Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Expressão de genes da via MEP/DOXP de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e sua relação com a produção de carotenóides e síntese de um composto inibidor do movimento estomatal

Raphael Severo da Cunha Antunes de Faria

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular Vegetal

Piracicaba
2021

Raphael Severo da Cunha Antunes de Faria
Biólogo

Expressão de genes da via MEP/DOXP de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e sua relação com a produção de carotenóides e síntese de um composto inibidor do movimento estomatal

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular Vegetal

Piracicaba
2021

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

Faria, Raphael Severo da Cunha Antunes de

Expressão de genes da via MEP/DOXP de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e sua relação com a produção de carotenóides e síntese de um composto inibidor do movimento estomatal / Raphael Severo da Cunha Antunes de Faria. - - Piracicaba, 2021.

50 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

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

Aos meus amados pais, Sônia e Joaquim

Que independente do desafio presente

Sempre foram fontes de inspiração, apoio e de carinho

Agradeço por toda a oportunidade e estímulos que me deram

Com todo meu amor

DEDICO

Ao meu amor, Eva

Que independente das decisões que tomei

Sempre foi um ponto de apoio e de estímulo

Sempre serei grato por dividir sua vida comigo

Com carinho

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, onde me formei, defendi minha dissertação e por fim concluo minha tese, por todas as oportunidades oferecidas.

Á 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, não somente pelos estímulos profissionais como a orientação e as discussões, mas pelo companheirismo ao longo de 12 anos em que trabalhamos juntos e por toda confiança, apoio, paciência ao longo desse período.

À professora Dra. Claudia Barros Monteiro-Vitorello que sempre esteve disposta a me ajudar e aconselhar, pelos ensinamentos, discussões e apoio em diversos momentos ao longo do meu doutorado.

Aos professores do Programa Internacional de Biologia Celular e Molecular pelo profissionalismo e dedicação a ciência, por contribuírem com novos conhecimentos e pelo apoio e auxílio nos momentos necessários.

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

Ao meu amor Eva Morais, pela paciência em ouvir sobre assuntos que fogem ao seu conhecimento, pelo apoio nos momentos de frustração e por sempre está lá a todo momento, sem você essa jornada seria muito mais árdua.

Aos queridos amigos, Pedro Confort, Lillian Bibiano, Mariana Cicarelli, Fernanda Moretti e Camila Perdoncini que sempre compartilharam suas ideias para me ajudar além das boas risadas e descontração ao longo de todo o período.

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular (LGM), Ana Galesi, Carolina Pereira Vanessa Macedo e Marie Laborde, pelo companheirismo, conversas e agradável convivência.

Aos colegas e amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Victor Moura, Sarah Galvão e Flávia Rogério, 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 independente da distância. Meu muito obrigado pelas conversas, conselhos e auxílios quando necessário. Sei que sempre poderei contar com vocês ao longo da minha vida e saibam que sempre poderão contar comigo!

À querida “Patota”, Mari Palau, Ney Pimenta, Gi Lucena, Armando Alves, Samuel Evangelista, Julieine Nascimento, Mara Figueiredo, Nati Min, Luma Confessor, Lanna Rêgo, Wellington Stopa e Pedrinho pela amizade, apoio, pelos momentos de descontração, risadas, danças, forrós e muita comida! Torço e amo muito todos vocês.

Aos meus pais, Sônia e Joaquim, meus tios Renan, Thereza, 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 essenciais.

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

Muito obrigado!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços
repetidos dia após dia.”
Robert Collier

“Pesquisar é acordar para o mundo.”

Marcelo Lamy

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
1. INTRODUÇÃO 11
1.1 A cultura da Cana-de-açúcar 11
1.2 Raquitismo-das-soqueiras 11
1.3 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* 13
2. MATERIAL E MÉTODOS 17
2.1 Desenho de oligonucleotídeos para genes da via MEP/DOXP de Lxx 17
2.2 Cultivo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* 17
2.3 Análise da expressão dos genes da rota MEP/DOXP de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* submetida a estresse osmótico e fosmidomicina 18
2.4 Avaliação da produção de isoprenóides em meio de cultura adicionado de inibidores da via MEP/DOXP 20
2.5 Análise do movimento estomatal de mutantes Micro-tom expostos a extratos de sobrenadante de culturas de Lxx. 20
3. RESULTADOS 23
3.1Análise da rota MEP/DOXP, levantamento dos genes para expressão e síntese dos primers. 23
3.2 Análise da expressão gênica dos genes da rota MEP/DOXP e do operon carotenóide de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* submetida a estresse osmótico e fosmidomicina. 26
3.4 - Avaliação da produção de carotenóides em meio de cultura adicionado de PEG 6000 e fosmidomicina. 29
3.5 - Análise do movimento estomatal de mutantes Micro-tom em expostos a extratos de sobrenadante de culturas de Lxx. 31
4. DISCUSSÃO 35
4.1 A expressão dos genes da rota MEP/DOXP e sua relação com o gene *des*A 35
4.2 Concentração do pigmento carotenóide e sua relação com a expressão dos genes. . 37
4.3 Fechamento estomatal em resposta ao extrato do sobrenadante de Lxx 38
5. CONCLUSÕES 41
REFERÊNCIAS 43

RESUMO

Expressão de genes da via MEP/DOXP de Leifsonia xyli subsp. xyli e sua relação com a produção de carotenóides e síntese de um composto inibidor do movimento estomatal

A cana-de-açúcar é cultivada globalmente, mas 30% de sua produção se concentra nas américas sendo o Brasil o maior produtor mundial. Nesta cultura existem diversos patógenos que são capazes de minar sua produção e dentre elas destaca-se o raquitismo-da-soqueira causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). A doença possui sintomas característicos como o encurtamento dos entrenós e a redução no diâmetro e comprimento dos colmos, porém não são específicos da doença podendo ser confundidos com outras doenças ou ainda com sintomas de seca. Desde o sequenciamento do seu genoma aventa-se a possibilidade da bactéria secretar um composto análogo ao ácido abscísico onde então já foi relatado alguns efeitos tóxicos dos extratos de Lxx a sementes de alface. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram analisar a expressão *in vitro* dos genes da rota MEP/DOXP de Lxx, dos genes do operon carotenóide e do gene *desA*, analisar a presença de pigmentos carotenóides por absorbância e analisar os efeitos do extrato de Lxx no fechamento estomático de mutantes para ácido abscísico de Micro-tom (MT) na presença de polietilenoglicol 6000 (PEG6000), fosmidomicina e em ambos juntos. A expressão gênica mostrou que o PEG6000 eleva a expressão de todos os genes quando comparado ao controle enquanto que a adição de fosmidomicina inibe a expressão de quase todos os genes, com exceção do gene *dxs* e *des*A. O tratamento com ambos os compostos resultou numa expressão mais elevada que o controle, porém com menor grau que somente com PEG6000. A análise da presença de pigmentos carotenóides por absorbância mostrou um pico elevado e claro na faixa de 400nm no tratamento controle o um pico claro, mas não muito grande no tratamento com PEG6000 e fosmidomicina. Nos tratamentos com PEG6000 e fosmidomicina isoladamente não foi possível identificar um pico característico. Os extratos aplicados nos mutantes de MT tiveram resultados semelhantes mostrando um maior fechamento no extrato com tratamento de PEG6000 e um menor fechamento com fosmidomicina. Os extratos dos tratamentos controle e com adição simultânea de PEG6000 e fosmidomicina tiveram valores similares. Estes resultados corroboram para a hipótese da predição genômica de que Lxx produz um composto tóxico análogo ao ácido abscísico, mostrando a relação genética com efeitos fisiológico e auxilia no avanço da compreensão dos sintomas causados por Lxx.

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

ABSTRACT

Gene expression from the MEP/DOXP pathway of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and its relationship with the carotenoids production and synthesis of a compound that inhibits stomach movement

Sugarcane is grown globally, but 30% of its production is concentrated in the Americas, Brazil being the largest producer in the world. In this culture there are several pathogens that are capable of undermining its production and among them stands out the ratoon rickets caused by the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). The disease has characteristic symptoms such as the shortening of the internodes and reduction in the diameter and length of the stalks, but they are not specific to the disease and can be confused with other diseases or even with symptoms of drought. Since the genome's sequencing, the possibility of the bacterium secreting a compound analogous to abscisic acid has been suggested, where some toxic effects of Lxx extracts on lettuce seeds have already been reported. In this context, the objectives of this work were to analyze the *in vitro* expression of Lxx MEP/DOXP route genes, carotenoid operon genes and *desA* gene, analyze the presence of carotenoid pigments by absorbance and analyze the effects of Lxx extract on stomatal closure of Micro-tom (MT) abscisic acid mutants in the presence of polyethylene glycol 6000 (PEG6000), fosmidomycin and in both together. Gene expression showed that PEG6000 increased the expression of all genes when compared to the control, whereas the addition of fosmidomycin inhibited the expression of almost all genes, with the exception of the *dxs* and *desA* gene. Treatment with both compounds resulted in a higher expression than the control, but to a lesser degree than with PEG6000 alone. Analysis of the presence of carotenoid pigments by absorbance showed a high and clear peak in the 400nm range in the control treatment or a clear peak, but not very large in the treatment with PEG6000 and fosmidomycin. In treatments with PEG6000 and fosmidomycin alone, it was not possible to identify a characteristic peak. The extracts applied to the MT mutants had similar results showing a greater closure in the extract with PEG6000 treatment and a smaller closure with fosmidomycin. The extracts from the control treatments and with simultaneous addition of PEG6000 and fosmidomycin had similar values. These results support the genomic prediction hypothesis that Lxx produces a toxic compound analogous to abscisic acid, showing the genetic relationship with physiological effects and helping to advance the understanding of symptoms caused by Lxx.

Keywords: Ratoon stunting disease, Sugar cane, qPCR, Parasitism

1. INTRODUÇÃO

1.1 A cultura da Cana-de-açúcar

A Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), nativa de Nova Guiné, encontrou nas américas o melhor local para seu desenvolvimento (MOZAMBANI et al.,2006). Atualmente é cultivada em quase todos os continentes, mas mais de 30% da produção mundial se concentra e três países americanos: Brasil, México e Estados Unidos (FNP, 2010). O Brasil é o principal produtor mundial de cana-de-açúcar e estima-se que a safra 21/22 atingirá 628 milhões de toneladas, um valor 4% menor quando comparada a safra 20/21 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2021). A queda na produção é explicada pela redução de 3% na área de colheita na principal região produtora de cana, o Sudeste. Além disto, também se estima que a produtividade deverá reduzir em 6,2%. No Brasil, somente o estado de São Paulo é responsável por 50% da produção, seguido pelos estados das regiões centro-sul e centro-oeste.

