

Arthur Peixoto Berselli

Estudo da colonização de diferentes estirpes de *Xanthomonas albilineans* em *Saccharum hybrid* spp.

Study of the colonization of different strains of *Xanthomonas albilineans* in *Saccharum hybrid* spp.

SÃO PAULO  
2023

Arthur Peixoto Berselli

Estudo da colonização de diferentes estirpes de *Xanthomonas albilineans* em *Saccharum hybrid* spp.

Study of the colonization of different strains of *Xanthomonas albilineans* in *Saccharum hybrid* spp.

EXEMPLAR CORRIGIDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Botânica, na Área de Biologia de Sistemas

Orientadora: Professora Doutora  
Marie-Anne Van Sluys

SÃO PAULO  
2023

## Ficha Catalográfica

---

Berselli, Arthur Peixoto

Estudo da colonização de diferentes estirpes de *Xanthomonas albilineans* em *Saccharum hybrid* spp. / Arthur Peixoto Berselli; orientadora Marie-Anne Van Sluys – São Paulo, 2023.

31 p. + anexo

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Botânica).

1. Escaldadura de folhas
2. Cana-de-açúcar
3. *Xanthomonas albilineans*. I. Van-Sluys, Marie-Anne orient. Título.

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).



---

Prof(a). Dr(a). Marie-Anne Van Sluys

Orientador(a)

## Epígrafe

---

“A única coisa que torna a vida possível é uma incerteza permanente e intolerável: não saber o que vem a seguir.”

Ursula K. Le Guin, *A mão esquerda da escuridão*  
(trad. Susana L. de Alexandria)

## Agradecimentos

---

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho está inserido do Projeto Temático de título “Contribuição de genes, genomas e elementos de transposição na interação entre plantas e microorganismos: estudo de caso em cana-de-açúcar”, que possui apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, processo 2016/17545-8.

Meus agradecimento também se estendem à todos os membros do laboratório, que possibilitaram não apenas a construção do presente trabalho, mas também foram essenciais nesta jornada que foi realizar o Mestrado durante uma pandemia. À minha orientadora, Marie-Anne, por ter aceito o desafio e iluminado o caminho. À técnica Tatiana, pela paciência e conhecimento inesgotáveis, responsável pelo sucesso deste e de tantos outros trabalhos. À Suzy, pelo bom humor revigorante e trabalho incansável para o contínuo funcionamento de tudo. Aos pós-doutorandos Juliane, Paula, Mariane e Marcelo pelas orientações e ensinamentos preciosos. E aos meus colegas de laboratório, estando em outras paragens ou tendo chegado mais recentemente, pelo apoio diário e por construir um ambiente acolhedor e próspero repleto de bons momentos e experiências compartilhadas, tanto científicas quanto interpessoais, em especial ao Henrique, à Dora e à Diana, pelo companheirismo nas vicissitudes destes últimos três anos.

Minha gratidão à equipe da Secretaria de Pós-Graduação, Erika e Helder, pelo atendimento fantástico e pela paciência incomparável.

E serei eternamente grato pelo apoio dos meus amigos e familiares, sem os quais eu nunca teria chegado tão longe. À minha mãe, Isabel, à minha companheira, Brunna e ao gato Joca, saibam que vocês moram em meu coração e são minha força para seguir em frente. E em memória ao meu pai, Marco, que sempre torceu por mim.

# Índice

---

Introdução	1
Cana-de-açúcar	1
Genoma de <i>Saccharum</i>	1
Escaldadura de Folhas	2
O gênero <i>Xanthomonas</i>	3
<i>Xanthomonas albilineans</i>	5
Projeto GEMACana	6
Objetivos	6
Material e Métodos	6
Linhagens Bacterianas	6
Cultivo <i>Xanthomonas albilineans</i>	7
Variedade de Cana-de-açúcar utilizada no estudo	7
Cultivo Cana-de-açúcar	7
Inoculação	8
Crescimento em diferentes condições de iluminação	10
Microscopia de fluorescência	10
Isolamento de microrganismos das plantas inoculadas	11
Resultados e Discussão	13
Estudos <i>in planta</i>	13
Isolamento a partir de canas inoculadas	13
Experimento de inoculação 1	15
Experimento de inoculação 2	18
Estudos <i>in vitro</i>	22
Experimento Luz Azul	22
Coloração Polissacarídeos	23
Co-crescimento <i>in vitro</i>	24
Estudos <i>in silico</i>	25
Análise T3SS em <i>X. albilineans</i>	25
Conclusão	27
Resumo	28
<i>Abstract</i>	29
Referências Bibliográficas	30
Anexos	33
Anexo 1 - Capítulo para “Botânica no Inverno - 2021”	33
Anexo 2 - Artigo Miranda <i>et al.</i> , 2023	45

