyme A synthetase</i>	1126,48
SAMP_4151	<i>yjjK</i>	<i>ABC transporter ATP binding protein</i>	1572,74
SAMP_2391	<i>atoB</i>	<i>acetoacetyl CoA thiolase</i>	1389,8
SAMP_2287	<i>accA</i>	<i>acetyl coenzyme A carboxylase carboxyl transferase</i>	1024,6
SAMP_1423	<i>XCC2770</i>	<i>acetyltransferase</i>	608,12
SAMP_3707	<i>rpfA</i>	<i>aconitase</i>	876,46
SAMP_2298	<i>acnB</i>	<i>aconitate hydratase 2</i>	1383,25
SAMP_2302	<i>acpP</i>	<i>acyl carrier protein</i>	24155,52
SAMP_4122	<i>yfcY</i>	<i>acyl CoA thiolase</i>	314,08
SAMP_4121	<i>yfcB</i>	<i>adenine specific methylase</i>	238,47
SAMP_3794	<i>sahH</i>	<i>adenosylhomocysteinase</i>	717,74
SAMP_2319	<i>adk</i>	<i>adenylate kinase</i>	6904,41
SAMP_3612	<i>purA</i>	<i>adenylosuccinate synthetase</i>	3331,07
SAMP_607	<i>XCC1105</i>	<i>alanyl dipeptidyl peptidase</i>	631,73
SAMP_1770	<i>XCC3389</i>	<i>alcohol dehydrogenase C</i>	1215,17
SAMP_3460	<i>pepN</i>	<i>aminopeptidase</i>	645,65
SAMP_3458	<i>pepA</i>	<i>aminopeptidase A I</i>	1558,72
SAMP_4028	<i>wxcK</i>	<i>aminotransferase</i>	880,16
SAMP_2371	<i>argS</i>	<i>arginyl tRNA synthetase</i>	1556,47
SAMP_3965	<i>tyrB</i>	<i>aromatic amino acid aminotransferase</i>	630,34
SAMP_2383	<i>asnS</i>	<i>asparaginyl tRNA synthetase</i>	390,53
SAMP_2381	<i>asd</i>	<i>aspartate semialdehyde dehydrogenase</i>	2031,8
SAMP_2389	<i>aspS</i>	<i>aspartyl tRNA synthetase</i>	210,49
SAMP_2528	<i>clpX</i>	<i>ATP dependent Clp protease ATP binding subunit</i>	1254,75
SAMP_2526	<i>clpB</i>	<i>ATP dependent Clp protease subunit</i>	899,94

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3073	<i>hslU</i>	<i>ATP dependent HslUV protease ATP binding subunit HslU</i>	1037,35
SAMP_2645	<i>deaD</i>	<i>ATP dependent RNA helicase</i>	606,91
SAMP_3178	<i>lon</i>	<i>ATP dependent serine proteinase La</i>	347,77
SAMP_2392	<i>atpA</i>	<i>ATP synthase alpha chain</i>	3632,59
SAMP_2395	<i>atpD</i>	<i>ATP synthase beta chain</i>	6909,44
SAMP_2398	<i>atpG</i>	<i>ATP synthase gamma chain</i>	467,06
SAMP_563	<i>XCC1045</i>	<i>bacterioferritin</i>	2518,25
SAMP_2429	<i>bfr</i>	<i>bacterioferritin</i>	3139,68
SAMP_2739	<i>fabH</i>	<i>beta ketoacyl ACP synthase III</i>	371,88
SAMP_3230	<i>metL</i>	<i>bifunctional aspartokinase homoserine dehydrogenase I</i>	558,71
SAMP_3618	<i>purH</i>	<i>bifunctional purine biosynthesis protein</i>	713,03
SAMP_3624	<i>putA</i>	<i>bifunctional PutA protein</i>	398,47
SAMP_2288	<i>accC</i>	<i>biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase</i>	247,96
SAMP_3099	<i>ilvE</i>	<i>branched chain amino acid aminotransferase</i>	611,77
SAMP_2524	<i>clp</i>	<i>CAP like protein</i>	1043,59
SAMP_2469	<i>carB</i>	<i>carbamoil phosphate synthase large chain</i>	377,85
SAMP_2468	<i>carA</i>	<i>carbamoil phosphate synthase small chain</i>	174,03
SAMP_3126	<i>katE</i>	<i>catalase</i>	300,57
SAMP_2854	<i>ftsZ</i>	<i>cell division protein</i>	237,86
SAMP_2702	<i>engXCA</i>	<i>cellulase</i>	2016,32
SAMP_2942	<i>gltA</i>	<i>citrate synthase</i>	6793,67
SAMP_3592	<i>prpC</i>	<i>citrate synthase 2</i>	233,13
SAMP_710	<i>XCC1318</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	35622,3
SAMP_764	<i>XCC1428</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	24270,38
SAMP_1220	<i>XCC2365</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	326,95
SAMP_1789	<i>XCC3441</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	45292,11
SAMP_1155	<i>XCC2215</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	652,45

