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

Análise *in vitro* da expressão de genes de resposta a estresse oxidativo e osmótico da bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Raphael Severo da Cunha Antunes de Faria

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

Raphael Severo da Cunha Antunes de Faria
Biólogo

**Análise in vitro da expressão de genes de resposta a estresse oxidativo e osmótico da
bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

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

Faria, Raphael Severo da Cunha Antunes de

Análise *in vitro* da expressão de genes de resposta a estresse oxidativo e osmótico da bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* / Raphael Severo da Cunha Antunes de Faria. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

57 p. : il.

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

1. Raquitismo-da-soqueira 2. Cana-de-açúcar 3. qPCR 4. Parasitismo I. Título

CDD 633.61
F226a

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

Aos meus amados pais, Sônia e Joaquim
Fontes de minha inspiração
Por todo amor, incentivo, carinho e apoio
Em todas as fases da minha vida
Com amor
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, onde me formei e agora concluo o mestrado, por todas as oportunidades oferecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro.

Ao professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pelas oportunidades de aprendizado, orientação, confiança, apoio, paciência e conselhos ao longo dos anos.

À professora Dra. Claudia Barros Monteiro-Vitorello, pelos ensinamentos, conselhos e discussões em diversas etapas deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Genética pelo profissionalismo e dedicação a ciência, por contribuírem com novos conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia por toda atenção quando necessário.

À Mariana Cicarelli por toda ajuda e colaboração ao longo das etapas deste trabalho. Obrigado pela companhia, conversas, conselhos, ideias, discussões e atenção ao longo do período, além das risadas e momentos de descontração.

À Fernanda Moretti pelos inóculos e auxílio no cultivo de Lxx. Obrigado também pelas discussões, conversas e conselhos por todo o período.

Aos colegas e amigos, tanto atuais quanto antigos, do laboratório de Genética Molecular (LGM), Mariana Cicarelli, Fernanda Moretti, Lillian Bibiano, Aline Zavaglia, Vanessa Macedo, Maísa Curtolo, Thais Egreja, Debora Wassano, Giselle Carvalho, Jeronimo Vieira, Leandro Dallagnol e Rafael Poppin pelo companheirismo, conversas e agradável convivência.

Aos colegas e amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Victor Moura, Sarah Galvão, Flávia Rogério, Pedro Confort, pelo incentivo, apoio, companheirismo e convivência ao longo de diversas etapas.

Aos meus “irmãos” Eric Oliveira e Stefania Rosalen que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente por diversos momentos. Meu muito obrigado pelas conversas, conselhos e auxílios quando necessário. Sempre estarei presente da maneira que for necessária quando precisarem.

Aos amigos esalqueanos, Suzane Saito, Guilherme Oliveira, Mayra Camargo, Laís Mondini, Gustavo “Napister”, pela amizade e apoio em vários momentos necessários. Torço muito para o sucesso de vocês.

Aos meus amigos Bruna Rizato, Leonardo Miranda, Ademar Moretti, Mariana Bordini, Juliana Coelho, Luís Sansígolo, Eduardo Souza, Claudio Nakashima, Evelyn Majolo, Axel Thomé, Rafael Thomé, Mariana Murrer, Marcio e Ira Belucci, Bruno Rosa e Carla Alves pelos momentos de descontração, risadas e apoio.

Aos meus pais, Sônia e Joaquim, meus tios Renan, Tereza, Eliete, Ieda, Rommel e Sandra, meus primos Maurício e Rogério e a toda minha família, que próximos ou distantes, sempre me incentivaram e apoiaram. Vocês são fundamentais.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O raquitismo da soqueira da cana de açúcar	15
1.2 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	16
1.3 Sistemas de combate a estresses	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Identificação de genes responsivos a agentes de estresse de <i>Leifsonia xyli</i>	21
subsp. <i>xyli</i>	21
2.5 Expressão gênica de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> após exposição a H ₂ O ₂ e PEG	25
6000	25
2.6 Análise da expressão gênica de genes relacionados ao estresse	25
3 RESULTADOS	29
3.1 Quantificação da peroxidação lipídica de Lxx submetida a peróxido de hidrogênio e polietilenoglicol 6000	29
3.2 Extração de RNA de células de Lxx e confirmação de pureza do RNA para ambos estresses... ..	30
3.3 Análise das amplificações com os <i>primers</i> desenhados	31
3.4 Análise da estabilidade de expressão dos genes normalizadores	34
3.5 Análise de expressão gênica de células de Lxx expostas a 30mM de peróxido de hidrogênio.....	34
3.6 Análise de expressão gênica de Lxx exposta a 7% (p/v) de PEG 6000	37
3.7 Análise do <i>cluster</i> de genes carotenoides afim de verificar a presença de um operon.....	39
4 DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Análise *in vitro* da expressão gênica da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a estresse oxidativo e osmótico

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), no qual o estado de São Paulo é responsável por mais de 50% da produção. Esta cultura é hospedeira de diversos patógenos que podem limitar sua produção, dentre os quais se destaca a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), agente causal do raquitismo da soqueira (ratoon stunting disease - RSD). Pouco se sabe sobre a fisiologia deste organismo e quais as estratégias utilizadas por este para colonizar seu hospedeiro. No entanto, sabemos que para infectar e colonizar seus hospedeiros, é necessário que bactérias parasíticas superem estresses de diversas naturezas impostas durante estes processos, como os estresses oxidativo e o osmótico. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram identificar *in silico* e analisar a expressão *in vitro*, por qPCR, de genes relacionados a estes dois estresses. Uma análise da sequência do genoma de Lxx identificou 35 genes, sendo 8 relacionados ao estresse oxidativo, 9 relacionados ao estresse osmótico e 11 relacionados a estresse gerais, incluindo um *cluster* de 6 genes envolvidos na síntese de carotenoides. A expressão destes foi avaliada 60 minutos após exposição a 30mM de H₂O₂ ou 7% (p/v) de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000). Sete genes foram avaliados como normalizadores das reações de qPCR. A quantificação do grau de peroxidação lipídica indicou que ambos os tratamentos resultaram em sensível peroxidação, muito embora o efeito do tratamento com PEG 6000 tenha sido maior do que o tratamento com H₂O₂. A exposição ao H₂O₂ aumentou a expressão dos genes *katA* (catalase), *sodA* (superóxido dismutase), *msrA* (Sulfóxido de metionina redutase) e *msrB* (Sulfóxido de metionina redutase) bem como de todos os genes responsáveis pela síntese de carotenoides. Por outro lado, todos os genes relacionados ao estresse osmótico foram menos expressos na presença deste composto. Já quando a bactéria foi exposta a PEG 6000, o oposto ocorreu, ou seja, os genes relacionados ao estresse osmótico, que são *otsA* (Trealose-6-fosfato sintase), *otsB* (Trealose fosfatase), *treY* (Malto-oligosil trealose sintase), *treZ* (Malto-oligosil trealose trealoidrolase), *treS* (Trealose sintase), *proX* (Proteína de ligamento em substrato, tipo ABC glicina betaína transportadora), *proW* (Proteína permease, tipo ABC glicina betaína transportadora), *proZ* (Proteína permease, tipo ABC glicina betaína transportadora) e *Naggn* (Amidotransferase), além dos genes do *cluster* carotenoide, foram mais expressos, ao passo que alguns dos genes ligados à resposta ao estresse oxidativo foram menos expressos. Verificou-se também, através de PCR convencional utilizando *primers* para amplificar as regiões entre os genes carotenoides, que estes são expressos como um RNA policistrônico, constituindo assim um operon. Estes resultados validam predições anteriores baseadas na análise *in silico* da sequência do genoma de Lxx, confirmando que Lxx possui mecanismos responsivos aos estresses osmótico e oxidativo aos quais é submetida durante o processo de infecção de seu hospedeiro.

Palavras-chave: Raquitismo-da-soqueira; Cana-de-açúcar; qPCR; Parasitismo

ABSTRACT

In vitro analysis of gene expression of the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in response to osmotic and oxidative stresses

Currently, Brazil is the largest producer of sugarcane (*Saccharum* spp.) and the state of São Paulo accounts for over 50% of the national production. This crop is host to many pathogens that may limit its production, among which the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), causal agent of ratoon stunting disease (RSD), is one of the most important. Little is known about the physiology of this organism and the strategies it uses to colonize its host. However, it is known that to infect and colonize their hosts, parasitic bacteria have to overcome stresses of various natures imposed during these processes, such as oxidative and osmotic stresses. In such context, the objectives of this study were to identify *in silico* and to analyze *in vitro*, by qPCR, the expression of Lxx genes related to these two stresses. The analysis of the genome sequence of Lxx identified 35 genes, of which 8 were related to oxidative stress, 9 to osmotic stress and 11 to general stress, including a cluster of 6 genes involved in the synthesis of carotenoids. The expression of these genes was assessed 60 minutes after exposure to either 30 mM of hydrogen peroxide (H₂O₂) or 7% (w/v) of polyethylene glycol 6000 (PEG6000). Seven genes were tested as normalizers of the qPCR reactions. The quantification of the level of lipid peroxidation in cells of Lxx indicated that both treatments induced substantial peroxidation, even though the effect of PEG6000 was greater than that of H₂O₂. The exposure to H₂O₂ resulted in higher expression of the genes *katA* (catalase), *sodA* (superoxide dismutase), *msrA* (sulfoxide methionine reductase) and *msrB* (sulfoxide methionine reductase), as well as all genes involved in the synthesis of carotenoids. On the other hand, the expression of all genes related to osmotic stress was reduced in the presence of this compound. When Lxx was exposed to PEG6000, the opposite was detected: the expression of the genes related to osmotic stress, *otsA* (Trehalose-6-phosphate synthase), *otsB* (trehalose phosphatase), *treY* (Malto-oligosil trehalose synthase), *treZ* (Malto-oligosil trehalose trehaloidrolase), *treS* (trehalose synthase), *proX* (ligament protein substrate, type ABC glycine betaine carrier), *proW* (permease protein, ABC type glycine betaine carrier), *proZ* (protein permease, type ABC glycine betaine carrier) and *naggn* (amidotransferase), along with the carotenoid genes was increased, while some of the genes linked to oxidative stress response were less expressed. It was also concluded through conventional PCR that the genes of the carotenoid cluster are expressed as a polycistronic RNA and, therefore, this arrangement constitutes an operon. These results validate previous *in silico* predictions that Lxx has mechanisms responsive to osmotic and oxidative stresses to which it is subjected during the process of infection of its host.