No Brasil, o valor bruto que a cadeia sucroenergética movimentou superou os US$100 bilhões e esta é responsável por um PIB de US$40 bilhões, o que corresponde a 2% do PIB mundial (UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2019). Em 2019, o Brasil bateu recorde de produção de etanol atingindo mais de 35 bilhões de litros produzidos, um acréscimo de 7,5% em relação ao ano anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019). Além da extrema importância ao PIB brasileiro, o agronegócio da cana também gera emprego para milhares de brasileiros e com a boa perspectiva da safra 20/21 ainda pretende gerar mais 70mil vagas.

Portanto, a fim de tornar sustentável a produção agrícola de cana-de-açúcar no Brasil, é necessário conhecer e entender os fatores de estresse biótico e abiótico para que seus efeitos sejam contidos. Estima-se que 19% das perdas mundiais na cultura da cana são causadas por doenças (ROSSETTO; SANTIAGO, 2010). Em cana-de-açúcar já foram descritas mais de 216 doenças, sendo que pelo menos 58 foram relatadas no Brasil e 10 delas são de extrema importância (BIRCH, 2001), entre as quais estão o raquitismo-da-soqueira (RSD), a escaldadura das folhas e o carvão.

1.2 Raquitismo-das-soqueiras

Sendo uma das principais doenças da cana de açúcar, o RSD pode causar perdas de mais de 30% com crescente aumento após os cortes anuais (YOUNG; BRUMBLEY, 2004; GRISHAM et al.; 2009). No Brasil, em 2013 as perdas oscilaram entre 10 a 41% dependendo das variáveis, incluindo variedade, condições ambientais e quantidade do patógeno

(URASHIMA; MARCHETTI, 2013). Há relatos de perdas de 37% na Austrália, 41% na África do Sul e 27% no Brasil (YOUNG; BRUMBLEY, 2004; GAGLIARDI; CAMARGO, 2009). Nos últimos trinta anos, a perda estimada foi de mais de dois bilhões de dólares (URASHIMA; MARCHETTI, 2013). A magnitude das perdas está relacionada com a condição ambiental, uma vez que a redução da produtividade pode atingir até 30% em boas condições frente a uma perda de mais de 40% em situações de escassez hídrica (BAILEY; MCFARLANE, 1999; NGARUIYA et. Al., 2005).

Os sintomas da doença não são específicos e podem ser facilmente confundidos com outras doenças ou ainda com sintomas de seca. Estes compreendem o encurtamento dos entrenós e a redução no diâmetro e comprimento dos colmos, de onde origina o nome da doença, e ainda podem surgir sintomas internos como coloração rósea próximo ao meristema apical e pontuações avermelhadas em feixes vasculares (IGLESIA, 2003; COMSTOCK; LENTINI, 2005). Os principais meios de transmissão do patógeno compreendem o uso de material propagativo contaminado para o estabelecimento de plantios comerciais e de equipamentos contaminados durante a colheita (IGLESIA, 2003).

Ao estudar a fisiologia da cana-de-açúcar infectada por Lxx, verificou-se que a infecção pela bactéria reduz a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), enzima responsável pela primeira carboxilização na fotossíntese, além de reduzir também taxas de fotossíntese e transpiração, porém as taxas de compostos e enzimas antioxidativas aumentam (ZHANG et al., 2017). Outras variações também foram relatadas como o entupimento do xilema, variação em níveis hormonais (como ácido abscísico, ácido indol-acético e ácidos giberélicos) e alterações no tecido vascular como degradação, a presença de deformidades e a irregularidade da parede celular (ZHANG et al, 2016). Estudos recentes mostraram que plantas infectadas com alto título bacteriano apresentaram aumento da expressão de genes de síntese de ácido abscísico e de degradação de ácido indol-acético, mostrando um balanço complexo na síntese de degradação de hormônios. Como o metabolismo do ácido abscísico é interligado com estresse hídrico, os autores sugerem que o balanço hormonal esteja intrinsecamente ligado à gênese dos sintomas de raquitismo. Corroborando com esses resultados, outro estudo evidenciou que canas com alto título de Lxx tiveram genes relacionados ao ciclo celular com regulação reduzida como por exemplo os genes *CycA*, *CycB*, *CDBK1;1* que sintetizam ciclina A, ciclina B e Proteina kinaase dependente de ciclina importantes proteínas no ciclo da mitose enquanto que genes relacionados a hormônios como o ácido abscísico, etileno, giberelina, auxina e ácido jasmônico tiveram suas expressões elevadas (CIA et al., 2018).

1.3 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Leifsonia xyli subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras, é uma actinobactéria da família Microbacteriaceae, corineforme, pequena (0,25 x 5 µm), Gram positiva, aeróbia obrigatória e fastidiosa que tem por habitat o xilema da cana-de-açúcar (DAVIS et al., 1984; EVTUSHENKO et al., 2000; IGLESIA, 2003). Em meio de cultura M-SC new suas colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm (TEAKLE; RYAN, 1992; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O desenvolvimento de uma cepa transgênica de Lxx com o gene GFP revelou que, além do xilema, a bactéria também coloniza as células do mesófilo e do feixe da bainha, local rico em nutrientes em função da alta taxa fotossintética. (QUECINE et al., 2016). Com o sequenciamento do seu genoma descobriu-se que Lxx possui um cromossomo circular de aproximadamente 2,6 Mb, sem plasmídeo, com 67,7% de GC (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), além de possuir uma alta taxa de pseudogenes, totalizando 13% do total dos genes preditos. Por ser uma bactéria fitopatogênica esperava-se uma grande quantidade de genes relacionados a patogenicidade de adaptação ao hospedeiro, porém apenas 105 genes desta categoria foram encontrados, sendo que, dentre eles, 18% são possivelmente pseudogenes (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004). É o menor número de genes relacionados a patogenicidade dentre os genomas conhecidos de bactérias fitopatogênicas (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004). O elevado número de pseudogenes é uma possível evidência de que a bactéria esteja passando por um processo evolutivo de decaimento genômico, sendo originalmente um organismo de vida livre se tornando hoje num patógeno exclusivo de cana-de-açúcar aonde se multiplica sem causar grande danos aparentes à planta, permanecendo viável no hospedeiro por longos períodos (MILLS et al. 2001; ZAVAGLIA et al. 2016).

Outra informação relevante que surgiu no estudo do genoma da Lxx e por onde elabora-se a hipótese do presente estudo, é a possibilidade de que a bactéria sintetize uma substância análoga ou precursora ao ácido abscísico (ABA) e que a secreção desta substância seja um dos principais efetores que levam ao desenvolvimento da doença e de seus sintomas (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). A síntese desta molécula teria por precursor um pigmento carotenóide codificado pelos genes *crt*Eb (licopeno elongase), *lct*B (licopeno e-ciclase isoprenoide transferase B), *crt*Ye (C50 carotenóide epslon ciclase), *crt*I (fitoeno deidrogenase), *crt*B (fitoeno sintase) e *crt*E (geranil geranil pirofosfato sintase) cuja disposição no genoma sugere uma organização em operon, tal qual descrito para espécies de famílias próximas, o que foi validado experimentalmente por Faria (2016), ao analisar que os genes estavam sequencialmente ligados. Em seguida, Faria (2016) analisou a expressão dos

genes diante de estresse osmótico e oxidativo *in vitro* e foi possível detectar atividade destes genes. Os resultados de Faria (2016) concordaram com os resultados de Rezende de Castro (2012) que mostrou que a bactéria produzia um pigmento similar a carotenóides através de análise espectrofotométrica. Rezende de Castro (2012) também mostrou quando a Lxx era submetida ao estresse osmótico com PEG6000, a presença do pigmento diminuía substancialmente sugerindo que a bactéria poderia estar utilizando este pigmento de alguma forma. Ao analisar a expressão dos genes responsáveis pela produção do pigmento carotenóide sub estresse osmótico, Faria (2016) detectou um aumento na expressão dos mesmos reforçando a hipótese de que este composto estaria sendo utilizado para outras funções.

Outro gene identificado que reforça a hipótese de que Lxx sintetiza um composto análogo ao ABA é a presença de uma dessaturase (*desA*), enzima que tem participação na produção de ácido abscísico quando utiliza vias de pigmentos carotenóides e está também já teve sua expressão gênica comprovada sob estresses osmótico e oxidativo (FARIA et al., 2019). Este gene está localizado em uma ilha genômica e, portanto, poderia não ter expressão. Dessaturase podem adicionar duas duplas ligações à molécula ζ-caroteno (zeta-caroteno), convertendo-a em γ-caroteno (gama-caroteno), xantoxina e ácido abscísico (XIONG; ZHU, 2003).

As rotas de síntese de ABA e de seus análogos variam entre os organismos (ORITANI e KIYOTA, 2003). A via do mevalonato (MVA) é a principal utilizada por plantas superiores e fungos fitopatogênicos, como *Cercospora rosicola*, *C. cruenta* e *Botrytis cinerea* (YAMAMOTO et al., 2000; ORITANI; KIYOTA, 2003). Uma segunda via, a do não-mevalonato, conhecida também por MEP/DOXP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato) é a que aparenta predominar em actinobactérias e outros procariotos e que se mantém conservada (NETZER et al., 2010). Por exemplo, *Corynebacterium glutamicum* e *Dietzia sp.* são capazes de acumular moléculas carotenóides de 40 e 50 carbonos, licopeno e decaprenoxantina respectivamente, utilizando a via MEP/DOXP. Já *Micrococcus luteus*, utilizando essa mesma via, produz a sarcinaxantina, composto carotenóide de 50 carbonos (TAO et al., 2006; NETZER et al., 2010). Rezende de Castro (2012) seguindo a hipótese de que Lxx pode sintetizar um composto tóxico análogo ao ABA utilizando a via MEP/DOXP e o seu operon carotenóide, realizou uma extração do sobrenadante de célular de Lxx e aplicou em sementes de alface. Este experimento evidenciou um composto tóxico ainda não identificado que foi capaz de inibir a germinação das sementes, semelhante ao efeito da adição de ácido abscísico

Uma alternativa para verificar se há correlação entre a expressão dos genes do operon e a possível produção de pigmentos e a correlação com o extrato tóxico é o uso de inibidores de rota metabólica, como por exemplo a fosmidomicina, conhecido inibidor da rota MEP/DOXP em actinobactérias e que pode ser utilizado para validar tais hipóteses (MUELLER et al., 2000; GALL et al., 2005; TRUTKO et al., 2005). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fosmidomicina a) na expressão de genes da rota MEP/DOXP e sua relação com os genes do no operon carotenóide, b) na síntese de carotenóides e c) na atividade tóxica de extratos de sobrenadante da bactéria no movimento estomatal dos genótipos mutantes *notabilis* e *sitiens* de tomate Micro-tom. O mutante *notabilis* possuem baixas quantidade do hormônio ABA enquanto o mutante *sitiens* não o produz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho de oligonucleotídeos para genes da via MEP/DOXP de Lxx

A análise dos genes da estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi realizada através do site "http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/lbi/index.html" onde está disponível seu genoma. A análise focou na busca de genes que estejam ligados a rota metabólica MEP/DOXP, seguido dos genes para síntese de carotenóides. Em seguida, as sequências dos genes selecionados foram comparadas com outros organismos através do NCBI utilizando o algoritmo BLAST para que o desenho dos primers priorizasse regiões exclusivas de Lxx.