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_365	XCC0546	<i>conserved hypothetical protein</i>	5571,18
SAMP_2197	XCC4098	<i>conserved hypothetical protein</i>	823,14
SAMP_622	XCC1129	<i>conserved hypothetical protein</i>	5420,11
SAMP_1949	XCC3683	<i>conserved hypothetical protein</i>	3334,61
SAMP_927	XCC1690	<i>conserved hypothetical protein</i>	803,22
SAMP_102	XCC0115	<i>conserved hypothetical protein</i>	243,07
SAMP_1948	XCC3682	<i>conserved hypothetical protein</i>	15167,39
SAMP_2077	XCC3899	<i>conserved hypothetical protein</i>	3375,17
SAMP_2066	XCC3884	<i>conserved hypothetical protein</i>	778,51
SAMP_208	XCC0274	<i>conserved hypothetical protein</i>	11558,25
SAMP_2011	XCC3783	<i>conserved hypothetical protein</i>	1606,45
SAMP_2194	XCC4094	<i>conserved hypothetical protein</i>	1539,95
SAMP_2116	XCC3958	<i>conserved hypothetical protein</i>	873,51
SAMP_156	XCC0205	<i>conserved hypothetical protein</i>	35809,3
SAMP_949	XCC1742	<i>conserved hypothetical protein</i>	1298,05
SAMP_946	XCC1737	<i>conserved hypothetical protein</i>	347,99
SAMP_35	XCC0025	<i>conserved hypothetical protein</i>	11174,28
SAMP_417	XCC0689	<i>conserved hypothetical protein</i>	701,56
SAMP_2475	<i>cbpA</i>	<i>curved DNA binding protein</i>	2597,37
SAMP_2604	<i>cysB</i>	<i>cystathionine beta synthase</i>	190,47
SAMP_2612	<i>cysK</i>	<i>cysteine synthase</i>	1549,47
SAMP_2615	<i>cysS</i>	<i>cysteinyl tRNA synthetase</i>	1100,38
SAMP_2597	<i>cyoA</i>	<i>cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II</i>	288,63
SAMP_3490	<i>phdB</i>	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase</i>	1287,73
SAMP_3448	<i>pdhB</i>	<i>dihydrolipoamide acyltransferase</i>	200,62
SAMP_3179	<i>lpdA</i>	<i>dihydrolipoamide dehydrogenase</i>	1857,43
SAMP_3853	<i>sucB</i>	<i>dihydrolipoamide S succinyltransferase</i>	2519,32

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3627	<i>pyrC</i>	<i>dihydroorotase</i>	563,2
SAMP_2668	<i>dnaN</i>	<i>DNA polymerase III beta chain</i>	1177,6
SAMP_2667	<i>dnaK</i>	<i>DnaK protein</i>	7924,79
SAMP_2710	<i>etfA</i>	<i>electron transfer flavoprotein alpha subunit</i>	1108,43
SAMP_2711	<i>etfB</i>	<i>electron transfer flavoprotein beta subunit</i>	2720,09
SAMP_2861	<i>fusA</i>	<i>elongation factor G</i>	17543,51
SAMP_2695	<i>efP</i>	<i>elongation factor P</i>	2874,71
SAMP_3944	<i>tsf</i>	<i>elongation factor Ts</i>	7530,37
SAMP_3962	<i>tufB</i>	<i>elongation factor Tu</i>	86761,72
SAMP_2703	<i>eno</i>	<i>enolase</i>	6751,05
SAMP_983	<i>XCC1818</i>	<i>enolase phosphatase</i>	262,93
SAMP_4068	<i>xthA1</i>	<i>exodeoxyribonuclease III</i>	403,55
SAMP_2657	<i>dhs1</i>	<i>family II 2 keto 3 deoxy D arabino heptulosonate 7 phosphate synthase</i>	1765,3
SAMP_2425	<i>bfeA</i>	<i>ferric enterobactin receptor</i>	2185,85
SAMP_3431	<i>pbuA</i>	<i>ferric pseudobactin M114 receptor protein</i>	117,68
SAMP_2858	<i>fumB</i>	<i>fumarate hydratase</i>	921,21
SAMP_3981	<i>uptA</i>	<i>fumarylacetoacetate hydrolase</i>	692,27
SAMP_384	<i>XCC0606</i>	<i>GDP mannose 4 6 dehydratase</i>	871,88
SAMP_2485	<i>celD</i>	<i>glucan 1 4 beta glucosidase</i>	296,16
SAMP_3690	<i>rmlA</i>	<i>glucose 1 phosphate thymidyltransferase</i>	205,18
SAMP_4181	<i>zwf</i>	<i>glucose 6 phosphate 1 dehydrogenase</i>	154,36
SAMP_3471	<i>pgi</i>	<i>glucose 6 phosphate isomerase</i>	747,28
SAMP_2927	<i>glnA</i>	<i>glutamine synthetase</i>	530,28
SAMP_2931	<i>glnE</i>	<i>glutamine synthetase adenyltransferase</i>	140,55
SAMP_2891	<i>gapA</i>	<i>glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>	6159,47
SAMP_2936	<i>glpD</i>	<i>glycerol 3 phosphate dehydrogenase</i>	810,21
SAMP_2938	<i>glpK</i>	<i>glycerol kinase</i>	489,36