Keywords: Ratoon Stunting Disease; Sugarcane; qPCR; parasitism

1 INTRODUÇÃO

1.1 O raquitismo da soqueira da cana de açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) é uma cultura presente em diversos países subtropicais e tropicais, tendo como maiores produtores o Brasil, a Austrália e a Índia (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO - ÚNICA, 2010). No Brasil, o estado de São Paulo tem ampla participação, sendo responsável por 54,2% da área cultivada (URASHIMA; GRACHET, 2012). Devido à sua importância, essa cultura tem sido objeto de intenso melhoramento genético, objetivando a obtenção de variedades que apresentem maior produtividade (maior produção de colmos e sacarose por hectare), maior tolerância ao estresse hídrico (devido à expansão da cultura para áreas com menor aptidão edafoclimática), melhor adaptação à colheita mecanizada e maior resistência à pragas e doenças (URASHIMA; MARCHETTI, 2013).

Em função da alta demanda da indústria sucroalcooleira, o plantio desta cultura está se expandindo para novos estados como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Alagoas, Pernambuco e Paraná. Um sério problema para estes novos canaviais é a possibilidade do transporte de material propagativo contaminado com patógenos sistêmicos, dentre os quais destaca-se a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (GAGLIARDI; CAMARGO, 2009), agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD). O RSD é uma das doenças mais importantes da cultura (IGLESIA, 2003) e o maior agente de disseminação deste patógeno é o próprio homem, através do uso de instrumentos contaminados em práticas culturais (máquinas de colheita, facões, etc). Esta doença diminui a produtividade da cana-de-açúcar nas principais regiões do mundo onde a agroindústria sucroalcooleira está presente (IGLESIA, 2003). Estas perdas podem variar de 10 a 41% em função da variedade, título bacteriano e condições ambientais as quais a cultura está exposta (URASHIMA; MARCHETTI, 2013). As perdas atingem 41% na África do Sul, 37% da Austrália e 27% no Brasil (BAILEY; BECHET, 1997; YOUNG; BRUMBLEY, 2004; GAGLIARDI; CAMARGO, 2009). Para o Estado de São Paulo, a estimativa de perdas nas últimas três décadas é de mais de dois bilhões de dólares (URASHIMA; MARCHETTI, 2013).

Esta doença tem por sintomas externos o encurtamento de entrenós e a redução no diâmetro e comprimento dos colmos, justificando seu nome (GAO et al., 2008). Podem ainda surgir sintomas internos como pontuações avermelhadas em feixes vasculares e coloração

rósea próximo ao meristema apical (IGLESIA, 2003; COMSTOCK; LENTINI, 2005). Entretanto, estes sintomas não são específicos e podem ser relacionados a outros patógenos, dificultando a diagnose da doença e o emprego de métodos de controle específicos (TOKESHI, 1997; GRISHAM et al., 2007). Estes se baseiam no plantio de variedades tolerantes e também no uso de material de plantio sadio, que pode ser obtido via cultura *in vitro* de meristemas ou por termoterapia de toletes. (BRUMBLEY et al., 2006; URASHIMA; GRACHET, 2012).

1.2 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

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). No entanto, a etiologia da doença somente foi esclarecida em 1984 através do isolamento do patógeno e confirmação de sua patogenicidade (DAVIS et al., 1984). Primeiramente, a bactéria foi classificada como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* e posteriormente reclassificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (IGLESIA, 2003).

Leifsonia xyli subsp. *xyli* (Lxx) é uma bactéria gram-positiva, fastidiosa, corineforme, não móvel, aeróbia obrigatória, da ordem *Actinomycetales*, família *Microbacteriaceae*, e que coloniza o xilema da cana-de-açúcar (DAVIS et al., 1984; EVTUSHENKO et al., 2000; IGLESIA, 2003). Suas células medem 0,25-0,5 µm por 1-4 µm, com forma reta ou levemente curva e ocasionalmente inchada nas pontas ou no meio (TEAKLE et al., 1973). As colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm em meio de cultura M-SC new (TEAKLE; RYAN, 1992; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Mais recentemente, uma estirpe de Lxx transformada com o gene GFP auxiliou na compreensão de como a bactéria coloniza a planta. Além de ser encontrada no xilema, seu principal nicho segundo já descrito na literatura, a bactéria também foi encontrada nas células do mesófilo e nas células do feixe da bainha, local de alta atividade fotossintética e mais rica em termos de nutrientes. (QUECINE et al., 2015). A bactéria possui um cromossomo circular de aproximadamente 2,6Mb, com 68% de GC (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), além de abrigar um número alto de pseudogenes, totalizando 13% do total dos genes preditos. Em seu genoma, apenas 105 genes foram identificados com algum possível papel na adaptação e patogenicidade ao hospedeiro, dos quais 18% são possivelmente pseudogenes. Vale observar que este é o menor número de genes desta categoria identificados em uma bactéria

fitopatogênica (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004). O decaimento gênico da bactéria sugere que ela passou por um processo de evolução, onde inicialmente era um organismo de vida livre e que passou a ser um patógeno quase perfeito da cana de açúcar, em função do alto título bacteriano e ausência de sintomas graves e assim sendo, teria obtido seus genes de virulências por transferência lateral. (MILLS et al. 2001; MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004).

1.3 Sistemas de combate a estresses

Em bactérias, existem dois sistemas de defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs). O primeiro combate a ação do peróxido de hidrogênio, que é controlado pelo ativador transcricional denominado OxyR, e o segundo age em resposta ao radical superóxido, controlado pelo sistema SoxRS. Ambos os mecanismos só se manifestam na presença de condições de estresse (CABISCOL et al., 2000; IMLAY, 2008). O ativador transcricional OxyR controla, entre outros, a ativação dos genes que codificam para catalase, glutaredoxina e glutathione redutase, ao passo que o sistema SoxRS envolve cerca de dez genes, incluindo o gene que codifica a Mg-superóxido dismutase. A ativação desses sistemas aumenta a resistência celular aos agentes oxidantes (CABISCOL et al., 2000; IMLAY, 2008). *Leifsonia* possui genes destes dois sistemas: *kata* (ORF 2780.1), que codifica uma catalase, e *ahpC* (ORF 12690.1), que codifica uma proteína da família alquil-hidroperóxido redutase, referentes ao sistema OxyR, e *sodA* (ORF 11510.1), que codifica uma superóxido dismutase e *zwf* (ORF 11590.1), que codifica uma glucose-6-fosfato 1-dehidrogenase, ambas componentes do sistema SoxRS. Fora destes sistemas, existem ainda mais de dez genes envolvidos na proteção anti-oxidativa, dos quais o sulfóxido de metionina redutase, NADH oxidase e o thiol peroxidase são exemplos clássicos. (LI et al., 2009). Ainda como suposto mecanismo de combate ao estresse oxidativo, *Lxx* possui o gene *bcp* (ORF 19210.1), que codifica uma proteína que se relaciona com a alquil hidroperóxido redutase produzidas pelo gene *ahpC*, *gpoA* (ORF 17630.1), que codifica uma glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) e *msrA* e *msrB* (ORF 6570.1 e 6560.1 respectivamente), que sintetizam enzimas que atuam no reparo de proteínas danificadas pelo estresse oxidativo e, portanto, são importantes tanto no combate a EROs como na virulência (BRENOT et al., 2004; LAKHAL et al., 2011; ROMSANG et al., 2013).

Dentre os mecanismos bacterianos de combate ao estresse osmótico, a síntese de trealose é usada por diversos organismos (CARVALHO et al., 2011). Este composto possui um papel duplo dentro das células, pois além de servir como reserva de carbono e energia ainda atua na proteção de membranas e proteínas. Nesta via, Lxx possui os genes *otsA* (ORF 13230.1), *otsB* (ORF 13220.1), *treY* (ORF 2190.1), *treZ* (ORF 2200.1) e *treS* (ORF 11830.1). Além da síntese de trealose, Lxx possui os genes *proW* (ORF 12260.1), *proZ* (ORF 12270.1) e *proX* (ORF 12280.1) que se assemelham a genes do operon *proU*. Este operon, que já foi relatado em *Bacillus subtilis* (LIN, HANSEN; 1995), codifica três proteínas (proteínas ProX, ProW e ProZ) que constituem um sistema de transporte de alta afinidade de glicina betaína de fontes externas para o interior da célula (KAPPES et al, 1996; ABBAS et al. 2014). Para manter a turgescência, reestabelecer o balanço hídrico e proteger a célula dos efeitos do estresse osmótico, a Lxx pode acumular no seu citosol grandes quantidades de moléculas osmoprotetoras como a glicina betaína, transportando-as do xilema da cana-de-açúcar através das proteínas traduzidas a partir do operon *proU* (BOCH, 1996; KAPPES et al, 1996; ABBAS et al. 2014).

