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

**Análise *in vitro* da expressão de genes de adaptação e de
patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em presença de fluido
vascular de cana-de-açúcar**

Lilian Luzia Beloti

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

**Piracicaba
2008**

Lilian Luzia Beloti

Bióloga

Análise *in vitro* da expressão de genes de adaptação e de patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar

Orientador

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

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

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Beloti, Lilian Luzia

Análise in vitro da expressão de genes de adaptação e de patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em presença do fluido vascular de cana-de-açúcar / Lilian Luzia Beloti. - - Piracicaba, 2008.
51p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Cana-de-açúcar 3. Expressão gênica 4. Raquitismo das soqueiras 5. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDD 633.61
B452a

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

Dedico

A minha Mãe, minha guia

Aos grandes amigos, àqueles presentes e mesmo os
ausentes que são parte do que sou hoje.

A todos que compartilham comigo suas vidas,
pelo carinho e convivência

Ao meu pai, meus irmãos Nilton e
Vander pela vida familiar,
meu ponto de equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Energia entregue a tudo.

Ao professor Luis Eduardo Aranha Camargo pela valiosa orientação, oportunidade,
apoio, advertências e conselhos essenciais para o meu crescimento profissional.

A minha Mãe por acreditar sempre em mim, sem ela eu não realizaria meus sonhos.

Ao meu Pai, incansável trabalhador.

Aos meus Irmãos por serem parte da maior empresa da vida: a Família.

A UNESP-Jaboticabal e todos que a compõe pela minha formação.

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ-USP pela continuidade dos meus sonhos.

A CAPES, pela concessão de bolsa.

Ao prof. Dr. Júlio Cezar Franco de Oliveira, meu primeiro orientador e amigo.

Aos meus queridos amigos de trabalho: Alexandre, Ana, Bruno, Carol, Cynthia, Daniel, Erika, Fátima, Fernanda, Júlia, Juliana, Lara, Leandro, Luíza, Márcia, Osmar, Raphaele, Thaís e Thayne. Obrigada pela amizade, ajuda e convivência agradável.

Aos funcionários: Carmem, Edvaldo, Fernanda, Heloísa, Jeferson, Liliane, Linda, Pedro e Rodolfo.

Aos amigos de convívio comum: Alderi, Alessandra, Anne, Cristiane, Diogo, Fabrício, Laura, Leonardo, Pastora, Vanessa e Thaís.

Aos professores do departamento de Fitopatologia pelos valiosos ensinamentos.

A Rodrigo Mendes pela inestimável ajuda com meus experimentos, paciência e solicitude.

Ao Dr. Reinaldo Montrazi Barata pelos ensinamentos, ajuda, conselhos e paciência.

Aos professores: Dr. Welington Luiz de Araújo, Dr. Carlos Alberto Labate, Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira, pela recepção e colaboração ao meu trabalho.

Ao Dr. Fernando Dini Andreote e ao Dr. Thiago Domingues Zucchi pelos conselhos profissionais.

Ao Leo, pelo companheirismo e carinho.

As lendárias Codornas: Júlia, Laura e Cristiane, amigas queridas.

Aos meus bons e velhos amigos, de todas as horas, com os quais a vida é mais alegre.

"Deus criou as Mães por saber que não poderia estar em todos os lugares ao mesmo tempo"

O conhecimento faz do ser humano uma criatura livre, permitindo uma visão da vida com os olhos de alguém que se sente capaz em entender e se defender perante tanta diversidade.

Ninguém, em momento algum deve acreditar que sabe o suficiente ou mais que o outro, sempre haverá um conhecimento incomum em alguém. A beleza em se estudar está naquilo que ainda vamos descobrir, assim nasce à ciência, acompanhada de vislumbamento e humildade. O aprendizado é diário e gratuito, no entanto, nos pertence quando adquirido, mas seu valor só existe quando é transferido.

Lilian Luzia Beloti

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Revisão bibliográfica.....	13
2.1.1 O raquitismo-das-soqueiras: história e distribuição.....	13
2.1.2 Etiologia do agente causal do raquitismo-das-soqueiras.....	14
2.1.3 Sintomas.....	15
2.1.4 Transmissão.....	16
2.1.5 Diagnose.....	16
2.1.6 Prevenção e controle.....	17
2.1.7 Genoma da Lxx, patogenicidade e adaptação.....	18
2.1.8 RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real).....	21
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.1 Isolado de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	24
2.2.2 Material vegetal e obtenção de fluido vascular de cana-de-açúcar.....	24
2.2.3 Meio de cultivo para Lxx.....	24
2.2.4 Obtenção da curva de crescimento de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar.....	25
2.2.5 Cultivo de Lxx e indução da expressão gênica com fluido vascular de cana-de-açúcar.....	27
2.2.5.1 Extração do RNA total.....	28
2.2.5.2 Digestão do DNA contaminante do RNA.....	29
2.2.5.3 Síntese da primeira fita de cDNA.....	29
2.2.5.4 Síntese de primers para análise da expressão gênica.....	30
2.2.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real.....	30
2.2.6.1 Método de análise dos valores de C_T	31
2.3 Resultados e discussão.....	32

2.3.1 Curva de crescimento de Lxx em presença de 20% de fluido vascular de cana-de-açúcar.....	32
2.3.2 Confirmação do RNA extraído.....	34
2.3.3 Confirmação da eliminação do DNA.....	35
2.3.4 Análise quantitativa da expressão gênica.....	36
2.3.4.1 Curvas de dissociação (melting).....	36
2.3.4.2 Avaliação da expressão gênica <i>in vitro</i> de genes de adaptação e de Patogenicidade de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar.....	38
3 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

Análise *in vitro* da expressão de genes de adaptação e de patogenicidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar

O raquitismo das soqueiras da cana-de-açúcar (RSD) é causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), sendo uma das principais doenças dessa cultura. O sequenciamento do genoma da Lxx trouxe novas perspectivas para um melhor entendimento de sua biologia, permitindo a elaboração de suposições sobre seus mecanismos de patogenicidade e adaptação. Estudos preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que a adição de fluido vascular de cana-de-açúcar no meio de cultura promove um crescimento mais rápido da bactéria *in vitro*. Esses resultados levantaram a hipótese de que alguma substância sinalizadora presente no fluido vascular poderia ativar ou reprimir genes da bactéria relacionados ao reconhecimento do hospedeiro. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi analisar *in vitro* o perfil de expressão gênica de possíveis genes relacionados à patogenicidade e adaptação de Lxx quando cultivada em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar em períodos de cinco e vinte minutos. Desta forma, duas variedades de cana-de-açúcar, uma suscetível e outra resistente a Lxx, foram analisadas. O nível transcricional dos genes de interesse foi avaliado por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) pelo sistema SYBR® Green. Os genes hipotéticos de patogenicidade estudados codificam para uma celulase (*celA*) e uma protease (*pat-1*), que são homólogos a genes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Os genes supostamente envolvidos na adaptação ao hospedeiro foram os envolvidos na produção de peroxidase (*per*) e arginase (*arg*), relacionados com a resistência ao estresse oxidativo e supressão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, respectivamente. No tratamento com fluido vascular da variedade suscetível apenas os genes *celA* e *arg* tiveram expressão induzida após cinco minutos de exposição ao fluido. Em presença de fluido vascular da variedade resistente, os genes *celA* e *pat-1* foram positivamente regulados somente no período de cinco minutos, enquanto que o gene *arg* manteve regulação positiva nos dois períodos observados. O gene *per* foi reprimido em todos os tratamentos, exceto em fluido vascular da variedade resistente por vinte minutos. No período de vinte minutos, com exceção do gene *celA* todos os outros genes tiveram a expressão negativa em presença de fluido vascular da variedade suscetível. Estes resultados indicam que substâncias presentes no fluido de cana-de-açúcar atuam como sinais reguladores da expressão gênica em Lxx e esta regulação talvez seja necessária para adaptação e consequentemente colonização no hospedeiro.

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras; Expressão gênica; PCR quantitativo

ABSTRACT

***In vitro* analysis of the expression of adaptation and pathogenicity genes of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in the presence of sugar cane vascular fluid**

Sugarcane ratoon stunting disease (RSD) is a major disease in that crop and is caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Its genome sequencing brought new perspectives for a better understanding of its biology, allowing the elaboration of suppositions concerning its pathogenicity and adaptation mechanisms. Preliminary studies showed that the addition of 20% vol / vol of sugarcane vascular fluid in the cultivation medium promotes a faster growth of the bacteria *in vitro*. These results raise the hypothesis that some signaling molecule/substance in the vascular fluid does activate or repress the bacteria genes related to the host's recognition. Therefore, the objective of this study was to analyze *in vitro* the profile of gene expression of possible related genes to pathogenicity and adaptation of Lxx when cultivated in the presence of sugarcane vascular fluid in periods of five and 20 minutes. Two sugarcane varieties were analyzed, one susceptible and one resistant to Lxx. The transcription of the genes of interest was evaluated by quantitative real time PCR (RT-qPCR) by the SYBR® Green system. The hypothetical pathogenicity genes studied encode a cellulase (*celA*) and a protease (*pat-1*), that are homologous to the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* genes. The genes supposedly involved in the adaptation to the host where the ones involved in the production of peroxidase (*per*) and arginase (*arg*), related to the resistance of the oxidative stress and suppression of the host's defense mechanisms, respectively. With the Lxx susceptible variety's vascular fluid, only *celA* and *arg* genes had their expression induced after a five minutes exposure to the fluid. In presence of the resistant variety's vascular fluid, *celA* and *pat-1* genes were positively regulated only in the exposure period of five minutes, while the *arg* gene maintained a positive regulation in both observed periods. The *per* gene was repressed in all treatments, except in the presence of the resistant variety's vascular fluid for 20 minutes. In the 20 minutes period, with the exception of the *celA* gene, the other genes had negative expression in the presence of vascular fluid of the susceptible variety. These results indicate that substances present in the sugarcane fluid act as regulating signals for the Lxx gene expression and this regulation may be necessary for the adaptation and consequently colonization on the host.