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2904	<i>gcvT</i>	<i>glycine cleavage T protein</i>	380,2
SAMP_2902	<i>gcvP</i>	<i>glycine decarboxylase</i>	356,92
SAMP_2952	<i>glyS</i>	<i>glycyl tRNA synthetase beta chain</i>	505,58
SAMP_3963	<i>typA</i>	<i>GTP binding elongation factor protein</i>	796,47
SAMP_3154	<i>lepA</i>	<i>GTP binding protein</i>	271,85
SAMP_3676	<i>ribA</i>	<i>GTP cyclohydrolase II 3 4 dihydroxy 2 butanone 4 phosphate synthase</i>	174,33
SAMP_2986	<i>gumC</i>	<i>GumC protein</i>	648,74
SAMP_3077	<i>htpG</i>	<i>heat shock protein G</i>	2929,81
SAMP_1487	<i>XCC2875</i>	<i>histone H1</i>	3065,09
SAMP_3082	<i>hup</i>	<i>histone like protein</i>	16886,11
SAMP_3083	<i>hupB</i>	<i>histone like protein</i>	2658,29
SAMP_3033	<i>hmgA</i>	<i>homogentisate 1 2 dioxygenase</i>	112,88
SAMP_138	<i>XCC0169</i>	<i>hypothetical protein</i>	1661,35
SAMP_1100	<i>XCC2096</i>	<i>hypothetical protein</i>	146,7
SAMP_3042	<i>hpt</i>	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase</i>	973,37
SAMP_3104	<i>infC</i>	<i>initiation factor IF 3</i>	1539,14
SAMP_3563	<i>ppa</i>	<i>inorganic pyrophosphatase</i>	1333,46
SAMP_2984	<i>guaB</i>	<i>inosine 5 monophosphate dehydrogenase</i>	725,8
SAMP_3017	<i>hflK</i>	<i>integral membrane protease subunit</i>	239,99
SAMP_3089	<i>icd</i>	<i>isocitrate dehydrogenase</i>	4574,04
SAMP_3095	<i>ileS</i>	<i>isoleucyl tRNA synthetase</i>	465,77
SAMP_3097	<i>ilvC</i>	<i>ketol acid reductoisomerase</i>	677,78
SAMP_3442	<i>pcm</i>	<i>L isoaspartate protein carboxylmethyltransferase</i>	276,68
SAMP_1068	<i>XCC2032</i>	<i>L sorbosone dehydrogenase</i>	449,46
SAMP_2707	<i>estA</i>	<i>lipase esterase</i>	621,6
SAMP_3076	<i>hspA</i>	<i>low molecular weight heat shock protein</i>	40357,25
SAMP_3213	<i>mdh</i>	<i>malate dehydrogenase</i>	16023,15

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_1304	XCC2574	<i>metallopeptidase</i>	315,82
SAMP_3229	<i>metK</i>	<i>methionine adenosyltransferase</i>	2200,81
SAMP_3232	<i>metS</i>	<i>methionyl tRNA synthetase</i>	204,73
SAMP_2304	<i>acrA</i>	<i>multidrug resistance protein</i>	788,67
SAMP_2841	<i>fruB</i>	<i>multiphosphoryl transfer protein</i>	758,39
SAMP_3374	<i>nusA</i>	<i>N utilization substance protein A</i>	1156,13
SAMP_3365	<i>nuoF</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO1 subunit</i>	360,74
SAMP_3366	<i>nuoG</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO3 subunit</i>	1347,09
SAMP_3363	<i>nuoD</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO4 subunit</i>	1308,33
SAMP_3362	<i>nuoC</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO5 subunit</i>	1198,82
SAMP_3194	<i>maeB</i>	<i>NADP dependent malic enzyme</i>	337,63
SAMP_523	XCC0947	<i>non hemolytic phospholipase C</i>	236,37
SAMP_3345	<i>nonF</i>	<i>NonF related protein</i>	2239,12
SAMP_3378	<i>oar</i>	<i>Oar protein</i>	2256,34
SAMP_2215	XCC4132	<i>OmpA related protein</i>	343,52
SAMP_3385	<i>oma</i>	<i>outer membrane antigen</i>	809,23
SAMP_3269	<i>mopB</i>	<i>outer membrane protein</i>	80633,95
SAMP_3390	<i>ompW</i>	<i>outer membrane protein</i>	19936,97
SAMP_3387	<i>ompP1</i>	<i>outer membrane protein</i>	5009,54
SAMP_767	XCC1436	<i>outer membrane protein</i>	9655,31
SAMP_3985	<i>uptE</i>	<i>outer membrane protein</i>	537,87
SAMP_3389	<i>ompW</i>	<i>outer membrane protein</i>	27616,71
SAMP_3388	<i>ompP6</i>	<i>outer membrane protein P6 precursor</i>	10452,24
SAMP_3820	<i>slp</i>	<i>outer membrane protein Slp</i>	11142,72
SAMP_3258	<i>mocA</i>	<i>oxidoreductase</i>	4463,56
SAMP_3381	<i>odhA</i>	<i>oxoglutarate dehydrogenase</i>	2696,94
SAMP_2624	<i>dacC</i>	<i>penicillin binding protein 6</i>	193,22