No contexto de combate a estresses gerais, é importante também ressaltar a via da tiamina (vitamina B1), que tem eficácia contra ambos os estresses citados por ser utilizada como cofator de diversas enzimas relacionadas ao metabolismo energético que são essenciais à sobrevivência da célula, como por exemplo nas enzimas do tipo descarboxilases em toda célula (KOWALSKA et al., 2012). Lxx possui ainda os genes *cds* (ORF 9470.1), *dxs* (ORF 10450.1) e *thiL* (ORF 9720.1) que atuam na via de síntese de tiamina, cujo produção e acúmulo no interior da célula protege-a de diversos estresses, entre estes o estresse osmótico e o oxidativo (GIGLIOBIANCO et al., 2010; KOWALSKA et al., 2012). Integrando também o grupo dos genes de estresses gerais, o genoma de Lxx abriga um *cluster* constituído de genes similares aos responsáveis pela síntese de pigmentos carotenoides bacterianos encontrados em outras actinobactérias (TAO, et al., 2006) (Figura 1). Este *cluster* é composto pelos genes *crtEb* (licopeno elongase, ORF 15580.1), *lctB* (licopeno e-ciclase isoprenoide transferase B, ORF 15590.1), *crtYe* (C50 carotenóide epsilon ciclase, ORF 15600.1), *CrtI* (fitoeno deidrogenase, ORF 15610.1), *crtB* (fitoeno sintase, ORF 15620.1) e *crtE* (geranil geranil pirofosfato sintase, ORF 15630.1). Pigmentos carotenoides são conhecidos por participarem do combate a diferentes estresses, como oxidativo e osmótico, em bactéria através do acúmulo destes pigmentos para neutralizar as diferenças de potenciais osmóticos ou utilizando o pigmento carotenóide como alvo a ser oxidado por EROs (GLAESER; KLUG, 2005; OREN, 2008).

Figura 1- Parte do mapa genômico de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* onde está localizado o *cluster* carotenóide. O número da ORF está acima de cada gene e a coordenada genômica abaixo.

O RSD tende a ser mais severo em regiões suscetíveis a períodos de seca, pois esta condição favorece o crescimento de Lxx dentro da cana-de-açúcar (RAMOS, 2012). Sendo assim, sob déficit hídrico, a planta sofre alterações morfológicas e fisiológicas (HSIAO, 1973; SULLIVAN; EASTIN, 1974), dentre as quais estão a redução na quantidade de água disponível no xilema, o aumento na quantidade de alguns compostos como prolinas, trealoses e glicina betaína, que levam ao acréscimo da concentração de solutos nos vasos do xilema e, por consequência, também à elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como por exemplo o H_2O_2 (ROGIERS et al. 2011; CIA et al., 2012; ABBAS et al. 2014). Nestas condições, os microrganismos presentes nos vasos estão sujeitos ao menos a dois tipos de estresses: o osmótico e o oxidativo.

Apesar da evidência experimental de que Lxx produz uma toxina quando exposta a estresse osmótico (CASTRO, 2012), nada se sabe sobre os efeitos deste estresse na expressão dos genes de adaptação ao hospedeiro e nos genes do *cluster* carotenóide. O comportamento dos genes relatados diante do estresse osmótico e oxidativo que as células estão submetidas quando presentes no xilema da cana-de-açúcar sob estresse hídrico também é desconhecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar genes de adaptação ao hospedeiro que estão focados em proteger a Lxx de estresses oxidativos e osmóticos a que a mesma está sujeita quando dentro do xilema da cana de açúcar bem como analisar o comportamento dos genes do *cluster* de genes carotenóides e genes relacionados diante destes dois estresses.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação de genes responsivos a agentes de estresse de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

A análise da sequência genômica da estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi realizada através do site “<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/lbi/index.html>”. A análise focou na busca de genes não-truncados que estejam implicados na defesa contra estresses oxidativos e osmóticos. Os genes selecionados foram divididos em quatro categorias: genes relacionados a estresse oxidativo, genes relacionados ao estresse osmótico, genes relacionados a estresses gerais e genes normalizadores a serem usados como controle nas reações de qPCR (Tabela 1). Em seguida, as sequências de nucleotídeos dos genes escolhidos foram comparadas com as de outros organismos através do algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para que os primers fossem desenhados em regiões específicas de Lxx.

2.2 Desenho de *primers*

Foram desenhados 35 pares de *primers* (Tabela 2 e 3) com auxílio do programa *Beacon Designer* (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) considerando os seguintes parâmetros: a) tamanho de amplicon de 100 a 150 pares de base; b) tamanho do primer entre 17 – 23pb; c) temperatura de anelamento entre 57 – 69° C. O mesmo programa foi utilizado para evitar a presença das estruturas secundárias *hairpin*, *self-dimer*, e *cross-dimer*, nesta ordem. As reações de amplificação consistiram de 12,5 µL de tampão master mix 2X (Promega), 0,3 µM de cada primer, 2 µL de cDNA e água isenta de nucleases (Ambion, Holanda) para completar um volume final de 25 µL. O programa de PCR seguiu as seguintes condições: um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 10s a 95°C, 30s a 54-68°C (dependendo dos *primers*) e 10s a 72°C para extensão. Ao fim, seguiu-se um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 1 - Genes selecionados para análise de expressão *in vitro* e respectivas proteínas codificadas, números das ORFs no genoma de Lxx e processos metabólicos aos quais pertencem

(continua)			
GENE	PRODUTO	ORF	PROCESSO METABÓLICO
<i>katA</i>	Catalase	2780.1	Estresse Oxidativo
<i>ahpC</i>	Proteína da família AhpC/TSA	12690.1	
<i>sodA</i>	Superóxido Dismutase	11510.1	
<i>Zwf</i>	Glucose-6-fosfato 1-deidrogenase	11590.1	
<i>Bcp</i>	Homólogo comigratório Bacterioferritina	19210.1	
<i>gpoA</i>	Glutathione peroxidase	17630.1	
<i>msrA</i>	Sulfóxido de metionina redutase	6570.1	
<i>msrB</i>	Sulfóxido de metionina redutase	6560.1	
<i>otsA</i>	Trealose-6-fosfato sintase	13230.1	
<i>otsB</i>	Trealose-fosfatase	13220.1	
<i>treY</i>	Malto-oligosil trealose sintase	2190.1	Estresse Osmótico
<i>treZ</i>	Malto-oligosil trealose trealoidrolase	2200.1	
<i>treS</i>	Trealose sintase	11830.1	
<i>proW</i>	Proteína permease, tipo ABC glicina betaína transportadora	12260.1	
<i>proZ</i>	Proteína permease, tipo ABC glicina betaína transportadora	12270.1	
<i>proX</i>	Proteína de ligamento em substrato, tipo ABC glicina betaína transportadora	12280.1	
<i>Naggn</i>	Amidotransferase	10740.1	
<i>Cds</i>	Fosfatidato citidil transferase	12480.1	Estresses Gerais
<i>Dxs</i>	1-deoxi xilulose-5-fosfato sintase	10450.1	
<i>thiL</i>	Tiamina-monofosfato quinase	9720.1	
<i>marR</i>	Regulador de transcrição da classe marR	15640.1	
<i>crtE</i>	Geranyl geranyl pirofosfato sintase	15630.1	
<i>crtB</i>	fiteno sintase	15620.1	
<i>crtI</i>	fiteno deidrogenase	15610.1	

Tabela 1 - Genes selecionados para análise de expressão *in vitro* e respectivas proteínas codificadas, números das ORFs no genoma de Lxx e processos metabólica aos quais pertencem

(conclusão)			
GENE	PRODUTO	ORF	PROCESSO METABÓLICO
<i>crtYe</i>	C50 carotenóide epsilon ciclase	15600.1	Estresses Gerais
<i>Lctb</i>	Licopeno e-ciclase isoprenoide transferase B	15590.1	
<i>crtEB</i>	Licopeno elongase	15580.1	
<i>desA</i>	Dessaturase de ácidos graxos delta	22410.1	
<i>16S rRNA</i>	RNA ribossomal 16S	1380.1	Normalizadores
<i>proC</i>	Pirrolina-5-carboxilato redutase	1720.1	
<i>Pyk</i>	Piruvato kinase II	11340.1	
<i>qcrA</i>	Ferro-enxofre componente de ubiQ-cytB redutase	9830.1	
<i>hrdB</i>	RNA polimerase fator da família sigma-70	10190.1	
<i>sigH</i>	RNA polimerase, fator sigma-70, subfamília ECF	19190.1	
<i>fliA</i>	RNA polimerase, fator sigma	6230.1	

2.3 Cultivo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*:

A estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) foi utilizada em todos os experimentos. Essa estirpe foi depositada na coleção do banco de bactérias do Instituto Biológico sob o número IBSBF 1853 e o número de acesso da sequência de seu genoma no *GenBank* (NCBI- *The National Center for Biotechnology Information*) é NC 006087. A bactéria foi cultivada em meio de cultura líquido MSC new, o qual foi primeiramente formulado por Davis et al. (1984) e posteriormente modificado por Monteiro-Vitorello et al. (2004). A modificação consiste na adição de metionina a uma concentração de 0,5% (v/v). As culturas bacterianas foram sempre incubadas a 28 °C sob agitação de 150 rpm.