Foram desenhados 16 pares de oligonucleotídeos, sendo estes distribuídos em 14 pares referentes aos genes da rota MEP/DOXP (*dxr, ispF, ispE, gcpE, lytB, gds, crtE, crtB, crtI, crtYe, lctb, crtEB, crtEB, desA*) e 2 pares referentes aos genes normalizadores RNA ribossomal 16S (*16S rRNA*) e pirrolina-5-carboxilato redutase (proC) conforme estabelecido previamente (FARIA et al. 2020). O desenho dos oligonucleotídeos foi realizado pelo programa *Beacon Designer* (http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1) considerando os seguintes parâmetros: a) 100 – 150pb; b) tamanho do primer 17 – 23pb; c) temperatura de anelamento 54 – 67º C. O mesmo programa foi utilizado para evitar ao máximo a presença de estruturas secundárias para melhor qualidade nos resultados com a seguinte ordem de critério: 1) *Hairpin*; 2) *self-dimer*; 3) *cross-dimer*.

2.2 Cultivo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Foi utilizada a estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). 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) pela adição de metionina e cisteína. O meio é preparado com 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 H2PO4 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. Depois que o conteúdo atinge a temperatura próxima de 50ºC, 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). O meio de cultivo com a bactéria foi incubado a 28 ºC sob agitação de 150 rpm.

2.3 Análise da expressão dos genes da rota MEP/DOXP de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* submetida a estresse osmótico e fosmidomicina

Inicialmente foi produzido um pré-inóculo de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em meio líquido até a densidade óptica atingir entre 0,6 e 0,7 (D.O. 600nm). Uma alíquota de 4mL (1% v/v) deste pré-inóculo foi transferida para 800mL de meio líquido, o qual foi posteriormente dividido em 16 partes iguais de 50mL em frascos "erlenmeyer" de 125 mL. O experimento foi constituído por quatro tratamentos e quatro repetições cada. O experimento teve duas repetições. Os tratamentos foram:

Tratamento 1 – controle, meio sem adição de nenhum composto.

Tratamento 2 – meio adicionado de polietilenoglicol 6000 numa concentração final de 7% (p/v)

Tratamento 3 – meio adicionado de fosmidomicina na concentração final de 50 mg/L de fosmidomicina

Tratamento 4 – meio adicionado de polietilenoglicol 6000 numa concentração final de 7% (p/v) e de fosmidomicina na concentração final de 50 mg/L

Os frascos foram incubados a 28ºC por sete dias sob agitação a 150 rpm até atingir densidade óptica próxima de 0,6 a 0,7 (D.O. 600nm). Em seguida, as células foram precipitadas através de centrifugação por dez minutos a 10.000 rpm, lavadas em tampão salino, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 ºC para análise posterior.

Os pellets bacterianos foram ressuspendidos em 80 uL de TE pH 8,0 (tris, 10mM ph 8,0; EDTA, 0,1mM) contendo 20mg/mL de lisozima (Sigma). Estas suspensões foram adicionadas de 100 uL de SDS 10% e então agitadas por vortex por 2 minutos. Em seguida foram incubadas em banho-maria a 37ºC por 60 minutos misturando por inversão a cada 10 minutos. Após a incubação, adicionou-se igual volume de reagente TRIzol (Invitrogen) e a suspensão foi novamente incubada em banho maria a 64ºC por 10 minutos, misturando por inversão a cada 2 minutos. Seguiu-se uma centrifugação final a 14.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado à coluna do kit Direct zol RNA Miniprep plus seguindo as instruções do fabricante (Sinapse – Biotecnologia).

A qualidade do RNA foi avaliada 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 o 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 ºC por 5 minutos e aplicadas no gel. O RNA ficou armazenado em freezer – 80ºC até ser utilizado. Para digestão de DNA residual foi utilizado a enzima RQ1 – RNAse free DNAse (Promega). Para cada 1 µg de RNA foi adicionada 1 unidade da enzima citada, 1 µL de tampão e completando-se o volume final de 10 µL com água livre de nucleases. Em seguida, para confirmação da não contaminação do RNA com DNA genômico foi feito um PCR qualitativo com as mesmas especificações descritas no item 2.1.

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 e em seguida as amostras foram aquecidas a 70ºC 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 tampão de reação, 4 µL MgCl2 (4mM de concentração final) 1,0 µL de "PCR nucleotide mix (concentração final de 0,5mM de cada nucleotídeo), 20 unidades de RNasin, 1,0 µL GoScript Reverse Transcriptase 1,0 µL e água livre de nucleases para completar um volume final de 15 µL. O cDNA foi armazenado a -20 ºC 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 se basearam em 2 µL do 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.

Os dados (dados sem correlação da linha de base) dos níveis de fluorescências foram submetidos ao programa LinRegPCR (RAMAKERS et. al., 2003) para obter a regressão linear de cada curva de amplificação e calcular a eficiência de amplificação em cada curva (E=10slope). Valores ideais de E ($1,8 \leq E \leq 2$) e correlação ($R \geq 0,995$) foram desejados. Os genes endógenos analisados foram os que codificam para RNA ribossomal 16S (16S rRNA) e pirrolina-5-carboxilato redutase (proC) (FARIA et al. 2020). 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; JENSEN; ORNTOFT, 2004) e ΔCt (SILVER et al., 2006). Após o cálculo de cada programa separadamente, o RefFinder fornece pesos diferentes

a cada um dos resultados e calcula a média geométrica destes, classificando-os em graus distintos de estabilidade. A análise de expressão gênica do controle e tratamentos bem como suas respectivas análises estatísticas foram feitas utilizando o software REST (Relative Expression Software Tool) (PFAFFL et al., 2002).

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

Células coletadas de um experimento conduzido conforme descrito no item 2.3 foram pulverizadas com um bastão de vidro. Os pigmentos foram extraídos em metanol por agitação em vortex por alguns minutos. A mistura de células e metanol foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos. A extração foi repetida duas vezes. A proporção de metanol utilizada foi de 100 mL por cada 1 g de pellet e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro entre os comprimentos de onda 300 e 600 nm, com intervalo de 50 nm. O experimento foi repetido duas vezes.

2.5 Análise do movimento estomatal de mutantes Micro-tom expostos a extratos de sobrenadante de culturas de Lxx.

Os sobrenadantes obtidos dos tratamentos utilizados no ensaio de expressão gênica descrito em 2.3 foram transferidos para novos tubos, acidificados com ácido clorídrico (pH = 2,5) e extraídos com acetato de etila por duas vezes, utilizando iguais volumes de sobrenadante e solvente. Ao misturar o sobrenadante com acetato forma-se um sistema bifásico, onde o extrato fica na parte superior. Este foi transferido para um béquer e evaporado em capela, no escuro, à temperatura ambiente. Após a evaporação completa de todo solvente, o extrato foi ressuspendido em água Milli-Q, aliquotado e armazenado em freezer -20ºC até o momento do ensaio. Obteve-se então 4 extratos diferentes sendo um de cada tratamento descrito no item 2.3. A verificação da atividade do extrato foi feita utilizando sementes de alface como descrito por Castro, 2012. Para este teste as sementes de alface foram imergidas em 1,5mL do extrato por 24 horas à 25ºC e então transferidas para placas de petri descartáveis onde foram incubadas por 4 dias sob as mesmas condições. A germinação das sementes foi feita por contagem de sementes germinadas e não germinadas.

O cultivo das plantas de Micro-tom e seus mutantes *sitiens* e *notabillis* foi realizado na casa de vegetação do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ-USP, com temperatura média de 28°C. O mutante *sitiens* é deficiente em ácido abscísico enquanto o mutante *notabillis* possui baixas quantidades deste hormônio.

As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 350 mL contendo o substrato comercial Basaplant® (Base Agro, Artur Nogueira, SP, Brasil). Após a emissão da primeira folha verdadeira, as plântulas foram individualizadas em vasos de 350mL para a instalação dos experimentos. Foram utilizadas cinco plantas para cada tratamento. Os experimentos foram conduzidos com plantas adultas com 30 dias após o transplante. O experimento foi realizado duas vezes.

A contagem do número de estômatos abertos e fechados das face adaxial das folhas dos genótipos selvagem, *sitiens* e *notabillis* foram determinados através *imprints* de silicone (WEYERS; JOHANSEN, 1985; CAMPOS et al., 2009). Para tal, foi selecionado a folha mais velha com cinco folíolos com dimensões semelhantes onde foram aplicados os extratos dos tratamentos e em seguida foram gerados seus *imprints*. Para a produção destes foram utilizados os silicones de condensação de uso odontológico Xantopren VL Plus e Optosil Xantopren Activador Universal (Heraeus Kulzer South America Ltda, São Paulo, SP, 46 Brasil). Essas substâncias, ao serem misturadas, formam um polímero que permite a obtenção de impressões precisas da superfície sobre a qual foi depositado. Foram então obtidos cinco moldes (*imprints*) da face adaxial de cada folha de cada repetição. Após a secagem dos *imprints*, aplicou-se uma fina camada de esmalte finalizador de unha de secagem rápida em suas superfícies (Revlon, Nova Iorque, NY, Estados Unidos da América) para obter uma impressão inversa, em baixo relevo. Essa camada de esmalte foi então colocada sobre uma lâmina de microscopia em solução de glicerina a 50% e coberta com uma lamínula, sendo então utilizada para contagem em microscopia óptica de 100x do número de estômatos e fechados e cálculo da porcentagem de estômatos fechados. Foram realizadas 5 contagens de cada *imprint* onde todos os estômatos foram contados. O teste Tukey foi utilizado para comparar os valores médios da porcentagem de estômatos fechados entre tratamentos.

