**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização do efeito tóxico de extrato de culturas líquidas de
Leifsonia xyli subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface**

Fernanda Raquel Oliveira de Souza Rezende de Castro

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2012**

Fernanda Raquel Oliveira de Souza Rezende de Castro
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização do efeito tóxico de extrato de culturas líquidas de *Leifsonia xyli*
subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Castro, Fernanda Raquel Oliveira de Souza Rezende de
Caracterização do efeito tóxico de extrato de culturas líquidas de *Leifsonia xyli*
subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface / Fernanda Raquel Oliveira de
Souza Rezende de Castro. - - Piracicaba, 2012.
71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Alface 2. Bactérias gram-positivas 3. Cana-de-açúcar 4. Estresse oxidativo
5. Germinação de sementes 6. Raquitismo das soqueiras 7. Toxinas I. Título

CDD 633.61
C355c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Ao meu querido **Ademar Moretti**

Pela confiança e apoio constante

Aos meus pais

Antonio R. de Castro

Carita R. de Castro

E a minha avó

Francisca de Oliveira

Pelo incentivo, paciência e amor incondicional

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por fornecer uma excelente estrutura para a minha formação.

Ao Professor e Orientador Luis Eduardo Aranha Camargo, pela dedicação integral, suporte, ensinamentos, conselhos e principalmente pela acolhida e confiança quando procurava me iniciar no mundo científico.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, por ensinar com tanto carinho e profissionalismo, complementando minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Professor Lázaro Eustáquio Pereira Peres, pela disponibilidade e atenção nos vários momentos em que recorri à sua ajuda.

Aos funcionários e secretárias do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, em especial a Heloísa Moraes, Fernanda Groppo, Silvia Lourenço, Liliane Teixeira, Edivaldo Buriolla, Fabiana Wolak e Vera Durrer, que tantas vezes me ajudaram e tornaram possível realizar as tarefas do mestrado.

Aos membros do Laboratório de Micotoxinas, Maria Antônia Calori Domingues e Ivani Valarini Zambello, pela grande ajuda em uma das etapas do meu trabalho.

Aos meus queridos professores da Universidade de Brasília: Everaldo Anastácio Pereira, Ricardo Carmona, Luiz Antônio Borgo, Sebastião Alberto de Oliveira, Wenseslau Goedert, Itiberê Saldanha, José Mauro da Silva Diogo, Carlos Hidemi Uesugi e Carlos Alberto da Silva Oliveira e ao Dr. Eduardo Alano do CPAC; por mostrar possível crescer profissionalmente com integridade e de forma ética.

Aos colegas do departamento, pelo companheirismo nas horas de estudo. Em especial gostaria de agradecer à Silvia Blummer pela atenção e grande ajuda em várias ocasiões.

Aos colegas e queridos amigos do LGM: Thaís Galhardo, Débora Wassano, Giselle Carvalho, Mariana Cicarelli, Thayne Munhoz, Leandro Dallagnol e Jerônimo Araújo, pelo apoio em todo momento, idéias e grande amizade. Nossa convivência harmoniosa tornou possível a realização deste trabalho.

Aos estagiários do LGM Ana Beatriz, Rafael e Raphael Severo, por dedicar o pouco tempo disponível aos nossos trabalhos.

À antiga equipe do LGM, em especial à Raphaele Komatsu, Pastora Querales e Bruno Marco de Lima, por me ensinar a rotina do laboratório com tanta paciência durante o meu estágio.

Ao meu irmão Frederico Márcio Vieira, quem com sua dedicação e amor à ciência me deu grandes conselhos, me incentivou a seguir adiante e foi o exemplo de aluno e pesquisador a seguir, me inspirando nas horas mais difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos para a realização do meu mestrado.

“O que chamamos de absurdo é a nossa ignorância”

Júlio Cortázar

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.1.1 Bactérias Fitopatogênicas.....	17
2.1.1.2 Toxinas bacterianas.....	18
2.1.2 Raquitismo da soqueira.....	19
2.1.2.1 Ocorrência.....	19
2.1.2.2 Importância.....	19
2.1.2.3 Sintomatologia e disseminação.....	20
2.1.3 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	21
2.1.3.1 Morfologia e classificação.....	21
2.1.3.2 O genoma de Lxx.....	22
2.2 Material e métodos.....	28
2.2.1 Ação de extratos de sobrenadantes de culturas de Lxx submetidas a estresse na germinação de sementes de alface.....	28
2.2.2 Ensaio de termoestabilidade.....	31
2.2.3 Produção de pigmentos isoprenóides por Lxx.....	34
2.2.4 Efeito da adição de fosmidomicina.....	35
2.3 Resultados.....	38
2.3.1 Ação de extratos de sobrenadantes de culturas de Lxx submetidas a estresse na germinação de sementes de alface.....	38
2.3.2 Ensaio de termoestabilidade.....	41
2.3.3 Produção de pigmentos isoprenóides por Lxx.....	44
2.3.4 Efeito da adição de fosmidomicina.....	46
2.4 Discussão.....	51
3 CONCLUSÕES.....	57
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	69

RESUMO

Caracterização do efeito tóxico de extrato de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface

Este estudo avaliou os efeitos de extratos de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) cultivada sob condições de estresse osmótico e na presença de inibidores da rota não-mevalonato (MEP/DOXP) de síntese de pigmentos isoprenóides, na germinação de sementes de alface. Também avaliou a relação entre o efeito tóxico dos extratos e a produção de pigmentos pela bactéria. Os extratos foram obtidos do sobrenadante de culturas de Lxx usando acetato de etila como solvente. Ensaios com sementes de alface embebidas nos extratos indicaram uma ação inibitória na germinação das sementes e no alongamento das radículas quando a bactéria foi cultivada na presença de 7% de PEG 6000 ou 100 mM de NaCl. O extrato foi submetido a vários tratamentos térmicos (temperatura ambiente; 30, 60 e 90°C em banho-maria e 121°C por autoclavagem) e sua ação inibitória em sementes mostrou-se termoestável. A presença de pigmentos isoprenóides de células cultivadas com PEG ou NaCl e de células incubadas sem estes agentes estressantes foi avaliada por espectrofotometria após extração dos pigmentos com metanol. Em células cultivadas na ausência de estresse, notou-se um pico de absorbância bem definido no comprimento de onda de 400 nm, ao passo que este pico foi sensivelmente reduzido em células cultivadas sob estresse. Esse efeito foi mais pronunciado na presença de PEG. Para confirmar a natureza isoprenóide do composto, Lxx foi cultivada na presença de fosmidomicina ou difenilamina, que são inibidores da rota metabólica não-mevalonato destes compostos em *Microbacteriaceae*. Ambas as substâncias reduziram o pico de absorbância no espectro em relação a células cultivadas sem adição destes antibióticos, confirmando a natureza do composto e sua via de síntese. No entanto, a redução foi mais acentuada no caso da fosmidomicina. Por fim, a fosmidomicina foi utilizada com a finalidade de verificar seu efeito na toxidez dos extratos. Foi observado que o efeito tóxico do extrato foi reduzido quando Lxx foi cultivada na presença do inibidor. Ao se avaliar o conteúdo das células, notou-se também redução expressiva no conteúdo relativo de compostos isoprenóides, como esperado. Os resultados indicaram que a bactéria secreta um produto cuja ação é similar à do ABA e que há uma correlação entre a produção do mesmo e a síntese de pigmentos isoprenóides. Em conjunto, o estudo dá suporte à hipótese levantada anteriormente por Monteiro-Vitorello et al. (2004) com base em análise *in silico* do genoma de Lxx, segundo a qual a bactéria estaria apta a secretar um composto análogo ao ácido abscísico (ABA).

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras; Bacteriose; Cana-de-açúcar; Estresse; Toxina; Ácido abscísico, Pigmentos isoprenóides

ABSTRACT

Biological characterization of the toxic effects of extracts of liquid cultures of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on the germination of lettuce seeds

This study evaluated the effects of extracts of liquid cultures of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) grown under osmotic stress and in the presence of inhibitors of the non-mevalonate pathway (MEP/DOXP) of synthesis of isoprenoid pigments on the germination of lettuce seeds. The relationship between the extracts' toxic effect and the production of pigments was evaluated as well. The extracts were obtained from the supernatant of Lxx cultures using ethyl acetate as a solvent. Essays with lettuce seeds soaked in the extracts indicated an inhibitory action on germination and on the elongation of the radicles when the bacterium was cultivated in the presence of 7% PEG 6000 or 100 mM NaCl. The extract was submitted to different thermal treatments (room temperature; 30, 60 and 90°C water bath and 121°C autoclaving) and its inhibitory action was shown to be thermostable. The presence of isoprenoid pigments in cells cultivated with PEG, NaCl or in the absence of these stressing agents was evaluated by spectrophotometry after extracting the pigments with methanol. In cells incubated in the absence of stress, a well-defined absorbance peak at 400 nm wavelength was noted, whereas this peak was sensibly reduced in cells cultivated under stress. This effect was more pronounced in the presence of PEG. To confirm the isoprenoid nature of the compound, Lxx was incubated in the presence of fosmidomycin and diphenylamine, which are inhibitors of the non-mevalonate metabolic pathway of these compounds in *Microbacteriaceae*. Both substances reduced the absorbance peak in the spectrum compared to cells cultivated in the absence of these antibiotics, confirming the nature of the compound and its synthesis pathway. Moreover, the peak reduction was more accentuated in the presence of fosmidomycin. Lastly, fosmidomycin was used to evaluate its effect on the toxicity of the extracts. It was observed that the toxic effect of the extract was reduced when Lxx was cultivated in the presence of this inhibitor. When the cell content was evaluated, an expressive reduction on the relative content of carotenoid compounds has also been noticed, as expected. The results indicated that the bacterium secretes a compound whose action is similar to ABA and that there is a correlation between the production of this compound and the synthesis of isoprenoid pigments. The results support the hypothesis proposed earlier by Monteiro-Vitorello et al. (2004) based upon an *in silico* analysis of the genome of Lxx, according to which the bacterium would be able to secrete a compound analogous to abscisic acid (ABA).

Keywords: Ratoon stunting disease; Plant bacteriology; Sugarcane; Stress; Toxin; Absciscic acid; Isoprenoid pigments

1 INTRODUÇÃO

A importância da cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) no Brasil pode ser mensurada avaliando-se a área destinada ao seu plantio. Em 2011, esta área foi superior a 8,4 milhões de hectares, ou aproximadamente 13% da área cultivada do país, que resultou em uma produção estimada em mais de 620 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011). Doenças fúngicas, bacterianas e viroses afetam esta cultura, reduzindo sua produção e causando grandes perdas. Entre as doenças está o raquitismo da soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Como o nome indica, o RSD reduz o porte das plantas, o que leva a reduções em biomassa. Na Austrália, por exemplo, as perdas foram estimadas em mais de 6 milhões de dólares por ano (CROFT et al., 2000). No Brasil, somente no Estado de São Paulo nos últimos 30 anos, os prejuízos causados por esta doença superaram 2 bilhões de dólares norte-americanos (GIGLIOTI, 1997).