Keywords: Ratoon stunting disease; Gene expression; Quantitative PCR

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é cultivada em mais de 127 países subtropicais e tropicais, sendo o Brasil seu maior produtor, seguido pela Austrália e Índia (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO - ÚNICA, 2007). A área plantada com cana-de-açúcar no Brasil compreende 6,6 milhões de hectares, com uma safra estimada para 2007/08 de 491 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo que 87,43% são produzidas na região Centro-Sul e 12,57% nas regiões Norte e Nordeste. Do total produzido, 88,67% destina-se à indústria sucroalcooleira e o restante à fabricação de cachaça, alimentação animal, fabricação de rapadura, açúcar mascavo e outros (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO - CONAB, 2007). O setor é ainda responsável por cerca de um milhão de empregos diretos na área rural e outros 300 mil diretos e indiretos na área industrial. No território nacional existem 350 unidades industriais, todas privadas, e cerca de 50 mil produtores independentes. Estima-se que nos próximos seis anos a produção de cana-de-açúcar aumentará cerca de 50% devido a substituição promovida na área de combustíveis em razão do crescente aumento do preço do petróleo e à necessidade de redução de emissão de poluentes na atmosfera (ÚNICA, 2007).

A cana-de-açúcar comercializada nos últimos anos é resultado de intenso programa de melhoramento genético que visa criar cultivares mais produtivas e resistentes a vários estresses bióticos e abióticos. Entre os estresses, os causados por microrganismos são os mais relevantes e, dentre estes, destaca-se o agente causal do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar (RSD), que é a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Esta doença causa danos à cultura nas principais regiões do mundo onde a agroindústria sucroalcooleira está presente (IGLESIA, 2003). As perdas decorrentes dessa doença podem ser superiores a 50% em cultivares suscetíveis (RICAUD; RYAN, 1989; DAVIS; BAILEY, 2000).

O sequenciamento do genoma da bactéria Lxx forneceu informações importantes a respeito da sua fisiologia, possibilitando inferir sobre sua resposta adaptativa quanto em contato com a planta hospedeira, onde coloniza apenas os vasos do xilema. No genoma da Lxx alguns dos supostos genes de patogenicidade parecem ter sido

adquiridos por transferência horizontal. Estes genes estão agrupados em ilhas genômicas de patogenicidade, que podem variar de 10 a 200 kb (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004; HENTSCHEL; HACKER, 2001). Dentro destas possíveis ilhas genômicas de patogenicidade, alguns genes foram descritos como homólogos a genes de patogenicidade de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), que são espécies bem próximas a Lxx (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Dentre esses genes, destacam-se os homólogos aos genes que codificam para uma celulase (*celA*) e uma serina protease (*pat-1*). Em ambas as espécies, estes genes estão presentes em um plasmídio e desempenham papel decisivo na virulência dessas bactérias. O gene que codifica para uma celulase, do tipo endoglucanase, está diretamente ligado à manifestação dos sintomas de murcha em tomateiro causado por Cmm e aumento de virulência em Cms (JAHR et al., 2000; LAINE et al., 2000). O gene *pat-1*, que codifica para uma serina protease está diretamente envolvido no desenvolvimento dos sintomas de infecção por esta bactéria. A essencialidade destes genes é evidenciada pelo fato de que isolados de Cmm que não possuem esse gene são pouco virulentos e não causam sintomas de murcha. Entretanto, o papel dessa protease na patogênese não é completamente conhecido; especula-se que ocorra proteólise de proteínas estruturais da parede celular da planta, permitindo a distribuição da bactéria no tecido vegetal (DREIER et al., 1997).

A adaptação de bactérias aos seus hospedeiros se deve pela presença de genes cujos produtos permitem controlar os mecanismos de defesa da planta (RESENDE et al., 2003). Dentre vários mecanismos que as plantas utilizam como defesa contra fitopatógenos podemos citar o mecanismo de explosão oxidativa que geralmente resulta de uma resposta de hipersensibilidade (HR). Essa explosão oxidativa gera espécies reativas de oxigênio (ERO) que são tóxicas ao patógeno. Este, por sua vez, responde produzindo enzimas que catalisam a degradação das ERO, permitindo seu estabelecimento e sobrevivência no hospedeiro (RESENDE et al., 2003). As enzimas de degradação das ERO são codificadas por genes como peroxidase e superóxido dismutase, que estão possivelmente ligados ao processo de adaptação das bactérias aos seus hospedeiros. Em Lxx, genes homólogos ao gene que codifica a proteína superóxido dismutase em *Escherichia coli* (MCCORMICK et al., 1997) e peroxidase em

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (GRASKOVA et al., 2004), podem estar envolvidos na capacidade da bactéria de se instalar e colonizar os vasos do xilema da cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Outro gene supostamente importante para adaptação de bactérias em seu hospedeiro codifica para uma arginase, que foi descrito em *Helicobacter pylori* como sendo responsável por inibir a produção de óxido nítrico (NO), que é um poderoso agente antimicrobiano (GOBERT et al., 2001). Em Lxx, um homólogo ao gene da arginase foi descrito e pode estar envolvido nos mecanismos pelos quais a bactéria coloniza o hospedeiro (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Os genes acima citados relatados como sendo possíveis genes relacionados a patogenicidade e adaptação de Lxx podem participar do processo de colonização da cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Em nosso laboratório, curvas de crescimento de Lxx foram feitas adicionando-se ao meio de cultura fluido vascular de duas variedades de cana-de-açúcar (20% v/v), sendo uma variedade resistente e outra suscetível. O resultado evidenciou que em presença de fluido vascular de ambas as variedades de cana-de-açúcar, Lxx apresentou um crescimento mais rápido quando comparado ao controle. Além disso, o crescimento é mais rápido em presença do fluido vascular da variedade resistente do que na variedade suscetível (dados não publicados). Estes resultados preliminares sugeriram estudos mais detalhados sobre o comportamento *in vitro* de Lxx quando da adição de fluido vascular de cana-de-açúcar ao meio de cultura. Sendo assim, a hipótese específica deste projeto é a de que substâncias presentes no fluido vascular de cana-de-açúcar não só afetam o crescimento da bactéria, mas também servem como sinalizadoras do ambiente vegetal, ativando ou reprimindo genes envolvidos na adaptação e na patogenicidade ao hospedeiro. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo analisar perfis de expressão de genes homólogos de patogenicidade e adaptação ao hospedeiro da bactéria cultivada *in vitro* na presença ou ausência de fluido vascular de cana-de-açúcar (cultivar resistente e suscetível), via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 O raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar: história e distribuição

O raquitismo-da-soqueira (RSD) causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é uma das doenças mais importantes da cultura da cana-de-açúcar (IGLESIA, 2003). A doença foi primeiramente descrita em 1944 em Queensland, na Austrália, quando a variedade Q28 apresentou sintomas de subdesenvolvimento e descoloração vascular. Em 1949, a natureza infecciosa do RSD foi comprovada através de estudos de reprodução de sintomas em colmos sadios de cana-de-açúcar a partir de inoculações artificiais com caldo extraído de colmos afetados (STEINDL, 1949). Estes resultados mostraram que o maior agente de disseminação desse patógeno é o próprio homem, através dos instrumentos usados em práticas culturais (máquinas de colheita, facões, etc).

Por muitos anos, acreditou-se que o RSD fosse uma doença de etiologia viral, pois não se conseguia isolar o microrganismo causador da doença pelos métodos convencionais de cultivo *in vitro*. Somente em 1973 pesquisadores conseguiram detectar a presença de bactérias nos vasos do xilema de plantas infectadas (GILLASPIE JR. et al., 1973; MARAMORCH et al., 1973; TEAKLE et al., 1973). Esta bactéria foi identificada em 1984 pelo pesquisador americano Dr. Michael J. Davis, que conseguiu isolá-la em cultura axênica e confirmar sua patogenicidade (DAVIS et al., 1984). Primeiramente a bactéria foi classificada como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* e recentemente reclassificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (DAVIS et al., 1984; EVTUSHENKO et al., 2000; IGLESIA, 2003).

No final da década de 80, a doença já tinha sido relatada em mais de 60 países (TOKESHI, 1997). Hoje a doença é encontrada nos campos comerciais de cana-de-açúcar em todo mundo, sendo responsável por até 50% de perda nas variedades suscetíveis e não tolerantes (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). A importância do raquitismo-da-soqueira se deve não somente a dificuldade de reconhecer a doença no

campo, mas também por causar perdas na produção superiores às aquelas acarretadas por outras doenças da cultura. Os prejuízos anuais com essa doença no mundo são da ordem de milhões de dólares anualmente. No Brasil, estima-se que o RSD acarretou perdas superiores a US\$ 2 bilhões em um período de 30 anos (GIGLIOTI, 1997).

2.1.3 Etiologia do agente causal do raquitismo-da-soqueira

Leifsonia xyli subsp. *xyli* é uma bactéria Gram-positiva, corineforme, não móvel, aeróbia obrigatória e restrita ao xilema das plantas. As células bacterianas são bastonetes pleomórficos, medindo de 0,25-0,5µm por 1-4µm, sendo retos ou levemente curvos e ocasionalmente dilatados nas pontas ou no meio (IGLESIA, 2003). As colônias em meio de cultura são circulares, não pigmentadas, com diâmetro abrangendo de 0,1 a 0,3 µm (DAVIS et al., 1984; IGLESIA, 2003). Como os outros membros do gênero *Leifsonia*, a bactéria não é esporogênica, caracteriza-se pela presença de peptidioglicanos baseados em ácido 2,4 diaminobutírico em sua parede celular, ausência de ácido micotílico e predominância de metaquinonas com 9 a 10 cadeias de carbono. Apresenta ainda fosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol como principais fosfolípidios da membrana (DAVIS et al., 1986; EVTUSHENKO et al., 2000; IGLESIA, 2003).