# Introdução

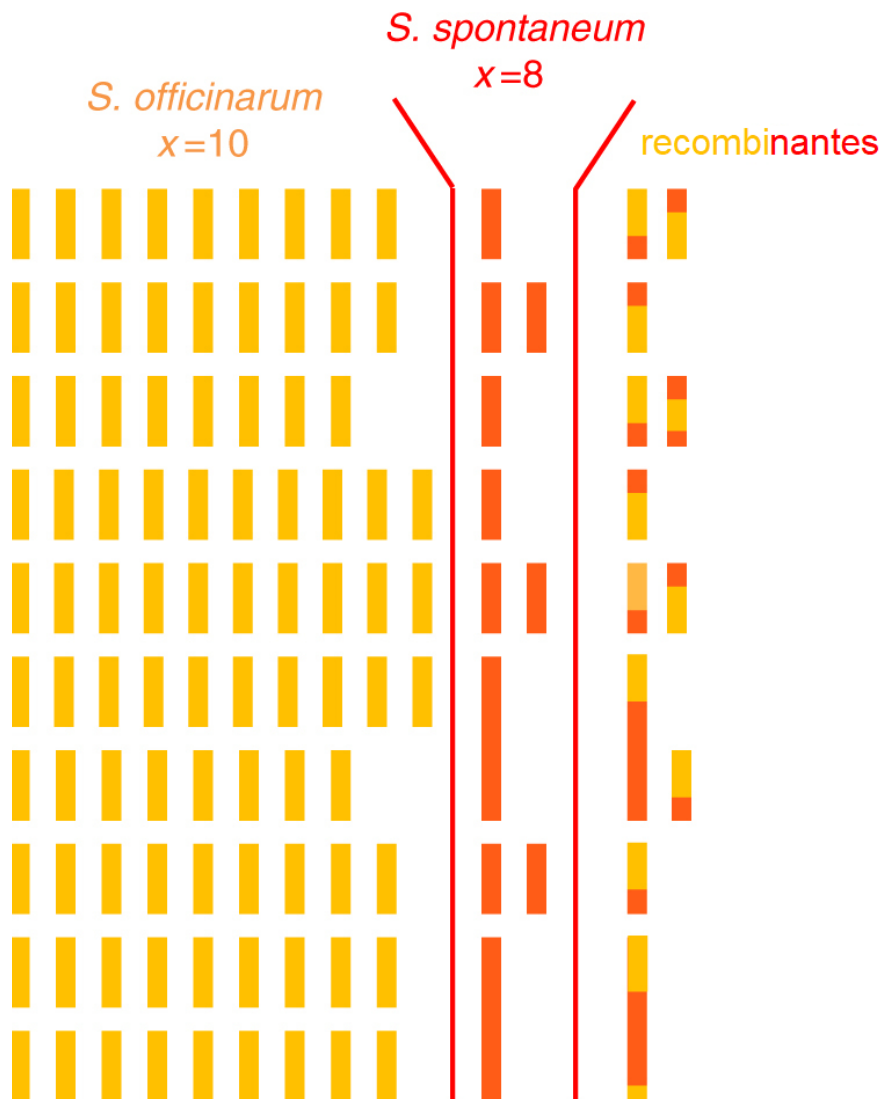
---

## Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é membro de Poaceae e a classificação taxonômica atual dos cultivares utilizados é *Saccharum hybrid* spp., dado que todos resultam de hibridações interespecíficas realizadas há mais de cem anos (Miranda, 2008; Heinz 1987). De modo geral, os cruzamentos interespecíficos mais frequentes são entre *Saccharum officinarum* L. e *S. spontaneum* L. A cana é a principal fonte (80%) de açúcar produzido mundialmente (European Commission, 2017). O Brasil é, desde o início do século, o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Em 2021, a produção brasileira foi de 715 milhões de toneladas, 70% a mais do que a Índia, segundo maior produtor mundial, que produziu 405 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2023). Em novembro de 2022, o cultivo de cana-de-açúcar representava 10% dos 88 milhões de hectares de área plantada no Brasil (IBGE, 2023). Além disso, a palha e o bagaço são queimados nas usinas para geração de eletricidade e a produção de energia pode ser tão alta que cidades ao redor de usinas se beneficiam dessa produção extra (Miranda, 2008).