3. RESULTADOS

3.1 Análise da rota MEP/DOXP, levantamento dos genes para expressão e síntese dos primers.

Na análise da rota MEP/DOXP em Lxx foram identificados 7 genes com auxílio da plataforma KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Os genes são: ORF Lxx10450 – EC: 2,2,1,7- *dxs* - 1-deoxixilulose-5-fosfato sintase, ORF Lxx12180 – EC: 1.1.1.267 - *dxr* - 1-deoxi-d-xilulose 5-fosfato redutoisomerase, ORF Lxx18250 – EC: 2.7.7.60 e 4.6.1.12 - *ispF* - 2-C-metiil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferase/2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfate sintase, ORF Lxx17480 – EC: 2.7.1.148 - *ispE* – 4-difosfocitidil-2-C-methil-D-eritritol quinase, ORF Lxx12200 – EC: 1.17.7.1 e 1.17.7.3 - *gcpE* – 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfate sintase 2, ORF Lxx16760 – EC: 1.17.7.4 - *lytB* – 4-hidroxi-3-metilbutil-2-enil difosfato redutase e ORF Lxx15370 – EC: 2.5.1.1, 2.5.1.10 e 2.5.1.29 – gds – geranil geranil pirofosfato sintase / proteína da família apoliprenil sintetase (FIGURA 1).

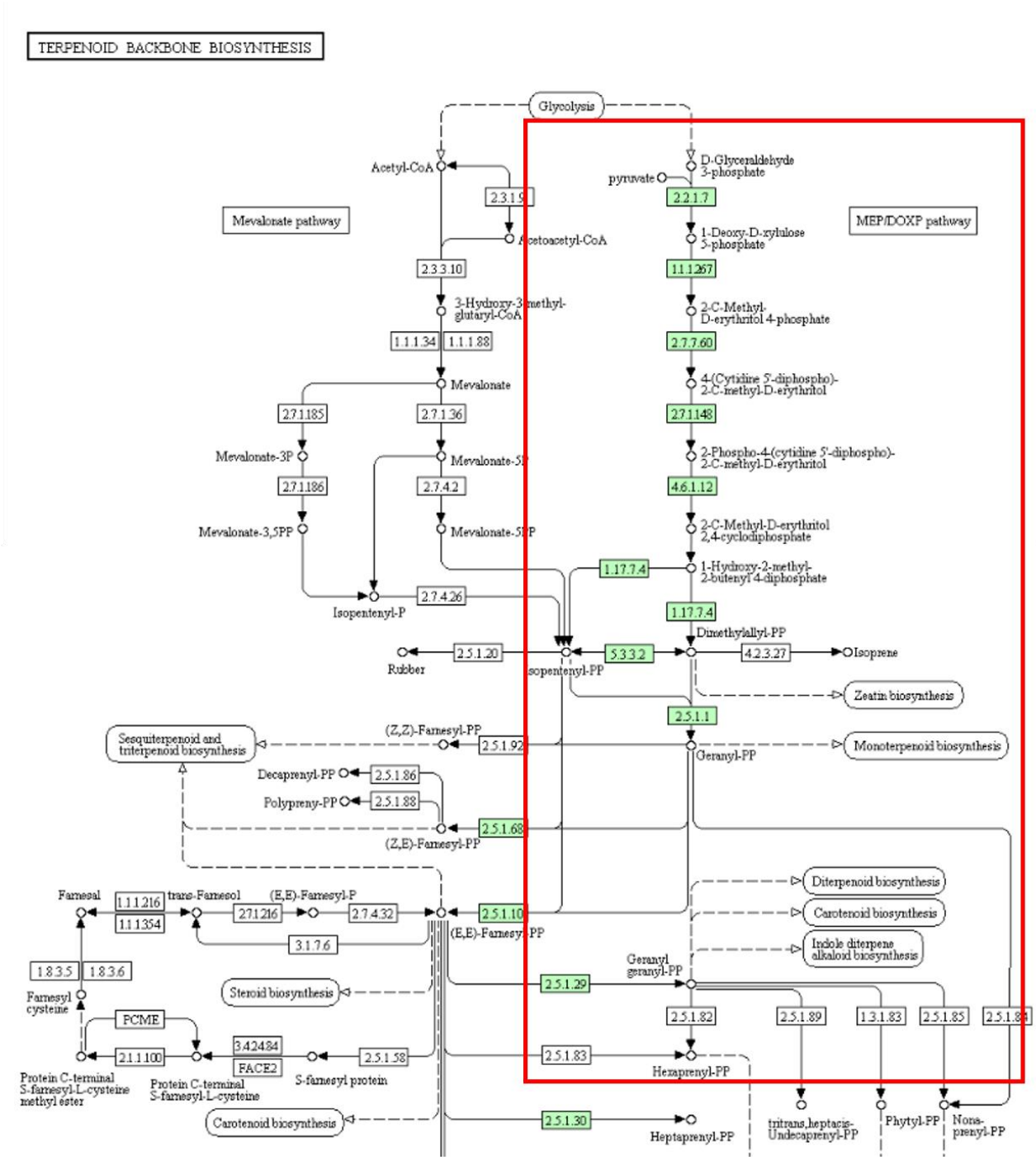

Figura 1. Via de biossíntese de terpenoides de Lxx gerada pelo KEEG. Em destaque está a rota MEP/DOXP e em verde as ORFs dos genes selecionados.

Os *primers* foram desenhados de acordo com o descrito no item 2.1 e suas sequencias, bem como as respectivas temperaturas de anelamento, estão disponíveis na tabela 1. As demais sequências de *primers* dos genes do operon carotenóide, da dessaturase e dos genes usados como normalizadores já haviam sido determinadas (Faria, 2019).

Tabela 1. Sequência dos *primers*, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento.

	Sequência dos *primers*	Temperatura de anelamento (ºC)	Tamanho do fragmento (pb)
dxs	F: GCCGCCTCATAATCGTCGTCAA R: TGCCACGATACAAGGACTGC	65	174
dxr	F: ATGCGTCTCCCGATCTCC R: GTCCAGCGGCTCGAAGGTC	64	108
ispF	F: GCATCGCCGTCATCGTCG R: GCTGGAACGGTCGCTGCA	60	109
ispE	F: GCTCAGCACACCGACT R: GTTCGACAGCACCTCCGC	56	157
gcpE	F: GCGTGAATCCCGGCAACAT R: CGTACTTCTCCAGCAGGC	59	135
lytB	F: GACGAGACGATGGAGACC R: GCCGAACCGACGACGATGAC	62	155
gds	F: GACTTTCTCAGCGGTGGCAAGA R: CGTCTCGTCAGTAGCGTCTTC	67	134
crtE	F: GACCCACGCTCCCACACC R: TCCCAGAGCCGCCGGTAG	68	147
crtB	F: ATGACCCGCACCGAGACCG R: CGTACACATCTTCGACTCG	64	172
crtI	F: GCCCGTCCTGGTATCTCAT R: AGGGCTCGGTTGGCGGCT	64	174
crtYe	F: TCGTCTACCTCGCTTGTCTGCT R: CCAGGCGAGGAAGAAGAGGAC	64	137
lctb	F: CGTCCTGCTCAGCCTGGTCTT R: CCAAAACCGCCGTGAGGAC	64	152
crtEB	F: CGACTCGGCGACCTCAAG R: GACGCCCCACAGGAAGAA	64	122
desA	F: GACGAACACCCAGCAACCG	68	124

	R: GCCCGAGCGTGGATGCGA		
16S rRNA	F: CGAACGATGAACCAGGA	59	144
	R: CAACCGCTGGAGATGCC		
	F: CCCGCCTATGTCTTCTTCCT	61	132
proC	R: GAAAGGTGCCGTTAACAAGG		

3.2 Análise da expressão gênica dos genes da rota MEP/DOXP e do operon carotenóide de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* submetida a estresse osmótico e fosmidomicina.

A concentração do RNA extraído das células de Lxx variou entre 958,37 ng/µL e 2.157,22 ng/µL. Como recomendado por Sambrock et al. (2001), as razões entre os valores das absorbâncias A260/A280 e A260/A230 mantiveram-se entre 1,9 a 2,0 e 1,8 a 2,0, respectivamente. A integridade do RNA foi avaliada por gel de agarose desnaturante 1% onde foi possível observar as bandas 23S, 16S e 5S do RNA ribossomal (FIGURA 2). Em seguida, as amostras foram submetidas a um PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos complementares ao gene *proC* que codifica uma Pirrolina-5-carboxilato redutase com as condições descritas no item 2.3 e uma amostra de DNA puro de Lxx como controle positivo a fim de verificar possível contaminação com DNA. Não houve amplificações (FIGURA 3).

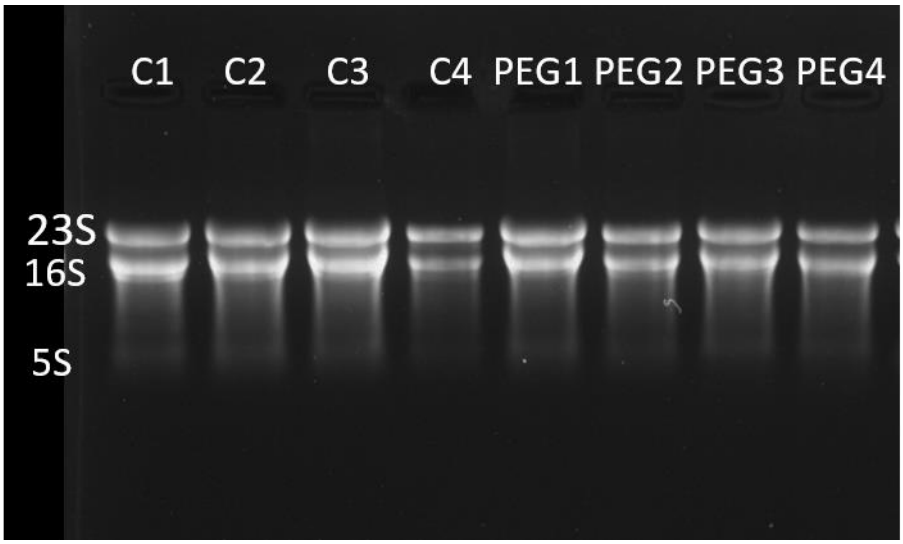

Figura 2: Gel de agarose contendo as amostras de RNA do experimento sendo C – Controle e suas repetições e PEG – Amostras com Adição de PEG6000 e suas repetições. O gel foi carregado com 5 µL de amostra e 3 µL de tampão de carregamento.