O conteúdo de bases G+C no genoma compõem 69 mol% (EVTUSHENKO et al., 2000; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O extrato de ácidos graxos totais possui de 17 a 24, 5 a 14 e de 62 a 72% dos ácidos 15:0 anteiso, 16:0 iso e 17:0 anteiso, respectivamente (GILLASPIE JR.; DAVIS, 1992). Não foi relatada variação entre isolados *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* com relação a patogenicidade e virulência. A comparação bioquímica, sorológica e morfológica entre isolados de todo mundo foram similares (DAVIS et al., 1980, 1984).

Estudos *in situ* demonstraram que o crescimento de Lxx é limitado aos vasos, traqueídes, parênquima e lacunas do xilema (DAVIS et al., 1992). A sobrevivência da Lxx no campo está relacionada com a própria cana-de-açúcar, sendo transmitida durante os ciclos da cultura (renovação do canavial, cana-planta e socas), onde células

viáveis são transportadas para dentro do tecido suscetível dos colmos por ferramentas contaminadas (facões, colheitadeiras, etc) (GIGLIOTI, 1997). A Lxx consegue colonizar, além da cana-de-açúcar, outras plantas como milho, sorgo e outras espécies de gramíneas. No entanto, esta colonização só foi observada mediante inoculação artificial (GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989; MATSUOKA, 1972).

2.1.4 Sintomas do RSD

Como o próprio nome diz , raquitismo é a redução do crescimento das plantas, compreendendo a manifestação externa da doença. Plantas afetadas apresentam crescimento irregular, os colmos ficam com o diâmetro reduzido e mais curtos. Os tipos de sintomas associados a ocorrência da RSD são crescimento retardado, encurtamento dos entrenós, aspecto de murcha, necrose nas pontas e nas bordas das folhas e até morte da planta (STEINDL, 1961; TOKESHI, 1997; GIGLIOTI, 1997). Os sintomas internos se caracterizam pela presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas, em decorrência da deposição de gomas ou formação de tiloses nos feixes do xilema e coloração rosada próximo ao meristema apical de plantas jovens (IGLESIA, 2003). Porém, os sintomas do RSD não são típicos, podendo ser facilmente confundidos com doenças provocadas por outros patógenos, como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* e *Erwinia herbicola* (RICAUD, 1974; TOKESHI, 1980).

Fatores ambientais podem influenciar na manifestação dos sintomas externos, sendo que a favorável disponibilidade de água e nutrientes podem mascarar o desenvolvimento de sintomas. Algumas variedades de cana-de-açúcar podem exibir altas taxas de infecção porém sem que sejam notados sintomas externos de raquitismo (GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989; GILLASPIE JR.; DAVIS, 1992; TOKESHI, 1997). Condições que causam estresse na planta, como práticas culturais inadequadas, alta competição com plantas invasoras, compactação do solo e condições extremas do ambiente como longos períodos de estiagem, favorecem a manifestação dos sintomas externos da doença.

2.1.6 Diagnose

Como mencionado anteriormente, os sintomas externos e internos do RSD podem ser confundidos com várias outras doenças e também mascarados dependendo da variedade da cana-de-açúcar e condições climáticas. Como resultado desta dificuldade, várias técnicas foram desenvolvidas para diagnosticar e, em alguns casos, quantificar a bactéria a partir de amostras de cana-de-açúcar do campo (IGLESIA et al., 2002). Após a descoberta de um meio de cultivo para Lxx (DAVIS et al., 1980), foi possível produzir anticorpos específicos para a identificação da bactéria (CARNEIRO et al., 2004). O diagnóstico do RSD por teste de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) e EB-EIA (“evaporative-binding enzyme-linked immunoassay”) tem sido de grande valia por serem técnicas específicas e sensíveis. As técnicas de TBEIA (“tissue blot enzyme immunoassay”) e “dot blot enzyme immunoassay” também são opções de diagnose do RSD (GIGLIOTI et al., 1997; IGLESIA, 2003; CARNEIRO et al., 2004).

Métodos de microscopia, como microscopia de contraste de fase, microscopia de campo escuro e eletrônica também podem ser utilizadas para o diagnóstico de material de seleção e, mesmo sendo uma técnica dispendiosa, é de alta confiabilidade (IGLESIA, 2003). Entretanto, a técnica de PCR (“polimerase chain reaction”) permite a detecção do patógeno em extratos da planta, conteúdo líquido dos vasos condutores e colônias em placas ou meio de cultura (SHNEIDER; DEBRUIJN, 1996). No entanto, muitos dos métodos de diagnose citados podem mostrar um resultado falso positivo, ou não detectar células bacterianas em pequenas concentrações. O resultado falso positivo pode ocorrer devido a existência de bactérias geneticamente próximas de Lxx, como *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc) (TAYLOR et al., 2003). Para contornar este problema e ao mesmo tempo identificar Lxx em pequenas concentrações na cana-de-açúcar, Taylor e colaboradores (2003) desenvolveram uma sonda de DNA a partir de RAPD (random amplified polymorphic DNA). Essa sonda hibridiza em uma região específica do genoma da Lxx inexistente em Lxc e em bactérias geneticamente próximas a Lxx. Este fragmento é usado para identificar Lxx em pequenas concentrações no fluido fibrovascular da cana-de-açúcar, sendo o método de diagnose mais sensível disponível para RSD atualmente (TAYLOR et al., 2003).

2.1.7 Prevenção e controle

A maneira mais eficiente para controlar a bactéria em campo é utilizar material sadio para plantio. Para tal, os instrumentos de corte devem ser desinfestados antes de iniciar o corte, pois poucas plantas doentes podem comprometer todo o campo. A desinfestação pode ser feita através do calor (chama, vapor ou água quente) ou produtos químicos, como amônia quartenária, solução de ácido cresílico e etanol 50% (STEINDL, 1961; TEAKLE, 1983; GILLASPIE JR.; TEAKLE, 1989).

A termoterapia vem sendo largamente utilizada para a desinfestação de toletes para eliminar Lxx antes do plantio. O tratamento baseia-se na imersão dos toletes em água a 50°C por 2 a 3 horas. Alguns trabalhos relatam que o uso de ar quente a 58°C por 8 ou 24 horas também é eficaz para reduzir a incidência de Lxx (BUERGO et al., 1992). A temperatura usada para tratamento dos toletes está no limiar da temperatura que o material vegetal resiste e um pouco acima da capacidade de sobrevivência da bactéria. Portanto, existem dois problemas estão relacionados a este tratamento: a morte do material vegetal e a resistência da bactéria ao calor. Mesmo a termoterapia não sendo totalmente eficiente, este método é o mais seguro para sanitizar colmos sementes (IGLESIA, 2003). No entanto, é imprescindível associar a termoterapia com a prática do “roguing”, que é a eliminação de plantas doentes nos viveiros propagativos (TOKESHI, 1997).

Outra alternativa é a utilização de plantas geneticamente resistentes a doença ao introduzir a cultura no campo. Os programas de melhoramento de plantas têm como principais objetivos a seleção de genótipos resistentes as principais doenças e agronomicamente mais produtivos (BRESSIANE, 2001). Existem variedades de cana-de-açúcar resistentes a várias doenças, inclusive ao RSD, porém, estas cultivares resistentes não comportam boas características agronômicas.

2.1.8 Genoma da Lxx, patogenicidade e adaptação ao hospedeiro

O genoma da estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi completamente sequenciado, trazendo informações importantes sobre sua fisiologia. A análise deste genoma revelou, dentre várias particularidades desta bactéria, a presença de muitos “pseudogenes”, em quantidades superiores às encontradas em genomas de outras fitobactérias (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Estes pseudogenes são genes fragmentados ou que apresentam mudanças no sentido da leitura ou ainda códon de parada de leitura prematura. Muitos destes possuem seqüências similares a genes essenciais para um organismo de vida livre. Essa característica sugere que, em seu passado evolutivo, a bactéria teria um nicho ecológico mais amplo, não sendo restrita ao hospedeiro. Sendo assim, teoriza-se que a perda da funcionalidade destes genes teve um impacto muito grande no comportamento ecológico de Lxx. Esta alteração de nicho resultou na redução da capacidade adaptativa da bactéria, tornando-a dependente de seu hospedeiro. Portanto, é razoável supor que este fenômeno ocorreu às custas do desenvolvimento de mecanismos de adaptação ao hospedeiro (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

As bactérias de um modo geral, apesar de serem organismos pouco complexos, exibem alta variabilidade genética, fato que se reflete na grande diversidade de nichos ocupados por estes organismos. Essa variabilidade é resultado de mutações e de eventos de transferência gênica horizontal (TGH), que possibilitam a seleção de indivíduos adaptados aos mais diversos ambientes colaborando para a evolução desses organismos. A transferência gênica horizontal é a troca de material genético entre células ou genoma de espécies não relacionadas. Este evento ocorre em bactérias por intermédio da conjugação, transdução e principalmente transformação (BROWN, 2003). A aquisição de um conjunto gênico por TGH aumenta a adaptabilidade destes organismos a um determinado nicho, podendo os genes transferidos já estarem preparados e melhorados para determinada condição (LAWRENCE, 2002). O que reforça a evidência da TGH é a existência de ilhas genômicas, que são fragmentos nos quais se encontram vários genes, além de transposases e integrases (HENTSCHEL; HACKER, 2001). A característica principal

dessas ilhas genômicas é a existência dos mesmos genes em distintos organismos que apresentam a mesma função em contextos ecológicos distintos. Especula-se que durante o processo evolutivo, *Lxx* tenha adquirido genes de patogenicidade por transferência horizontal, formando ilhas genômicas de patogenicidade. Este fato também pode sugerir que a *Lxx* possa ter passado do estado de um simples endofítico para um patógeno.