(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3578	<i>prfC</i>	<i>peptide chain release factor 3</i>	232,2
SAMP_3444	<i>pcp</i>	<i>peptidoglycan associated outer membrane lipoprotein</i>	16628,1
SAMP_2638	<i>dcp</i>	<i>peptidyl dipeptidase</i>	1012,12
SAMP_3824	<i>slyD</i>	<i>peptidyl prolyl cis trans isomerase</i>	5984,47
SAMP_3297	<i>mucD</i>	<i>periplasmic protease</i>	10375,92
SAMP_3569	<i>ppsA</i>	<i>phosphoenolpyruvate synthase</i>	3880,65
SAMP_4035	<i>xanA</i>	<i>phosphoglucomutase</i>	2226,7
SAMP_3472	<i>pgk</i>	<i>phosphoglycerate kinase</i>	4188,87
SAMP_3475	<i>pgmA</i>	<i>phosphoglycerate mutase</i>	1568,16
SAMP_4036	<i>xanB</i>	<i>phosphomannose isomerase GDP mannose pyrophosphorylase</i>	14221,91
SAMP_3615	<i>purD</i>	<i>phosphoribosylamine glycine ligase</i>	601,39
SAMP_3614	<i>purC</i>	<i>phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamidesynthase</i>	684,86
SAMP_3485	<i>phaF</i>	<i>poly hydroxyalcanoate granule associated protein</i>	1118,17
SAMP_3550	<i>pnp</i>	<i>polynucleotide phosphorylase</i>	4898,27
SAMP_3807	<i>secA</i>	<i>preprotein translocase SecA subunit</i>	343,81
SAMP_3590	<i>proS</i>	<i>prolyl tRNA synthetase</i>	104,97
SAMP_3470	<i>pfpl</i>	<i>protease</i>	2092,72
SAMP_3079	<i>htrA</i>	<i>protease Do</i>	1045,1
SAMP_3103	<i>infB</i>	<i>protein chain initiation factor IF 2</i>	292,45
SAMP_2295	<i>aceE</i>	<i>pyruvate dehydrogenase</i>	634,86
SAMP_3625	<i>pykA</i>	<i>pyruvate kinase type II</i>	755,2
SAMP_2709	<i>etf</i>	<i>QO flavoprotein ubiquinone oxidoreductase</i>	207,73
SAMP_205	<i>XCC0270</i>	<i>quinone oxidoreductase</i>	249,51
SAMP_3648	<i>recA</i>	<i>RecA protein</i>	1727,79
SAMP_3675	<i>ribA</i>	<i>riboflavin biosynthesis protein</i>	320,92
SAMP_3646	<i>rbsK</i>	<i>ribokinase</i>	968,79
SAMP_3699	<i>rne</i>	<i>ribonuclease E</i>	526,58

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2839	<i>frr</i>	<i>ribosome recycling factor</i>	4759,43
SAMP_3751	<i>rpoA</i>	<i>RNA polymerase alpha subunit</i>	6155,88
SAMP_3752	<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase beta subunit</i>	2208,21
SAMP_3754	<i>rpoD</i>	<i>RNA polymerase sigma 70 factor</i>	954,56
SAMP_3285	<i>mreB</i>	<i>rod shape determining protein</i>	2061,55
SAMP_3839	<i>speD</i>	<i>S adenosyl methionine decarboxylase proenzyme</i>	383,35
SAMP_3245	<i>minD</i>	<i>septum site determining protein</i>	3646,01
SAMP_3817	<i>serS</i>	<i>seryl tRNA synthetase</i>	366,89
SAMP_3846	<i>ssb</i>	<i>single stranded DNA binding protein</i>	2260,61
SAMP_3840	<i>speE</i>	<i>spermidine synthase</i>	1242,33
SAMP_3803	<i>sdhA</i>	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit</i>	2175,79
SAMP_3804	<i>sdhB</i>	<i>succinate dehydrogenase iron sulfur protein</i>	1464,8
SAMP_3855	<i>sucD</i>	<i>succinyl CoA synthetase alpha subunit</i>	11001,16
SAMP_3854	<i>sucC</i>	<i>succinyl CoA synthetase beta subunit</i>	8895,65
SAMP_3833	<i>sodC2</i>	<i>superoxide dismutase</i>	2180,92
SAMP_3575	<i>prc</i>	<i>tail specific protease</i>	138,03
SAMP_3938	<i>trx</i>	<i>thioredoxin</i>	5457,27
SAMP_3878	<i>tdh</i>	<i>threonine 3 dehydrogenase</i>	384,67
SAMP_3895	<i>thrS</i>	<i>threonyl tRNA synthetase</i>	430,2
SAMP_3907	<i>tolB</i>	<i>TolB protein</i>	1970,2
SAMP_3908	<i>tolC</i>	<i>TolC protein</i>	3218,87
SAMP_3909	<i>tolQ</i>	<i>TolQ protein</i>	462,24
SAMP_2865	<i>fyuA</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	1902,96
SAMP_3118	<i>iroN</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	805,02
SAMP_2865	<i>fyuA</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	1902,96
SAMP_3118	<i>iroN</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	805,02
SAMP_2457	<i>btuB</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	26049,65