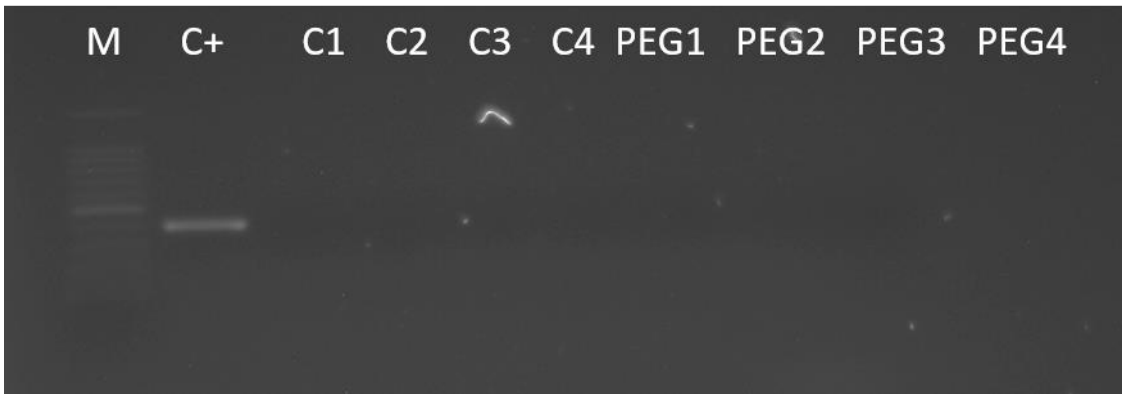

Figura3. Gel de agarose contendo a amplificação de PCR das amostras de RNA do experimento sendo C – Controle e suas repetições e PEG – Amostras com Adição de PEG6000 e suas repetições. O gel foi carregado com 5 µL de amostra e 3 µL de tampão de carregamento.

Quando cultivada na presença de PEG, todos os genes foram mais expressos quando comparados ao controle, sem PEG ou fosmidomicina. Neste tratamento os níveis de expressão variaram de 660% (gene *dxr*) a 1050% (gene *crtE*) em relação ao controle. Porém, uma resposta oposta ocorreu quando a bactéria foi cultivada na presença de fosmidomicina, pois, com exceção dos genes *dxs* e *desA*, a expressão de todos os demais foi menor em relação ao tratamento controle, onde a variação da expressão ficou entre o gene *lctb*, que teve uma redução de 1000%, e o gene *lytb* cuja expressão foi reduzida em 200%. No tratamento combinado de PEG com fosmidomicina, os valores de expressão foram todos maiores que o controle, porém inferiores aos do tratamento com PEG (FIGURA 4), indicando que o estresse osmótico reverteu parcialmente o efeito inibidor da fosmidomicina sobre a expressão destes genes. Os genes com maior e menor alteração de expressão correspondem a *desA* e *dxr* com aumento de 570% e 360% respectivamente em relação ao controle.

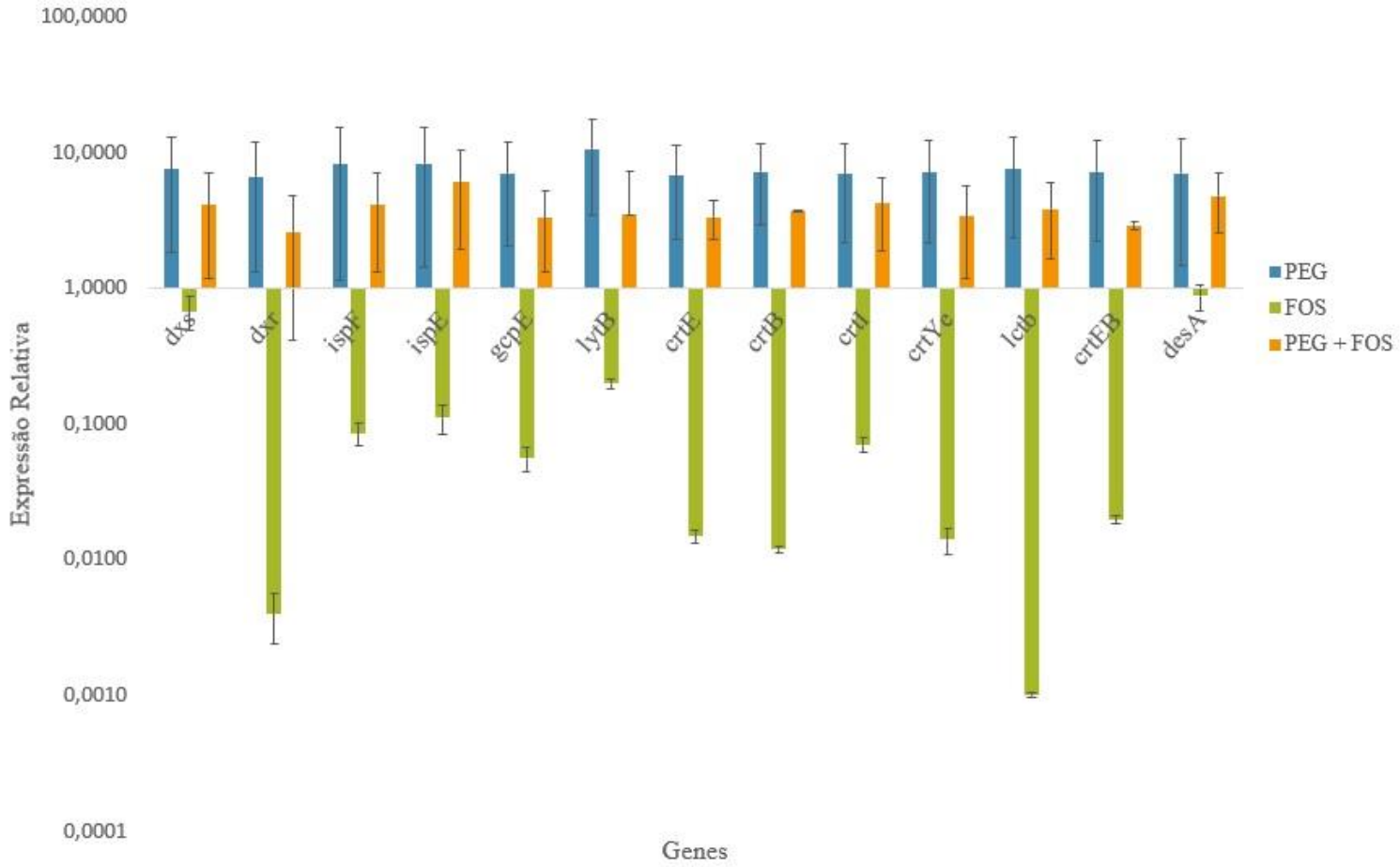

Figura 4 - Razão de expressão dos genes de Lxx ($p \leq 0,05$) cultivada na presença de polietilenoglicol 6000 (PEG), fosmidomicina (FOS) ou de PEG + fosmidomicina (PEG + FOS). As barras representam o desvio padrão de três repetições biológicas.

3.4 Avaliação da produção de carotenóides em meio de cultura adicionado de PEG 6000 e fosmidomicina.

As densidades ópticas médias dos tratamentos medidas na faixa de 400nm foram de 0,635 (controle), 0,132 (PEG), 0,214 (FOS) e 0,173 (PEG+FOS), evidenciando que a concentração do pigmento carotenóide é maior no tratamento controle (sem adição de nenhum composto) e que a adição de PEG ou de fosmidomicina, em separado ou em conjunto, leva a uma diminuição no pico de absorção, não permitindo concluir, no entanto, se sua síntese foi inibida ou se o pigmento foi metabolizado em outro composto. No entanto, levando-se em conta os resultados da expressão gênica é razoável aceitar a primeira hipótese no caso da fosmidomicina e a segunda no caso de PEG, já que na presença destes compostos houve diminuição e aumento nos níveis de expressão gênica, respectivamente. O mesmo raciocínio se aplica ao tratamento combinado de PEG com fosmidomicina; a não detecção do pico do carotenóide sugere seu metabolismo, uma vez a expressão dos genes da via também foi aumentada em relação ao controle. (FIGURA 5).

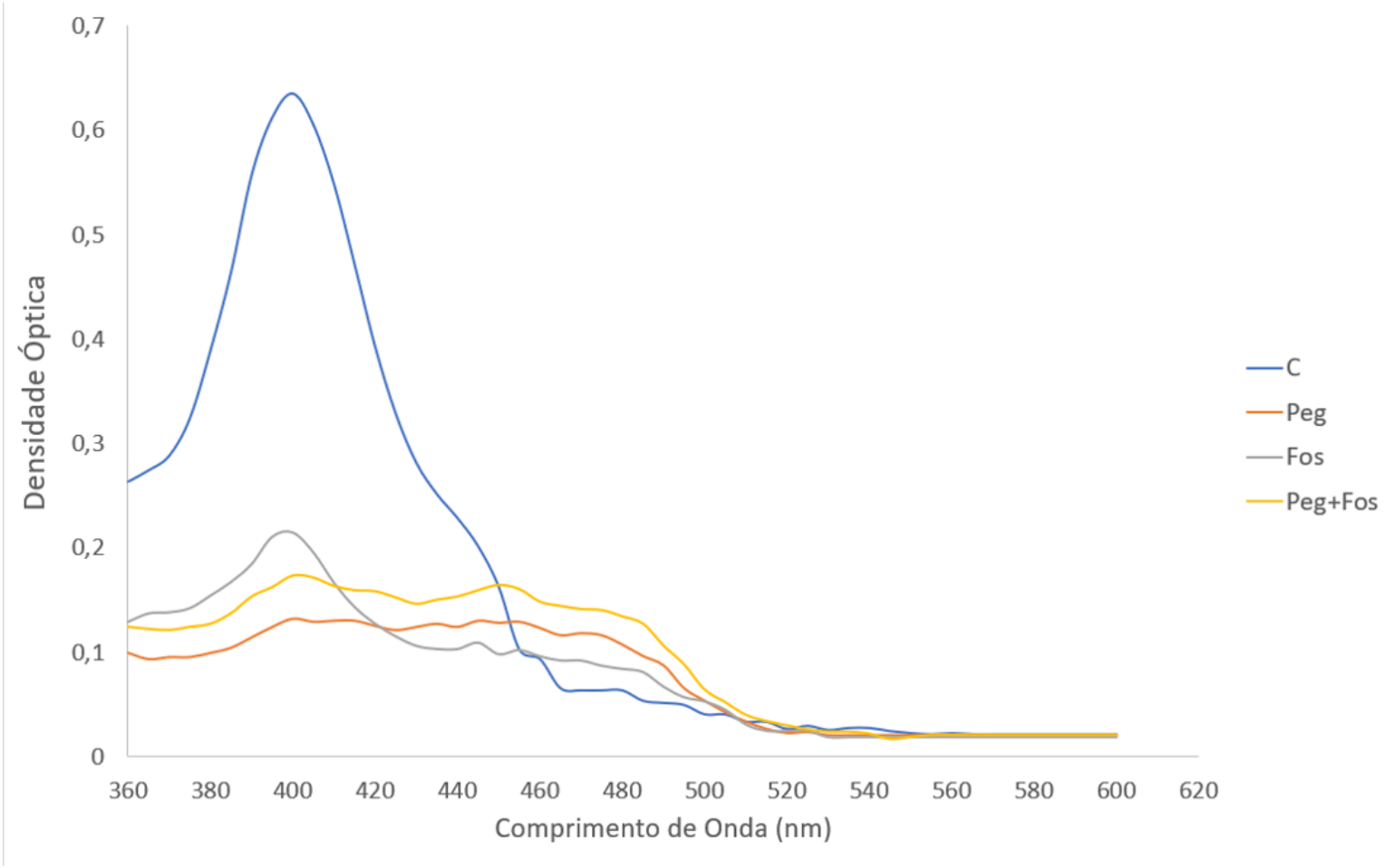

Figura 5 - Curvas de absorbância de extratos metanólicos de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* cultivadas na presença de PEG6000 7% p/v (Peg), fosmidomicina 50mg/L (Fos) e - PEG6000 7% p/v + fosmidomicina 50mg/L (Peg+Fos). C (controle) representa o espectro de absorbância de extratos de células bacterianas cultivadas na ausência destes compostos.