A primeira descrição do raquitismo-da-soqueira deu-se em 1944, na Austrália (TOKESHI; RAGO, 2005). Entretanto, sua etiologia só foi definida na década de 80. O patógeno é uma bactéria corineforme, Gram-positiva e fastidiosa, que mede aproximadamente 0,25µm x 1,4µm (AGRIOS, 2005). Em termos de localização no tecido vegetal, é uma bactéria que coloniza o xilema e as células-tronco do meristema apical (BRUMBLEY et al., 2003). O seu cultivo *in vitro* é elaborado devido às suas exigências nutricionais e lento crescimento (Monteiro-Vitorello et al., 2009). Sendo assim, o seu manuseio está muito sujeito a contaminações.

A análise da sequência do genoma de Lxx identificou um possível operon contendo genes similares a genes envolvidos na síntese de pigmentos carotenóides (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Com base nisto, os autores aventaram a hipótese de que estes genes estariam envolvidos na síntese de uma substância análoga ao ABA ou um precursor deste hormônio. Ainda segundo a hipótese, o composto seria secretado nos tecidos meristemáticos, afetando assim o crescimento vegetal. Desta forma, este composto estaria diretamente implicado na gênese do RSD. Ainda segundo a hipótese, o composto seria produzido através da desaturação do pigmento carotenóide pela ação de uma enzima produzida pelo gene *desA*, uma δ -12 acil-lipídio desaturase (delta-12 acil-lipídio desaturase) que adiciona ligações duplas na molécula de caroteno, transformando-a em um

precursor de licopeno, que por sua vez será transformando em ABA (XIONG; ZHU, 2003). Tendo esta descoberta como base, o presente trabalho visou avaliar o efeito de extrato de culturas líquidas de Lxx na germinação e crescimento de sementes de alface. Também avaliou-se a produção de pigmentos carotenóides por células de Lxx sob situações de estresse e com adições de antibióticos inibidores da rota não-mevalonato (MEP/DOXP).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Bactérias Fitopatogênicas

Bactérias fitopatogênicas podem ser Gram negativas ou positivas conforme a estrutura da parede celular (KADO, 2010). A maioria possui formato de bastonete e não forma esporo, exceto espécies do gênero *Streptomyces* que formam esporos e são filamentosas e de *Rhodococcus*, que não são baciliformes. Podem ser fastidiosas ou não, com crescimento ótimo entre as temperaturas de 23 a 28°C (KADO, 2010).

A infecção nos tecidos da planta ocorre intercelularmente na maioria dos casos e há vários genes envolvidos na virulência e na patogênese localizados tanto em plasmídeos como em cromossomos. Muitas vezes sinais moleculares gerados pelas próprias plantas também estão envolvidos na patogênese e estes ativam mecanismos de secreção bacterianos quando reconhecidos pelo patógeno. Estes sistemas secretórios, por sua vez, são responsáveis pela translocação extracelular de moléculas (AGRIOS, 2005). O sistema secretório mais estudado é o do tipo III, presente em bactérias Gram-negativas necrogênicas, no qual participam os genes *hrp* (hypersensitive response protein), *hrc* (hypersensitive response conserved genes) e *avr* (avirulence response). Os genes *hrp* e *avr* estão relacionados à especificidade do hospedeiro, enquanto que os genes *hrc* compõem a estrutura do sistema secretório (AGRIOS, 2005). Em bactérias Gram-positivas, por outro lado, tal sistema é ausente devido à estrutura da parede celular e pouco se sabe da participação dos outros sistemas secretórios como mediadores da patogênese em plantas. Além destes sistemas, outros mecanismos, como o *quorum-sensing*, também ativado por reconhecimento de moléculas do hospedeiro, estão envolvidos tanto na patogênese como na sobrevivência das bactérias em suas plantas hospedeiras. Este sistema funciona através da percepção de sinais entre as células bacterianas mediada pelo acúmulo de moléculas que são reconhecidas por proteínas receptoras e podem ativar genes ligados à patogenicidade (VON BODMAN et al., 2003). A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que causa podridão negra em crucíferas, utiliza-se deste mecanismo na produção de pigmentos relacionados à intensidade de doença (VON BODMAN et al., 2003).

Outros fatores de patogenicidade, como aqueles que resultam na quebra e degradação de parede/membrana celular, estão associados a famílias gênicas, onde vários membros são responsáveis pela codificação de enzimas que degradam a parede celular, como por exemplo, as pectinases e cutinases. A fitobactéria *Erwinia carotovora* é um exemplo clássico e causa podridões moles devido à produção de muitas enzimas degradadoras (WULFF, 2008). Alguns estudos demonstram que na bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, as cutinases degradam a parede celular dos vasos xilemáticos da hospedeira, intensificando os sintomas de murcha (WULFF, 2008). Da mesma forma, muitas bactérias secretam toxinas, outro fator de patogenicidade, que participam da infecção e colonização dos tecidos, desregulando o metabolismo da planta hospedeira e podendo inclusive causar a morte celular (STROBEL, 1977; AGRIOS, 2005).

2.1.1.2 Toxinas bacterianas

Fitotoxinas bacterianas são compostos cujas moléculas variam em tamanho e composição química e tem como característica causarem um desbalanço no metabolismo da planta (STROBEL, 1977). Várias bactérias utilizam toxinas como fatores de patogenicidade (AGRIOS, 2005). De forma geral, estas toxinas podem ser agrupadas em três categorias: causadoras de necrose no tecido vegetal; causadoras de murcha e modificadoras do crescimento celular da planta (KADO, 2010). Um exemplo clássico é a siringomicina produzida por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, que induz necrose nos tecidos da planta (KENNELLY et al., 2007). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* que ataca o feijoeiro produz a toxina chamada faseolotoxina, que induz a formação de halos cloróticos e *P. syringae* pv. *syringae* produz a siringomicina, que provoca necrose dos tecidos da hospedeira (BENDER et al., 1999). Vários patovares de *Pseudomonas syringae* secretam uma toxina análoga ao hormônio ácido jasmônico, denominada coronatina (UPPALAPATI et al., 2005). Algumas mudanças na planta hospedeira atribuídas à ação da coronatina são: mudanças na estrutura dos cloroplastos, aumento da espessura da parede celular, acúmulo de inibidores protéicos e inibição do crescimento radicular (UPPALAPATI et al., 2005). Também são efeitos relacionados à coronatina o aumento dos sintomas como clorose e lesões e da multiplicação bacteriana nos tecidos das plantas infectadas (NOMURA et al., 2005). O modo de atuação análogo

ao do ácido jasmônico (BROOKS et. al., 2004) demonstra que seu modo de ação suprime o sistema de defesa da planta dependente de ácido acetilsalicílico, tornando-a mais suscetível ao ataque de alguns patógenos (KUNKEL; BROOKS, 2002; NOMURA et al., 2005).

2.1.2 Raquitismo da soqueira

2.1.2.1 Ocorrência

O raquistimo da soqueira (ratoon stunting disease – RSD) é uma das principais doenças da cana-de-açúcar. Foi primeiramente relatada em Queensland, na Austrália, em 1944, durante uma primavera bastante seca. Plantas da variedade Q28 apresentaram um subdesenvolvimento e descoloração pontual em feixes vasculares (JAMES, 1996; BRUMBLEY et al., 2006). Inicialmente acreditava-se que a doença estava relacionada a um vírus devido a dificuldade de isolamento do agente causal. Porém, em 1980 uma bactéria corineforme foi isolada de planta doente e quando inoculada em canas saudáveis, induziu os sintomas da doença (DAVIS et al., 1980). Em 1989 o RSD já havia sido relatado em 61 países, sendo encontrado na maioria das áreas cultivadas com cana-de-açúcar (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; TOKESHI; RAGO, 2005). Atualmente, Lxx encontra-se distribuída em todos os países produtores de cana-de-açúcar (AGRIOS, 2005; EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION - EPPO, 2011).

Apesar de sua ampla distribuição, infecções naturais de Lxx foram relatadas apenas em híbridos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), embora possa ser transmitida experimentalmente para diversas outras gramíneas, incluindo *Pennisetum purpureum*, *Zea mays*, *Panicum maximum*, *Echinochloa colonum*, *Imperata cylindrica*, *Rhynchelytrum repens*, *Cynodon dactylon* e espécies dos gêneros *Brachiaria* e *Sorghum* sem, no entanto, causar sintomas (MILLS et al., 2001).

2.1.2.2 Importância

O RSD é uma das doenças mais difundidas da cultura da cana, acarretando perdas superiores a 30% (YOUNG et al., 2006). Relatos de perdas em produção variaram de 1 a 41% na África do Sul e de 12 a 37% na Austrália (BAILEY; BECHET, 1997). Nos Estados Unidos, estimativas variaram de 9 a 33% (GRISHAM,

1991). As perdas decorrem da redução da biomassa, que pode chegar a 50% em variedades suscetíveis submetidas a condições de estresse hídrico (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; TOKESHI; RAGO, 2005). No Brasil, perdas em biomassa devidas ao RSD foram estimadas em 3,3 milhões de toneladas/ano, o que equivaleu a R\$ 107 milhões/ano, segundo o preço praticado de R\$ 32/t em 2009 (L.E.A. Camargo, comunicação pessoal). Outro dano direto é a redução do número de cortes em talhões altamente infectados em função do comprometimento do crescimento das plantas: em média, a cultura permite até 6 cortes consecutivos em plantas sadias, ao passo que em talhões infectados este número reduz-se para aproximadamente dois, fazendo com que o custo advindo da renovação dos talhões aumente substancialmente (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; JAMES, 1996).

As perdas devido ao raquitismo das soqueiras são mais severas sob estresse hídrico. Além disso, solos pobres com drenagem deficiente, monocultivos sucessivos com variedades suscetíveis e práticas culturais inadequadas também favorecem o desenvolvimento da doença (DAVIS; BAILEY, 2000; BRUMBLEY et al., 2006).

2.1.2.3 Sintomatologia e disseminação

Os sintomas externos são subdesenvolvimento da planta e encurtamento dos colmos. Já os internos são caracterizados por pontuações ou vírgulas avermelhadas localizadas na região inferior do nó, decorrentes da deposição de gomas ou da formação de tiloses nos feixes do xilema, e pela coloração rosa nos tecidos meristemáticos de plantas jovens (STEINDL, 1961). Genótipos suscetíveis podem apresentar em condições extremas, além do subdesenvolvimento, aspecto de murcha, necrose nas pontas e bordas das folhas. No entanto, estes sintomas não são específicos e podem ser causados por outros patógenos, como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *X. campestris* pv. *vasculorum* e *Erwinia herbicola* (RICAUD, 1974; TOKESHI; RAGO, 2005). Todavia, algumas variedades podem exibir altos níveis de infecção sem, no entanto, apresentarem sintomas externos e internos sendo, portanto, consideradas tolerantes. (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; GILLASPIE; DAVIS, 1992; TOKESHI; RAGO, 2005).

A informação da literatura indica que o ciclo de vida de Lxx está limitado à cana de açúcar (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Porém, há um relato mostrando sua sobrevivência em solo, por 2 – 3 meses, após a colheita (BAILEY; TOUGH, 1992). Além disso, sabe-se que a bactéria sobrevive por vários meses nas soqueiras ou restos de toletes, sendo necessário deixar transcorrer entre três e seis meses antes de um novo plantio (TOKESHI; RAGO, 2005).