2.4 Quantificação da peroxidação lipídica em Lxx exposta a peróxido de hidrogênio e PEG 6000

Os agentes de estresse utilizados neste estudo foram o peróxido de hidrogênio e o polietileno glicol 6000. No entanto, afim de determinar se a exposição a estes agentes resulta em estresse celular em Lxx, delineou-se um experimento com 4 tratamentos e 4 repetições por tratamento para determinar se há dano celular, avaliado pela análise do grau de peroxidação lipídica das células bacterianas. Os tratamentos consistiram em expor células de Lxx a 30 mM de H₂O₂ (tratamento H₂O₂ 60) ou a 7% (p/v) de PEG 6000 (tratamento PEG 60) por 60 minutos. Também foram usados dois controles representados por células não expostas aos agentes e analisadas imediatamente antes da adição dos compostos ao meio de cultura (controle 0) ou 60 minutos após (controle 60). Para tanto, 800mL de meio de cultura M-SC new foram adicionados de 1% do volume (v/v) de inóculo bacteriano de Lxx (OD_{600nm} = 0,7; aproximadamente 8 dias) e então divididos em volumes iguais de 50mL em 16 frascos erlenmeyer de 125mL. As culturas bacterianas foram incubadas por 7 dias até atingirem uma densidade óptica aproximada de 0,6, quando foram adicionados os agentes estressantes. A concentração e os tempos utilizados nos tratamentos foram definidos através de ensaios e resultados preliminares. O grau de peroxidação foi determinado através da quantificação de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), segundo Heath e Packer (1968) e Buege e Aust (1978), resultante dos danos à membrana celular, sendo assim uma quantificação indireta do grau de estresse. Pellets de bactérias pesando 0,1 g foram macerados em 450 µL de TCA (ácido tricloroacético) (0,1%) e

20% de PVPP. Após a homogeneização, 1,4 mL da suspensão foram transferidos para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga de mesa. Um volume de 250 µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado de 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho seco por 30 minutos a 95°C e resfriada em gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. Em seguida, 1mL do sobrenadante foi utilizado para realizar a leitura em espectrofotômetro Lambda 40 (Perkin Elmer, EUA) a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em nmol/mL.

2.5 Expressão gênica de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* após exposição a H₂O₂ e PEG 6000

Uma alíquota de 4mL de um pré-inóculo de Lxx (OD_{600nm} = 0,6) foi transferida para 400mL de meio sob intensa agitação. Volumes de 50 mL foram transferidos para oito erlenmeyers de 125 mL. As culturas foram incubadas a 28 °C por sete dias sob agitação de 150 rpm até atingir densidade óptica próxima de 0,6. Após este período, foram adicionados 170 µL de H₂O₂ 30% a quatro culturas, resultando numa concentração final de 30mM. As quatro culturas restantes, às quais não foram adicionadas H₂O₂, serviram como controles experimentais. Sessenta minutos após a adição do agente estressante, as células expostas ao peróxido foram precipitadas através de centrifugação por dez minutos a 10.000 rpm, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

Um experimento com o mesmo delineamento descrito acima foi conduzido independentemente, exceto que, neste, as culturas foram expostas a 7% (p/v) de PEG 6000. De igual modo, o tratamento controle consistiu de culturas não expostas a este agente.

2.6 Análise da expressão gênica de genes relacionados ao estresse

O RNA total foi extraído de acordo com protocolo descrito por Bowtell e Sambrook (2003) com algumas alterações para maximizar sua eficácia. A extração de RNA iniciou-se com a suspensão dos pellets das células de Lxx em 80 µL de TE pH 8,0 (tris, 10mM pH 8,0; EDTA, 0,1mM) contendo 10mg/mL de lisozima (Sigma), adição de 80 µL de SDS 10% e incubação em banho-maria a 64°C por 2 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 88 µL de NaOAc 1M pH 5,2, que foi misturado gentilmente por inversão. O volume foi dividido em duas partes iguais em microtubos estéreis de 2mL nos quais adicionou-se 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 em microcentrífuga de bancada e a fase superior foi transferida para um novo 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 1mL de etanol 80% gelado seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. O etanol foi removido e o pellet suspenso em 30 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi aquecido a 65°C por 5 minutos em banho seco para facilitar a suspensão. A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e ajustada para 100 ng/µL.

Uma alíquota de 4 µL da suspensão de RNA foi utilizada para avaliar a qualidade da extração por eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1% contendo 20% de formaldeído 37%, 10% de tampão MOPS 10X (MOPS 0,2M; acetato de sódio 50 mM; EDTA 10 mM; pH 7,2) e 0,5X de Sybr safe (Invitrogen). Antes da aplicação no gel, adicionou-se a 400 ng de RNA ao tampão de amostra 5X (30,84% de formamida; 40% de MOPS 10X; 7,2% de formaldeído 37%; 0,5% de EDTA 500mM; 20% de glicerol; 0,35% de azul de bromofenol) na proporção de 4 de amostra: 1 de tampão. As amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos e aplicadas no gel. Para digestão de DNA residual, foi utilizado a enzima *RQ1 – RNase free DNase* (Promega). Para cada 1 µg de RNA foi adicionado 1 unidade da enzima e 1 µL de tampão em um volume final de 10 µL completado com água livre de nucleases. Em seguida, para confirmação da não contaminação do RNA com DNA genômico foi feito um PCR qualitativo com o *primer referente ao gene 16SrRNA* com as mesmas especificações descritas no item 2.2.

O RNA foi utilizado em uma reação de transcrição reversa usando o kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega) para a obtenção do cDNA segundo as recomendações do fabricante. Nesta reação, juntamente com o RNA bacteriano, foi adicionado 1 µL de *random primers* a 50 ng/µL; em seguida, as amostras foram aquecidas a 70°C por 5 minutos e colocadas no gelo por, no mínimo, 5 minutos. Após esse período, foi adicionado a cada amostra 15 µL de um mix de reação contendo 4 µL de 5X *reaction buffer*, 4 µL MgCl₂ (4mM concentração final), 1,0 µL de PCR *nucleotide mix* (concentração final de 0,5mM de cada nucleotídeo), 20 unidades de *recombinant RNasin*, 1,0 µL da enzima transcriptase reversa *GoScript Reverse Transcriptase*, 1,0 µL de água livre de nucleases

(Ambion, Holanda) para completar um volume final de 15 µL. O cDNA foi armazenado a -20 °C e posteriormente utilizado nas reações de qPCR.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit *GoTaq® Real-Time qPCR and RT-qPCR Systems for Dye-Based Detection* (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. As reações foram compostas por 2 µL de cDNA, 6,25 µL de tampão de amplificação GoTaq qPCR Master Mix 2X, 0,3 µM de cada *primer* e água livre de nucleases para um volume final de 12,5 µL. As reações foram feitas como descrito no item 2.2 e para cada amostra houve uma repetição técnica.

Os dados brutos (dados sem correlação da linha de base) dos níveis de fluorescências foram analisados pelo programa LinRegPCR (RAMAKERS et. al., 2003) para se obter a regressão linear de cada curva de amplificação para efeito de cálculo da eficiência de amplificação de cada curva ($E=10^{\text{slope}}$). Valores ideais de E entre 1,8 e 2 e de correlação (R) superiores a 0,995 foram considerados satisfatórios. Como genes normalizadores foram testados os genes *16S rRNA* (sub-unidade 16S do RNA ribossomal), *proC* (pirrolina-5-carboxilato redutase), *pyk* (piruvato kinase II), *qcrA* (ferro-enxofre componente de ubiQ-cytB redutase), *hrdB* (fator sigma-70 da RNA polimerase), *sigH* (fator sigma-70 subfamília ECF da RNA polimerase) e *fliA* (RNA polimerase, fator sigma) (tabela 1). A análise da estabilidade da expressão dos genes foi obtida através da ferramenta RefFinder (www.leonxie.com/referencegene.php) que une os métodos geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e o método ΔC_t (SILVER et al., 2006). Após o cálculo de cada programa separadamente, o RefFinder fornece pesos diferentes a cada um dos resultados e realiza a média geométrica dos mesmos, classificando-os em graus distintos de estabilidade. A análise de expressão gênica e as análises estatísticas dos experimentos foram realizadas pelo software REST (Relative Expression Software Tool) (PFAFFL et al., 2002). Um *heat map* com agrupamento hierárquico foi gerado através do software Cluster 3.0 (HOON et al., 2004).