3.5 Análise do movimento estomatal de mutantes Micro-tom em expostos a extratos de sobrenadante de culturas de Lxx.

Os resultados deste experimento demonstraram que os genótipos de micro-tom se comportaram de maneira semelhante frente aos extratos de culturas bacterianas. O tratamento controle, nos três mutantes, ficou em valores intermediários que variaram de 59% (WT) a 65%(*sit)* (Figura 7 e 9 respectivamente). O maior índice de estômatos fechados foi obtido com o extrato do tratamento 2 (PEG6000), chegando a mais de 76% no mutante *not* (Figura 8). Um efeito contrário acontece com a adição do extrato do tratamento 3 pois o índice de estômatos fechados cai muito, chegando em 25% no mutante *not*, sendo este o menor valor obtido (Figura 8). O resultado obtido na aplicação do extrato do tratamento 4 (PEG+FOS) foi semelhante ao resultado controle com os valores variando de 59% (*sit*) a 65%(*not*) (Figuras 7 e 9 respectivamente). Novamente a fosmidomicina tem um efeito contrário ao visto com o tratamento com PEG6000 (Tabela 2).

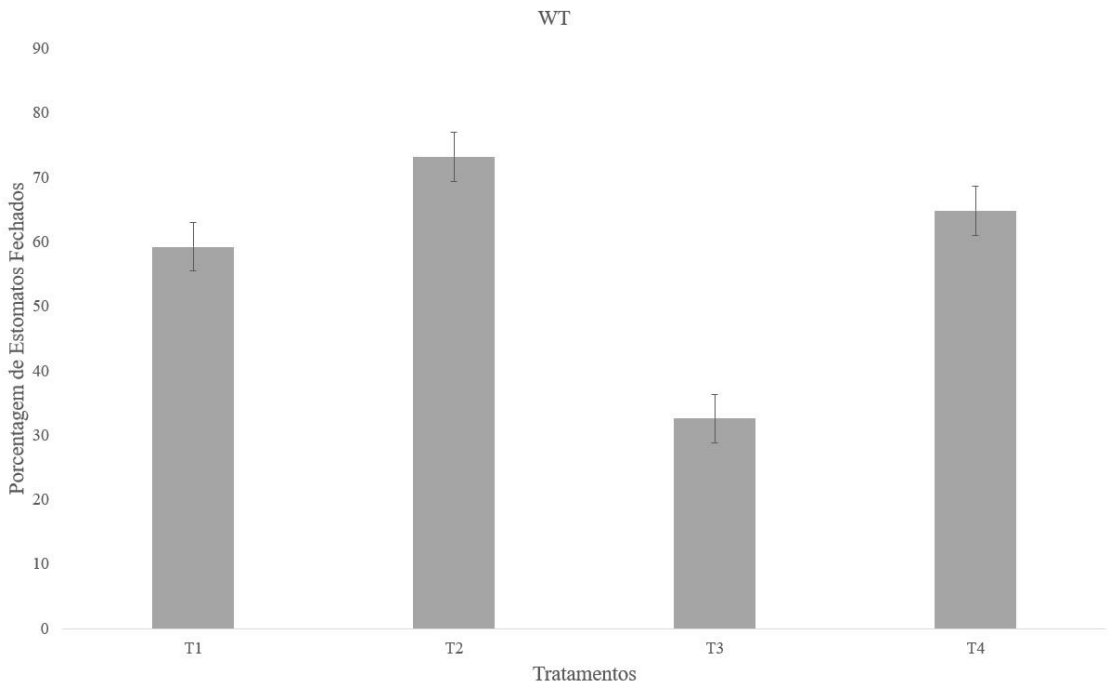

Figura 7: Gráfico em barras das porcentagens de estômatos fechados de Micro-tom WT e seus mutantes em frente ao extrato dos quatro tratamentos. WT – Micro-tom selvagem, *sit* – mutante sitiens, *not* – mutante *notabilis*. T1 – Controle, T2 – Lxx + PEG, T3 – Lxx + FOS e T4 – Lxx + PEG + FOS.

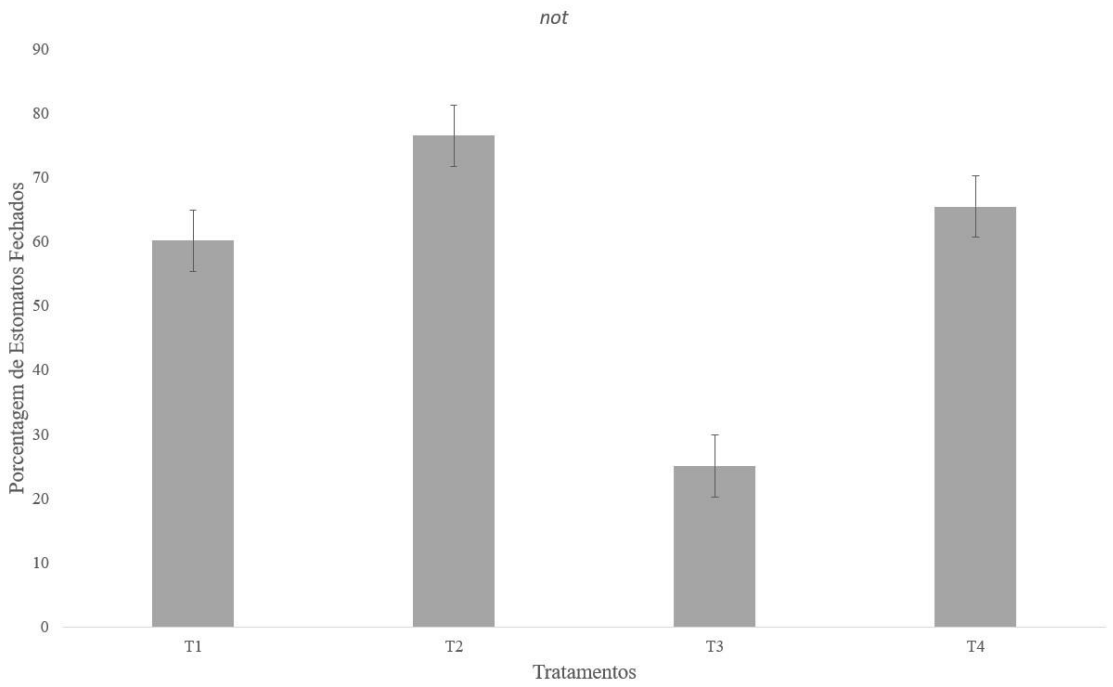

Figura 8: Gráfico em barras das porcentagens de estômatos fechados do mutante *not* e seus mutantes em frente ao extrato dos quatro tratamentos. WT – Micro-tom selvagem, *sit* – mutante sitiens, *not* – mutante *notabilis*. T1 – Controle, T2 – Lxx + PEG, T3 – Lxx + FOS e T4 – Lxx + PEG + FOS.

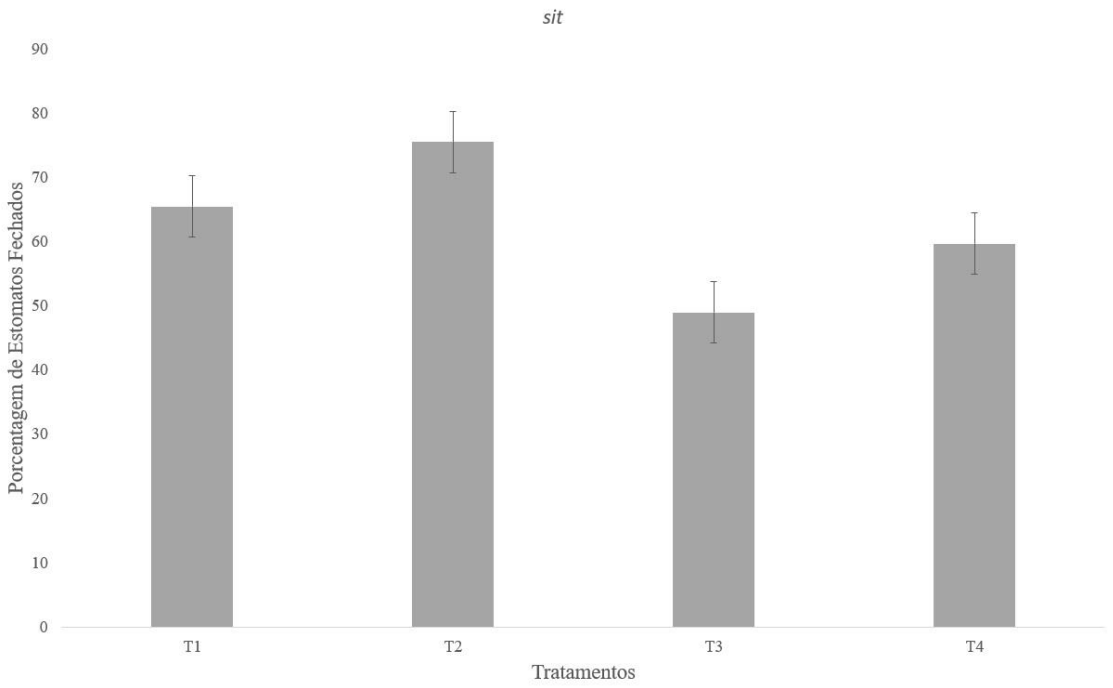

Figura 9: Gráfico em barras das porcentagens de estômatos fechados do mutante *sitiens* e seus mutantes em frente ao extrato dos quatro tratamentos. WT – Micro-tom selvagem, *sit* – mutante sitiens, *not* – mutante *notabilis*. T1 – Controle, T2 – Lxx + PEG, T3 – Lxx + FOS e T4 – Lxx + PEG + FOS.