As bactérias fitopatogênicas são transportadas de uma planta a outra por meio da irrigação ou através de animais, insetos e práticas culturais realizadas pelo homem (AGRIOS, 2005). Este último é o fator determinante na disseminação de Lxx. A bactéria entra em contacto com os tecidos internos da planta através de ferimentos causados por instrumentos de corte, infecta o xilema e coloniza a planta sistemicamente, das raízes até o meristema apical. No entanto, a quantidade de bactéria é variável em função da parte da planta analisada. Os tecidos internos da parte inferior do colmo, por exemplo, apresentam maiores títulos bacterianos do que os da parte superior. Foi observado também que caules e folhas mais velhas são mais favoráveis para o crescimento da bactéria (BAILEY; BECHET, 1997).

2.1.3 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

A bactéria Lxx é Gram-positiva, aeróbia e possui hábito de crescimento fastidioso mesmo em meios de cultura ricos em nutrientes (LIAO; CHEN, 1981; HAAPALAINEN et al., 2000), levando de 10 a 20 dias para o aparecimento de colônias isoladas e 7 dias para um crescimento razoável em meio de cultura líquido. O meio de cultura inicialmente desenvolvido para seu cultivo foi o MSC (DAVIS et al., 1980), que foi modificado por Teakle e Ryan (1992), sendo denominado MSC New. Este, por sua vez, foi modificado por Monteiro-Vitorello et al. (2004) e então denominado de MSC NEW modificado.

2.1.3.1 Morfologia e classificação

O gênero *Leifsonia* pertence ao Domínio *Bacteria*, Reino *Bacteria*, Filo *Actinobacteria* e família *Microbacteriaceae*. Em 1984 foi proposto que as quatro espécies de *Corynebacterium*: *C. michiganensis*, *C. iranicum*, *C. tritici* e *C. rathayi*, fossem reclassificadas no novo gênero *Clavibacter* (DAVIS et al., 1984) com base na presença do ácido 2,4-diaminobutírico (DAB) na composição do peptideoglicano da parede celular destas bactérias. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Leifsonia xyli* subsp.

cynodontis, que até então não haviam sido classificadas, mas já haviam sido isoladas de cana-de-açúcar e capim-bermuda, respectivamente, foram incluídas como subespécies de uma nova espécie de *Clavibacter*, *C. xyli* (DAVIS et al., 1984). Esta nova espécie distinguia-se das outras bactérias do gênero *Clavibacter* pela sua natureza fastidiosa, pela incapacidade da conversão de sacarose em ácido láctico mediante sua fermentação oxidativa, pela predominância das menaquinonas na forma de MK-10 e MK-11 na parede celular e padrão semelhante de bandas do DAB em gel de poliacrilamida (DAVIS et al., 1984). Em 1999, no entanto, Suzuki et al. criaram o gênero *Leifsonia* para comportar uma bactéria na época chamada de *Corynebacterium aquaticum*, baseado na composição da parede celular e comparações com outras espécies. Um ano mais tarde, Evtushenko et al. (2000), baseando-se nos mesmos princípios e por análises do gene 16S do rRNA, reclassificaram as bactérias então chamadas de *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* e *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* no gênero *Leifsonia*.

A parede celular das bactérias do gênero *Leifsonia* contém ácido diamino-butírico, fosfatil-glicerol e difosfatil-glicerol como base de seus peptidoglicanos, diferenciando-se filogeneticamente de outros gêneros de bactérias da Classe *Actinobacteria* (EVTUSHENKO et al., 2000). As células de Lxx são corineformes, ou seja, duas células podem formar um ângulo entre elas após a divisão celular. Sua parede é pouco permeável e, como toda bactéria Gram-positiva, o peptideoglicano é o componente majoritário desta estrutura, representando entre 40 a 90% do peso seco da parede (ROMEIRO, 2000). As células não apresentam flagelos e possuem uma dimensão aproximada de 1,4 µm de comprimento e 0,25 µm de diâmetro (TEAKLE et al., 1973). Quando cultivadas em meio de cultura sólido MSC New, as colônias são diminutas, brancas e circulares e vistas contra a luz aparecem na forma de diminutos pontos brancos na placa.

2.1.3.2 O genoma de Lxx

Segundo Monteiro-Vitorello et al. (2004), o genoma da estirpe CTC B07 de Lxx apresenta um número elevado de “pseudogenes”, isto é, genes fragmentados ou que apresentam mudanças no sentido de leitura (*frameshift*) ou ainda códons de parada de leitura prematura, prevendo uma porcentagem de 11,6 % em relação ao genoma completo. Esse fato pode estar associado ao ambiente restrito em que a

bactéria vive, já que alguns genes que seriam importantes para um estilo de vida livre parecem ser não-funcionais. Entre estes, podemos citar genes que codificam glicina e betaína, proteínas relacionadas à tolerância ao estresse osmótico; uma fotoliase, que é induzida pela presença de luz e um operon flagelar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2009). Esse processo de decaimento genômico parece similar ao descrito em outras bactérias como *Rickettsia*, *Buchnera*, (ANDERSON; ANDERSON, 1999) e *Mycobacterium leprae* (COLE et al., 2001), todas espécies parasitas obrigatórias.

Também foram identificados genes putativamente ligados à patogenicidade de bactérias, como genes que codificam para a produção de celulase, lisoenzima e pectinase (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Como em *Xylella fastidiosa*, bactéria também restrita ao xilema, a presença destes genes pode ser de fundamental importância para a colonização dos vasos da hospedeira, por permitir o uso de polissacarídeos como fonte de carbono (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2009; SIMPSON et al., 2000). Não obstante a identificação de genes da patogenicidade no genoma de Lxx, é importante ressaltar que o número de genes pertencentes a esta categoria foi o menor descrito para bactérias fitopatogênicas (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), pois foram relatados apenas 105 genes dos quais 18% parecem ser *pseudogenes* (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Outra observação importante oriunda da análise da sequência do genoma de Lxx e com estreita relação com o presente estudo, diz a respeito à hipótese de que a bactéria produza uma substância análoga ou precursora do ácido abscísico (ABA) (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) e que a secreção deste composto seja um principal determinante da doença. A produção de tal composto se daria a partir de um pigmento carotenóide codificado pela presença de um operon constituído por genes similares a genes envolvidos na síntese de pigmentos carotenóides em outras bactérias (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O operon é composto pelos genes *lctB* (licopeno e-ciclase isoprenoide transferase B), *crtYe* (carotenóide C50 epsilon ciclase), *crtB* (fitoeno sintase), *crtI* (fitoeno desidrogenase) e *crtE* (geranil-geranil difosfato sintase; Figura 3). Reforçando esta hipótese, identificou-se na sequência do genoma um gene putativo que codifica para uma desaturase (*desA*): enzima fundamental na síntese de ABA a partir de compostos carotenóides, já que sua atividade permite com que as moléculas precursoras de carotenóides sofram as

modificações necessárias para se transformarem em um análogo de ABA (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2009). Na cianobactéria *Synechocystis* sp., onde o gene *desA* é homólogo ao encontrado em *Lx*, a sua expressão é induzida em estresse gerado por temperaturas baixas, fazendo com que a enzima δ -12 acil-lipídio desaturase (delta-12 acil lipídio desaturase) seja produzida e introduza ligações insaturadas às moléculas de ácido oléico, transformando-as em ácido linoleico e permitindo com que a membrana plasmática adquira maior mobilidade. Também foi associado a atividade da enzima o funcionamento dos sistemas fotossintéticos das bactérias em baixas temperaturas (LOS; MURATA, 2002). Na formação do ABA, a desaturase atua adicionando duas duplas ligações à molécula do ζ -caroteno (zeta-caroteno), transformando-a em um precursor do licopeno, que por sua vez será transformado em γ -caroteno (gama-caroteno), xantoxina e ácido abscísico (Figura 1) (XIONG; ZHU, 2003).

Figura 1 - Rota de síntese do ácido abscísico. As siglas entre as setas se referem aos genes que codificam as respectivas enzimas (*CrtP*: 15-cis-fitoeno desaturase; *Z-ISO*: zeta-caroteno isomerase; *CrtQ*: zeta-caroteno desaturase; *CrtH*: prolicopeno isomerase; *CrtY*: licopeno beta-ciclase; *CrtR*: beta-caroteno hidroxilase; *CrtZ*: beta-caroteno 3 hidroxilase; *Lut5*: beta-anel hidroxilase; *ZEP*: zeatina epoxidase; *NSY*: neoxantina sintase; *NCED*: 9-cis-epoxi-carotenóide dioxigenase; *ABA2*: xantoxina desidrogenase; *AA03*: aldeído-abscísico oxidase)

O ABA e seus análogos podem ser sintetizados por diferentes rotas (ORITANI e KIYOTA, 2003). Plantas superiores, membros do reino Fungi e algas sintetizam ABA a partir de compostos carotenóides estruturados por distintos números de carbonos e utilizando ao menos uma de duas vias metabólicas. A rota do mevalonato (MVA) é

a mais utilizada por fungos e plantas superiores, como por exemplo, os fungos fitopatogênicos *Cercospora rosicola*, *C. cruenta* e *Botrytis cinerea* (YAMAMOTO et al., 2000; ORITANI; KIYOTA, 2003). A outra via é a do não-mevalonato, ou MEP/DOXP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato), que parece ser a mais comum entre procariotos e mais especificamente em actinobactérias. *Micrococcus luteus*, por exemplo, produz um composto carotenóide de 50 carbonos chamado sarcinaxantina (Figura 2) (NETZER et al., 2010) através desta via. *Dietzia* sp. e *Corynebacterium glutamicum*, por sua vez, acumulam os compostos carotenóides de 40 e 50 carbonos licopeno e decaprenoxantina, respectivamente (TAO et al., 2006; NETZER et al., 2010). A organização do operon de genes responsáveis pela produção destes pigmentos é conservada em actinobactérias, incluindo Lxx (Figura 3). No entanto, no caso desta última, não há dados experimentais que indiquem a participação de genes deste operon na produção de pigmentos carotenóides. Uma forma de assegurar-se da origem dos compostos carotenóides é aplicar inibidores da rota metabólica e avaliar a quantidade de produto final produzido (JAMIL et al., 2010). A fosmidomicina e a difenilamina são substâncias inibidoras da rota MEP/DOXP (MUELLER et al., 2000; GALL et al., 2005; TRUTKO et al., 2005) e podem ser utilizadas com o propósito de definir a rota metabólica utilizada por Lxx para a síntese de pigmentos.