2.7 Análise de expressão de genes do *cluster* carotenoide

Afim de determinar se o *cluster* de genes carotenoides de Lxx atua como um operon, *primers* foram desenhados de modo a amplificar regiões que compreendem o final de um gene e o início do gene seguinte. Os *primers* foram desenhados como descrito no item 2.2. Foram desenhados 3 pares de *primers* referentes as regiões entre os genes *crtE* e *crtB*; *crtB* e

crtI; *crtI* e *crtYe*. Para amplificar os últimos genes do *cluster* foi utilizado o *primer crtYeF* e o *primer crtEbR*. Estes foram usados em reações de PCR convencional utilizando cDNA do experimento com PEG como molde, seguindo o protocolo descrito no item 2.2. Amplificações positivas são indicativos da presença de mRNA policistrônico.

3 RESULTADOS

3.1 Quantificação da peroxidação lipídica de Lxx submetida a peróxido de hidrogênio e polietilenoglicol 6000

A concentração de MDA variou significativamente entre tratamentos ($P=0,05$) segundo o teste de Tukey. O tratamento com PEG foi o que resultou em maiores concentrações de MDA, diferindo dos demais, sendo esta aproximadamente 300% superior (PEG 60' = 2,29 nmol de mda/mL) em comparação com as concentrações dos controles (C = 0,76 nmol de mda/mL e C 60' = 0,84 nmol de mda/mL) e aproximadamente 50% maior que o tratamento com peróxido de hidrogênio. O tratamento com peróxido de hidrogênio também diferiu dos controles, sendo verificado um aumento de 200% na concentração de MDA (H_2O_2 60' = 1,58). Não houve diferença na concentração de MDA entre os tratamentos controle. (Figura 2).

Figura 2- Concentração de MDA (nmol/g amostra) em células de Lxx não expostas a agentes estressantes no tempo inicial (C) e 60 minutos após o início do experimento (C 60') e em células expostas por 60 minutos a 7% (p/v) PEG 6000 (PEG 60') e 30 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 60'). Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade

3.2 Extração de RNA de células de Lxx e confirmação de pureza do RNA para ambos estresses

A concentração de RNA extraído de células de Lxx variou entre 102,37 ng/ μ L e 643,89 ng/ μ L. Os valores de absorbância das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} respeitaram os intervalos de 1,9 a 2,0 e 1,8 a 2,0 respectivamente como recomendado por Sambrook et al. (2001). A integridade do RNA foi avaliada por gel de agarose desnaturante 1% onde foi possível observar nitidamente os fragmentos correspondentes às moléculas 23S, 16S e 5S do RNA ribossomal (Figura 3).

Figura 3- Qualidade do RNA extraído das repetições do tratamento controle (amostras c1 a c4) e do tratamento de exposição a peróxido de hidrogênio por 60 minutos (amostras 60-1 a 60-4). O gel foi carregado com 300 ng de amostra e 4 μ L de tampão de carregamento

As amostras de RNA foram submetidas a um PCR convencional utilizando os *primers* complementares ao gene *16S rRNA*. Como controle positivo da reação, foi usada uma amostra com DNA de Lxx. Nenhuma amostra de RNA resultou em amplificação (Figura 4), indicando que não houve contaminação com DNA genômico.

Figura 4- Resultado da reação de PCR das amostras de RNA extraídas das repetições do tratamento controle (amostras C1 a C4) e do tratamento de exposição a peróxido de hidrogênio por 60 minutos (amostras 60-1 a 60-4) e um controle positivo (C+) para verificar o funcionamento da reação. O gel foi carregado com 6 μ L de amostra e 4 μ L de tampão de carregamento

Para o experimento de estresse osmótico, os resultados foram semelhantes, tanto para qualidade do RNA quanto para a contaminação com DNA genômico (dados não apresentados).

3.3 Análise das amplificações com os *primers* desenhados

Cada par de primers (Tabela 2) foi testado tanto em PCR convencional como em qPCR, afim de ajustar as temperaturas ideais de hibridização. Em ambos os casos, os primers se revelaram específicos, pois resultaram na amplificação de um único fragmento de tamanho esperado a julgar pelo padrão de bandas em gel de agarose (Figura 5) ou ainda a julgar pela curva de *melting*, onde foi verificado apenas um pico.(Figura 6).

Figura 5- Exemplos de fragmentos de amplificação usando os primers para os genes *crtB*, *crtI*, *crtYe*, gene ribossomal 16S, *pyk*, *qcrA* e *sigH* em gel de agarose 1%. Padrões de pesos moleculares de 50pb (M1) e de 100 pb (M2)

Figura 6- Exemplos de curvas de *melting* geradas para os genes *16S rRNA* (A), *qcrA* (B), *katA* (C), *proX* (D) ilustrando a especificidade dos primers

Tabela 2- Genes, sequências dos *primers*, temperaturas de hibridização e tamanhos esperados do fragmento

Nome dos <i>Genes</i>	Sequência dos <i>primers</i> F	Sequência dos <i>primers</i> R	Temperatura de hibridização (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
<i>katA</i>	CATCGTCGGCAACAACACCC	GTCCGCATCCCGCAGTCC	64	109
<i>ahpC</i>	CACCCAGGCTCCCGACTT	CGAGCGGGAAGAAGACGAT	64	104
<i>sodA</i>	CCTATGACTATTCGGCTCTCG	AGTGAGGTTGTCCGCATCG	61	143
<i>zwf</i>	CCAGGGCATCCGCTTCGTC	GGATCGAGAGGTAGAACG	61	128
<i>bcp</i>	CGGGTCATCGGCATCTCG	GACCTTGCCGTAGAGCTTC	61	150
<i>gpoA</i>	GGTCATCCTCGTCGTC	ACTGGTTGCTCGGGAATC	58	125
<i>msrA</i>	GATGTCCCGAACGCTACG	ATCGTTGCCCTGGCGGTT	61	150
<i>msrB</i>	CTTCGCCTCCGTGGACAA	GCGCAACGTCCCGAAGG	61	112
<i>otsA</i>	CGGCGTGCTCATTCTCAG	CGATCTCGACGGCCTGCG	64	119
<i>otsB</i>	ACGGCAAGGACATTATCG	TCATCCGTCACGTCGTCC	58	121
<i>treY</i>	ATCAACGGACTCGGAGCG	GCGTGCGAGCAGCCCGGCGGA	64	150
<i>treZ</i>	GCGTCCATGCGAACCTCAC	GAAAGCCGAGTACGTCCC	61	119
<i>treS</i>	CTACTACGGCGACGAGAT	GGAGGAAGAGTTTGCCCG	58	134
<i>proW</i>	GCTCTGATCGGCACCAAG	GCGGACTGCACGACCTC	61	131
<i>proZ</i>	CATCCCTCCACTCCTTGC	GAAGGGAGAGCGGCAGTT	58	131
<i>proX</i>	GCCTATGGGGTACAGCG	GGTGTGGCCGTGTAGATATTG	61	113
<i>Naggn</i>	GACCGACCTGAGCTTCC	CGACGCTCTCCACGATG	61	80
<i>cds</i>	CACCTGGAGCGTCTTCGT	AGACCGCTCACGTAGGCTC	61	147
<i>dxs</i>	GTTCACAAGCTGCTCACCG	CTGAGCGACGACGAGGCG	64	131
<i>thiL</i>	GCCTGGTCGAGTCCCGCG	CGAGGGCGACGACGGGCA	68	136
<i>marR</i>	CGAACACCTCCACATCTCCACC	TCCTCTCGCTCACCTGCCG	58	134
<i>crtE</i>	GACCCACGCTCCACACC	TCCCAGAGCCGCCGGTAG	68	147
<i>crtB</i>	ATGACCCGCACCGAGACCG	CGTACACATCTTCGACTCG	64	172
<i>crtI</i>	GCCCGTCCTGGTATCTCAT	AGGGCTCGGTTGGCGGCT	64	174
<i>crtYe</i>	TCGTCTACCTCGTTGTCTGCT	CCAGGCGAGGAAGAAGAGGAC	64	137
<i>lctb</i>	CGTCTGCTCAGCCTGGTCTT	CCAAAACCGCCGTGAGGAC	64	152
<i>crtEB</i>	CGACTCGGCGACCTCAAG	GACGCCCCACAGGAAGAA	64	122
<i>desA</i>	GACGAACACCCAGCAACCG	GCCCGAGCGTGGATGCGA	68	124
<i>16S rRNA</i>	CGAACGATGAACCAGGA	CAACCGCTGGAGATGCC	59	144
<i>proC</i>	CCCGCCTATGTCTTCTTCCT	GAAAGGTGCCGTTAACAAGG	61	132
<i>pyk</i>	CGGGTGACTTCCTGCTGA	ATGCCCTTGTTGTTGGAGAC	61	140
<i>qcrA</i>	GCTGGAACAGAAAGCGAAAG	GGGTCTGCTGCTCGTAGAGT	61	162
<i>hrdB</i>	GTAACCTCGGACTCATC	CTTGTTGATGACCTCCAC	52	164
<i>sigH</i>	CGCTGCCGTTTCATGGACC	GGTTGGTGCCCTGCTGGA	59	135

3.4 Análise da estabilidade de expressão dos genes normalizadores

Os níveis de expressão dos genes normalizadores foram analisados pela ferramenta RefFinder a fim de avaliar a estabilidade de expressão.. Os genes com menores médias geométricas são considerados mais estáveis. Por este critério, os genes *16S rRNA* e *proC*, foram selecionados como normalizadores para as análises de expressão gênica (Figura 7).