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_3911	<i>tonB</i>	<i>TonB protein</i>	1484,75
SAMP_3426	<i>parC</i>	<i>topoisomerase IV subunit A</i>	131,44
SAMP_3864	<i>talB</i>	<i>transaldolase B</i>	2942,17
SAMP_3376	<i>nusG</i>	<i>transcription antitermination factor</i>	3987,63
SAMP_3672	<i>rho</i>	<i>transcription termination factor Rho</i>	1861,18
SAMP_3898	<i>tktA</i>	<i>transketolase 1</i>	687,04
SAMP_3916	<i>tpiA</i>	<i>triosephosphate isomerase</i>	328,42
SAMP_2542	<i>colR</i>	<i>two component system regulatory protein</i>	5868,09
SAMP_3500	<i>phoP</i>	<i>two component system regulatory protein</i>	6474,79
SAMP_3972	<i>ugd</i>	<i>UDP glucose dehydrogenase</i>	706,66
SAMP_3298	<i>murA</i>	<i>UDP N acetylglucosamine 1 carboxyvinyltransferase</i>	902,37
SAMP_3181	<i>lpxA</i>	<i>UDP N acetylglucosamine acyltransferase</i>	225,2
SAMP_2890	<i>galU</i>	<i>UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase</i>	4388,57
SAMP_3994	<i>valS</i>	<i>valyl tRNA synthetase</i>	441,39
SAMP_2314	<i>acvB</i>	<i>virulence protein</i>	728,55
SAMP_4063	<i>xrvA</i>	<i>virulence regulator</i>	954,11
SAMP_4071	<i>xylA</i>	<i>xylose isomerase</i>	2296,32
SAMP_1834	<i>XCC3524</i>	<i>zinc protease</i>	475,93
SAMP_4100	<i>ybdR</i>	<i>Zn dependent alcohol dehydrogenase</i>	545,96

Tabela 3 - **Proteínas únicas (exclusivas)** identificadas no proteoma dos isolados *Xcc51* e *XccY21*, na condição de cultivo em meio **NYG**.

ENTRADA	NOME DO GENE	ISOLADO BACTERIANO	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2427	<i>bfeA</i>	<i>Xcc51</i>	ferric enterobactin receptor	35,04
SAMP_1962	<i>gumK</i>	<i>Xcc51</i>	gumK protein	315,82
SAMP_4057	<i>xpsJ</i>	<i>Xcc51</i>	general secretion pathway protein J	236,37
SAMP_2521	<i>cirA</i>	<i>Xcc51</i>	TonB dependent receptor	117,68
SAMP_4150	<i>yjgF</i>	<i>Xcc51</i>	translation initiation inhibitor	232,2
SAMP_2527	<i>clpP</i>	<i>XccY21</i>	ATP dependent Clp protease proteolytic subunit	1661,35
SAMP_4179	<i>zipA</i>	<i>XccY21</i>	cell division protein	1661,35

Tabela 4 - **Proteínas únicas (exclusivas)** identificadas no proteoma dos isolados *Xcc51* e *XccY21*, na condição de cultivo em meio mínimo – **XVM1** (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).

ENTRADA	NOME DO GENE	ISOLADO BACTERIANO	DESCRIÇÃO	SCORE
SAMP_2521	<i>cirA</i>	<i>Xcc51</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	35,04
SAMP_1304	<i>XCC2574</i>	<i>Xcc51</i>	<i>metallopeptidase</i>	315,82
SAMP_523	<i>XCC0947</i>	<i>Xcc51</i>	<i>non-hemolytic phospholipase C</i>	236,37
SAMP_3431	<i>pbuA</i>	<i>Xcc51</i>	<i>ferric pseudobactin M114 receptor protein</i>	117,68
SAMP_3578	<i>prfC</i>	<i>Xcc51</i>	<i>peptide chain release factor 3</i>	232,2
SAMP_138	<i>XCC0169</i>	<i>XccY21</i>	<i>hypothetical protein</i>	1661,35
SAMP_3114	<i>ipsI</i>	<i>XccY21</i>	<i>3 oxoadipate CoA succinyl transferase alpha subunit</i>	345,21
SAMP_2615	<i>cysS</i>	<i>XccY21</i>	<i>cysteinyl tRNA synthetase</i>	1100,38