Figura 2 - Rota MEP/DOXP de produção de sarcinaxantina em *Micrococcus luteus* e genes envolvidos no processo (adaptado de NETZER et al., 2010)

Figura 3 - Organização de genes nos operons carotenóides das bactérias *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Dietzia* sp., *Corynebacterium glutamicum* e *Micrococcus luteus*. As siglas se referem à: geranyl-geranyl difosfato sintase (*crtE*); fitoeno sintase (*crtB*); fitoeno desidrogenase (*crtI*); carotenóide C50 epsilon ciclase (*crtYe*); licopeno enlongase (*lbtA*, *lbtBC* e *crtEb*); licopeno e-ciclase isoprenoide trasferase B (*lctb*); zeaxantina glicosil transferase (*crtX*); proteína hipotética (*orf4*); carotenóide C50 epsilon ciclase (*crtYe*, *crtYf* e *crtYg*) e geranyl-geranyl difosfato sintase (*crtE2*), sendo que C50 se refere a carotenóides de 50 carbonos (adaptado de TAO et al., 2006)

2.2 Material e métodos

2.2.1 Ação de extratos de sobrenadantes de culturas de Lxx submetidas a estresse na germinação de sementes de alface

Cultivo de Lxx e obtenção do inóculo

Uma cultura inóculo de Lxx foi preparada transferindo-se 200 µL de células de Lxx conservadas em glicerol 25% a 50 mL de meio de cultura MSC New modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). A composição deste meio é de 8 g peptona de soja; 0,2 g sulfato de magnésio (MgSO₄); 10 mL de solução fosfato de potássio monobásico 0,13 M (KH₂PO₄); 10 mL de solução fosfato de potássio dibásico 0,87 M (K₂HPO₄) e 0,03 g hemina bovina dissolvida em 30 mL de solução hidróxido de sódio NaOH 0,05M e água para completar o volume de 900 mL. O pH é ajustado a 7,5 com NaOH 1 M e, após a autoclavagem, adiciona-se 100 mL de um suplemento

composto por 2 g de albumina bovina; 5 g de glicose; 0,5 g de cisteína e 0,5 g de metionina. Este suplemento é esterilizado por filtração (Millipore 0,22 μ M).

Culturas líquidas de Lxx incubadas na presença de NaCl, PEG e sem a presença destes compostos foram estabelecidas a partir de 1500 mL de MSC New líquido modificado que foram divididos em três volumes iguais em erlenmeyers. Em um frasco adicionou-se 100 mM de NaCl, em outro 7% de PEG 6000 (p/v) e o terceiro meio foi mantido sem adições. Posteriormente, o volume de cada frasco foi subdividido em dois volumes iguais em frascos erlenmeyer de 500 mL; sendo que um foi semeado com 3 mL do inóculo de Lxx (D.O. aproximadamente = 0,7) e o outro não. Os frascos foram incubados por 10 dias em shaker sob rotação de 400 rpm a 28°C e, após este período, uma amostra de 2 mL de cada frasco foi avaliada em espectrofotometria para obtenção da densidade ótica (D.O.).

O conteúdo dos frascos foi centrifugado em tubos falcon a 3500 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, acidificados com ácido clorídrico (pH = 2,5) e extraídos com acetato de etila por duas vezes, utilizando volumes iguais de sobrenadante e solvente. Ao se misturar o sobrenadante com acetato, forma-se um sistema bifásico, onde o extrato fica na parte superior. Este foi transferido para um béquer e evaporado em capela, no escuro, à temperatura ambiente. O extrato foi ressuscitado em 15 mL de solução artificial de xilema (AX: 1mM CaCl_2 ; 1mM KH_2PO_4 ; 1 mM K_2HPO_4 ; 1mM MnSO_4 ; 0,1mM MgSO_4 e pH = 6,8; DODD, 2003). Esse processo de extração se encontra ilustrado no esquema da Figura 4. As células recuperadas na primeira centrifugação foram lavadas em uma solução NaCl 100 mM e preservadas em freezer a -80°C para futuras análises de conteúdo de compostos carotenóides (Item 2.2.3).

Figura 4 - Esquema de extração dos sobrenadantes de meio de cultura com acetato de etila

Efeito do extrato na germinação de sementes de alface

Vinte sementes de alface da variedade Marisa (Horticeres) contidas em um tubo eppendorf foram embebidas em 1,5 mL dos extratos por 24 horas a 25°C e transferidas para folhas de papel filtro em placas de petri descartáveis. As placas foram incubadas sob as mesmas condições por 4 dias. A germinação das sementes foi avaliada por contagem do número de sementes germinadas e não germinadas e também pela medida de comprimento das radículas. A análise dos dados foi feita com o uso do programa estatístico SAS pelo método de comparação entre médias

de Fisher ($p=0,05$). Os dados referentes à porcentagem de germinação de sementes foram transformados seguindo a recomendação para dados de porcentagem (BARBIN, 2009; GARCIA et al., 2009), utilizando a fórmula $\arcsin \sqrt{\frac{p}{100}}$, onde $\arcsin$ é o arco seno e p o dado de porcentagem. Como controles adicionais, as sementes também foram incubadas, sob as mesmas condições, em 1,5 mL de água, de solução AX e de solução de ABA 100 μM . Desta forma, a germinação das sementes foi avaliada frente a nove tratamentos (Tabela 1). Foram preparados quatro tubos com sementes por cada tratamento, cada um representando uma repetição.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio de ação de extratos de sobrenadantes de culturas de Lxx submetidas a estresse na germinação de sementes de alface

Tratamento	Sigla	Descrição
Tratamento 1	Lxx	Extrato de cultura de Lxx
Tratamento 2	Lxx +NaCl	Extrato de cultura de Lxx com 100 mM de NaCl.
Tratamento 3	Lxx + PEG	Extrato de cultura de Lxx com de 7 % de PEG 6000
Controle 1	ABA	Solução 100 μM de ABA
Controle 2	água	Água
Controle 3	AX	Solução artificial de xilema
Controle 4	meio	Extrato do meio
Controle 5	meio + sal	Extrato do meio com 100 mM de sal
Controle 6	meio + PEG	Extrato do meio com 7% de PEG 6000

2.2.2 Ensaio de termoestabilidade

Este ensaio teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica do efeito tóxico do extrato produzido pela bactéria quando cultivada na presença de PEG 6000 sobre sementes de alface (Figura 5). O extrato foi preparado pela inoculação de 400 mL de meio MSC New adicionado de 7% de PEG 600 com 2 mL de inóculo (D.O. aproximadamente = 0,7). A cultura foi incubada em shaker rotativo a 28°C e 400 rpm por 10 dias. O preparo do inóculo e do extrato seguiu a metodologia descrita no item

2.2.1. O extrato foi submetido a diversas temperaturas e depois utilizado em um ensaio de germinação de sementes de alface que foi conduzido conforme descrito anteriormente. Como controles, foram utilizadas solução artificial de xilema AX e de 100 μ M de ABA a (Tabela 2).

Volumes de 1,5 mL de cada solução (extrato de Lxx, solução AX e ABA 100 μ M) foram transferidos para tubos eppendorf e estes foram expostos às seguintes temperaturas: temperatura ambiente; a 30°C; 60°C; 90°C e autoclavagem à 121°C por 30 minutos (Tabela 2), utilizando-se três tubos (repetições) de cada solução por tratamento térmico. Depois da exposição aos tratamentos térmicos, os tubos foram resfriados até atingirem a temperatura ambiente. Vinte sementes de alface da variedade Marisa (Horticeres) foram adicionadas a cada tubo e incubadas por 24 horas, sob temperatura ambiente com fotoperíodo de 12 horas. As sementes foram então plaqueadas sobre duas folhas de papel filtro previamente esterilizadas dentro de placas de petri e incubadas sob as mesmas condições (Figura 5). A porcentagem de germinação e o comprimento médio das radículas das plântulas foram avaliados quatro dias após. A análise dos dados foi feita com o uso do programa estatístico SAS e as médias foram comparadas pelo teste LSD de Fisher ($p=0,05$). Assim como no ensaio anterior, os dados relativos à porcentagem de germinação foram transformados usando a fórmula $\arcsin \sqrt{\frac{p}{100}}$, onde arcsin é o arco seno e p o dado de porcentagem.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos

Tratamentos	Descrição
Lxx + PEG ta	Extrato de cultura de Lxx tratado a temperatura ambiente
Lxx + PEG 30	Extrato de cultura de Lxx tratado a 30°C
Lxx + PEG 60	Extrato de cultura de Lxx tratado a 60 °C
Lxx + PEG 90	Extrato de cultura de Lxx tratado a 90 °C
Lxx + PEG 121	Extrato cultura de Lxx tratado a 121 °C (autoclavado)
ABA ta	solução ABA 100 µM tratada a temperatura ambiente
ABA 30	solução ABA 100 µM tratada a 30°C
ABA 60	solução ABA 100 µM tratada a 60°C
ABA 90	solução ABA 100 µM tratada a 90°C
ABA 121	solução ABA 100 µM tratada a 121°C (autoclavada)
AX ta	solução AX tratada a temperatura ambiente
AX 30	solução AX tratada a 30 °C
AX 60	solução AX tratada a 60 °C
AX 90	solução AX tratada a 90 °C
AX 121	solução AX a 121°C (autoclavada)

Figura 5 - Tratamentos e metodologia do ensaio da termoestabilidade do extrato de Lxx.

2.2.3 Produção de pigmentos isoprenóides por Lxx

Um primeiro ensaio foi conduzido com o objetivo de analisar a produção de pigmentos isoprenóides *in vitro* por Lxx quando cultivada na presença de PEG 6000 ou NaCl. Um segundo ensaio avaliou o efeito da fosmidomicina e difenilamina na produção destes pigmentos.

Avaliação da produção de isoprenóides em meio de cultura adicionado de PEG ou NaCl

A extração de isoprenóides foi realizada de acordo com Medicharla (1991) com modificações a partir do pellet de massa bacteriana obtido em experimento descrito anteriormente (item 2.2.1). Diferente destes autores, aqui a análise não foi feita por HPLC, mas sim por medida de absorbância por espectrofotometria, por não haver necessidade de quantificar e especificar o carotenóide. O pellet bacteriano foi lavado em uma solução salina 100 mM, congelado em nitrogênio líquido e pulverizado com um bastão de vidro. Os pigmentos foram extraídos em metanol agitando-se as células por vortex por alguns minutos. A mistura de células e metanol foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos e o processo de extração foi repetido novamente. A proporção de metanol utilizada foi de 100 mL por cada 1 g de pellet e o sobrenadante foi analisado em espectrofotometria entre os comprimentos de onda 300 e 600 nm, com intervalo de 50 nm.

Os tratamentos utilizados como controle foram amostras de cenoura e de células de *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc) devido ao fato de se conhecer a presença de carotenos na cenoura e pela formação de colônias amarelas em Lxc. A cultura de Lxc foi obtida como descrito para Lxx. Estas amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e os pigmentos foram extraídos da mesma forma que as células de Lxx.

Avaliação da produção de isoprenóides em meio de cultura adicionado de inibidores da via *MEP/DOXP*

Células de Lxx foram cultivadas na presença de fosmidomicina ou difenilamina com a finalidade de avaliar o efeito destes antibióticos na produção de pigmentos isoprenóides. Para tanto, 120 mL de meio MSC New sem o suplemento foram divididos em volumes iguais em 4 frascos erlenmeyer. Os inibidores foram

adicionados aos suplementos do meio, nas concentrações de 50 mg/L de fosmidomicina (TRUTKO et al., 2005) e 50 e 75 μ M de difenilamina (GALL et al., 2005), em relação ao volume final de meio de cultura. Um frasco foi mantido sem adições como controle. Os suplementos foram esterilizados por filtração (Millipore; 0,22 μ M) e cada frasco foi inoculado com Lxx, utilizando-se 500 μ L de inóculo (D.O. aproximadamente= 0,7) preparado conforme descrito anteriormente (Item 2.2.1). Os frascos foram incubados em shaker a 28 °C em rotação a 400 rpm por 10 dias. Posteriormente, os conteúdos foram vertidos em tubos falcon, centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm para obtenção do pellet bacteriano. O pellet foi lavado em solução salina e os pigmentos carotenóides foram extraídos com metanol conforme descrito anteriormente. A absorbância dos extratos celulares foi determinada em espectrofotômetro em comprimentos de onda que variaram de 360 nm até 550 nm, a intervalos de 5 nm, sendo que foi feita uma leitura por cada tratamento. Em uma tentativa de refinar os resultados deste ensaio em relação ao anterior, reduziu-se o intervalo entre cada leitura e o espectro analisado.