Tabela 2.:Valores médios das porcentagens de estômatos fechados seguido pelo desvio padrão. Valores seguidos por letras distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo este de Tukey. T1 – Controle, T2 – Lxx + PEG, T3 – Lxx + FOS e T4 – Lxx + PEG + FOS.

Genótipo	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
WT	59,23 ± 3,78b	73,19 ± 3,78a	32,59 ± 3,78c	64,83 ± 3,78b
sit	65,46 ± 4,69b	75,48 ± 4,69a	48,97 ± 4,69c	59,65 ± 4,69b
not	60,15 ± 2,43b	76,49 ± 2,43a	25,06 ± 2,43c	65,45 ± 2,43b

4. DISCUSSÃO

4.1 A expressão dos genes da rota MEP/DOXP e sua relação com o gene *des*A

A infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é um problema recorrente nos canaviais, causando perdas consideráveis no Brasil e em outros países devido ao raquitismo-da-soqueira. Esta doença manifesta sintomas tardiamente e não são específicos, o que dificulta sua diagnose. Seu comportamento fastidioso é singular entre as bactérias fitopatogênicas e a coloca em um grupo restrito, como as espécies do gênero *Xyllela*. A análise de sua sequência genômica (MONTEIRO-VITORELLO et al, 2004) sugeriu que a bactéria poderia sintetizar uma substância análoga ao fitormônio ácido abscísico (ABA), uma vez que esta possui a rota não-mevalonato (MEP/DOXP) de síntese de pigmentos isoprenóides em conjunto com o gene *desA*, responsável pela síntese de uma dessaturase. Existem duas vias para síntese de ABA, a rota do mevalonato (MEP) utilizada por plantas por intermédio dos seus plastídeos, e a rota do não-mevalonato (MEP/DOXP) utilizada por bactérias (NETZER et al., 2010). Vale ressaltar que não existe, até o momento, a descrição de uma rota de síntese de ABA para bactérias, porém todas as bactérias que produzem ABA também produzem pigmentos carotenóides, como acontece em *Achromobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (LIEVENS et al, 2017). Assim, uma via hipotética seria a produção do hormônio utilizando um carotenóide como precursor, onde o gene *desA* poderia catalisar dessaturações seguidas no pigmento produzido por Lxx convertendo-o em um sesquiterpenóide como o ABA ou seu precursor (NETZER, et al. 2010 e LIEVENS et al, 2017). A produção de ABA ou de um análogo por Lxx poderia explicar ao menos em parte alguns dos sintomas que causa em cana, como a diminuição de tamanho e o encurtamento de entrenós, uma vez que esse hormônio é diretamente relacionado à inibição do ciclo celular e poderia então causar a inibição no meristema intercalar, região responsável pelo alongamento dos entrenós (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Com base nesta hipótese, Castro (2012) realizou experimentos para avaliar se a bactéria secreta algum composto inibitório ao crescimento vegetal. As análises de extratos metanólicos de sobrenadantes de cultura indicaram que Lxx de fato secreta uma substância que inibe a geminação de sementes e diminui o alongamento de radículas em alface (CASTRO, 2012). Além destes efeitos, foi mostrado também que a atividade deste metabólito na germinação de sementes é maior quando a bactéria é cultivada sob estresse osmótico na presença de PEG6000 e que na presença de fosmidomicina, um inibidor da rota MEP/DOXP, a atividade do extrato é bastante reduzida (CASTRO, 2012). Até o momento, no entanto, os níveis de atividade do extrato não haviam sido correlacionados com os níveis de expressão dos genes

da via MEP/DOXP, um estudo importante para a confirmação da hipótese da produção de um análogo do ABA por Lxx como parte de um mecanismo de patogenicidade.

Afim de dar continuidade e complementaridade aos trabalhos relacionados à hipótese acima, o presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão dos genes da via MEP/DOXP, bem como dos genes do operon carotenóide (FARIA, 2016) de Lxx quando cultivada na presença de PEG6000, fosmidomicina e com ambos juntos seguido pela avaliação da produção de pigmentos isoprenóides nas mesmas condições. Por fim, objetivou-se avaliar o efeito do extrato tóxico no movimento estomático nos genótipos Micro-tom (WT) de tomate e de linhagens mutantes para ABA, sendo uma que apresenta uma baixa produção do hormônio (linhagem *notabilis; not*) e outra que não é capaz de produzi-lo (linhagem *sitiens*; *sit*).

Os experimentos de avaliação da expressão gênica e dos efeitos dos extratos de culturas na movimentação estomatal foram os mesmos, aproveitando-se as células para a extração do RNA e os sobrenadantes para a extração do composto bioativo. O experimento foi conduzido desta maneira de modo a relacionar diretamente a expressão dos genes com o efeito do extrato em planta.

A presença de PEG6000, um indutor de estresse osmótico em Lxx (FARIA et al., 2019) atuou como um estimulante da expressão gênica, uma vez que todos os genes da rota MEP/DOXP, os genes do operon carotenóide e a *desA* foram mais expressos que o controle. A maior expressão dos genes do operon carotenóides já era esperado, pois estes pigmentos também são importantes moléculas osmorreguladoras em bactérias e que podem auxiliar a membrana plasmática a se estabilizar em condições de estresse (FARIA, 2016; SALMA et al., 2020). Uma vez que a rota MEP/DOXP é a rota de síntese de pigmentos carotenóides em procariotos e presente em Lxx, também se esperava que estivessem mais expressos (MONTEIRO-VITORELLO et al, 2004; LIEVENS et al, 2017). A hipótese sobre a relação dos genes da rota MEP/DOXP e os genes do operon carotenóide comprovou-se verdadeira, uma vez que todos os genes analisados se mostraram mais expressos quando a bactéria foi cultivada na presença do composto. Apesar de ainda não haver uma rota descrita para a síntese de ABA em bactérias, a maior expressão também do gene *desA* pode indicar que o pigmento está sendo metabolizado em outro composto, talvez em um sesquiterpenóide antecessor ou similar ao ácido abscísico, como aventado (MONTEIRO-VITORELLO et al, 2004; NETZER et al., 2010).

A fosmidomicina é um antibiótico bloqueador clássico da rota MEP/DOXP pois atua logo no segundo estágio da via, inibindo o gene *dxr* que codifica a enzima 1-deoxi-d-xilulose

5-fosfato reductoisomerase, o que resulta na inibição da produção de pigmentos carotenóides em bactérias (LICHTENTHALER, 2004; HALE et al., 2012; SLADE et al., 2019). Seu efeito em células de Lxx não foi diferente; o antibiótico inibiu praticamente todos os genes analisados com exceção dos genes *dxs* e *desA*. A não inibição do gene *dxs* era esperada, pois ele codifica a enzima 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase, metabolizando o D-gliceraldeído-3-fosfato em 1-deoxi-D-xilulose-5 fostato e sim que a inibição ocorresse no gene *dxr* inibindo a enzima 1-deoxi-d-xilulose 5-fosfato reductoisomerase que metaboliza o composto 1-deoxi-D-xilulose-5 fostato em 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, porém, além do gene *dxr*, os demais genes foram todos tiveram menor expressão. Essa relação mostra que há uma ligação direta entre a rota MEP/DOXP e os genes do operon carotenóide, mostrando que a fosmidomicina é capaz de reduzir a produção destes pigmentos como também visto em outros membros da família *Microbacteriaceae* (TRUTKO et al., 2005). Já o gene *desA* não exibiu uma relação direta com os demais genes da rota MEP/DOXP e os genes do operon carotenóide; este evento pode-se explicar pelo gene estar localizado numa ilha genômica de Lxx, sendo obtido por transferência lateral e apesar de poder haver uma relação, sua regulação não está interligada (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O tratamento final onde unem-se o agente oxidante, que atuou como um estimulante da rota MEP/DOXP, e o inibidor da mesma, a fosmidomicina, resultou num aumento brando, porém significativo, da expressão dos genes. Assim nota-se que a concentração usada de PEG6000 causou um efeito muito maior de estímulo do que a fosmidomicina de inibição da rota.

4.2 Concentração do pigmento carotenóide e sua relação com a expressão dos genes.

Na análise espectrofotométrica de pigmentos isoprenóides verificou-se a presença de um grande pico de absorbância no tratamento controle na faixa de 400nm, pico este também já relatado em outras bactérias da família *Microbacteriaceae,* inclusive em outras espécies do gênero *Leifsonia,* como *Leifsonia poae* e *Leifsonia aquática* (TRUTKO et al., 2005; CASTRO, 2012). Existem outras bactérias do gênero *Leifsonia* como *Leifsonia soli* e a *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* que podem produzir pigmentos de mesma natureza já que possuem coloração amarelada, embora ainda não haja nenhum dado experimental (MADHAIYAN et al., 2010; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2013).

Ao se adicionar o agente osmoestressante PEG6000 não foi possível distinguir o pico de 400nm, o que levanta duas hipóteses: ou o agente inibiu a produção do pigmento ou a bactéria metabolizou-o em outro composto, porém pelos dados da expressão gênica sugere-se

que a segunda hipótese esteja correta. Já no tratamento com fosmidomicina, os resultados concordam com o resultado da expressão gênica. É possível distinguir um pico de absorbância em 400nm, porém muito menor que no tratamento controle, resultado já visto em outros trabalhos (TRUTKO et al., 2005; CASTRO. 2012). Assim, estabeleceu-se uma relação direta entre redução da expressão dos genes da rota MEP/DOXP e do operon carotenóide e a síntese do pigmento (TRUTKO et al., 2005; CASTRO. 2012).

No tratamento conjunto de células de Lxx com PEG6000 e fosmidomicina o pigmento volta a não ficar distinto. Quando comparamos esse resultado com os dados da expressão gênica, vemos a correlação com o tratamento controle. Os genes novamente estão com expressão elevada, o que reforça a hipótese de que os pigmentos foram metabolizados em outro composto. Novamente verifica-se que a inibição da fosmidomicina não é completa para a concentração usada, o que reforça a conclusão anterior de que sob estas condições experimentais o PEG6000 causa um estímulo muito superior ao do antibiótico, elevando a expressão dos genes; porém, como existe o efeito da inibição da fosmidomicina, o aumento da expressão não chega a ser tão elevado quanto no tratamento somente com PEG6000 (TRUTKO et al., 2005; CASTRO. 2012).