Em *Lxx*, muitos foram os genes descritos como possivelmente envolvidos em adaptação ao hospedeiro e genes de patogenicidade presentes em ilhas genômicas. Dentre os genes de adaptação podemos citar os genes arginase (*arg*), peroxidase (*per*) e superóxido dismutase (*sod*). Quanto aos genes de patogenicidade, destacam-se os genes celulase (*celA*) e uma protease (*pat-1*) (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

O gene que possivelmente codifica para uma arginase (*arg*) em *Lxx* é homólogo ao gene da arginase de *Helicobacter pylori*, cujo produto é responsável por inibir a produção de óxido nítrico (NO) (poderoso agente antimicrobiano) nas células do hospedeiro (GOBERT et al., 2001). A arginase produzida pela bactéria inibe a produção de óxido nítrico por competição do substrato comum, a arginina, que é hidrolisada em uréia e L- ornitina, regulando negativamente a produção celular de NO (GOBERT et al., 2001). Esse mecanismo garante a sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Em *Lxx*, um homólogo ao gene arginase foi descrito e pode estar envolvido nos mecanismos pelos quais a bactéria coloniza o hospedeiro (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Para as bactérias garantirem sua sobrevivência, elas precisam burlar o sistema de defesa dos seus hospedeiros de modo a garantir sua colonização nos mesmos (RESENDE et al., 2003). A explosão oxidativa é um dos mais importantes e estudados mecanismos de defesa em plantas. Esse mecanismo é resultado da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), O_2^- (ânion superóxido), e OH^- (radicais hidroxilas livres), que são tóxicos aos organismos patogênicos (RESENDE et al., 2003). Por outro lado, o patógeno responde às ERO com enzimas responsáveis pela catalisação da degradação destas. Essas enzimas são codificadas por genes como superóxido dismutase e peroxidase que estão possivelmente ligados ao processo de adaptação das bactérias aos seus hospedeiros (RESENDE et al., 2003; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

O gene peroxidase é bem estudado no patossistema *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – batata, onde participa do processo de supressão das defesas do hospedeiro degradando espécies reativas de oxigênio e determinando a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (GRASKOVA et al., 2004).

Dentre os genes descritos no genoma da Lxx como possivelmente relacionados a patogenicidade, temos os genes celulase (*celA*) e uma protease (*pat-1*). Estes foram relatados como genes essenciais para a patogenicidade em *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), que é uma espécie muito próxima filogeneticamente a Lxx. O gene *celA* (celulase) codifica para uma endoglucanase relatada em Cmm como um importante fator de patogenicidade responsável pelo desenvolvimento do sintoma de murcha em tomateiro, que é promovida em decorrência do ataque enzimático das endoglucanases nos vasos do xilema e células parenquimáticas adjacentes (JAHR et al., 2000). Estudos baseados em mutagênese confirmaram a importância deste gene para a patogenicidade deste organismo, sendo que a transferência deste para um isolado não virulento o torna capaz de causar sintomas de murcha na planta (JAHR et al., 2000).

O gene *pat-1* de Cmm codifica para uma protease que é determinante de patogenicidade. Estudos revelaram que isolados avirulentos não apresentam o plasmídeo que contém a região *pat-1*. No entanto, quando o plasmídeo que contém esta região é inserido nestes isolados, estes se tornam virulentos. Estes resultados confirmam que o gene *pat-1* é essencial para o desenvolvimento da doença em tomateiro (DREIER et al., 1997).

A disponibilidade da sequência do genoma de Lxx é uma importante ferramenta para estudos de genômica funcional. A análise desta sequência visa elucidar os mecanismos pelos quais a bactéria coloniza e utiliza seu arsenal genético de patogenicidade nos vasos do xilema da cana-de-açúcar. Devido a importância dos genes citados acima, estudos do perfil de expressão dos mesmos foram feitos a partir de RT-qPCR. Estes genes foram escolhidos diante da possibilidade de obter-se resultados inéditos para um melhor entendimento do comportamento da Lxx frente a um estímulo provindo de seu hospedeiro.

2.1.9 RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real)

A técnica de RT-PCR (transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase) vem sendo amplamente empregada e ganhando importância desde o desenvolvimento da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (BUSTIN, 2002). O termo RT está relacionado à confecção de uma fita de DNA a partir do molde de RNA, mediado pela ação da enzima transcriptase reversa, denominando a fita gerada de cDNA. Enquanto que a PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) é uma técnica que permite a quantificação do mRNA em tempo real, este RNA deve estar na forma de cDNA, pois são necessários ácidos nucleicos de fita dupla para a realização da qPCR.

A técnica envolve a combinação da PCR com a combinação de um agente intercalante (SYBR Green) que se torna fluorescente quando está associado à molécula de DNA de dupla fita. Sendo assim, a quantidade de produto inicial colocado na reação de PCR é diretamente proporcional ao número de ciclos para detecção do sinal fluorescente (BUSTIN, 2000).

Para obter resultados reproduzíveis e com exatidão, a eficiência da reação deve ser próxima de 100%, ou seja, a quantidade de DNA deve duplicar após cada ciclo de amplificação. A eficiência é verificada através de uma curva padrão, cujo valor da inclinação da reta permite o cálculo da eficiência da reação (BUSTIN, 2000). A pureza do produto é verificada a partir de uma curva de dissociação, que revela se existe mais de um produto amplificado. Esta múltipla amplificação pode ser consequência da presença de dímeros, “harpins” ou amplificações inespecíficas. Desta maneira, uma reação específica se caracteriza pela produção de um único pico, representando uma única temperatura de dissociação da dupla fita de DNA (temperatura de melting), que prova a singularidade e pureza do produto amplificado (BUSTIN, 2000).

A intensidade de fluorescência é monitorada após cada ciclo da PCR, o que possibilita a análise da reação durante sua fase exponencial. O ponto no gráfico que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T). O C_T representa o primeiro ciclo em que o nível de fluorescência detectado está acima de sinais inespecíficos. O valor atribuído ao C_T é inversamente proporcional à quantidade de transcrito detectado (o valor de C_T para um transcrito

abundante será numericamente inferior ao de um transcrito menos abundante). A quantificação exata do transcrito é dada pelo ponto do C_T baseada na fluorescência, sendo que uma diminuição no valor de C_T de x para $x-1$ corresponde a um aumento de 2^x na quantidade do transcrito detectado (BUSTIN, 2000).

Quando o objetivo da análise visa verificar mudanças no perfil de expressão gênica, realiza-se uma quantificação relativa, isto é, a expressão do gene sob estudo é comparada com a expressão de um gene de referência (gene de expressão constitutiva), como os genes ribossomais (PFAFFL et al., 2001). Os genes de expressão constitutiva são aqueles ditos essenciais para o metabolismo do organismo, sendo continuamente expressos e em igual nível independente das condições ambientais em que o organismo se encontra. Neste trabalho foram testados dois genes de expressão constitutiva de forma a escolher o mais estável para a normalização dos dados: o gene *proC* (pyrroline-5-carboxilate reductase), já relatado na literatura como um excelente gene de expressão constitutiva em estudos com *Pseudomonas aeruginosa* (SAVLI et al., 2003), e o gene *pykA* (pyruvate kynase), estudado em *Actinobacillus pleuropneumoniae* como sendo de expressão altamente estável (NIELSEN; BOYE, 2005).

A quantificação da expressão relativa dos genes é calculada pelo modelo matemático de Pfaffl (2001). Este modelo utiliza as eficiências de amplificação dos genes de interesse (E) e seus respectivos C_T na determinação dos níveis de expressão. A eficiência E para cada par de primers é calculada de acordo com a equação 1 (RASMUSSEN, 2001). O valor da eficiência é dado antes do processo de quantificação da expressão gênica, quando é confeccionado uma curva de diluição usando diferentes concentrações de cDNA como molde inicial da quantificação. Dessa forma, a eficiência é uma entidade matemática fornecida pelo software baseada na inclinação (slope) da reta proveniente da curva de diluição (BUSTIN 2000; 2002). Os dados de eficiência são diretamente relacionados com o cálculo da expressão relativa (R), que é demonstrado na equação 2.

$$E = 10^{\left[-\frac{1}{\text{slope}}\right]} \quad (1)$$

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}}(\text{controle-tratamento})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref}}(\text{controle-tratamento})}} \quad (2)$$

O R é sempre calculado comparando-se dois tratamentos, sendo um o controle (sem tratamento indutor) e o outro submetido ao tratamento em estudo. Se o valor de R for igual a 1, significa que a expressão do gene estudado não foi alterada com o tratamento indutor. Valores maiores ou menores do que a unidade indica 1 que ocorreu aumento ou diminuição da expressão do gene em relação ao tratamento controle.

O E_{alvo} é o valor da eficiência obtida com o par de primers do gene que se deseja analisar. Ela apresenta o mesmo valor seja para a amostra ou para o controle. Isto é, a eficiência do par de primers que amplifica o produto do gene estudado tem o mesmo valor e é determinado na amplificação da curva padrão. A eficiência do gene alvo, por sua vez, é elevada ao valor obtido pela diferença entre o valor do C_T (valor disponibilizado pelo software) obtido com o par de primers do gene que se deseja verificar a expressão no tubo controle e o C_T obtido com os mesmos primers na amostra (tratamento). No denominador inserimos o valor da eficiência (E) obtida com a curva de diluição com o par de primers do gene de referência (controle interno ou normalizador) elevado pela diferença entre os C_{Ts} provenientes das reações desses mesmos primers no tubo amostra e tubo controle os mesmos usados para calcular os valores do gene alvo. Esta normalização dos dados em relação ao gene de referência resulta na denominação de razão relativa.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Isolado de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Utilizou-se a estirpe CTC B07 que foi seqüenciada pelo projeto genoma da Lxx (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) e depositada na coleção do banco de bactérias do Instituto Biológico sob o número IBSBF 1853.

2.2.2 Material vegetal e obtenção de fluido vascular de cana-de-açúcar

Plantas das variedades resistente (RB835486) e suscetível (SP80-3480) foram utilizadas para a extração de fluido vascular. As plantas apresentavam aproximadamente dois anos de idade, obtidas a partir de toletes colhidos em viveiro de matrizes do Centro de Tecnologia Canavieira - CTC (Piracicaba-SP) e foram cultivadas no campo experimental da Seção de Fitopatologia.