## Genoma de *Saccharum*

Sendo caracterizado por altos níveis de poliploidia e aneuploidia, o genoma de *Saccharum, hybrid* spp. é  $2n = 100-120$  e uma sequência de referência foi apenas recentemente montada (Garsmeur *et al.*, 2018) (Figura 1). Aliado à presença de genes homólogos com até doze cópias (alelos), sequenciar o genoma de cana-de-açúcar foi uma tarefa árdua, que demorou consideravelmente mais do que para outras culturas (Souza *et al.*, 2011). O uso de outros genomas, como o de milho, como referência para a anotação de partes do genoma foi uma estratégia para começar a destrinchar o problema (D'Hont *et al.*, 1994). Garsmeur e colaboradores conseguiram uma sequência genômica monoplóide do cultivar comercial R570 de cana-de-açúcar usando o sorgo como referência (Garsmeur *et al.*, 2018) e um genoma de uma das espécies parentais, *S. spontaneum* L., foi sequenciado no mesmo ano (Zhang *et al.*, 2018) e oferece uma importante ferramenta para futuras empreitadas. Um ano antes, o cultivar SP80-3280, que será utilizado neste trabalho, teve um esboço de seu genoma sequenciado (Riaño-Pachón & Mattiello, 2017) e, mais recentemente, um estudo conseguiu montar um compreensivo conjunto de, aproximadamente, 373 mil genes putativos e suas regiões regulatórias, incluindo os elementos-chave para a produção de biomassa como, por exemplo, particionamento de carbono e síntese de fibras (Souza & Van Sluys, et al. 2019).



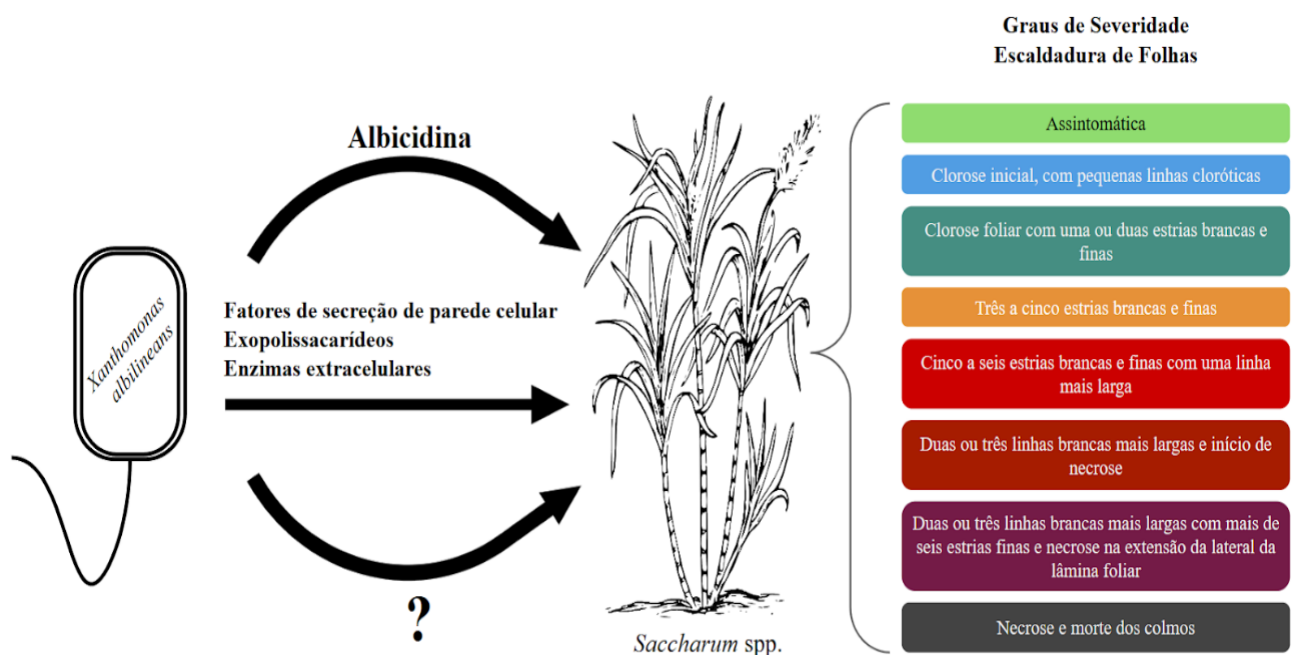
**Figura 1.** Representação esquemática do genoma de um cultivar moderno de cana-de-açúcar. Cada barra representa um cromossomo originário de *S. officinarum* (amarelo) ou *S. spontaneum* (laranja). Cromossomos na mesma linha são homeólogos. Características que evidenciam a complexidade do genoma e podem ser vistas na imagem incluem aneuploidia, alta poliploidia, diferença estrutural de cromossomos originários de espécies diferentes e a presença de cromossomos recombinantes interespecíficos. Extraído de (Garsmeur *et al.*, 2018) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6035169/figure/Fig1/>