Tabela 5 - **Proteínas diferencialmente aumentadas** identificadas no proteoma do isolado Xcc51 a partir da razão **XccY21/Xcc51** (< 0,66), na condição de cultivo em meio mínimo – **XVM1** (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE	RAZÃO XccY21/Xcc51 Log (e)
SAMP_2181	<i>HpaG</i>	<i>2 hydroxyhepta 2 4 diene 1 7 dioateisomerase 5 carboxymethyl 2 oxo hex 3 ene 1 7</i>	1726,44	0,41
SAMP_3779	<i>rpsT</i>	<i>30S ribosomal protein S20</i>	12157,59	0,59
SAMP_3741	<i>rpmA</i>	<i>50S ribosomal protein L27</i>	3991,09	0,54
SAMP_2526	<i>clpB</i>	<i>ATP dependent Clp protease subunit</i>	899,94	0,49
SAMP_3073	<i>hslU</i>	<i>ATP dependent HslUV protease ATP binding subunit HslU</i>	1037,35	0,62
SAMP_2524	<i>clp</i>	<i>CAP like protein</i>	1043,59	0,65
SAMP_2963	<i>groES</i>	<i>chaperonin 10 kDa</i>	120826,4	0,58
SAMP_2011	<i>XCC3783</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	1606,45	0,32
SAMP_35	<i>XCC0025</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	11174,28	0,36
SAMP_710	<i>XCC1318</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	35622,3	0,31
SAMP_764	<i>XCC1428</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	24270,38	0,52
SAMP_2066	<i>XCC3884</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	778,51	0,21
SAMP_2612	<i>cysK</i>	<i>cysteine synthase</i>	1549,47	0,17
SAMP_3944	<i>tsf</i>	<i>elongation factor Ts</i>	7530,37	0,62
SAMP_2425	<i>bfeA</i>	<i>ferric enterobactin receptor</i>	2185,85	0,23
SAMP_2902	<i>gcvP</i>	<i>glycine decarboxylase</i>	356,92	0,62
SAMP_2986	<i>gumC</i>	<i>GumC protein</i>	648,74	0,60
SAMP_3082	<i>hup</i>	<i>histone like protein</i>	16886,11	0,55
SAMP_3033	<i>hmgA</i>	<i>homogentisate 1 2 dioxygenase</i>	112,88	0,39
SAMP_3563	<i>ppa</i>	<i>inorganic pyrophosphatase</i>	1333,46	0,65
SAMP_3076	<i>hspA</i>	<i>low molecular weight heat shock protein</i>	40357,25	0,45
SAMP_2304	<i>acrA</i>	<i>multidrug resistance protein</i>	788,67	0,54
SAMP_2841	<i>fruB</i>	<i>multiphosphoryl transfer protein</i>	758,39	0,61

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE	RAZÃO XccY21/Xcc51 Log (e)
SAMP_3366	<i>nuoG</i>	<i>NADH ubiquinone oxidoreductase NQO3 subunit</i>	1347,09	0,64
SAMP_3378	<i>oar</i>	<i>Oar protein</i>	2256,34	0,33
SAMP_3269	<i>mopB</i>	<i>outer membrane protein</i>	80633,95	0,55
SAMP_3390	<i>ompW</i>	<i>outer membrane protein</i>	19936,97	0,64
SAMP_3388	<i>ompP6</i>	<i>outer membrane protein P6 precursor</i>	10452,24	0,40
SAMP_3444	<i>pcp</i>	<i>peptidoglycan associated outer membrane lipoprotein</i>	16628,1	0,62
SAMP_2638	<i>dcp</i>	<i>peptidyl dipeptidase</i>	1012,12	0,57
SAMP_2639	<i>dcp</i>	<i>peptidyl dipeptidase</i>	738,18	0,39
SAMP_3897	<i>tig</i>	<i>peptidyl prolyl cis trans isomerase</i>	577,71	0,32
SAMP_3470	<i>pfpl</i>	<i>protease</i>	2092,72	0,63
SAMP_2463	<i>btuB</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	4633,34	0,55
SAMP_2865	<i>fyuA</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	1902,96	0,43
SAMP_2866	<i>fyuA</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	808,65	0,53
SAMP_3118	<i>iroN</i>	<i>TonB dependent receptor</i>	805,02	0,50
SAMP_2314	<i>acvB</i>	<i>virulence protein</i>	728,55	0,44
SAMP_1834	<i>XCC3524</i>	<i>zinc protease</i>	475,93	0,61
SAMP_4100	<i>ybdR</i>	<i>Zn dependent alcohol dehydrogenase</i>	545,96	0,56

Tabela 6 - **Proteínas diferencialmente diminuídas** identificadas no proteoma do isolado *Xcc51* a partir da razão ***XccY21/Xcc51*** (> 1,5), na condição de cultivo em meio mínimo – ***XVM1*** (condição indutora da transcrição de genes relacionados à virulência).