Figura 7- Médias geométricas dos genes normalizadores avaliados pela ferramenta RefFinder para dados do experimento de estresse oxidativo (A) e de estresse osmótico (B)

3.5 Análise de expressão gênica de células de Lxx expostas a 30mM de peróxido de hidrogênio

Dentre os genes de estresse oxidativo, os genes *katA*, *sodA*, *msrA* e *msrB* foram mais expressos na presença de H_2O_2 em relação ao controle, enquanto que os genes *ahpC*, *zwf* e *bcp* não apresentaram alteração em expressão (Figura 8). Na categoria de genes relacionados ao estresse osmótico, o gene *otsA* também não mostrou diferença de expressão. No entanto, todos os outros oito genes analisados bem como os três dos genes relacionados a estresses

gerais foram menos expressos (Figura 8). Por outro lado, a adição de peróxido aumentou a expressão dos genes relacionados a produção de carotenoides, na categoria de genes relacionado a estresses gerais, exceto o gene *marR*, cuja expressão foi reduzida (Figura 8). A razão de expressão de cada gene foi usada para gerar um *heat map* (Figura 10).

Figura 8 - Razão de expressão de genes ($p \leq 0,05$) de Lxx cultivada sob estresse oxidativo a 60 minutos. As barras representam o desvio padrão

3.6 Análise de expressão gênica de Lxx exposta a 7% (p/v) de PEG 6000

Dentro dos genes relacionados ao estresse oxidativo, os genes *gpoA*, *msrA* e *msrB* e o gene *dxs* de estresses gerais foram menos expressos em relação ao controle, enquanto que os genes *katA*, *sodA*, *ahpC* e *bcp*, de estresse oxidativo, e os genes *thiL* e *cds*, de estresse gerais, não apresentaram diferença de expressão (Figura 9). No caso dos genes relacionados ao estresse osmótico, todos os genes estudados foram mais expressos quando comparados ao controle (Figura 9). Dentre os genes relacionados a estresses gerais, todos os de síntese de pigmentos carotenóides foram mais expressos que o controle, à exceção do gene *marR* que não apresentou expressão diferenciada, (Figura 9). A razão de expressão de cada gene foi utilizada para gerar um *heat map* (Figura 10).

Figura 9 - Razão de expressão dos genes analisados ($p \leq 0,05$) de Lxx cultivada sob estresse osmótico à 60 minutos. As barras representam o desvio padrão.

Figura 10- *Heat map* dos genes analisados de Lxx sob estresse oxidativo e osmótico a 60 minutos. As cores vermelhas significam que os genes foram induzidos e verde reprimidos

3.7 – Análise do *cluster* de genes carotenoides afim de verificar a presença de um operon

Foram utilizados os *primers* (Tabela 3) desenhados nas regiões inter-gênicas do *cluster* carotenoide para confirmar a presença do RNA mensageiro policistrônico através da técnica de PCR convencional como descrito no item 2.2, porém utilizando o cDNA sintetizado a

partir do experimento de expressão gênica com Lxx submetida a estresse osmótico (figura 11).

Tabela 3- Sequência dos *primers*, temperatura de hibridização e tamanho esperado do fragmento

Região dos <i>primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Temperatura de hibridização (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Entre <i>crtE</i> e <i>crtB</i>	F - GACGACCTGCTCGGCGTGTTTC R - GCGGGTCATTTCATACGATCCT	58	348
Entre <i>crtB</i> e <i>crtI</i>	F -TCGGCGACGGGCGAATCGGTCAG R- TCGGAGAACAGTGCGTGC	59	290
Entre <i>crtI</i> e <i>crtYe</i>	F - CTCCGCCCCAGGCAACGC R - GGACATCGAGCAGGACCATC	59	253

Figura 11- Regiões em destaque mostram as regiões escolhidas para verificar a existência de um RNA policistrônico. Região 1 utilizou *primers* crtE_B F e crtE_B R, região 2 utilizou os *primers* crtB_I F e crtB_I R, a região 3 utilizou os *primers* crtI_Ye F e crtI_YE R e a região 4 utilizou os *primers* crtYe F e crtEb R.

Todas as regiões amplificaram os alvos, conforme esperado, confirmando a presença de um RNAm policistrônico para os genes do operon carotenóide (Figura 12).

Figura 12- Fragmentos resultantes das amplificações de cDNA de Lxx com *primers* desenhados em regiões intergênicas do cluster de genes carotenóide. M – marcador molecular 1kb+ Invitrogen, 1 – região entre os genes *crtE* e *crtB*, 2 – região entre os genes *crtB* e *crtI*, 3 – região entre os genes *crtI* e *crtYe*, 4 – região entre os genes *crtYe* e *crtEb*

4 DISCUSSÃO

Leifsonia xyli subsp. *xyli*, é uma fitobactéria de comportamento peculiar, pois pertence a um restrito grupo de organismos fastidiosos habitantes do xilema de plantas, junto com espécies do gênero *Xylella*. Em função da importância da doença que causa em cana-de-açúcar, a sequência do genoma de Lxx foi analisada, quando foram descritos diversos genes de adaptação ao hospedeiro que resultaram em diversas hipóteses sobre sua biologia (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). No entanto, poucos ainda são os trabalhos de análise funcional de seus genes. Um aspecto fundamental da relação patógeno-hospedeiro, que foi tema deste trabalho, é entender como os patógenos se adaptam às condições adversas impostas pelo seu hospedeiro, sendo que, dentre estas, temos os estresses oxidativo e o osmótico. O principal agente de estresse oxidativo é o H_2O_2 oriundo da resposta de defesa da planta que ocorre em função da infecção por patógenos e de estresses de outras naturezas (APEL; HIRT, 2004). Já o estresse osmótico decorre em função da imposição de um déficit hídrico ao hospedeiro, uma vez que nestas condições a quantidade de água disponível em seus tecidos diminui o que resulta na produção de alguns compostos osmorreguladores que aumentam a concentração de solutos (ROGIERS et al. 2011; CIA et al., 2012; ABBAS et al. 2014).

O presente trabalho analisou a expressão de genes de resposta a estes estresses quando Lxx foi exposta *in vitro* a H_2O_2 e PEG 6000. As condições de estresse impostas por estes agentes foram previamente avaliadas pela medição do grau de peroxidação lipídica das células bacterianas, que evidenciou um aumento significativo da concentração de lipídios peroxidados quando Lxx foi exposta a 30 mM de peróxido de hidrogênio e 7% (p/v) de PEG 6000 por 60 minutos, reflexo do dano causado à membrana celular. Entre as duas situações de estresse, no entanto, a adição de PEG 6000 resultou em uma concentração de malondialdeído quase 300% superior a verificada nos controles. Já no caso do peróxido de hidrogênio, este valor foi 200% superior aos controles. Por outro lado, na ausência de agentes estressantes, não houve alteração significativa na peroxidação de lipídios no período analisado, dado que não houve alteração na concentração de MDA entre os controles no tempo inicial do experimento e 60 minutos após.

A análise da expressão gênica de Lxx submetida ao estresse oxidativo por H_2O_2 evidenciou aumento na expressão dos genes *kata*, *soda*, *msrA* e *msrB*. Os genes *kata* e *soda* codificam as proteínas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que são enzimas

de fundamental importância para resistência ao estresse oxidativo (CABISCOL et al, 2000). A catalase é responsável por decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, enquanto a superóxido dismutase é responsável por converter o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio e oxigênio na presença do próton H^+ . Desta forma, as duas enzimas tem uma ação complementar, pois, enquanto a SOD elimina o radical O_2^- e por consequência gera H_2O_2 , a CAT utiliza esta molécula em uma reação que gera água e oxigênio (CABISCOL et al., 2000; LEE et al., 2005; HANDTKE et al., 2014). Caso este sistema entre em desequilíbrio por uma superprodução de SOD e/ou a CAT se torne inativa ou pare de ser sintetizada, a SOD também reagirá com o peróxido de hidrogênio; porém, nesta situação, causará mais danos que benefícios, pois entre os produtos desta reação estarão espécies reativas de oxigênio como o próprio radical superóxido ou ainda o radical hidroxila (OH^-) (LEE et al., 2005; HANDTKE et al., 2014). Os genes *msrA* e *msrB* codificam duas sulfóxido metionina redutases, que são enzimas responsáveis por reverter a oxidação de sulfóxido metionina (Met(O)) a metionina (ROMSANG et al., 2013). Met(O) é formada a partir da oxidação de metionina por espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 , e seu acúmulo em células procarióticas pode acarretar um aumento de geração de EROs, perda da capacidade de combate ao estresse oxidativo, degradação proteica e inativação de diversas enzimas (STADTMAN et al., 2005). Desta forma, a maior expressão desses genes em Lxx evidencia um mecanismo completo e capaz de responder a este estresse. A expressão de outros três genes relacionados ao estresse oxidativo (*ahpC*, *zwf* e *gpoA*) não foi alterada na presença do composto. Este resultado pode ter ocorrido pois as condições podem não ter sido suficientes para a ativação destes genes, ou ainda é possível que esta ativação ocorra em tempos diferentes do aqui analisado. Entre os genes de estresses gerais, os genes do *cluster* carotenoide foram mais expressos em relação ao controle e com razões de expressões muito próximas, mostrando que estes pigmentos também podem estar auxiliando no combate a EROs, a exemplo do descrito em outros procariotos (GLAESER; KLUG, 2005; OREN, A; 2008). Por outro lado, todos os genes da categoria de resposta ao estresse osmótico foram menos expressos na presença de H_2O_2 .