### Escaldadura de folhas

A escaldadura de folhas foi observada em cana-de-açúcar há mais de um século e a associação da doença com a presença da bactéria *Xanthomonas albilineans* foi descrita nos anos 20 (século XX), concomitantemente em Java e na Austrália (Ricaud & Ryan, 2012). Na primeira década do século XX, um surto na Austrália levou a uma substituição dos cultivares, incentivando a hibridação entre os utilizados até então e outras variantes selvagens que apresentavam maior tolerância à doença (Govindaraju & Zhang, 2019). Ao longo do século, outros casos ao redor do mundo causaram grandes perdas, como nas Ilhas Maurício em 1928 e na Guiana Britânica nos anos 50 (Ricaud & Ryan, 2012).



Essa doença foi descrita no Brasil inicialmente em 1944 em canaviais dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo (Arruda, 1944). Atualmente, seu agente etiológico, *Xanthomonas albilineans*, está presente em todo o território brasileiro (Miranda, 2008). Sua ampla dispersão se dá por uma fase latente da doença, em que variedades comerciais cultivadas que apresentam certo grau de tolerância mostram-se assintomáticas, passando despercebidas. Assim, a manifestação da fase aguda da doença, em que os sintomas clássicos são observados, depende de fatores ambientais, geralmente condições de estresse para a planta, como por exemplo, o estresse hídrico (Miranda, 2008). Dada à grande variabilidade entre os cultivares em relação à sua tolerância ao patógeno e entre os patógenos em relação à sua virulência, a agressividade da doença varia de interação a interação. Tardiani e colaboradores (Tardiani *et al.*, 2014) propuseram uma escala de notas baseada na severidade dos sintomas para as condições brasileiras (Figura 2). Partindo da condição assintomática, a escala passa pelo aparecimento de finas linhas cloróticas ao longo das folhas da cana, evoluindo para necrose do tecido e o eventual apodrecimento da folha, sendo o quadro mais grave a morte do colmo (Rott *et al.*, 1997). Adicionalmente às fases latente e crônica da doença, também é observada uma fase aguda da doença, que ocorre em variedades suscetíveis de cana e que apresenta uma evolução rápida, com a necrose das folhas, o murchamento da planta e sua morte de forma abrupta (Tardiani *et al.*, 2014).