As plantas de ambas as variedades foram colhidas, lavadas e cortadas na região dos entrenós. O fluido vascular da cana-de-açúcar foi extraído com a ajuda de uma bomba a vácuo, na qual foi instalada uma mangueira de borracha que se adapta ao tolete e extrai o fluido por pressão positiva. O fluido foi recolhido em tubo estéril de 50 mL, centrifugado por 20 min a 5500 rpm e filtrado em membrana de 0,45 µm e posteriormente em filtro Millipore de 0,22 µm (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

2.2.3 Meio de cultivo para Lxx

O meio de cultivo MSC foi primeiramente formulado por Davis et al (1984) e modificado por Monteiro-Vitorello et al. (2004), renomeado como MSC *new*. O meio é composto por 8,0 g de peptona de soja (Biobrás), 30mL de solução de 0,1% de hemina bovina (Inlab) em NaOH 0,05M, 0,2g MgSO₄ · 7H₂O 0,01M, 13 mL de KH₂PO₄ 0,1M, completando-se o volume para 900 mL. Após o pH ser ajustado para 7,5 com NaOH

1M, o meio é esterilizado por autoclavagem. Finalmente, depois que o conteúdo atinge a temperatura próxima de 50°C, são adicionados 100 mL (10% vol/vol) de uma solução filtrada em filtro Millipore® de 0,22 µm, contendo 5,0 g de glicose (Merck), 0,5g de cisteína (Sigma) e 2,0g de albumina bovina (Inlab) – fração V e 0,5 g de metionina (Vetec). A modificação de Monteiro-Vitorello et al. (2004) consiste na adição de metionina ao meio (0,5% v/v). Para o meio de cultura sólido, adiciona-se 17 g de “corn meal agar” (Sigma) e 8 g de ágar bacteriológico (Sigma).

2.2.4 Obtenção da curva de crescimento de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar

Para obtenção da curva de crescimento de Lxx, um pré-inóculo foi primeiramente produzido em 50 mL de meio líquido, o qual foi obtido pela transferência de colônias de Lxx cultivadas em meio MSC *new* sólido por 10 dias a 28°C. O pré-inóculo foi incubado sob agitação (130 rpm) por 4 dias a 28°C, quando a cultura atingiu uma densidade óptica de 0,08, que corresponde à fase lag (fase de adaptação ao meio) do crescimento de Lxx (ROSA, 2006). Esta cultura foi utilizada para inocular À parte, 240 mL de meio de cultura foram divididos em três erlenmeyers (80 mL cada), onde foram adicionados 500 µL (1% vol/vol) do pré-inóculo. Destes três erlenmeyers, um frasco foi adicionado de 20% vol/vol (20 mL) de fluido vascular de cana-de-açúcar resistente, o outro de 20% vol/vol (20 mL) de fluido vascular suscetível e o terceiro foi a condição controle, contendo somente meio de cultura sem adição de fluido.

O volume de cada frasco foi subdividido em alíquotas de 5 mL que foram distribuídos em tubos estéreis de 50 mL, totalizando 15 tubos para cada tratamento. Estes foram incubados por um período máximo de 10 dias a 28°C sob agitação. A cada dois dias de incubação, 3 repetições de cada tratamento foram utilizados para leitura em espectrofotômetro, usando como leitura normalizadora (branco) o meio de cultura correspondente a cada condição de tratamento sem o inóculo de Lxx. Leituras de densidade óptica (DO) foram efetuadas em espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro

(Amershan Pharmacia biotech) a um comprimento de onda de 600 nm. Adicionalmente, alíquotas de 100 µl foram retiradas de cada tubo e semeadas em meio de cultura *MSC new* sólido e incubado por um período 10 dias a 28°C para excluir a hipótese de contaminação.

2.2.5 Cultivo de Lxx e indução da expressão gênica com presença de fluido vascular de cana-de-açúcar

Para análise da expressão gênica, Lxx proveniente de colônias foi cultivada por dez dias em 600 mL de meio *MSC new* quando atingiu uma densidade óptica de 0,6 que corresponde ao início da fase exponencial (ROSA, 2006). Neste ponto, a cultura foi subdividida em 6 frascos em quantidades iguais de volume (100 mL cada), constituindo 6 tratamentos: (1) exposição a 20% (vol/vol) de fluido vascular da variedade suscetível por um período de cinco minutos; (2) exposição a 20% (vol/vol) de fluido vascular da variedade suscetível por um período de vinte minutos; (3) exposição a 20% (vol/vol) de fluido da variedade resistente por um período de cinco minutos; (4) exposição a 20% (vol/vol) de fluido vascular da variedade resistente por vinte minutos; (5) e (6) foram a condição controle (adição de água em 20% (vol/vol) nos períodos de cinco e vinte minutos (figura 1).

Depois de decorridos os tempos, o metabolismo da bactéria foi bloqueado com uma solução contendo 1,2 mL de etanol absoluto e 0,0625 mL de fenol ácido saturado em água (quantidades para 10 mL de solução). Cada tratamento foi distribuído em tubos de 50 mL (repetições) e posteriormente submetidos a centrifugação por 20 minutos a 5500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* celulares foram armazenados em ultrafreezer a -80°C até o procedimento da extração de RNA. A figura 1 representa esquematicamente o processo experimental.

Figura 1 – Esquema ilustrativo do experimento para análise da expressão gênica de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar suscetível (S), resistente (R), e controle (sem adição de fluido) nos tempos 5 e 20 min

2.2.5.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído dos *pellets* celulares obtidos utilizando-se o protocolo de extração descrito por Bowtell e Sambrook (2003), com algumas modificações que foram efetuadas para maximizar o rendimento. Essas mudanças consistiram em mudanças na quantidade de lisozima e fenol saturado utilizados em algumas das etapas de extração, considerando que o protocolo foi descrito para extração de RNA em *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa e de grande produção de biomassa quando cultivada em laboratório.

De maneira simplificada, para um volume de 10 mL de cultura, os *pellets* foram ressuspendidos em 800 μ L de TE pH 8,0 (tris, 10mM pH 8,0; EDTA, 0,1mM) contendo 10 mg/mL de lisozima (Boehringer Mannheim). Estas suspensões foram adicionadas de 80 μ L de SDS 10% e incubadas em banho-maria a 64°C por 2 minutos. Após a incubação, adicionou-se 88 μ L de NaOAc 1M pH 5,2, que foi misturado gentilmente por inversão. O volume foi dividido em duas partes iguais para tubos estéreis de 2 mL nos quais se adicionou igual volume de fenol ácido saturado em água. Em seguida, os tubos foram incubados por 6 minutos a 64°C em banho - maria, sendo manualmente agitados a cada minuto. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C e a fase superior foi transferida para outro microtubo, ao qual adicionou-se igual volume de clorofórmio seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e o RNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de NaOAc 3M pH 5,2; 1mM EDTA. Após a incubação por 20 minutos a -80°C, centrifugou-se por 25 minutos a 14.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 1 mL de etanol 80% gelado seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. O etanol foi removido e o *pellet* ressuspendido em 30 μ L de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi aquecido a 65°C por 5 minutos em banho seco, e posteriormente aplicado em gel de agarose com formaldeído como descrito no manual “RNeasy minihandbook” (Qiagen, 2001).

2.2.5.2 Digestão do DNA contaminante do RNA

O DNA contido nas amostras de RNA foi digerido com DNaseI (Invitrogen). Para cada amostra foram utilizados 10 μ L de RNA total, 3 μ L de DNaseI, 0,5 μ L de RNase-out (Invitrogen), 1,6 μ L do buffer da DNaseI e 0,9 μ L de água tratada com DEPC. A digestão ocorreu por 1 hora a 37°C. Após este período, uma alíquota dessa digestão foi usada para reação de PCR para confirmar a eliminação do DNA e a amostra restante foi armazenada a -20°C. Após a constatação por PCR de total eliminação do DNA contaminante, 1,5 μ L de EDTA 25 mM (Invitrogen) foi adicionado as amostras para bloquear a ação da DNaseI.

2.2.5.3 Síntese da primeira fita de cDNA

Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit Superscript II Pre-Amplification System[®] para RT-PCR (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Em microtubo estéril (0,5 mL), foram adicionados 4 μ L de “random primer”, 2 μ g de RNA e água tratada com DEPC 0,01% (volume final de 10 μ L). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 1 minuto. Foram adicionados 4 μ L de tampão First Strand (5X), 2 μ L de DTT (0,1M) e 1 μ L de dNTPs (10mM). Os componentes foram misturados e incubados a 42 °C por 2 minutos após os quais se adicionou 1 μ L (200U) de Super Script II (Transcriptase Reversa). A reação foi incubada a 42 °C por 50 minutos e posteriormente inativada por aquecimento a 70 °C por 15 minutos. Ao tubo foi adicionado 1 μ L de RNase H de *E. coli* (2 unidades/ μ L) e o mesmo foi incubado a 37 °C por 20 minutos. A confirmação da síntese do cDNA foi feita através de PCR usando primers específicos. A fita única de cDNA foi usada como molde para amplificação por PCR usando primers específicos para cada gene.