2.2.4 Efeito da adição de fosmidomicina

O objetivo deste ensaio foi avaliar o efeito da adição de fosmidomicina ao meio de cultura no efeito tóxico do extrato de cultura líquida de Lxx na germinação de sementes de alface e na produção de compostos carotenóides.

Os tratamentos consistiram de extratos de sobrenadantes de meio inoculado com Lxx (Lxx); de meio adicionado de 7% de PEG 6000 e inoculado com Lxx (Lxx + PEG); de meio adicionado de fosmidomicina na concentração de 50 mg/L em relação ao volume total de meio e inoculado com Lxx (Lxx + Fos) e de meio adicionado de 7% de PEG 6000 e 50 mg/L de fosmidomicina inoculado com Lxx (Lxx + PEG + Fos). Como controles, foram utilizados uma solução 100 μ M de ABA (ABA), água (água), e extratos de meio de cultivo não inoculado (meio) e de meio não inoculado acrescido de 7% de PEG 6000 (meio + PEG) ou fosmidomicina (meio + Fos) ou ambos (meio + PEG + Fos) (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição dos tratamentos

Tratamento	Sigla	Descrição
Tratamento 1	Lxx	Extrato de cultura de Lxx
Tratamento 2	Lxx + PEG	Extrato extrato de cultura de Lxx com 7 % de PEG 6000
Tratamento 3	Lxx + Fos	Extrato de cultura de Lxx com fosmidomicina
Tratamento 4	Lxx + PEG + Fos	Extrato de cultura de Lxx com 7% de PEG 6000 e fosmidomicina
Controle 1	ABA	Solução ABA 100 μ M
Controle 2	água	Água
Controle 3	meio	Extrato do meio
Controle 4	meio + PEG	Extrato do meio com 7% de PEG 6000
Controle 5	meio + Fos	Extrato do meio com fosmidomicina
Controle 6	meio + PEG + Fos	Extrato do meio com 7% de PEG 6000 e fosmidomicina

Cultivo de Lxx

Foram preparados 800 mL de meio MSC New divididos em dois volumes, sendo que um volume foi adicionado de 7% de PEG (p/v) e o outro foi mantido sem adições. Cada volume foi posteriormente subdividido em quatro frascos. Fosmidomicina foi adicionada ao suplemento do meio de quatro frascos, dois contendo PEG e dois não. Os quatro frascos restantes receberam suplemento sem fosmidomicina (Figura 6). Os meios foram inoculados com 2 mL de inóculo de Lxx preparado conforme descrito anteriormente no item 2.2.1 (D.O. aproximadamente = 0,7) e as culturas foram incubadas a 28 °C sob rotação de 400 rpm por um período de 13 dias. Extratos dos sobrenadantes foram obtidos como descrito no item 2.2.1. e as células foram preservadas em freezer a -80°C para análises de produção de pigmentos carotenóides.

Figura 6 - Delineamento do experimento de avaliação do efeito de extratos de cultura de Lxx cultivada na presença de fosmidomicina na germinação de sementes de alface e na produção de carotenóides

Efeito do extrato na germinação de sementes de alface

Vinte sementes de alface da variedade Americana Delícia (Isla) contidas em tubos eppendorf (4 tubos para cada tratamento) foram embebidas em 1,5 mL de cada extrato por 12 horas a 25°C sob um regime de luz de 12 horas e transferidas para folhas de papel filtro em placas de petri. As placas foram distribuídas de forma aleatória e incubadas sob as mesmas condições por 4 dias. A germinação das sementes foi avaliada por contagem de sementes germinadas e não germinadas e também pela medida de comprimento das radículas. Como controles, as sementes foram incubadas sob as mesmas condições em água destilada esterilizada (pH 7) e uma solução de ABA 100 mM. A análise dos dados foi feita com o uso do programa estatístico SAS pelo teste de médias LSD de Fisher ($P=0,05$). Assim como nos ensaios anteriores, os dados de porcentagem foram transformados segundo a fórmula $\arcsin \sqrt{\frac{p}{100}}$, onde arcsin é o arco seno e p o dado de porcentagem.

Avaliação da produção de isoprenóides

Os pellets de massa recuperados das culturas foram extraídos com metanol e avaliados para a concentração de pigmentos conforme descrito anteriormente no item 2.2.3.

2.3 Resultados

2.3.1 Ação de extratos de sobrenadantes de culturas de Lxx submetidas a estresse na germinação de sementes de alface

Efeito na germinação

Os resultados da análise estatística evidenciaram que não houve diferença entre os tratamentos-controle de 3 a 6 (meio, meio + sal e meio + PEG) e que o tratamento 1 (Lxx) e o controle 2 (água) foram semelhantes a estes (Tabela 4; Figura 7A). A alta taxa de germinação verificada nestes tratamentos comprovou a viabilidade das mesmas (Tabela 4). Já a germinação nos tratamentos onde foi aplicado extrato de sobrenadante de Lxx cultivada na presença de NaCl e PEG e (tratamentos 2 e 3) foi significativamente reduzida em relação a estes tratamentos, mostrando que a adição de agentes estressantes ao meio de cultura tornou o extrato tóxico às sementes. A redução na germinação, no entanto, foi mais acentuada no tratamento 3, pois este não diferiu do tratamento controle 1 com ABA.

Efeito no comprimento da radícula

A exemplo da variável anterior, não houve diferença estatística entre os tratamentos controle de 2 a 6 e o tratamento 1 mas que o comprimento da radícula foi reduzido em relação a estes nos tratamentos 2 e 3. De igual forma, o tratamento com PEG reduziu de forma mais acentuada o comprimento da radícula, uma vez que não diferiu estatisticamente do tratamento com ABA (controle 1) (Tabela 4; Figura 7B).

Tabela 4 - Porcentagem de germinação média e comprimento de radícula médio das sementes embebidas em seus respectivos tratamentos

Tratamentos	Porcentagem de germinação média	Pt (Dados de porcentagem transformados)	Comprimento de radículas médio (cm)
Tratamento 1 (Lxx)	68,75	0,99 b	0,68 a
Tratamento 2 (Lxx + NaCl)	30,00	0,57 c	0,40 b
Tratamento 3 (Lxx + PEG)	10,00	0,31 cd	0,20 bc
Controle 1 (ABA)	0,00	0,00 d	0,00 c
Controle 2 (água)	93,75	1,35 a	2,88 a
Controle 3 (AX)	85,00	1,23 ab	1,54 a
Controle 4 (meio)	85,00	1,25 ab	1,39 a
Controle 5 (meio + NaCl)	72,50	1,07 ab	1,19 a
Controle 6 (meio + PEG)	82,50	1,23 ab	1,27 a

Tratamentos com as mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si segundo teste LSD de Fisher (P=0,05).

Figura 7 - Porcentagem de germinação média (A) e comprimento médio da radícula (B) de sementes de alface embebidas em diversos extratos de sobrenadante de culturas líquidas de Lxx e soluções-controle. Tratamentos com as mesmas letras não diferem entre si segundo o teste de Fisher ($P=0,05$)

2.3.2 Ensaio de termoestabilidade

Efeito na germinação

A elevada percentagem de germinação dos tratamentos com a solução AX comprovou a viabilidade das sementes (Tabela 5). No entanto, estes tratamentos diferiram dos tratamentos com extratos de cultura de Lxx cultivada na presença de PEG, onde a germinação foi reduzida em aproximadamente 30%, em média. Houve diferença estatística dentre estes tratamentos, sendo que a germinação foi menor nos tratamentos Lxx + PEG ta e Lxx + PEG 90 (Tabela 5). Como esperado, os tratamentos com ABA inibiram completamente a germinação das sementes, independente da temperatura de exposição. As diferenças entre os tratamentos dos extratos de Lxx e os controles são melhor evidenciados na Figura 8A.

Efeito no comprimento da radícula

A termoestabilidade do efeito tóxico dos extratos ficou mais evidente quando da avaliação do comprimento das radículas (Figura 8B). Estatisticamente, houve diferença entre todos tratamentos e os controles com solução AX. Entretanto, nos tratamentos Lxx + PEG 30; Lxx + PEG 60 e Lxx + PEG 90 a ação deletéria na variável foi mais acentuada, uma vez que estes tratamentos não diferiram estatisticamente dos tratamentos com ABA (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem média de germinação e comprimento médio das radículas das sementes, embebidas em seus respectivos tratamentos

Tratamento	Porcentagem média de germinação	Pt (Dados de porcentagem transformados)	Comprimento de radículas médio (cm)
Lxx + PEG ta	56,57	0,85 d	0,54 e
Lxx + PEG 30	73,33	1,03 c	0,47 ef
Lxx + PEG 60	73,33	1,04 c	0,40 ef
Lxx + PEG 90	60,00	0,89 d	0,47 ef
Lxx + PEG 121	70,00	0,99 cd	0,71 e
ABA ta	0	0,00 e	0 f
ABA 30	0	0,00 e	0 f
ABA 60	0	0,00 e	0 f
ABA 90	0	0,00 e	0 f
ABA 121	0	0,00 e	0 f
AX ta	95	1,39 b	5,47 a
AX 30	95	1,35 b	5,02 ab
AX 60	95	1,39 b	4,57 bc
AX 90	93,33	1,31 b	3,87 d
AX 121	100	1,57 a	4,12 cd

Tratamentos seguidos de mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si segundo teste LSD de Fisher (P=0,05).

Figura 8 - Porcentagem de germinação média das sementes de alface embebidas em seus respectivos tratamentos (A) e comprimento médio de radículas (B). Tratamentos com as mesmas letras não diferem entre si segundo o teste de Fisher ($P=0,05$)

2.3.3 Produção de pigmentos isoprenóides por Lxx

Avaliação da produção de pigmentos isoprenóides em meio de cultura

As densidades ópticas dos meios de cultivo medidas após a incubação foram de 1,26 para o tratamento controle Lxx; 0,73 para a cultura incubada na presença de 7% PEG 6000 e 0,58 para a cultura incubada na presença de NaCl.

As curvas de absorbância dos tratamentos (Figura 9) indicaram que os extratos dos controles cenoura e Lxc diferiram das curvas de Lxx, indicando que o pigmento produzido por Lxx é distinto de beta-caroteno (cenoura) e de pigmento(s) ainda não caracterizados de Lxc. De fato, em relação a estas últimas, o maior valor de D.O. no caso de Lxx foi no comprimento de onda de 400 nm, enquanto que nos extratos de cenoura e células de Lxc o pico de leitura ocorreu no comprimento de 420 e 440 nm respectivamente. Os valores de D.O. em 400 nm de extratos de células de Lxx foram alterados em função dos tratamentos. Em células cultivadas em meio sem adição de PEG ou NaCl, a absorbância foi de 0,63, ao passo que em células cultivadas na presença de NaCl ou PEG, este valor foi de 0,30 (Figura 9).