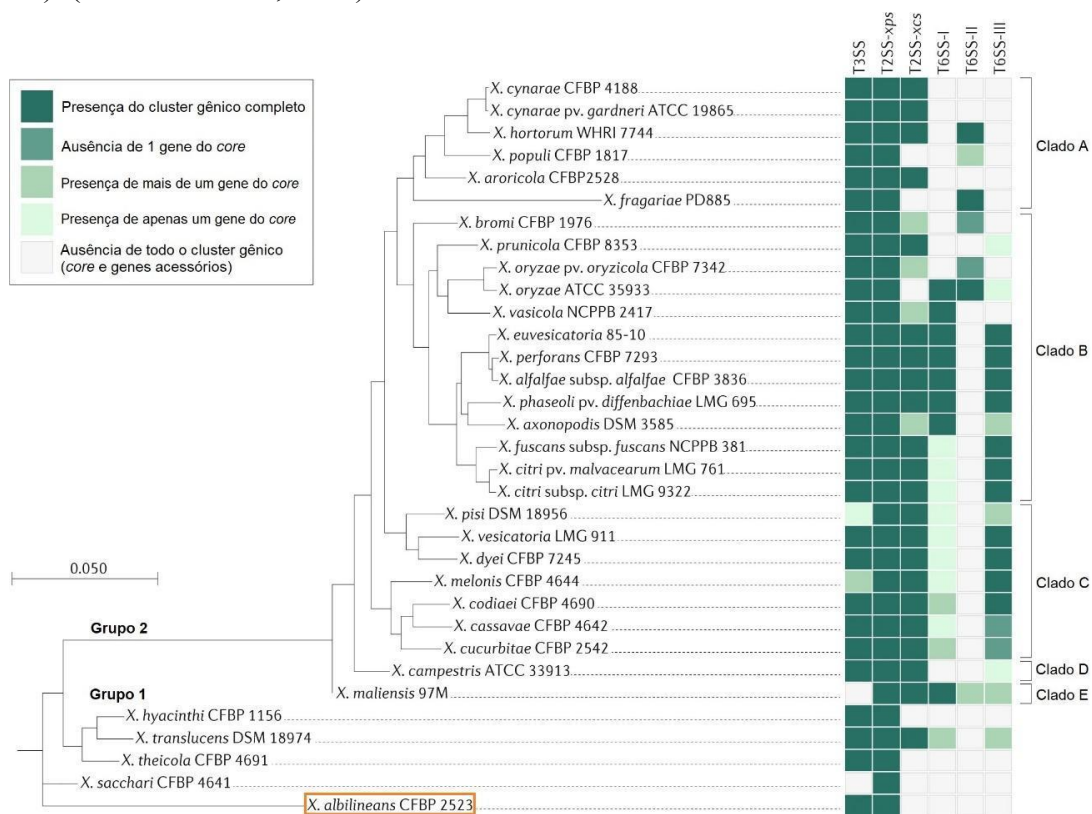
**Figura 2.** Esquema da infecção de cana-de-açúcar por *X. albilineans*, destacando os mecanismos conhecidos (com ênfase na albicidina) e o índice de severidade da escaldadura de folhas, conforme proposto por Tardiani e colaboradores (Tardiani *et al.*, 2014) e adotado neste projeto. Imagem adaptada de Miranda, 2023.

### O gênero *Xanthomonas*

Pertencente à classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Xanthomonadales* e da família *Xanthomonadaceae* (Naushad *et al.*, 2015), o gênero *Xanthomonas* apresenta 36 espécies reconhecidas pelo banco de dados LPSN (Parte *et al.*, 2020). A árvore filogenética do gênero pode ser vista na Figura 3. A maioria das espécies identificadas e

estudadas possuem plantas hospedeiras de amplo interesse econômico, como arroz, laranja, banana, tomate e cana-de-açúcar. Além de apresentar especificidade em relação às hospedeiras, diferentes patovares também possuem alto grau de especificidade aos tecidos infectados (Ryan *et al.*, 2011). Também há espécies não-patogênicas e putativas, cujo estudo não recebe a mesma atenção devido à falta de conexão com cultivares de alto valor econômico, apesar de serem tão importantes, do ponto de vista evolutivo, quanto suas contrapartes patogênicas (Vauterin *et al.*, 1996).