2.2.5.4 Síntese de primers para análise da expressão gênica por qPCR

A sequência dos genes de interesse foram obtidas no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez), onde se encontra depositada a sequência do genoma da linhagem de Lxx utilizada sob o código de acesso NC 006087. Os genes *proc* - pyrroline-5-carboxilate reductase; *pykA* - pyruvate kynase; *per* - peroxidase; *arg* - arginase; *pat-1* – protease; *celA* – celulase, foram utilizados para a síntese de oligonucleotídios que atuaram como primers em reações de amplificação por meio de PCR. Os softwares Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e Gene Runner (<http://www.generunner.net/>) foram usados para determinar e analisar as seqüências dos oligonucleotídeos (tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos primers desenhados para amplificar os genes de interesse em reação de qPCR

Genes	sense	antisense
<i>proc</i>	5'CCCGCCTATGTCTTCTTCCT3'	5'GAAAGGTGCCGTTAACAAGG3'
<i>pikA</i>	5'CGGGTGACTTCCTGCTGA3'	5'ATGCCCTTGTTGTTGGAGAC3'
<i>per</i>	5'TGCCGTGTAGCCAGT 3'	5'AATCTCTTCGGTCAGGTGGA3'
<i>arg</i>	5'GTGATCCTGCGAGTTCTGG3'	5'GACGCTGTGGAGGAAGGA3'
<i>pat-1</i>	5'GGTTCCATTGCTTACCGATT3'	5'CGTCATCCTGCCAAGTTTC3'
<i>celA</i>	5'GGTTAGCAATAGTTGGGGAAT3'	5'CGTACTGTCTGCCCTGGT3'

2.2.6 Reação de PCR quantitativo em tempo real

As reações foram realizadas em termociclador de PCR quantitativo da Bio-Rad iQ™ 5 do Laboratório de Genética de Microrganismos (Departamento de Genética-ESALQ/USP). No presente estudo a metodologia utilizada para preparar as reações de amplificação em qPCR foi a descrita no manual de instruções do kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). O kit fornece todos os componentes necessários para a reação de PCR, exceto os primers específicos. O SuperMix contém Platinum® *Taq* polimerase, SYBR® Green I dye, tris-HCl, KCl, 6mM MgCl₂, 400µM dATP, 400µM dCTP, 400µM dGTP, 800 µM dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG), e

estabilizadores, que não são descritas a concentração exata no manual do fabricante (Invitrogen).

Cada reação foi composta por 2 µL de cDNA (2 µg) utilizados como molde de amplificação, 12,5 µL de SuperMix, 1,25 µL do primer sense 100µM, 1,25 µL do primer antisense 100µM (de cada gene específico) e 8 µL de água, totalizando um volume final de 25 µL. Para utilizar a concentração ideal de cDNA a ser utilizado na reação de amplificação foram feitas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} para a construção da curva padrão e de dissociação. Esta curva verifica a quantidade ótima de DNA a serem usadas nas quantificações e a especificidade dos primers que foi avaliada em um gradiente de 72°C até 95°C variando 1°C a cada 15 segundos.

A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador iQTM 5 (Bio-Rad) programado para uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguida de 50 ciclos 30 segundos a 95°C e 15 segundos a 56.5°C. Foram seguidas todas as recomendações já estabelecidas pelos softwares e plataforma de instrumentação do fabricante do aparelho (programa específico para SYBR[®] Green, Invitrogen).

2.2.6.1 Método de análise dos valores de C_T

A quantificação da expressão relativa dos genes foi calculada pelo modelo matemático de Pfaffl (2001). Este modelo utiliza as eficiências dos genes de interesse (E) e seus respectivos C_T na quantificação. Esses valores são obtidos diretamente dos resultados das análises (software) e usados para calcular a Expressão Relativa (R). As expressões relativas dos genes (R) calculadas pela fórmula de Pfaffl (2001). Os valores de R obtidos foram transformados em escala logarítmica (Log₂) para que fosse possível visualizar numericamente os genes que tiveram a expressão reprimida, induzida ou igual ao tratamento controle. A partir das repetições os valores de R foram utilizados para estimativa da média e para determinação do desvio padrão das amostras.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Curva de crescimento de Lxx em presença de 20% de fluido vascular de cana-de-açúcar

O crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) em presença de 20% de fluido vascular de cana-de-açúcar foi avaliado através de medições de densidade óptica do meio de cultura, realizadas a cada dois dias, por um período de 10 dias. Na figura 1 estão ilustradas as curvas de crescimento desta bactéria nos diferentes tratamentos. As curvas de crescimento demonstram que o crescimento de Lxx foi estimulado em presença de fluido vascular de ambas as variedades de cana-de-açúcar. Porém, o crescimento de Lxx foi mais acentuado na presença de 20% de fluido vascular da variedade resistente, confirmando resultados anteriores (MONTEIRO-VITORELLO, dados não publicados).

Os padrões de crescimento do controle (sem fluido) e do tratamento com fluido vascular da variedade suscetível foram similares. Lxx cultivada na condição controle teve um declínio no crescimento mais rápido em relação aos outros tratamentos, o que pode ser reflexo do esgotamento de nutrientes e acúmulo de compostos tóxicos secretados pela bactéria no meio de cultura. Entretanto, no tratamento com fluido vascular da variedade resistente, Lxx apresentou um crescimento visivelmente mais rápido e com uma densidade de células acentuadamente maior que o tratamento com fluido da variedade suscetível e o controle. Este resultado mostra claramente que a adição de fluido vascular de cana-de-açúcar no meio de cultura favoreceu o crescimento de Lxx, ou seja, o período de geração celular bacteriano foi menor e conseqüentemente a densidade de células no meio foi maior. Resultados parecidos foram obtidos com *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc), que é patogênica em capim Bermuda (*Cynodon dactylon*), onde se desenvolve nos vasos do xilema desta gramínea (HAAPALAINEN et al., 2000). Esta bactéria mostrou um crescimento maior *in vitro* quando ao seu meio de cultura foram adicionados extratos de capim Bermuda e seiva do xilema de milho (HAAPALAINEN et al., 2000). Considerando que tanto Lxc como Lxx são cultivadas *in vitro* em meios de cultura muito ricos em nutrientes, e a composição

nutricional de fluidos vasculares não é tão rica, o aumento na velocidade de crescimento dessas bactérias na presença de fluidos vasculares e extratos de seus hospedeiros provavelmente se devem à presença de fatores de crescimento e/ou substâncias sinalizadoras da própria planta hospedeira que são reconhecidas pelo patógeno (HAAPALAINEN et al., 2000).

Uma vez que a adição de fluido vascular do hospedeiro ao meio de cultura promoveu um crescimento bacteriano mais rápido, pode-se sugerir que a bactéria cresceria *in vitro* no fluido vascular puro, como única fonte de nutriente. No entanto, esse evento não ocorre, o que sugere que apenas o fluido vascular não comporta as condições e nutrientes necessários para o desenvolvimento destes organismos. Provavelmente ambas as bactérias são capazes de obter nutrientes de outras fontes, como substâncias aos redores dos tecidos do xilema. Pode-se ainda levantar a hipótese que substâncias presentes no fluido vascular de cana-de-açúcar, tais como moléculas orgânicas e/ou fragmentos de estruturas poliméricas atuem como sinalizadoras para a Lxx e estimulem seu crescimento, através da ativação ou repressão de genes relacionados à sua adaptação e patogenicidade. Estes resultados foram a base para o estudo de expressão gênica de Lxx em presença de ambos os fluidos vasculares por PCR quantitativa.

Figura 1 – Curva de crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em meio de cultivo MSC *new* suplementado ou não com fluido vascular de cultivares suscetível e resistente a RDS. As barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três repetições biológicas

2.3.2 Confirmação da integridade do RNA extraído

A pureza do RNA extraído foi analisada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260nm e 280nm. A pureza foi determinada pela relação dos valores obtidos nos diferentes comprimentos de onda 260/280nm e a integridade foi avaliada por visualização em gel de agarose (1,2%), conforme ilustrado na figura 2, onde é possível observar as bandas que correspondem às regiões 23S 16S e 5S do RNAr. A quantidade de RNA variou entre 0,640 µg/µL a 1,040 µg/µL (260 nm), e a qualidade do RNA variou entre 1,74 a 1,92 (260/280 nm).

Figura 2 – Gel de agarose contendo as amostras de RNA extraídas de cada tratamento. Amostras: C5 - tratamento controle de cinco minutos sem fluido de cana-de-açúcar; S5 - tratamento com fluido de cana suscetível, indução de cinco minutos; R5 - tratamento com fluido de cana resistente, indução de cinco minutos; C20 - tratamento controle de vinte minutos sem fluido de cana-de-açúcar; S20 - tratamento com fluido de cana suscetível, indução de vinte minutos; R20 - tratamento com fluido de cana resistente, indução de vinte minutos. O gel foi carregado com 2 μ L do volume de RNA extraído homogeneizados em e 2 μ L de loading buffer

2.3.3 Confirmação da eliminação do DNA

O DNA contido das amostras de RNA foi completamente eliminado após digestão com a enzima DNaseI (Invitrogen). A confirmação da eliminação total do DNA foi feita por PCR, na qual foi usada como controle positivo uma amostra de RNA antes da digestão do DNA. Os primers usados para a reação de amplificação foram os complementares à regiões do gene *celA*, que amplifica um fragmento de 110 pares de bases (figura 3).

Figura 3 – Gel de agarose mostrando a amplificação por PCR, confirmando a total eliminação de DNA nas amostras de RNA. A única banda presente no gel é o controle positivo (+). O controle negativo (-) é o mix da reação de PCR sem RNA, descartando a hipótese de contaminação dos primers e reagentes da reação. Os primers utilizados amplificam um fragmento de 110 pares de bases (pb) do gene *celA* como visualizado no gel diante do marcador molecular (MM) 1 kb plus (Invitrogen). As amostras C5, S5, R5, C20, S20 e R20, correspondem a RNAs dos tratamentos presentes em duplicata no gel

2.3.4 Análise quantitativa da expressão gênica

2.3.4.1 Curvas de dissociação

As curvas de dissociação, como descrito anteriormente, revelam a especificidade dos primers e do produto amplificado. Esta curva deve apresentar um único pico, representando uma única temperatura de dissociação da dupla fita de DNA (BUSTIN, 2000). As curvas de dissociação apresentadas na figura 4 são produtos da diluição do cDNA de 10^{-1} a 10^{-4} , para cada gene estudado. Picos únicos de dissociação foram observados para a grande maioria das amostras e dos genes avaliados, com exceção para uma amostra em cada um dos genes *per* e *pykA*. No entanto, estas amostras eram controles negativos e mostraram amplificação inespecífica do gene alvo.