Figura 9 - Espectros de absorbância de extratos metanólicos de células de cenoura, de *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc) e de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* submetidas (Lxx + NaCl e Lxx + PEG) ou não (Lxx) a estresse

Avaliação da produção de isoprenóides em meio de cultura adicionado de inibidores da via *MEP/DOXP*

As densidades ópticas das culturas de Lxx incubadas sem a adição de inibidores e na presença de fosmidomicina foram de 1,29 e 1,38, respectivamente, evidenciando que não houve efeito da adição do antibiótico ao meio no crescimento bacteriano. Já nos tratamentos com 50 μM e 75 μM de difenilamina, este efeito foi bem pronunciado a julgar pelas reduzidas densidades de 0,83 e 0,62, respectivamente.

Foi possível observar que todos os espectros se apresentaram na faixa dos comprimentos de onda entre 350 e 500 nm (Figura 10), assim como no ensaio anterior.

Figura 10 - Curvas de absorvância de extratos metanólicos de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* submetidas (Lxx difenilamina 50 μM e 75 μM e Lxx fosmidomicina) ou não (Lxx) a inibidores da rota *MEP/DOXP*

O extrato de células cultivadas na ausência de inibidores apresentou uma leitura de absorvância máxima na faixa de 400 nm igual a 0,82. Já o extrato das células cultivadas na presença de fosmidomicina, a absorvância neste comprimento de onda foi bem inferior (0,23). Os extratos das células com 50 μM e 75 μM de difenilamina também apresentaram valores bem inferiores (0,37 e 0,30 respectivamente).

2.3.4 Efeito da adição de fosmidomicina

As densidades ópticas dos meios de cultura com Lxx após a incubação foram de 1,24 para meio sem adições (Lxx); 0,53 para o meio com PEG (Lxx + PEG); 1,42 para o meio com fosmidomicina (Lxx + Fos) e 0,64 para o meio com PEG e fosmidomicina (Lxx + PEG + Fos).

Efeito do extrato na germinação de sementes de alface

A porcentagem média de germinação das sementes dos tratamentos controle de 2 a 6 (água, meio, meio + PEG, meio + Fos e meio + PEG + Fos) foi de 100% e o comprimento médio das radículas foi de 5,6 cm, comprovando a viabilidade das mesmas (Tabela 6). A germinação das sementes incubadas no tratamento 2 (Lxx + PEG) foi reduzida em aproximadamente 30%, em média, em relação ao controle 2 (água) e ao controle 4 (meio + PEG) (Tabela 6; Figura 11A). Estatisticamente, os controles 2 – 6 e os tratamentos 1 e 3 (Lxx e Lxx + Fos respectivamente) não diferiram. Já os tratamentos 2 e 4 (Lxx + PEG e Lxx + PEG + Fos respectivamente) foram intermediários e foi possível detectar uma redução na porcentagem de germinação média das sementes destes tratamentos em relação aos mencionados anteriormente. O ABA (controle 1) inibiu completamente a germinação das sementes, como esperado (Tabela 6; Figura 11 A).

Efeito no comprimento de radícula

Com relação ao comprimento das radículas, os resultados foram semelhantes àqueles obtidos em relação à germinação das sementes, com uma interessante diferença entretanto: o tratamento 2 (Lxx + PEG) e o controle 1 (ABA) apresentam semelhança estatística, demonstrando o efeito deletério do extrato sob o desenvolvimento das plântulas (Tabela 6). Todos os tratamentos se mostraram estatisticamente diferentes dos controles; os tratamentos 1 e 4 são semelhantes (Lxx e Lxx + PEG + Fos respectivamente) e o tratamento 3 (Lxx + Fos) difere de todos. A figura 11B reflete o demonstrado pela análise estatística, mostrando o efeito tóxico dos extratos representado pelos tratamentos 1 – 4 sobre as plântulas de alface. As diferenças entre os comprimentos de plântulas podem ser visualizadas nas figuras 12A – 12J, onde é possível comparar os tratamentos com os controles.

Tabela 6 - Porcentagem de germinação média e comprimento médio de radículas de sementes

Tratamentos	Descrição	Porcentagem de germinação média	Pt (Dados de porcentagem transformados)	Comprimento médio das radículas (cm)
Tratamento 1 (Lxx)	Extrato de Lxx	98,75	1,51 a	1,30 d
Tratamento 2 (Lxx +PEG)	Extrato de Lxx com 7% de PEG 6000	67,5	0,96 c	0,30 e
Tratamento 3 (Lxx + Fos)	Extrato de Lxx com fosmidomicina	100	1,57 a	2,18 c
Tratamento 4 (Lxx + PEG + Fos)	Extrato de Lxx com 7% de PEG 6000 e fosmidomicina	87,5	1,26 b	0,90 d
Controle 1 (ABA)	ABA 100 μ M	0	0 d	0,00 e
Controle 2 (Água)	Água	100	1,57 a	5,63 a
Controle 3 (meio)	Extrato de meio	100	1,57 a	5,32 a
Controle 4 (meio + PEG)	Extrato do meio com 7% de PEG 6000	100	1,57 a	5,39 a
Controle 5 (meio + Fos)	Extrato do meio com fosmidomicina	100	1,57 a	4,54 b
Controle 6 (meio + PEG + Fos)	Extrato do meio com 7% de PEG 6000 e fosmidomicina	100	1,57 a	5,16 a

Tratamentos com as mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si segundo teste LSD de Fisher (P=0,05).

Figura 11 - Porcentagem de germinação média das sementes de alface embebidas em seus respectivos tratamentos (A) e comprimento médio de radícula (B). Tratamentos com as mesmas letras não diferem entre si segundo o teste LSD de Fisher ($P=0,05$)

Figuras 12A e 12B - Sementes embebidas em solução de ABA 100 μ M e em água

Figuras 12C e 12D - Sementes embebidas no extrato com estresse inoculado (Lxx + PEG) e não inoculado (meio + PEG)

Figuras 12E e 12F - Sementes embebidas no extrato com estresse e na presença de fosmidomicina inoculado (Lxx + PEG + Fos) e não inoculado (meio + PEG + Fos)

Figuras 12G e 12H - Sementes embebidas no extrato sem estresse inoculado (Lxx) e não inoculado (meio)

Figuras 12I e 12J - Sementes embebidas no extrato sem estresse e na presença de fosmidomicina inoculado (Lxx + Fos) e não inoculado (meio + Fos)

Avaliação da produção de isoprenóides em meio de cultura adicionado de inibidores da via *MEP/DOXP*

Com base nos espectros de absorvância, detectou-se uma redução no conteúdo de compostos isoprenóides das células de Lxx quando cultivadas na presença de fosmidomicina em relação à células cultivadas sem sua adição (Figura 13). O maior valor de absorvância foi observado no comprimento de onda de 400 nm, conforme determinado no ensaio anterior. O extrato das células cultivadas na ausência de PEG e de fosmidomicina apresentou um valor de D.O. igual a 0,70 neste comprimento de onda, ao passo que a D.O. do extrato das células cultivadas sem estresse na presença da fosmidomicina foi de 0,20.

Figura 13 - Conteúdo relativo de compostos isoprenóides nas células de Lxx cultivadas sem estresse (Lxx) e com estresse (Lxx + PEG). A sigla Fos representa os tratamentos com a presença de fosmidomicina (Lxx + Fos e Lxx + PEG + Fos)

2.4 Discussão

Em resposta aos mecanismos desenvolvidos pelas plantas para se defender do ataque de microorganismos, bactérias fitopatogênicas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, estratégias para garantir o sucesso de sua infecção, colonização e sobrevivência nos tecidos hospedeiros (NOMURA et al., 2005). A supressão do sistema imune das plantas é uma destas estratégias e isto é realizado mediante sinalizações químicas, por meio de moléculas que são produzidas pelas bactérias como, por exemplo, as toxinas e os efetores (MONTESANO et al., 2003; MEJÍA-TENIENTE et al., 2010). São muitos os sintomas causados por toxinas bacterianas em plantas, entre eles a necrose, clorose e inibição do crescimento (WULFF, 2008; KADO, 2010).

Sob estresse, bactérias podem produzir toxinas ou outras substâncias com distintas finalidades, como autopreservação ou ataque a seus hospedeiros. *Corynebacterium glutamicum*, por exemplo, produz trealose em resposta a estresse osmótico para manter intacta a estrutura de sua célula e conservar sua turgidez (WOLF et al., 2003). Bactérias endofíticas encontradas na rizosfera de girasol

produzem ABA e ácido jasmônico (JA), sendo que sobre estresse osmótico provocado por PEG a quantidade desses hormônios produzidos *in vitro* é ainda maior (FORCHETTI et al., 2007). Com os relatos encontrados na literatura e o fato da doença causada por Lxx ser mais severa em condições de seca (BRUMBLEY et al., 2003), simulou-se o estresse de Lxx *in vitro* com PEG ou NaCl a fim de avaliar o efeito na produção de uma suposta toxina que, de acordo com hipótese levantada por Monteiro-Vitorello et al. (2004) com base em uma análise da sequência do genoma da bactéria, seria análoga ao ABA. Ainda segundo os autores, a suposta toxina seria produzida a partir de um pigmento isoprenóide ainda não caracterizado, cuja síntese se daria a partir de um operon contendo genes envolvidos na síntese destes pigmentos normalmente encontrado em espécies bacterianas. A secreção deste composto nos tecidos da planta resultaria no principal sintoma da doença, isto é, o raquitismo, uma vez que o ácido abscísico está diretamente envolvido no controle do crescimento vegetativo (ADDICOTT; LYON, 1969; BELLANDI; DORFFLING, 1974; LEUNG; GIRAUDAT, 1998; TAIZ; ZEIGER, 2004; RAGHAVENDRA et al., 2010).

O extrato orgânico de sobrenadante do meio de cultura de Lxx cultivada sob condições de estresse osmótico induzido seja por PEG ou por NaCl, mostrou uma clara ação tóxica sobre as sementes de alface, inibindo a sua germinação e reduzindo o tamanho das radículas, um efeito senão da mesma magnitude ao menos de mesma natureza daquele causado pelo tratamento das sementes com ABA. Quando o extrato foi submetido ao calor, sob distintas temperaturas, o efeito tóxico não mostrou redução significativa, mostrando ter estabilidade térmica assim como o ABA (ADDICOTT; LYON, 1969; BURDEN; TAYLOR, 1976; ZEEVAART, 1988).