ENTRADA	NOME DO GENE	DESCRIÇÃO	SCORE	RAZÃO <i>Xcc51/XccY21</i> Log (e)
SAMP_2963	<i>leuC</i>	<i>3 isopropylmalate dehydratase large subunit</i>	620,62	1,62
SAMP_2631	<i>XCC1045</i>	<i>bacterioferritin</i>	2518,25	1,60
SAMP_2181	<i>engXCA</i>	<i>cellulase</i>	2016,32	3,00
SAMP_3157	<i>XCC0546</i>	<i>conserved hypothetical protein</i>	5571,18	1,80
SAMP_2744	<i>mtnC</i>	<i>enolase phosphatase</i>	262,93	1,80
SAMP_3159	<i>gmd</i>	<i>GDP mannose 4 6 dehydratase</i>	871,88	1,82
SAMP_2741	<i>ilvC</i>	<i>ketol acid reductoisomerase</i>	677,78	1,93
SAMP_2736	<i>gpm</i>	<i>phosphoglycerate mutase</i>	480,78	1,73

Tabela 7 - **Categorização funcional** das proteínas diferencialmente abundantes ( **aumentadas**) identificadas no proteoma do isolado ***Xcc51***, na condição de cultivo em meio mínimo – ***XVM1***. **Ontologia Gênica (GO)** baseada em análise utilizando o software *Blast2GO*®.

ENTRADA	NOME DO GENE	GO (Ontologia Gênica)	SCORE
SAMP_2181	<i>HpaG</i>	<i>Metabolismo de carboidrato (frutose/manose)</i>	1726,44
SAMP_3779	<i>rpsT</i>	<i>Tradução de proteínas</i>	12157,59
SAMP_3741	<i>rpmA</i>	<i>Tradução de proteínas</i>	3991,09
SAMP_2526	<i>clpB</i>	<i>Chaperonas induzidas por estresse</i>	899,94
SAMP_3073	<i>hslU</i>	<i>Atividade de chaperona (subunidade ATPase do proteossomo)</i>	1037,35
SAMP_2524	<i>clp</i>	<i>Fator de transcrição (proteína ativadora de gene de catabolismo)</i>	1043,59

(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	GO	SCORE
SAMP_2963	<i>groES</i>	<i>Co-chaperonina induzida por estresse (estabiliza e protege polipeptídios)</i>	120826,4
SAMP_2011	<i>XCC3783</i>	<i>Proteína hipotética</i>	1606,45
SAMP_35	<i>XCC0025</i>	<i>Reguladora de atividade peptidase (evita a lise bacteriana)</i>	11174,28
SAMP_710	<i>XCC1318</i>	<i>Proteína hipotética</i>	35622,3
SAMP_764	<i>XCC1428</i>	<i>Proteína de membrana</i>	24270,38
SAMP_2066	<i>XCC3884</i>	<i>Proteína hipotética</i>	778,51
SAMP_2612	<i>cysK</i>	<i>Biossíntese de aminoácidos e metabolismo de energia</i>	1549,47
SAMP_3944	<i>tsf</i>	<i>Fator atuante na tradução proteica</i>	7530,37
SAMP_2425	<i>bfeA</i>	<i>Proteína receptora de membrana (transporte de íons inorgânicos)</i>	2185,85
SAMP_2902	<i>gcvP</i>	<i>Metabolismo de carboidratos/aminoácidos/cofatores e vitaminas</i>	356,92
SAMP_2986	<i>gumC</i>	<i>Biossíntese de exopolissacarídeo (associado a virulência)</i>	648,74
SAMP_3082	<i>hup</i>	<i>Proteína tipo-histona (atua na regulação da transcrição gênica)</i>	16886,11
SAMP_3033	<i>hmgA</i>	<i>Metabolismo de aminoácido (tirosina) / biodegradação de xenobióticos</i>	112,88
SAMP_3563	<i>ppa</i>	<i>Metabolismo energético (fosforilação oxidativa)</i>	1333,46
SAMP_3076	<i>hspA</i>	<i>Atividade de chaperona (envolvida no redobramento de proteínas)</i>	40357,25
SAMP_2304	<i>acrA</i>	<i>Proteína envolvida com a excreção de drogas (desintoxicação celular)</i>	788,67
SAMP_2841	<i>fruB</i>	<i>Sistema fosfotransferase de transporte (PTS) / metabolismo de frutose-manose</i>	758,39
SAMP_3366	<i>nuoG</i>	<i>Metabolismo energético (fosforilação oxidativa)</i>	1347,09
SAMP_3378	<i>oar</i>	<i>Porinas (transporte de pequenas moléculas hidrofílicas através da membrana)</i>	2256,34
SAMP_3269	<i>mopB</i>	<i>Proteína externa de membrana /associada a peptidoglicanos (aquisição de nutrientes e manutenção da estrutura e integridade celular)</i>	80633,95
SAMP_3390	<i>ompW</i>	<i>Proteína externa de membrana (aquisição de nutrientes e manutenção da estrutura e integridade celular)</i>	19936,97
SAMP_3388	<i>ompP6</i>	<i>Proteína externa de membrana /associada a peptidoglicanos (aquisição de nutrientes e manutenção da estrutura e integridade celular)</i>	10452,24
SAMP_3444	<i>pcp</i>	<i>Peptídeo antigênico de membrana externa (proteção e aderência bacteriana)</i>	16628,1
SAMP_2638	<i>dcp</i>	<i>Metalopeptidase (atividade chaperona)</i>	1012,12
SAMP_2639	<i>dcp</i>	<i>Metalopeptidase (atividade chaperona)</i>	738,18



(Continuação)