A

B

C

D

E

Figura 4 – Curvas de dissociação (*melting curve*) dos genes *celA* (A); *per* (B); *arg* (C); *pat-1* (D) e *pykA* (E). Todas as curvas de desnaturação foram determinadas em gradiente de temperatura entre 72 e 95°C, com variação de 0,5°C a cada 15 segundos

2.3.4.2 Avaliação da expressão gênica *in vitro* de genes de adaptação e de patogenicidade de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar

O cálculo da expressão gênica relativa foi feito a partir do modelo matemático de Pfaffl (2001), sendo que a eficiência da reação para cada par de primers foi calculada de acordo com Rasmussen (2001). Os valores de R (expressão relativa) de cada gene analisado estão representados na tabela 2. Para a interpretação desses valores considerou-se o valor de R igual a 1, como indicativo de não alteração na expressão do gene. Valores maiores ou menores que a unidade correspondem a um aumento ou diminuição da expressão do gene, respectivamente. No entanto, para melhor visualização gráfica, valores $\log_2$ de R foram usados na plotagem dos dados, diretamente evidenciando a repressão (valores menores do que 1) ou indução (valores maiores do que 1) dos genes de interesse nos tratamentos com fluidos em relação ao controle (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Tabela 2 – Valores da expressão relativa (R) dos genes *celA*, *pat-1*, *arg* e *per*, de Lxx, em presença de 20% de fluido vascular de cana-de-açúcar de variedades suscetível (S) e resistente (R) nos tempos de 5 e 20 minutos de exposição aos tratamentos

Genes	Tempo (minutos)	Valores de R (expressão relativa)	
		Variedade R	Variedade S
<i>celA</i>	5	1,8733	1,6001
<i>celA</i>	20	1,0884	0,1642
<i>pat-1</i>	5	1,4554	0,9691
<i>pat-1</i>	20	0,8403	0,0852
<i>arg</i>	5	1,5689	1,4880
<i>arg</i>	20	1,4523	0,1207
<i>per</i>	5	0,9922	0,6602
<i>per</i>	20	1,3397	0,4626

Em nossos estudos, a expressão do gene *celA* apresentou regulação positiva nos tratamentos com fluido de cana-de-açúcar das variedades suscetível e resistente no tempo de 5 minutos. No entanto, após 20 minutos de exposição ao fluido vascular da variedade suscetível a expressão deste gene foi reprimida ao passo que em fluido vascular da variedade resistente voltou aos níveis de expressão constitutiva (figura 5). O aumento da expressão verificada no tempo de 5 minutos em ambos os fluidos pode estar relacionada com a resposta a presença de componentes do xilema da planta, como por exemplo, fragmentos de polímeros de celulose, que servem de substrato para as celulasas. Desta forma, seu aumento transiente na expressão se deve ao possível fato de estes compostos terem se esgotado no meio após o período de 20 minutos. Holtsmark et al. (2007) estudou a expressão relativa do gene *celA* em *Calvibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) durante a infecção em plantas de batata e em meio de cultura líquido. Em meio líquido, este gene teve uma expressão intermediária, enquanto que em planta o nível transcricional foi maior, principalmente nos primeiros estágios de infecção. Especula-se que as endoglucanases, que compõem um grupo das celulasas, rompem e degradam parcialmente polímeros de celulose nos estágios iniciais de infecção o que possibilitaria a dispersão da bactéria no hospedeiro. Por isso, sua expressão poderia ser positivamente regulada no início do processo infeccioso (HOLTSMARK et al., 2007).

O gene *celA*, como descrito anteriormente, pode estar ligado a patogenicidade de Lxx, sendo homólogo ao gene da celulase de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) que comprovadamente é fator de patogenicidade nesta bactéria (JAHR et al., 2000). Em Cmm, este gene é responsável pela indução de murcha no tomateiro, esse sintoma pode ser em decorrência do ataque enzimático dos vasos do xilema e células parenquimáticas adjacentes, permitindo a distribuição lateral de Cmm dentro da planta hospedeira alcançando os nutrientes necessários para sua colonização (JAHR et al., 2000).

Figura 5 – Níveis de transcrição do gene *ceIA* de *Lxx* em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar suscetível (S) e resistente (R) nos tempos de 5 e 20 minutos. As barras representam o desvio padrão de duas repetições biológicas

O gene *pat-1* de *Lxx* é homólogo ao gene encontrado em *Cmm*, que codifica para uma protease do tipo serina, encontrado em isolados virulentos e ausente em isolados pouco virulentos dessa espécie. Neste estudo, a expressão desse gene foi reprimida na presença de ambos os fluidos vasculares no período de 20 minutos; expressão inalterada em fluido vascular da variedade suscetível por 5 minutos; e expressão ligeiramente positiva em fluido vascular da variedade resistente no mesmo período (figura 6). No entanto, no tratamento com fluido vascular da variedade suscetível por 20 minutos, notou-se forte repressão, dez vezes mais que em fluido da variedade resistente no mesmo período. Esse fato pode estar relacionado com a ausência de componentes específicos da interação planta-patógeno, visto que a variedade é suscetível e talvez por isso não represente uma barreira efetiva contra o patógeno. Enquanto que a expressão positiva deste gene em fluido vascular da variedade resistente por 5 minutos pode ser interpretada da mesma forma, ou seja, a presença de um ou mais substratos podem ter ativado a expressão, considerando que a variedade é resistente, sendo provável a presença de substâncias relacionadas ao sistema de defesa da planta contra a bactéria. As proteases podem interferir na resposta de defesa da planta hospedeira promovendo ou reprimindo a reação de hipersensibilidade (HR)

(DE JONG et al., 2000; MUDGETT, 2005). Portanto, é razoável supor que o produto deste gene seja requisitado no início do processo infeccioso, interagindo com o sistema de defesa da planta. Essa hipótese corrobora com os dados da expressão deste gene em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar resistente no período de 5 minutos. Sendo o fluido vascular de uma variedade resistente, a ativação desse gene poderia estar relacionada ao reconhecimento de moléculas presentes no fluido que fazem parte do sistema de defesa do hospedeiro. Dessa maneira, o fluido vascular de uma variedade suscetível não contém essas moléculas sinalizadoras, o que impossibilita o reconhecimento do patógeno nos estágios iniciais de infecção.

A expressão relativa desse gene também foi analisada em *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em meio de cultura e em plantas de batata infectadas, onde este também foi reprimido e/ou inalterado em ambos os tratamentos (HOLTSMARK et al., 2007). Em *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* o único fato conhecido sobre a expressão do gene *pat-1* é a identificação do transcrito por northern blot a partir do RNA isolado da bactéria cultivada em meio de cultura (DREIER et al., 1997). Vale ressaltar, que a expressão de *pat-1* não foi possível em vários sistemas heterólogos como em células de *E.coli* e *Streptomyces lividans*. Além disso, não foi possível demonstrar a atividade proteolítica do produto deste gene *in vitro*, mesmo com o fornecimento de substratos como caseína, azocaseína e oligopeptídeos cromogênicos (BURGER et al., 2005). Estes dados indicam que a expressão de *pat-1* não é facilmente controlada sob condições de cultivo *in vitro*, talvez pela ausência de substratos apenas presentes no ambiente onde ocorre a interação planta-patógeno. (BURGER et al., 2005).

Figura 6 – Níveis de transcrição do gene *pat-1* de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar suscetível (S) e resistente (R) nos tempos de 5 e 20 minutos. As barras verticais representam o desvio padrão de duas repetições biológicas

O gene *arg*, que possivelmente codifica para uma arginase em Lxx, é homólogo ao gene de *Helicobacter pylori* que inibe a produção de óxido nítrico (NO) nas células hospedeiras (GOBERT et al., 2001). Neste estudo, o gene hipotético da arginase apresentou uma expressão positiva em todos os tratamentos, exceto em presença de fluido vascular da variedade suscetível após vinte minutos de exposição. Como este gene possivelmente está ligado ao processo adaptativo da bactéria, o perfil diferencial de expressão em presença de fluido vascular pode estar envolvido no reconhecimento do hospedeiro. A inibição da expressão deste gene no tratamento com fluido de planta suscetível pode estar ligado ao fato da bactéria não necessitar destes compostos, uma vez que a planta não apresenta resistência à bactéria. Podemos ainda supor que a expressão seja controlada por substrato, como a presença de NO, que pode ser menor em plantas suscetíveis. Desta forma, a realocação de gastos energéticos para expressão de outros genes, envolvido em processos como multiplicação seriam de grande interesse evolutivo para o patógeno.

Em animais, a L-arginina é oxidada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) criando subprodutos como a L-citrulina e óxido nítrico. Por outro lado, os patógenos

utilizam a enzima arginase para hidrolisar L-arginina em uréia e L-ornitina, a fim de competir com o hospedeiro pelo substrato comum, a L-arginina, e assim inibir a produção de óxido nítrico pelo mesmo (VINCENDEAU et al., 2002). A L-ornitina é substrato para a biossíntese de poliaminas (putresceína, espermidina e espermina), que participam de importantes funções celulares como a estabilização de ácidos nucleicos, membranas, regulação do crescimento celular e diferenciação (VINCENDEAU et al., 2002). Sendo assim, a possível produção de arginase por Lxx pode estar relacionada tanto à supressão de genes de defesa da planta relacionadas à via de produção do óxido nítrico, como ainda na utilização de poliaminas que podem estimular o crescimento da bactéria (WENDEHENNE et al., 2001).

Figura 7 – Níveis de transcrição do gene *arg* de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar suscetível (S) e resistente (R) nos tempos de 5 e 20 minutos. As barras verticais representam o desvio padrão de duas repetições biológicas

O gene que codifica para uma peroxidase (*per*) é homólogo ao encontrado em *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), onde este é expresso em resposta a ativação do sistema de defesa da planta, principalmente àquela ligada a produção de espécies reativas de oxigênio (RESENDE et al., 2003). Estudos mostram que a produção de peroxidases está diretamente relacionada ao sistema de defesa bactéria, com a função de detoxificar espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelo hospedeiro (RESENDE et al., 2003). Dessa forma, um gene homólogo a peroxidase de Cmm em Lxx pode estar ligado à adaptação da bactéria na planta de cana-de-açúcar, respondendo contra esses mesmos mecanismos de defesa. Na figura 8, pode-se observar que o gene hipotético *per* em Lxx teve sua expressão reprimida no tratamento com fluido vascular da variedade suscetível nos períodos de 5 e 20 minutos. No tratamento com o fluido vascular da variedade resistente no tempo de 5 minutos a expressão se manteve inalterada, enquanto que a expressão foi positiva no período de 20 minutos. As ERO são produzidas pela planta durante a tentativa do patógeno em infectá-las, o que justifica o baixo nível transcricional deste gene *in vitro*, sendo necessária a interação planta-patógeno para sua ativação.