A análise da expressão dos genes de Lxx na presença de PEG 6000 evidenciou uma resposta distinta daquela verificada em resposta a H_2O_2 , pois todos os genes relacionados ao estresse osmótico foram mais expressos em comparação ao controle. Os genes *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ* e *treS* atuam na síntese de trealose. Os resultados deste estudo indicaram que das quatro vias biossintéticas de trealose descritas em procariotos, as três presentes em Lxx, (*OtsAB*, *TreYZ* e *TreS*) segundo análises *in silico*, são todas funcionais (figura 13) (CARPINELLI et al., 2006; MCINTYRE et al., 2007). A primeira via envolve a reação de

condensação da glucose-6-fosfato com uma UDP-glucose pela proteína codificada pelo gene *otsA*, produzindo a trealose-6-fosfato e, em seguida, uma desfosforilase sintetizada pelo gene *otsB* atua na desfosforilação da molécula produzindo a trealose (CARPINELLI et al., 2006; MCINTYRE et al., 2007; CARVALHO et al., 2011). A segunda via utiliza os genes *treY* e *treZ* transformando maltodextrinas em trealose e, por fim, a trealose sintase, codificada pelo gene *treS* converte maltose em trealose (WOLF et al., 2003; CARPINELLI et al., 2006; MCINTYRE et al., 2007). *Corynebacterium glutamicum* possui as mesmas três vias de síntese de trealose que Lxx e também não possui genes que codificam para trealase, enzima responsável por degradar a trealose. Porém, foi mostrado neste organismo que a trealose sintase catalisa uma reação reversível e, desta maneira, pode converter trealose a maltose (WOLF et al., 2003). Neste contexto, é possível também que Lxx também seja capaz de produzir maltose a partir de trealose. Contribuindo com a via da trealose, a Lxx possui ainda o gene *malE*, que é capaz de sintetizar uma proteína responsável pelo transporte de trealose e de maltose do meio intra para o extra celular e também no sentido oposto. A julgar pelos resultados, todas as vias relacionadas a trealose se mostraram ativas e completas, possuindo genes de síntese, transporte e degradação de trealose, o que evidencia um mecanismo eficiente em responder a estresse osmótico. Os genes *proX*, *proW* e *proZ* também foram mais expressos em relação ao controle na presença de PEG 6000. Estes genes codificam proteínas transportadoras que possuem alta afinidade com moléculas osmorreguladoras como a glicina betaina, que são transportadas para fora ou dentro da célula em função do estresse (LIN; HANSEN, 1995; ABBAS et al. 2014). Em *Bacillus subtilis* foi descrito um operon constituído de genes *pro*, similares aos de Lxx. Esta informação, aliada ao padrão de expressão dos genes *pro* aqui relatado leva à hipótese de que estes genes também atuem como um operon em Lxx (LIN; HANSEN, 1995; ABBAS et al. 2014). O gene *naggn* também foi mais expresso na presença de PEG 6000 em relação aos controles. Este gene codifica uma amidotransferase capaz de converter a molécula N-acetilglutaminilglutamina em N-acetilglutaminilglutamina amida (Naggn). Já a Naggn atua com outras moléculas descritas anteriormente, como a trealose e a glicina betaina, no combate ao estresse osmótico através do acúmulo da mesma no citosol da célula (SAGOT et al., 2010). Todos os genes do *cluster* carotenoide, que pertencem aos genes relacionados a estresses gerais, também foram mais expressos quando comparados ao controle, corroborando com a função de proteção a estresses gerais atribuídas a estes pigmentos (GLAESER; KLUG, 2005; OREN, A; 2008). Por outro lado, três dos genes relacionados ao estresse oxidativo (*gpoA*, *msrA* e *msrB*) foram menos expressos que o

controle, junto com o gene *dxs* pertencente a categoria de estresse gerais. Os outros genes analisados não foram diferencialmente expressos. Desta forma, na presença de PEG6000, os resultados evidenciaram uma diminuição da expressão de alguns genes de estresse oxidativo e estresse gerais em detrimento do aumento da expressão de genes de resposta a estresse osmótico. Estes resultados sugerem a existência de um balanço gênico na expressão de genes de resposta a estresses de natureza diferentes, no qual um tipo de estresse desencadearia a expressão de genes específicos a ele e, ao mesmo tempo suprimiria a expressão de genes relacionados a um estresse de outra natureza e vice-versa.

Figura 13- Representação das vias de trealose presentes em Lxx

A capacidade de síntese de pigmentos carotenóides de 40 e 50 carbonos é uma característica de várias actinobactérias e a síntese destes pigmentos se dá a partir de genes organizados na forma de um operon, como em *Dietzia sp.* e *Corynebacterium glutamicum* (TAO et al., 2006). A sequência dos genes dentro destes operon é conservada neste grupo filogenético, incluindo Lxx (TAO et al., 2006). Além de sua importância na proteção contra estresses, o estudo destes genes em Lxx reveste-se de outro interesse, já que podem estar implicados na síntese de uma toxina análoga ao ácido abscísico após modificação de suas estruturas mediadas por desaturases, como a codificada pelo gene *desA* (MONTEIRO-VITORELLO et. al, 2004). Segundo esta hipótese, a secreção desta toxina poderia estar implicada na gênese do principal sintoma do raquitismo, que é a redução no crescimento da planta. As análises por PCR evidenciaram a natureza policistrônica dos transcritos dos genes carotenoides em Lxx, confirmando o arranjo em operon destes genes também nesta actinobactéria. A hipótese de que o gene *desA* atue na síntese da toxina a partir dos pigmentos

carotenóides continua válida, pois em ambos os experimentos sua expressão também foi aumentada, a exemplo dos genes do operon. Por outro lado, a proximidade do gene *marR* ao operon, levantou a hipótese de que este seria um regulador transcricional destes. No entanto, este parece não ser o caso já que sua expressão seguiu um padrão diferente do daquele dos genes carotenoides, ou seja, na presença de H₂O₂ ele foi menos expresso, ao passo que na presença de PEG6000 sua expressão não foi alterada. No entanto, além de *marR*, Lxx possui ainda outras seis ORFs que foram preditas como reguladores da família *marR* e que podem estar relacionados a expressão destes genes.

Este estudo utilizou a sequência do genoma da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* afim de analisar funcionalmente alguns de seus genes que são utilizados por fitobactérias durante o processo de infecção. Os genes aqui analisados são de fundamental importância pois podem determinar se a infecção terá sucesso e se a bactéria será capaz de permanecer viva *in planta* conjuntamente com possíveis alterações ambientais. Lxx mostrou-se capaz de responder a ambos os estresses através de mecanismos variados, validando a predição genômica de vários genes feita *in silico* (MONTEIRO-VITORELLO et. al, 2004).

5 CONCLUSÕES

Lxx possui genes relacionados a respostas a estresse oxidativo e osmótico e estes são responsivos a agentes que induzem estresses destas naturezas.

Lxx apresenta três vias funcionais para síntese de trealose, sendo que a funcionalidade do gene *treS* sugere a possibilidade de síntese reversa de maltose a partir de trealose.

A maior expressão dos genes *proU* e *naggn* de Lxx sugere a produção, transporte e armazenamento de osmoprotetores.

O *cluster* de genes carotenóides compreende um operon e estes pigmentos provavelmente protegem a bactéria de estresses gerais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. R.; AHMAD, S. D.; SABIR, S. M.; SHAH, A. H. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 14, p. 233-243, 2014.
- ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B.; MEALY, T.R.; SEATON, B.A. & HEAD, J.F. The crystal structure of *marR*, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. **Nature Structure Biology** New York, v.8, p. 710-714, 2001.
- ALTSCHUL, S F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS., E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time transcription-PCR data: a model-base variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v.64, p.5245-5250, 2004
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal transduction. **Plant Biology**, London, v. 55, p. 373-399. 2004.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes too transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigationn, in the leaves and roots of wild-tipe and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BAILEY, R. A.; BECHET G. R. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some South African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Associantion**, Durban, v. 69 , p. 74-78, 1995
- BLOOM, J. S.; KHAN, Z.; KRUGLYAK, L.; SINGH, M.; CAUDY, A. A. Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 221, 2009.
- BOCH, J.; KEMPF, B.; SCHMID, R.; BREMER, E. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. Characterization of the *gbsAB* genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p. 5121-5129, 1996
- BRENOT, A.; KING, K. Y.; JANOWIAK, B.; GRIFFITH, O.; CAPARON, M. G. Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 408-413, 2004.
- BRUMBLEY, S. M.; PETRASOVITS, L. A.; HERMANN, S. R.; YOUNG, A. J.; CROFT, B. J. Recent advantages in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 35, p. 681-689, 2006.

CASTRO, F. R. O. S. R. **Caracterização do efeito tóxico de extrato de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. na germinação de semestres de alface.** 2012. 71 p. Dissertação (Mestrado na área de Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, Barcelona, v. 3, p. 3-8, 2000.

CARPINELLI, J.; KRÄMER, R.; AGOSIN, E. Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Trehalose Overproduction: Role of the TreYZ Trehalose Biosynthetic Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1949-1955, 2006.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, London, v. 161, p.313-324, 2012.

CARVALHO, A. N.; CARDOSO, F. S.; BOHN, A.; NEVES, A. R.; SANTOS, H. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 4189-4199, 2011.