O conteúdo de células de Lxx incubadas ou não sob estresse causado por NaCl ou PEG foram avaliados em espectrofotometria, visando detectar presença de compostos isoprenóides. A análise do conteúdo das células incubadas sem estresse revelou um pico no comprimento de onda de 400 nm, o qual se enquadra no espectro típico de pigmentos carotenóides, que está entre 300 e 600 nm (NELSON; COX, 2004). Em relação às células incubadas sem estresse, esses picos se mostraram bem menores, principalmente quando as células foram cultivadas com PEG. Outras actinobactérias apresentam pigmentos isoprenóides em suas células, caracterizados por seus espectros de absorbância típicos (Figura 14), como por

exemplo *Leifsonia poae*, *L. aquatica* e *Curtobacterium flaccumfaciens* (TRUTKO et al., 2005). Apesar de se enquadrar no mesmo espectro, o comprimento de onda dos picos de absorbância observados na Figura 14 diferem do encontrado em Lxx. Possivelmente isso se deve à forma de extração dos pigmentos, já que as análises feitas neste trabalho não visaram análises em HPLC. Da mesma forma, deve ser considerado que estess pigmentos podem sofrer alterações metabólicas conforme são sintetizados. Desta forma, o momento em que a análise é efetuada tem grande interferência, pois conformação da molécula pode variar de acordo com o tempo de retenção da amostra (TRUTKO et al., 2005; TAO et al., 2006). A natureza dos pigmentos detectados em Lxx e a sua rota metabólica de síntese confirmaram-se com o uso dos inibidores da rota MEP/DOXP das *Microbacteriaceae* difenilamina e fosmidomicina (TRUTKO et al., 2005; BROWN; PARISH, 2008; VIDHYAVATHI et al., 2009). As células de Lxx cultivadas com ambas as substâncias mostraram uma redução expressiva na quantidade de pigmentos em relação às células incubadas sem adições, demonstrando a influência dos inibidores em sua síntese. A inibição com fosmidomicina mostrou-se mais eficiente, não só por reduzir de forma mais expressiva a quantidade de pigmentos em relação ao conteúdo das células incubadas sem adição, mas também pelo fato de não ter reduzido a multiplicação das células. Todavia, a redução na multiplicação das células observada nos tratamentos com difenilamina pode ser explicado em parte pelo fato desta ser pouco solúvel em água (FAO, 2012) e, apesar da quantidade mínima aplicada ao meio, encontrava-se diluída em metanol, que é uma substância tóxica para as células.

A fim de estabelecer uma relação entre a síntese de pigmentos e o efeito tóxico do sobrenadante de culturas líquidas de Lxx, conduziu-se um ensaio para avaliar o efeito da fosmidomicina na toxidez dos extratos. Ao se aplicar extratos de culturas cultivadas na presença do inibidor em sementes de alface, notou-se um menor efeito tóxico em relação às sementes nas quais se aplicou o extrato sem a adição de fosmidomicina. Novamente foi analisado o conteúdo de pigmentos carotenóides das células e, como esperado, houve uma redução no conteúdo de pigmentos das células incubadas na presença de fosmidomicina e de PEG.

Foi demonstrado que a produção de pigmentos carotenóides em várias actinobactérias ocorre pela via MEP/DOXP (ORITANI; KYOTA, 2003; TRUTKO et al., 2005), entre elas as espécies de *Leifsonia L. poae* e *L. aquatica* (TRUTKO et al., 2005). Os resultados do presente estudo corroboram a hipótese inicial de que Lxx

produz compostos isoprenóides a partir dessa via metabólica. Ainda foi possível estabelecer uma relação entre a produção desses pigmentos e a toxidez do extrato de culturas líquidas de Lxx, indicando que a síntese destes pigmentos acarreta na produção de um composto que, ao ser aplicado em sementes afetou negativamente a germinação e desenvolvimento das plântulas. Em conjunto, a hipótese formulada por Monteiro-Vitorello et al. (2004) é ratificada pelo presente estudo, pois propõe que a bactéria Lxx seja capaz de produzir um derivado de isoprenóide com ação inibitória ao crescimento de sua hospedeira. Este composto seria produzido por Lxx e transportado pela planta através do xilema, onde a bactéria se encontra restrita (BRUMBLEY et al., 2003; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2009), afetando seu crescimento e causando os sintomas de raquitismo (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Como a análise do seu genoma mostrou a presença do sistema de secreção tipo I (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004; KADO, 2010) este é o provável mecanismo pelo qual a bactéria excreta o composto tóxico, já que este sistema é típico em bactérias Gram-positivas para translocação de proteínas, lipídios, toxinas e outros produtos metabólicos desde o citoplasma e através das membranas (KADO, 2010).

Figura 14 – Espectro de absorção de pigmentos das bactérias *Leifsonia poae* e *L. aquatica* (curva 1) e *Curtobacterium flaccumfaciens* (curva 4) mostrando picos nos comprimentos 460 e 482 e 449 e 477 nm respectivamente (TRUTKO et al., 2005)

3 CONCLUSÕES

Conclui-se que Lxx sob condições de estresse, produz extratos tóxicos que afetam o crescimento vegetal. Por estar presente em sobrenadantes, depreende-se sejam secretados no meio.

Estes extratos não são de natureza protéica, já que sua ação não foi afetada pelo calor.

É possível determinar a presença de compostos isoprenóides em células de Lxx e ao submete-las a estresse, a quantidade dos mesmos é reduzida.

Dos inibidores da rota MEP/DOXP empregados, a fosmidomicina foi o que apresentou maior funcionalidade, por não prejudicar o crescimento bacteriano e reduzir de forma contundente a produção de pigmentos carotenóides nas células de Lxx.

A adição de fosmidomicina ao meio incubado com Lxx também resultou em uma menor toxidez do extrato do sobrenadante quando aplicado a sementes, sustentando a hipótese formulada por Monteiro-Vitorello et al. (2004) de que a bactéria é capaz de produzir um derivado de isoprenóide com ação tóxica a células vegetais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o extrato do sobrenadante de culturas líquidas de Lxx tem um efeito tóxico sobre sementes de alface. Foi relacionada a toxidez desse extrato com a quantidade de pigmentos carotenóides presente nas células de Lxx, portanto um ou mais componentes do extrato podem ter sua origem em um composto carotenóide. Futuras análises podem determinar estes componentes e validar em definitivo a hipótese formulada a partir do estudo do genoma de Lxx por Monteiro-Vitorello et al. (2004), afirmando que a bactéria produz uma toxina análoga ao ácido abscísico ou senão o próprio.

REFERÊNCIAS

ADDICOTT, F.T.; LYON, J.L. Physiology of abscisic acid and related substances. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 139-164, 1969.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**, 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technology**, Mt Edgecombe, v. 71, p. 97-101, 1997.

BAILEY, R.A.; TOUGH, S.A. Ratoon stunting disease: survival of *Clavibacter xvli* subsp. *xvli* in field soil and its spread to newly planted sugarcane. **Proceedings of the South African Sugar Technology**, Mt Edgecombe, v. 66, p. 75-77, 1992.

BARBIN, D. **Estatística experimental**: planejamento e análise estatística de experimentos agrônômicos. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Matemática e Estatística, 2009. 137 p.

BELLANDI, D.M.; DORFFLING, K. Effect of abscisic acid and other plant hormones on growth of apical and lateral buds of seedlings. **Physiologia Plantarum**, Estocolmo, v. 32, p. 369-372, 1974.

BROOKS, D.M.; HERNANDEZ-GUZMÁN, G.; KLOEK, A.P.; ALARCÓN-CHAIDEZ, F.; SREEDHARAN, A.; RANGASWAMY, V.; PEÑALOZA-VÁZQUEZ, A.; BENDER, C.L.; KUNKEL, B.N. Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, p. 162-174, 2004.

BROWN, A.C.; PARISH, T. Dxr is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to lack of uptake. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 1-9, 2008.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; HERMANN, S.R.; YOUNG, A.J.; CROFT, B.J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Adelaide, v. 35, p. 681-689, 2006.

BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; MURPHY, R.M.; NAGEL, R.J.; CANDY, J.M. Establishment of a functional genomics platform for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 17, p. 175-183, 2003.

BURDEN, R.S.; TAYLOR, H.F. Xanthoxin and abscisic acid. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 47, p. 203-209, 1976.

COLE, S.T.; EIGLMEIER, K.; PERKHILL, J.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; WHEELER, P.R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHIRCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, D.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M-A.; RUTHERFORD, K.M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELDON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, S.; WOODWARD, J.R.; BARRELL, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, London, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2011/2012, terceiro levantamento**. Brasília, 2011. 20 p.

CROFT, B.; MAGAREY, R.; WITTLE, P. Disease management. In: HOGARTH, M.; ALLSOPP, P. (Ed.). **Manual of cane growing**. Indooroopilly: Bureau of Sugar Experimental Stations, 2000. p. 263–289.

DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting disease. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: Editions Quae, 2000. p. 49-54.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratoon stunting disease of sugarcane – isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 210, p. 1365-1367, 1980.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. Nov., subsp. Nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. Nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 34, p. 107–117, 1984.

DODD, I.C.; TAN, L.P.; HE, J. Do increases in xylem sap pH and/or ABA concentration mediate stomatal closure following nitrate deprivation? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1281-1288, 2003.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **EPPO activities on plant quarantine**. Disponível em: <<http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>>. Acesso em: 13 set. 2011.

EVTUSHENKO, L.I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S.A.; COLE, J.R.; TIEDJE, J.M. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. Nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia 62quatic* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. Rev., comb. Nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 371–380, 2000.

FAO. **Diphenylamine**. Disponível em:

<www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2001_eva/07%20Diphenylamine.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2012.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 1145-1152, 2007.

GALL, A.; HENRY, S.; TAIKAICHI, S. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions. **Photosynthesis Research**, The Hague, v. 86, p. 25-35, 2005.

GARCIA, A.A.F.; BARBIN, D.; PIEDADE, S.M.E. **Estatística experimental**: aulas práticas. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciências Exatas, 2009. 63 p.

GILLASPIE, A.G.; DAVIS, M.J. Ratoon stunting disease of sugarcane. In: MUKHOPADHYAY, J.; KAMAR, H.S.; CHAUBE, U.S. (Ed.). **Plant disease of international importance, disease of sugar, forest, and plantation crops**. Englewood Cliffs: Prentice Hal, 1992. v. 4, p. 41-61.

GIGLIOTI, E.A. **Método conciliado para avaliar os efeitos da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* na funcionalidade do xilema**. 1997. 134 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

GILLASPIE, A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**: major diseases. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 58-80.

GRISHAM, M.P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 337-340, 1991.

HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M.C. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 147-155, 2000.

JAMES, G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, London, v. 98, p. 532-541, 1996.

JAMIL, M.; CHARNIKHOVA, T.; VERSTAPPEN, F.; BOUWMEESTER, H. Carotenoid inhibitors reduce strigolactone production and *Striga hermonthica* infection in rice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 504, p. 123-131, 2010.

KADO, C.I. **Plant bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.

KENNELLY, M.M.; CARZOLA, F.M.; VICENTE, A.; RAMOS, C.; SUNDIN, G.W. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, p. 4-17, 2007.

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 325-331, 2002.
 KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. Disponível em:
<http://www.genome.jp/kegg>. Acesso em: 10 out. 2011.

LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Absciscic acid signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 49, p. 199-222, 1998.

LIAO, C.H.; CHEN, T.A. Isolation, culture and pathogenicity to Sudan Grass of a corynebacterium associated with ratoon stunting of sugarcane and with Bermuda grass. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, p. 1303-1306, 1981.