Estes dados corroboram em parte com os observados para o gene *arg*, onde é possível supor que o reconhecimento bactéria-planta pode travar uma batalha onde tanto precursores de NO como ERO regula a expressão dos genes responsáveis por suas respectivas degradações da bactéria. Desta forma, as plantas suscetíveis não apresentam estas moléculas em seus fluidos, e conseqüentemente, a expressão destes genes não é ativada na bactéria quando em contato com o mesmo, disponibilizando energia para outros processos.

Figura 8 – Níveis de transcrição do gene peroxidase (*per*) de Lxx em presença de fluido vascular de cana-de-açúcar suscetível (S) e resistente (R) nos tempos de 5 e 20 minutos. As barras verticais representam o desvio padrão de duas repetições biológicas

Considerando a análise resposiva conjunta dos genes avaliados, é possível observar que os genes estudados nas condições apresentadas diferiram quanto a seus perfis de expressão gênica, com exceção do tratamento com fluido vascular de cana-de-açúcar suscetível no tempo de 20 minutos, no qual todos os genes foram reprimidos. Entretanto, no tratamento com fluido vascular da variedade suscetível no tempo de 5 minutos, apenas gene *celA* e *arg* foram positivamente regulados. Esse fato pode sugerir que pela planta ser suscetível a Lxx, o fluido vascular não apresente substâncias sinalizadoras para ativar os mecanismos de patogenicidade e adaptação, sendo menores as barreiras que dificultam a colonização da bactéria. Este fato evidencia que estes genes não são essenciais para a sobrevivência do patógeno quando em contato com plantas suscetíveis. O mesmo comportamento dos genes não é observado no tratamento com fluido resistente, onde a maioria dos genes foram positivamente regulados, talvez pela existência de substâncias que estão ausentes no fluido da variedade suscetível, havendo assim ativação dos genes, provavelmente devido ao reconhecimento de um hospedeiro mais hostil (resistente) a colonização da bactéria.

3 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho foi possível concluir que:

- A adição de fluido vascular ao meio de cultura utilizado para cultivo de Lxx induziu um aumento na densidade celular bacteriana, sendo esse efeito dependente da variedade de cana-de-açúcar utilizada.
- A exposição de células de Lxx a fluidos vasculares de cana-de-açúcar resultou na alteração dos níveis de expressão de genes supostamente envolvidos na patogenicidade desta bactéria e em sua capacidade de se adaptar ao hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- BOWTELL, D.; SAMBROOK, J. **DNA microarray**: a molecular cloning manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- BRESSIANE, L.A. **Seleção sequencial em cana-de-açúcar**. 2001. 133 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- BROWN, J. Ancient horizontal gene transfer. **Nature Reviews-Genetics**, Pennsylvania, v. 4, p.121-132, 2003.
- BUERGO, J.A.; GUZMÁN, T.; PAZOS, V.; PERALTA, E. LILIA y GAGO, S. Tratamientos hidrotérmicos para el control de RSD en propagación de caña de azúcar. **Revista de Protección Vegetal**, San José de las Lajas, v. 7, p. 17-21, 1992.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular endocrinology**, London, v. 25, p. 169-193, 2000.
- Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinoly**, London, v. 29, p. 23-39, 2002.
- CARNEIRO, J.B.; SILVEIRA, S.F.; DE SOUZA FILHO, G.A.; OLIVARES, F.L; GIGLIOTI, E.A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, Araras, v. 29, p. 614-619, 2004.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar/safra 2007/2008, primeiro levantamento, maio/2007**. Brasília, 2007. 12 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 30 out. 2007.
- DAMANN, J.R., K.E. Effect of sugarcane cultivar susceptibility on spread of ratoon stunting disease by the mechanical harvester. **Plant Disease**, Baton Rouge, v. 76, p. 1148-1149, 1992.
- DAVIS, M.J. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 115-140, 1986.
- DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.G.; SAUMTALLY, A.S. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000. p. 49-54.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; HARRIS, R.K.; 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 *Calvibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.107-117, 1984.

DE JONG, A.J.; HOEBERICHTS, F.A.; YAKIMOVA, E.T.; WOLTERING, E.J. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-liked proteases. **Planta**, Wageningen, v. 211, p. 656-662, 2000.

DREIER, J.; MELETZUS, D.; EINHNLAUB, R. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Bielefeld, v. 10, n. 2, p. 195-206, 1997.

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 aquatica* (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 Evolution Microbiology**, Pushchino, v. 50, p. 371-380, 2000.

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

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

GILLASPIE JR., A.G.; TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JUNIOR, A.G. **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 59-80.

GILLASPIE JR., A.G.; DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 987-990, 1973.

GOBERT, A.P.; MCGEE, D.J.; AKHTAR, M.; MENDZ, G.L.; NEWWTON, J.C. CHENG, Y., MOBLEY, H.L.; WILSON, K.T. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukariotic cells: A strategy for bacterial survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Sidney, v. 20, p. 13844-13849, 2001.

GRASKOVA, I.A.; BOROVSKII, G.B.; KOLESNICHENKO, A.V., and VOINIKOV, V.K. Peroxidase as a component of the signaling pathway in potato cells during ring rot infection. Rússia: **Russian Journal of Plant Physiology**, Lermontova, v. 51, n. 5, p. 621-626, 2004.

HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes and Infection**, Würzburg, v. 3, p. 545-548, 2001.

HOLTSMARK, I.; TAKLE, G.W.; BRURBERG, M.B. Expression of putative virulence factors in the potato pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* during infection. **Archives of Microbiology**, 2007. DOI 10.1007/s00203-007-0301-2.

IGLESIA, A. Review of ratoon stunting disease of sugarcane (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*). **Revista de Protección Vegetal**, Havana, v.18, n.1, p. 1-6, 2003.

IGLESIA, A.; DIAZ, MARICELA ;PERALTA, ESTHER, L. Validación de métodos inmunoquímicos para el diagnóstico de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. **Revista de Protección Vegetal**, Havana, v. 17, n.1, p. 20-24, 2002.

JAHR, H.; DREIER, J.; MELETZUS, D., BAHRO, R.; EICHENLAUB. The endo- β -1,4-glucanase celA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Bielefeld, v. 13, n. 7, p. 703-714, 2000.

LAINE, M.J.; HAAPALAINEN, M.; WAHLROOS, T.; KANKARE, K.; NISSINEN, R.; KASSUWI, S.; METZLER, M.C. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* play a role in virulence and contains an expansin-like domain. **Physiology Molecular Plant Pathology**, Helsinki, v. 57, p.221-233, 2000.

LAWRENCE, J.G. Gene transfer in bacteria: Speciation without Species? **Theoretical Population Biology**, Pittsburgh, v. 61, p. 449-460, 2002.

MARAMOROSCH, K.; PLAVISIC-BANJAC, B.; BIRD, J.; LIU, L.J. Electron microscopy of the ratoon stunted sugar cane: microorganisms in xylem. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 77, p. 270-273, 1973.

MATSUOKA, S. **Raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o agente causal**. 1972. 77 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Superior "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J. P.; TRUFFI, D.; DO AMARAL, A.M.; HARAKAVA, R.; DE OLIVEIRA, J.C.F.; WOOD, D.; DE OLIVEIRA, M.C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; DA SILVA, A.C.R.; 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.

MUDGETT, M.B. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 509-531, 2005.

NIELSEN, K.K.; BOYE, M. Real-Time quantitative reverse transcription-PCR analysis of expression stability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* housekeeping genes during *in vitro* growth under iron-depleted conditions. **Applied Environmental Microbiology**, Copenhagen, v. 71, p. 2949-2954, 2005.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Munich, v. 29, p. 2002-2007. 2001.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTERWER, C.; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid cycle real-time PCR: methods and applications**. Heidelberg: Springer Press, 2001. p. 21-43.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.123-130, 2003.

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

RICAUD, C.; RYAN, C.C. Leaf scald. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JR., A. G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Disease of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 39-58.

ROSA, D.D. **Uma abordagem genômica para o entendimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2006. 79 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SAVLI, H.; KARADENIZLI, A.; KOLAYLI, F.; GUNDES, S.; OZBEK, U.; VAHABOGLU, H. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, Istanbul, v. 52, p. 403-408, 2003.

SCHNEIDER, M.; DEBRUIJN F.J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology**, East Lansing, v. 2, n.12, p. 163-174, 1996.

STEINDL, D.R.L. Q.28 disease. **Cane Grow**, Melbourne, v. 12, n. 4, p. 191-193, 1949.

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.

TAYLOR, P.M.J.; PETRASOVITS, L.A.; VAN DER VOLD, R.; BIRCH, R.G.; CROFT, B.J.; FEGAN, M.; SMITH, G.R. ;BRUMBLEY, S.M. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australian Plant Pathology**, Queensland, v. 32, p. 367-375, 2003.

TEAKLE, D.S. The sugarcane ratoon stunting disease bacterium. In: FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. (Ed.). **Plant bacterial diseases: a diagnostic guide**. North Ryde: Academic Press, 1983. chap. 11, p. 247-257.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 12, p. 207-225.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Disponível em: <<https://www.unica.com.br>>. Acesso em: 30 out. 2007.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A. P.; DAULOUÈDE, S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M. D. Arginases in parasitic diseases. **Trends in Parasitology**, Bordeaux, v. 19, n. 1, p. 9–12, 2003.

WENDEHENNE, D.; PUGIN, A.; KLESSIG, D. F.; DURNER, J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends in Plant Science**, Oberschleissheim, v. 6, n. 4, p. 177–183, 2001.