4.3 Fechamento estomatal em resposta ao extrato do sobrenadante de Lxx

Um dos papeis do hormônio ácido abscísico na fisiologia vegetal é promover o fechamento estomatal sob condições de estresse através da diminuição da pressão de turgor das células-guarda (CAI et al., 2017). Desta forma, este ensaio foi conduzido com a finalidade de reforçar a hipótese da produção de ABA ou um análogo por Lxx. Os sobrenadantes dos experimentos de expressão gênica foram separados e submetidos a uma extração metanólica para averiguar uma relação direta entre a expressão dos genes da rota MEP/DOXP, genes do operon carotenóide e do gene *des*A e a ação dos sobrenadantes no movimento estomatal em Micro-tom selvagem e dois de seus mutantes, o mutante *notabilis* que tem baixa produção do hormônio ABA e o mutante *sitiens* que não o produz.

Tanto o tipo selvagem como os mutantes de Micro-tom reagiram da mesma forma frente aos tratamentos com os extratos. Porém, houve diferença entre tratamentos. No caso do tratamento com PEG6000, onde os genes foram positivamente expressos e o pico de absorbância do pigmento carotenóide não ficou evidente, houve uma maior porcentagem de estômatos fechados para os três genótipos (WT, *sit* e *not*), comportamento esperado caso fosse utilizado o hormônio ABA. Já quando utilizamos o inibidor fosmidomicina o comportamento se reverte e há uma pequena porcentagem de estômatos fechados também para os três

genótipos, resposta que concorda com os dados vistos anteriormente: baixa expressão dos genes e baixo pico de pigmento. Por fim, o tratamento que une o agente estressante e o antibiótico não diferiu estatisticamente do controle, recuperando o fenótipo original mesmo com a existência de uma maior expressão gênica e a não identificação do pico de absorbância do pigmento.

O mesmo comportamento dos mutantes pode se explicar por suas características fisiológicas. O mutante *notabilis* é capaz de produzir baixas quantidades do hormônio ABA e o mutante *sitiens* não é capaz de sintetiza-lo, mas sua sensibilidade e seus receptores não estão prejudicados. Assim, ao entrarem em contato com um composto com efeitos análogos ao ABA, tiveram uma resposta semelhante ao selvagem (CARVALHO et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). A diferença pode estar na velocidade da resposta. Por causa de suas deficiências hormonais, o fechamento estomático pode ter ocorrido em maior velocidade nos mutantes que no genótipo selvagem. Isto, porém, não foi analisado neste experimento. Outro dado que é possível analisar é que mesmo com a presença do pico no tratamento controle há uma maior taxa de fechamento estomático que o verificado no tratamento com fosmidomicina. Isso deixa claro que mesmo em condições não estressantes, *L. x.* subsp. *xyli* é capaz de produzir este composto.

A necessidade de um estresse na bactéria para a manifestação de um composto tóxico concorda com os dados da literatura a respeito dos sintomas que Lxx causa em cana-de-açúcar ser mais severo durante períodos de seca, uma vez que foi necessário que a Lxx estivesse em situação de estresse para manifestar maior expressão gênica e causar um maior fechamento estomático (RAMOS, 2012). Em conjunto com a condição ambiental, também é necessário o aumento da concentração de título bacteriano para que ocorra a manifestações de sintomas na planta. Este evento pode ser desencadeado pelo estresse anterior que estimula o crescimento de Lxx, fenômeno que foi visto em Lxx tanto *in vitro* quanto *in planta* (RAMOS, 2012; CIA et tal., 2018; FARIA et al., 2019). Mesmo com a maior expressão dos genes no tratamento que une PEG6000 + fosmidomicina, não há a mesma eficácia em causar o fechamento de estômatos. Aparentemente o antibiótico consegue inibir parte da formação com pigmento carotenóide deixando menos composto para que possa ser metabolizado no composto seguinte. Este estudo avançou na confirmação da hipótese de produção e secreção de um composto análogo ao ABA pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli,* uma vez que relatamos evidencias genéticas, bioquímicas e de efeito fisiológico no hospedeiro, seguindo na compreensão do funcionamento de alguns de seus genes em diferentes situações e elucidar alguns dos possíveis mecanismos de patogenicidade. Demonstrou-se uma relação direta entre

a expressão dos genes da rota MEP/DOXP e do operon carotenóide, a presença ou ausência do pigmento carotenóide e os efeitos dos extratos na movimentação estomática, reforçando a hipótese da produção de um análogo ao ácido abscísico por parte de *L. x.* subsp. *xyli*.

5. CONCLUSÕES

Lxx possui os genes da rota MEP/DOXP ativos e responsivos a diferentes situações.

Os genes da rota MEP/DOXP apresentaram expressão gênica relacionada com a expressão dos genes do operon carotenoide.

Lxx produz um pigmento carotenóide que possui um pico de leitura na faixa de 400nm e que sintetiza uma substância que pode ser precursora ou análoga ao ácido abscísico, composto que foi capaz de causar o fechamento de estômatos em mutantes de Micro-tom.

REFERÊNCIAS

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 bladdler and colon cancer data sets. **Cancer Research,** Baltimore, v.64, p.5245-5250, 2004

BAILEY, R. A.; MCFARLANE, S. A. The incidence and effects of ratoon stunting disease of sugarcane in Southern and Central Africa. **Sugar Technologists' Association of India**, Nova Deli, v. 9, p. 338-346, 1999

BIRCH, R.G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 2, p. 1-11, 2001

CAI, S.; CHEN, G.; WANG, Y.; HUANG, Y.; MERCHANT, D. B.; WANG, Y.; YANG, Q.; DAI, F.; HILLS, A.; FRANKS, P. J.; NEVO, E.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P.S.; SESSA, E.; WOLF, P. G.; XUE, D.; ZHANG, G.; POGSON, B. J.; BLATT, M. R.; CHEN, Z. H. Evolutionary Conservation of ABA Signaling for Stomatal Closure. **Plant Physiology,** Rockville, v.174, p. 732-747, 2017

CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, M.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LITHOLDO JR, C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 4347–4361, 2009.

CARVALHO, R. F.; QUECINI, V.; PERES, L.E.P. Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) hypocotyls: Physiological and genetic studies. **Plant Science**, Limerick, v.178 p.258-264, 2010.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.L.; ZSOGON, A.; LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: Micro-Tom as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, Londres, v.7, p.18, 2011.

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

CIA, M.C.; CARVALHO, G.; AZEVEDO, R. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SOUZA, G. M.; NISHIYAMA-JUNIOR, M. Y.; LEMBKE, C. G.; FARIA, R. S. C. A.; MARQUES, J. P. R.; MELOTTO, M.; CAMARGO, L. E. A. Novel insights into the early stages of ratoon stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis, **Phytopatology**, St. Paul, v. 108, p. 1455-1466, 2018.

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.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane ratoon stunting disease**. 2005. Disponível em: <http://eds.ufl.edu/body_SC008>. Acesso em: 01 set. 2021

CONAB**. Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-açúcar, v. 6 - Safra 2021/22, n. 4 - Segundo levantamento**. Disponível em:< https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/38841_c46487b7985626b6b41f7083ce9336c5 >. Acesso em: 01 set. 2021

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

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In: _____. **AGRIANUAL 2010**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. p. 239-261.

FARIA, R. S. C. A. **Análise in vitro da expressão de genes de resposta a estresse oxidativo e osmótico da bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado na área de Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FARIA, R. S. C. A.; CIA, M. C.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; AZEVEDO, R. A.; CAMARGO, L. E. A. Characterization of genes responsive to osmotic and oxidative stresses of the sugarcane bacterial pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, publicação online disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs42770-019-00163-6>, 2019.

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.

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

GRISHAM, M.P.; JOHNSON, R.M.; VIATOR, R.V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 29, p. 119-127, 2009.

HALE, I.; O'NEILL, P. M.; BERRY, N. G.; ODOM, A.; SHARMA, R. The MEP pathway and the development of inhibitors as potential anti-infective agentes. **Med. Chem. Commun.,** v. 3, p. 418-433, 2012

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.

LICHTENTHALER, H. K. Evolution of carotenoid and isoprenoid buisynthesis in photosynthetic and non-photosynthetic organisms**. Proceedings of the 16th Plant Lipid Symposium**, Budapeste, p. 11–24, 2004.

LIEVENS, L.; POLLIER, J.; GOOSSENS, A.; BEYAERT, R.; STAAL, J. Abscisic acid as pathogen effector and imunne regulator. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 1-15, 2017.

MADHAIYAN, M.; POONGUHALI, S.; LEE, J. S.; SENTHIKUMAR, M.; LEE, K. C.; SSUNDARAM, S. *Leifsonia soli* sp. Nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 60, p, 1322-1327, 2010

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.

MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M. História e morfologia da cana-de-acúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualizações em produção de cana-de-açúcar**. Campinas: Fundação Cargil, p. 11-18, 2006.

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

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

NGARUIYA, P. N.; SHIPTON, W. A.; COVENTRY, R. Ratoon stunting disease of sugarcane as influenced by environmental stressors. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology.** V.27, p.324–333, 2005.

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

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analisys 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., CARMARGO, L. E. A., MONTEIRO-VITORELLO, C. V. 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, 2016.

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.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. Doenças causadas por bactérias. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-deacucar/arvore/CONTAG01_78_22122006154841.html>. Acesso em: 05 set. 2021.

SALMA, M.; ABDULLA, M. K.; SAMINA, M. Osmoadaptation in halophilic bacteria and archea. **Research Journal of Biotechnology,** Vijay Nagar, v. 15, p.154-161, 2020.

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.

SLADE, J. A., BROCKETT, M.; SINGH, R.; LIECHTI, G. W.; MAURELLI, A. T. Fosmidomycin, an inhibitor of isoprenoid synthesis, induces persistence in *Chlamydia* by inhibiting peptidoglycan assembly. **PLOS Pathogens**, v.15, p.1-15, 2019.

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.

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

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em: 03 set. 2021.

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**, Berlim, v. 161, p. 478-484, 2013.

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

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

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.

WEYERS, J.D.B.; JOHANSEN, L.G. Accurate estimation of stomatal aperture from silicone-rubber impressions. **New Phytologist**, Oxford, v. 101, p. 109–115, 1985

ZAVAGLIA, A. C.; CIA, M. C.; POPIN, R. V.; CAMARGO, L. E. A. No alternative hosts of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were identified among grass and non-grass species using novel PCR primers. **Tropical Plant Pathology,** v. 41, p. 336-339, 2016.

ZHANG, X.; LIANG, Y.; ZHU, K.; WU, C. X.; YANG, L.; LI, Y. Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Techonology**, v. 19, p. 394-401, 2016.

ZHANG, X., CHEN, M., LIANG, Y., XING, Y., COMSTOCK, J. C., LI, Y., YANG, L. Morphological and physiological responses of sugarcane to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **Plant Disease**, v.100 p.2499-2506, 2017.