ENTRADA	NOME DO GENE	GO	SCORE
SAMP_3897	<i>tig</i>	<i>Atividade de chaperona (Modificação pós-traducional e dobramento de proteínas)</i>	577,71
SAMP_3470	<i>pfpl</i>	<i>Protease intracelular (fonte nutricional) / chaperona de resistência a estresse oxidativo</i>	2092,72
SAMP_2463	<i>btuB</i>	<i>Proteína periplasmáticas (ligação da membrana interna com a externa / envolvidas no carregamento de compostos iônicos e metálicos)</i>	4633,34
SAMP_2865	<i>fyuA</i>	<i>Proteína periplasmáticas (ligação da membrana interna com a externa / envolvidas no carregamento de compostos iônicos e metálicos)</i>	1902,96
SAMP_2866	<i>fyuA</i>	<i>Proteína periplasmáticas (ligação da membrana interna com a externa / envolvidas no carregamento de compostos iônicos e metálicos)</i>	808,65
SAMP_3118	<i>iroN</i>	<i>Proteína periplasmáticas (ligação da membrana interna com a externa / envolvidas no carregamento de compostos iônicos e metálicos)</i>	805,02
SAMP_2314	<i>acvB</i>	<i>Proteína de virulência bacteriana (VirJ)</i>	728,55

Tabela 8 - **Categorização funcional** das proteínas diferencialmente abundantes (**diminuídas**) identificadas no proteoma do isolado **Xcc51**, na condição de cultivo em meio mínimo – **XVM1**. **Ontologia Gênica (GO)** baseada em análise utilizando o *software Blast2GO*®.

ENTRADA	NOME DO GENE	GO	SCORE
SAMP_4100	<i>ybdR</i>	<i>Proteína com atividade oxireductase (envolvida em processos celulares)</i>	545,96
SAMP_3159	<i>leuC</i>	<i>Biossíntese/metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos</i>	620,62
SAMP_563	<i>bfR</i>	<i>Metabolismo de cofatores e vitaminas (porfirina e clorofila)</i>	2518,25
SAMP_2702	<i>engXCA</i>	<i>Metabolismo de carboidrato (amido e sacarose) / endoglucanase (celulase) relacionada com a patogenicidade</i>	2016,32
SAMP_365	<i>XCC0546</i>	<i>Superfamília das Porinas</i>	5571,18
SAMP_983	<i>mtnC</i>	<i>Metabolismo de cisteína e metionina (enolase-fosfatase com atividade na regeneração de metionina)</i>	262,93
SAMP_384	<i>gmd</i>	<i>Metabolismo de carboidrato (frutose e manose)</i>	871,88
SAMP_3097	<i>ilvC</i>	<i>Biossíntese of aminoácidos (valina, leucina e isoleucina)</i>	677,78
SAMP_2958	<i>gpmA</i>	<i>Biossíntese e metabolismo de aminoácidos (glicina, serina e treonina) / metabolismo de carboidrato (glicólise e gliconeogênese)</i>	480,78

## ANEXO – PREMIAÇÕES E CERTIFICADOS

ANEXO 1 - Premiação do XXI Encontro Talento Estudantil – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia: **2º lugar geral** na categoria pós-graduação.

### Certificado

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia outorga o presente certificado ao trabalho “Perfil protéico de dois isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* diferindo em virulência”, de autoria de FABIANO TOUZDJIAN PINHEIRO KOHLRAUSCH TÁVORA, que foi classificado em **2º Lugar** na categoria **pós-graduação**, em Recursos Microbianos, na parte “Microorganismos”, no XXI Encontro do Talento Estudantil, realizado de 01 a 02 de dezembro de 2016.

Brasília, DF, 09 de dezembro de 2016

  
José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Chefe Geral

**Embrapa**

Recursos Genéticos e Biotecnologia

### Registro

Certificado nº 499 / 2016 Livro 0011.2014-2015 Folha 59

Brasília, DF

08/12/16

  
assinatura

**XXI Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
Período: 01 a 02 de dezembro de 2016 - Brasília-DF  
Carga horária: 16h.

#### Conteúdo Programático:

- Evento científico para mostra dos trabalhos gerados pelos estudantes de graduação e pós-graduação, vinculados à Unidade, que inclui os temas Recursos Animais, Recursos Microbianos e Recursos Vegetais, visando o treinamento em participação de eventos, bem como, a divulgação dos resultados de pesquisa e da interação pesquisa/ensino;
- Exposição pública de trabalhos científicos completos sob a forma de pôsteres e apresentação oral, avaliados por comissão julgadora externa, constituída por profissionais filiados a Universidades, Faculdades e/ou Instituições de Pesquisa, que lidam com ciências biológicas, agronomia, engenharia florestal e medicina veterinária;
- Publicação dos Resumos em Anais do Encontro em CD e *on line*.

Brasília, DF, 09 de dezembro de 2016.

Zilda Maria de Araújo Ribeiro  
Coordenadora do XXI Encontro do Talento Estudantil

ANEXO 2 – Trabalho selecionado para apresentação no evento “1<sup>st</sup> IBERO-AMERICAN (6<sup>th</sup> BrMASS CONFERENCE) ON MASS SPECTROMETRY -RIO 2016”.