COLE, S.T.; EIGLMEIER, K.; PERKHILL, J.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; WHEELER, P.R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHIRCHER, C.; HARIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOR, 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.; SLELDON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, S.; WOORDWARD, J. R.; BARREL, B. G. Massive Gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, London v. 409, p. 1007-1011, 2001.

COMSTOCK, J. C.; LENTINI, R. S. **Sugarcane smut disease.** 2005. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/sc008/> Acesso: 10 nov. 2015.

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 Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.34, p.107-117, 1984.

EVTUSHENKO, L.I.; DOROFEEVA L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatic* (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.

GLAESER, J.; KLUG, G. Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. **Microbiology**, New York, v. 151, p. 1927-1938, 2005.

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, p. 1222-1226, 2009.

GAO, S.; PAN, Y.; CHEN, R.; CHEN, P.; ZHANG, H.; XU, L. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, New York, v.10, n. 4, p. 334-340, 2008.

GIGLIOBIANCO, T.; LAKAYE, B.; WINS, P.; EL MOUALIJ, B.; ZORZI, W.; BETTENDORFF, L. Adenosine thiamine triphosphate accumulates in *Escherichia coli* cells in responses to specific conditions of metabolic stress. **BMC Microbiology**, London, v. 10, 2010.

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.

GUNDOGDU, O.; da SILVA, D. T.; MOHAMMAD, B.; ELMI, A.; MILLS, D. C.; WREN, B. W.; DORREL, N. The *Campylobacter jejuni* MarR-like transcriptional regulators RprA and RprB both influence bacterial responses to oxidative and aerobic stress. **Frontiers in Microbiology**, Edmonton, v. 6, 2015.

HANDTKE, S.; SCHROETER, R.; JÜRGEN, B.; METHLING, K.; SCHLÜTER, R.; ALBRECHT, D.; VAN HIJUM, S. A. F. T.; BONGAERTS, J.; MAURER, K. H.; LALK, M.; SCHWEDER, T.; HECKER, M.; VOIGT, B. *Bacillus pumilus* reveals a remarkably high resistance to hydrogen peroxide provoked oxidative stress. **Plos one**, San Francisco, v. 9, 2014.

HINTON, J. C.; HAUTEFORT, I.; ERIKSSON, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 277-282, 2004.

HOON, M.J.L.; IMOTO, S.; NOLAN, J.; MIYANO, S. Open source clustering software. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 1453-1454, 2004.

HSIAO, T. C. Plant responses to water stress. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, 519-570, 1973.

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.

IMLAY, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Species. **Biochemistry**, Washington, v. 77, p. 755-776, 2008.

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

KAPPES, M. R.; KEMPF, B.; BREMER, E. Three transport systems for the Osmoprotectant Glycine Betaine Operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5071-5079, 1996.

KOWALSKA, E.; KUJDA, M.; WOLAK, N.; KOZIK, A. Altered expression and activities of enzymes involved in thiamine diphosphate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative and osmotic stress. **FEMS**, Amsterdam, v. 12, 534-546, 2012.

LAKHAL, R.; AURIA, R.; DAVIDSON, S.; OLLIVIER, B.; DURAND, M. C.; DOLLA, A.; HAMDI, M.; COMBET-BLANC, Y. Oxygen uptake rates in the hyperthermophilic anaerobe *Thermotoga maritima* grown in a bioreactor under controlled oxygen exposure: clues to its defence strategy against oxidative stress. **Arch Microbiol**, Berlin, v. 193, p.429-438, 2011.

LEE, J.; HEO, Y.; LEE, J. K.; CHO, Y. KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Infection and immunity**, Washington, v. 73, p. 4399-4403, 2005

LI, H.; JUBELIRER, S.; COSTAS, A. M. G.; FRIGAARD, N. U.; BRYANT, D. A. Multiple antioxidant proteins protect *Chlorobaculum tepidum* against oxygen and reactive oxygen species. **Arch Microbiol**, Berlin, v. 191, 853-867, 2009.

LIN, Y. E HANSEN, J. N. Characterization of a chimeric *proU* Operon in a subtilin-producing mutant of *Bacillus subtilis* 168. **Journal of Bacteriology**, Washington, p. 6874-6880, 1995.

MADDEN, J. C., RUIZ, N., AND CAPARON, M. Cytolysin-mediated translocation (CMT): A functional equivalent of type III secretion in gram positive bacteria. **Cell**, Cambridge, v.104 p.143-152, 2001

MCINTRE, H. J.; DAVIES, H.; HORE, T. A.; MILLER, S. H.; DUFOUR, J. P.; RONSOM, C. W. Trehalose Biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and Its Role in Desiccation Tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, p. 3984–3992, 2007.

MILLS, L., LEAMAN, T. M., TAGHAVI, S. M., SHACKEL, L., DOMINIAK, B. C., TAYLOR, P. W. J., FEGAN, M., AND TEAKLE, D. S. *Leifsonia xyli*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 30 p. 145-151, 2001.

MILSE, J.; PETRI, K.; RUCKERT, C.; KALINOWSKI J. Transcriptional response of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to hydrogen peroxide stress and characterization of the OxyR regulon. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 190, p. 40-54, 2014.

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.

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.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, Jerusalem, v. 4, 2008

PASSALACQUA, K. D.; VARADARAJAN, A.; ONDOV, B. D.; OKOU, D. T.; ZWICK, M. E.; BERGMAN, N. H. Structure and complexity of a bacterial transcriptome. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 8402-8403, 2007.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 30, e36, 2002.

QUECINE, M. C.; SILVA, T. M.; CARVALHO, G.; SAITO, S.; MONDIN, M.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; CAMARGO, L. E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. **Plant Pathology**, Oxford, v. 65, p. 154-162, 2015.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience letters**, New Haven, v. 13, p.62-66, 2003.

RAMOS, A. T. M. **Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a fatores do hospedeiro e do ambiente**. 2013, 84p. Tese (Doutorado na área de Ciências. Área de concentração: Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ROGIER S.Y., HOLZAPFEL B.P., SMITH J.P. Sugar accumulation in roots of two grape varieties with contrasting response to water stress. **Annals of Applied Biology**, London, v. 159, 399-413, 2012.

- ROMSANG, A.; ATICHARTPONGKUL, S.; TRINACHARTVANIT, W.; VATTANAVIBOON, P.; MONGKOLSUK, S. Gene expression and physiological role of *Pseudomonas aeruginosa* methionine sulfoxide reductases during oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 195, p. 3299-3308, 2013.
- SAGOT, B.; GAYSINSKI, M.; MEHIRI, M.; GUIGONIS, J.; LE RUDULIER, D.; ALLOING, G. Osmotically induced synthesis of the dipeptide N-acetylglutaminylglutamine amide is mediated by a new pathway conserved among bacteria. **PNAS**, Washington, v. 107, p. 12652-12657, 2010.
- SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Springs Harbour Press, 2001. 446 p.
- SESHASAYEE, A. S.; BERTONE, P.; FRASER, G. M.; LUSCOMBE, N. M. Transcript regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 9, p. 511-519, 2006.
- SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 33, p. 1-14, 2006.
- SULLIVAN, C. Y. E EASTIN, J. D. Plant physiological responses to water stress. **Agricultural Meteorology**, Nebraska, v.14, p.113-127, 1974.
- STANDTMAN, E. R.; REMMEN, H. V.; RICHARDSON, H. V.; WEHR, N. B.; LEVINE, R. L.; Methionine oxidation and aging. **Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1703, p. 135-140, 2005.
- STEINDL, D.R.L. Q.28 disease. **Cane Grow**, Melbourne, v.12, n.4, p. 191-93, 1949.
- 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.; SMITH P. M.; STEINDL, D. R. L. Association of a small *corynebacterium* with the ratton stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agriculture Research**, Victoria, v.24, p.869-874, 1973.
- TEAKLE, D. S.; RYAN, C. C. The effect of high temperature of the sugar cane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, *in vitro* and *in vivo*. **Sugar Cane**, High Wycombe, v.6, p. 5-6, 1992.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 185–196.
- UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. São Paulo, disponível em: <https://www.unica.com.br>. Acesso em: 14 jan. 2014.

URASHIMA, A. S.; GRACHET, N. G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.6, p. 57-64, 2012.

URASHIMA, A. S.; MARCHETTI, L. B. L. Incidence and severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection of sugarcane in São Paulo state, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161, p. 478-484, 2013.

VAN VLIET, A H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 302, p. 1-7, 2010.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PEAPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126239/>. Acesso em 21 nov. 2015.

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

YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematodes diseases**. New York: Enfield Science Publ. 2004. p. 97-124.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, p. 57-63, 2009.

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

WU, R.Y.; ZHANG, R.G.; ZAGNITKO, O.; DEMENTIEVA, I.; MALTZEV, N.; WATSON, J. D.; LASKOWSKI, R.; GORNICKI, P. & JOACHIMIAK, A. Crystal structure of *Enterococcus faecalis* SylA-like transcriptional factor. **Journal of Biology Chemistry, Cidade**, v.278, p. 20240-20244, 2003.

ZERILLO, M. M.; VAN SLUYS, M. A.; CAMARGO, L. E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. Characterization of new IS elements and studies of their dispersion in two subspecies of *Leifsonia xyli*. **BMC Microbiology**, London, disponível em: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-127>. Acesso em 01 out. 2015