LOS, D.A.; MURATA, N. Cold-inducible genes and their regulation. In: STOREY, J.M.; STOREY, K.B. (Ed.). **Sensing, signaling and cell adaptation**. Ottawa: Elsevier, 2002. v. 3, p. 139-145.

MEDICHARLA, V.; JAGANNADHAM, V.; JAYATHIRTHA, R.A.O. The mayor carotenoid pigment of a Psychotrophic *Micrococcus roseus* strain: purification, structure, and interaction with synthetic membranes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 7911-7917, 1991.

MEJÍA-TENIENTE, L.; TORRES-PACHECO, I.; GONZÁLEZ-CHÁVIRA, M.M.; OCAMPO-VELAZQUEZ, R.V.; HERRERA-RUIZ, G.; OLIVER-CHAPA, A.M.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, p. 9155-9162, 2010.

MILLS, L.; LEAMAN, T.M.; TAGHAVI, A.M. *Leifsonia xyli*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Adelaide, v. 30, p. 145-151, 2001.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; ZERILLO, M.M.; VAN SLUYS, M.A.; CAMARGO, L.E.A. Genome sequence-based insights into the biology of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. In: JACKSON, R.W. **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Reading: Caister Academic Press, 2009. p. 135-146.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M. do; HARAKAVA, R.; OLIVEIRA, J.C.F. de; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C. de; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R. da; FURLAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMROTTE, G.; ALMEIDA JUNIOR, N.F.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; E-DORRY, H.A.; FERRO, M.I.T.; GAGLIARD, P.R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H.; KIMURA, E.T.; FERRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MAURO, S.M.Z.; MACHADO, M.A.; MARINO, C.L.; MENCK, C.F.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; SIQUEIRA, W.; SOUZA, A.A. de; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, p. 827-836, 2004.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 73-79, 2003.

MUELLER, C.; SCHWENDER, J.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H.K. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 28, p. 792-793, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2004. 727 p.

NETZER, R.; STAFSNES, M.H.; ANDREASSEN, R.; GOKSOYR, A.; BRUHEIM, P.; BRAUTASET, T. Biosynthetic pathway for γ -cyclic sacinaxanthin in *Micrococcus luteus*: heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, p. 5688-5699, 2010.

NOMURA, K.; MELOTTO, M.; HE, S.Y. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 361-368, 2005.

ORITANI, T.; KIYOTA, H. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. **Natural Product Reports**, London, v. 20, p. 414-425, 2003.

RAGHAVENDRA, A.S.; GONUGUNTA, V.K.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. ABA perception and signaling. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 395-401, 2010.

RICAUD, C. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, Quatre Bornes, v. 15, p. 241-248, 1974.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGUES, C.G. (Ed.). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier, 1961. v. 1, p. 433-459.

SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C; ARRUDA, P; ABREU, F.A; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.C.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M.R.S.; BUENO, M.R.P.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.A.; CARRARO, D.M.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, F.F.; COSTA, M.C.R.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, V.C.A.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANÇA, S.C.; FRANCO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISEL, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E.L.; KITAJIMA, J.P.; KRIEGER, J.E.; KURAMAE, E.E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M.R.; LEITE, L.C.C.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOPES, S.A.; LOPES, C.R.; MACHADO, J.A.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MADEIRA, H.M.F.; MARINO, C.L.; MARQUES, M.V.; MARTINS, E.A.L.; MARTINS, E.M.F.; MATSUKUMA, A.Y.; MENCK, C.F.M.; MIRACCA, E.C.; MIYAKI, C.Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MOON, D.H.; NAGAI, M.A.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; NETTO, L.E.S.; NHANI JR., A.; NOBREGA, F.G.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, M.A.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.C.; PALMIERI, D.A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B.R.; PEREIRA, G.A.G.; PEREIRA JR., H.A.; PESQUERO, J.B.; QUAGGIO, R.B.; ROBERTO, P.G.; RODRIGUES, V.; ROSA, A.J.M.; ROSA JR., V.E.; SÁ, R.G.; SANTELLI, R.V.; SAWASAKI, H.E.; SILVA, A.C.R.; SILVA, A.M.; SILVA, F.R.; SILVA JR., W.A.; SILVEIRA, J.F.; SILVESTRI, M.L.Z.; SIQUEIRA, W.J.; SOUZA, A.A.; SOUZA, A.P.; TERENCEZI, M.F.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; TSUHAKE, M.H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M.A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, p. 151-157, 2000.

STROBEL, G.A. Bacterial phytotoxins. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 205-224, 1977.

SUZUKI, K.T.; SUZUKI, M.; SASAKI, J.; PARK, Y.H.; KOMAGATA, K. *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acidcontaining actinomycetes to accommodate "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Davis et al. 1984. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 45, p. 253–262, 1999.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722 p.

TAO, L.; YAO, H.; CHENG, Q. Genes from *Dietzia* sp. for synthesis of C40 and C50 b-cyclic carotenoids. **Gene**, Amsterdam, v. 386, p. 90-97, 2006.

TEAKLE, D.S.; RYAN, C.C. The effect of high temperature on the sugar cane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, *in vitro* and *in vivo*. **Sugar Cane**, Louisiana, v. 6, p. 5-6, 1992.

TEAKLE, D.S.; SMITH, P.M.; STEINDK, D.R.L. Association of a small corynebacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 24, p. 869-874, 1973.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, AL.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 187-188.

TRUTKO, A.M.; DOROFEEVA, L.V.; EVTUSHENKO, L.I.; OSTROVSKII, D.N.; HINTZ, M.; WIESNER, J.; JOOMA, H.; BASKUNOV, B.P.; AKIMENKO, V.K. Isoprenoid pigments in representatives of the family *Microbacteriaceae*. **Microbiology**, Reading, v. 74, p. 284-289, 2005.

UPPALAPATI, S.R.; AYOUBI, P.; WENG, H.; PALMER, D.A. The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 201-217, 2005.

VIDHYAVATHI, R.; SARADA, R.; ASWATHANARAYANA, R. Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in *Haematococcus pluvialis* under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 45, p. 88-93, 2009.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 41, p. 455-482, 2003.

WOLF, A.; KRAMER, R.; MORBACH, S. Three pathways for threulose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 49, p. 1119-1134, 2003.

WULFF, N.A. Bactérias causadoras de doenças em vegetais. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 51-144.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 133, p. 29-36, 2003.

YOUNG, A.J.; PETRASOVITS, L.A.; CROFT, B.J.; GILLINGS, M.; BRUMBLEY, S.M. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, Adelaide, v. 35, p. 503-511, 2006.

ZEEVAART, J.A.D. Metabolism and physiology of abscisic acid. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 39, p. 439-473, 1988.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BENDER, C.L.; ALARCÓN-CHAIDEZ, F.; GROSS, D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 63, p. 266-292, 1999.

BERGAMIN FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2: Doenças de plantas cultivadas, 663 p.

BRITTON, G. **The biochemistry of natural pigments**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 366 p.

BROWN, J.; XIN, Z. Temperature sensing and cold acclimation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 241-246, 2001.

BUONAURO, R. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. **Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 661, p. 169-197, 2008.

ERB, M.; KOLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; ZWAHLEN, C.; HIBBARD, B.; TURLINGS, T.C.J. The role of abscisic acid and water stress in root herbivore-induced leaf resistance. **New Phytologists**, London, v. 189, p. 308-320, 2011.

FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.F.; LIMA, N. **Microbiologia**. Lisboa: Lidel, 2010. 622 p.

GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L.E.A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1222-1226, 2009.

GRISHAM, M.P.; PAN, Y-B.; RICHARD JR., E.P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, p. 430-434, 2007.

GUILLEN, D.; HERNANDÉZ, R.; RODRÍGUEZ, L.; GÓMEZ, R. Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em caña de azúcar (*Saccharum spp.*), saneamiento mediante técnicas biotecnológicas. **BioTecnología**, Ciudad de Mexico, v. 2, n. 11, p. 8-17, 2007.

HOY, J.W.; FLYNN, J.L. Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, Quatre Bornes, v. 24, p. 417-421, 2001.

KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S.F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology And Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 1061-1064, 2006.

KRUBASIK, P.; KOBAYASHI, M.; SANDMANN, G. Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the

mechanisms for C50 carotenoid formation. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 268, p. 3702-3708, 2001.

LI, A.; HEATH, M.C. Effect of plant growth regulators on the interactions between bean plants and rust fungi non-pathogenic on beans. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 37, p. 245-254, 1990.

METZLER, M.C.; LAINE, M.J.; DE BOER, S.H. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 150, p. 1-8, 1997.

MIRANDA-DINARDO, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2008. 882 p.

ORITANI, T.; YAMASHITA, K. Biosynthesis of (+)-abscisic acid in *Cercospora cruenta*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 49, p. 245-249, 1985.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 34, p. 131-151, 1994.

QIU, F.; HUANG, Y.; SUN, L.; ZHANG, X.; LIU, Z.; SONG, W. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 405-408, 2007.

RAMALHO, J.; RAMALHO, N.E.V. Aplicación de la hidrotermoterapia para la obtención de caña semilla de sanidad controlada. **Avance Agroindustrial**, Tucumán, v. 22, p. 16-18, 2001.

REZZONICO, E.; FLURY, N.; MEINS, F.; BEFFA, R. Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related b-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 117, p. 585-592, 1998.

RUSSELL, J.B. **Química geral**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1992. v. 2, 645 p.

SCHOLZ-SCHROEDER, B.K.; HUTCHISON, M.L.; GRGURINA, I.; GROSS, D.C. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 336-348, 2000.

SEGATO, S.V.; NÓBREGA, J.C.M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP, 2006. 415 p.

STANGARLIN, J.R.; LEITE, B. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 177-226.

STUCLIFFE, I.C.; HUTCHINGS, M.I. Putative lipoproteins identified by bioinformatics genome analysis of *Leifsonia xyli* ssp. *xyli*, the causative agent of sugarcane ratoon stunting disease. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, p. 121-128, 2007.

TAMURA, K.; IMAMURA, M.; YONEYAMA, K.; KOHNO, Y.; TAKIKAWA, Y.; YAMAGUCHI, I.; TAKAHASHI, H. Role of phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in the formation of halo lesions of kiwifruit canker disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 207-214, 2002.

TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 153-164, 2002.

WALTON, J.D. Host-selective toxins: agents of compatibility. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1723-1733, 1996.

WILKSON, S.; CORLETT, J.E.; OGER, L. Effects of Xylem pH on Transpiration from Wild-Type and *flacca* Tomato Leaves: a vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 117, p. 703-709, 1998.

YAMAMOTO, H.; INOMATA, M.; TSUCHIYA, S.; NAKAMURA, M.; ORITANI, T. Metabolism of chitral ionylideneacetic acids on the abscisic acid biosynthetic pathway in *Cercospora*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, p. 2644-2650, 2000.

YANG, J.C.; ZHANG, J.H.; WANG, Z.Q.; ZHU, Q.S.; LIU, L.J. Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 1621-1631, 2003.

YOUNG, A.J.; BRUMBLEY, S.M. Ratoon stunting disease: history, management and current research. In: RAO, G.P. (Ed.). **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publ., 2004. v. 3: Bacterial and nematode diseases, p. 97–124.