Uma característica compartilhada por quase todas as espécies dentro deste gênero é o seu sistema de secreção de tipo 3 codificado pelo cluster de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade hrp-T3SS (Teper *et al.*, 2021). Tal sistema é responsável pela secreção de proteínas efetoras, cuja ação engloba desde a supressão das defesas da planta hospedeira até a progressão da doença (Kay & Bonas, 2009). Os mecanismos bioquímicos que esses efetores desempenham incluem acetiltransferases, cisteína proteases, SUMO proteases, proteína quinases, uridiltransferases, fitases, fosfatases, nucleosídeo transferases e maquinário ubiquitina-proteassomo. Os alvos mais frequentes dessas moléculas são a supressão de respostas de defesa das plantas denominadas de ETI e PTI, imunidade ativada por efetores e imunidade ativada por PAMPs, respectivamente. A promoção de virulência, geração de resposta de hipersensibilidade, supressão de defesa mediada por etileno, redução de imunidade induzida por seca e até manipulação da expressão gênica do hospedeiro resultam na promoção do crescimento do patógeno (este último é específico para efetores do tipo TAL). (Schreiber *et al.*, 2021)



**Figura 3.** Distribuição filogenética de espécies de *Xanthomonas*, baseada no alinhamento de 198.114 sequências nucleotídicas. Genomas e sequências disponíveis no banco de dados do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) foram usados para a reconstrução filogenética. Em destaque está a presença de sistemas de secreção associados à virulência. Destaque para a posição da *Xanthomonas albilineans* no Grupo 1, com ressalva de que o T3SS encontrado é diferente dos demais encontrados no resto do gênero. Extraído e traduzido de Timilsina e colaboradores (Timilsina *et al.*, 2020)

## *Xanthomonas albilineans*

A bactéria Gram-negativa *Xanthomonas albilineans* (Ashby, 1929) Dowson, 1943 é um patógeno sistêmico, que coloniza o xilema de cana-de-açúcar. Um estudo apontou sua capacidade de colonizar também células parenquimáticas, dadas as condições apropriadas (Mensi *et al.*, 2014). Comparada a outras espécies do gênero *Xanthomonas*, *X. albilineans* apresenta o genoma reduzido, de onde destaca-se a ausência de dois *clusters* de genes de patogenicidade característicos: a biossíntese de goma xantana e o sistema de secreção Hrp2-T3SS, de resposta de hipersensibilidade e secreção de tipo 3, já citados anteriormente. No entanto, apresenta um sistema de secreção T3SS, da família dos injectossomos de *Salmonella* (SPI-1) (Pieretti *et al.*, 2015, Miranda *et al.*, 2023). Além disso, a família a qual pertence, Xanthomonadaceae, possui vários representantes que apresentam um sistema de secreção de tipo IV, que em espécies como *Xanthomonas citri*, já foi comprovado ser utilizado como um mecanismo de competição interespecífica com outras bactérias (Souza *et al.*, 2015).

*X. albilineans* foi caracterizada como o agente causador da doença escaldadura de folhas e está presente em, ao menos, 66 países ao redor do mundo, causando grande impacto na produção mundial de cana-de-açúcar (Rott, 2000). Sua transmissão pode se dar mecanicamente, pelo instrumento utilizado para a colheita, e há relatos da possibilidade de transmissão aérea de planta para planta em locais com surtos da doença (Daugrois *et al.*, 2003, Creste, S., comunicação pessoal). No Centro-Oeste brasileiro e no noroeste de São Paulo, devido ao clima propenso a períodos de estiagem e ao processo de mecanização da colheita assim como o abandono da prática de queimada, verificou-se o aumento da incidência da doença, elevando a importância deste patógeno para os produtores de cana (Tardiani *et al.*, 2017). Os principais sintomas que caracterizam essa doença são causados, entre outros fatores, pela ação da toxina albicidina (um potente inibidor de DNA girase) cujo alvo é a DNA girase A de cloroplastos, inibindo a replicação do DNA plastidial e interrompendo a diferenciação do cloroplasto (Hashimi *et al.*, 2007). A albicidina, produzida especificamente por *Xanthomonas albilineans*, também possui atividade antimicrobiana, tendo sido observada a inibição na replicação de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, como a *Escherichia coli* (Birch & Patil, 1985).

Recente estudo desenvolvido por Miranda e colaboradores (Miranda *et al.*, 2023) investigou a associação entre características compartilhadas por diferentes estirpes e suas respectivas virulências observadas em cultivar suscetível ao patógeno. Usando uma abordagem que integrou estudos de genômica, transcriptômica e biologia celular, o grupo concluiu que não foi possível traçar correlação direta entre quaisquer singularidades que caracterizam as estirpes pela virulência apresentada. As estirpes estudadas possuem sua origem em diferentes regiões do território do Estado de São Paulo e foram denominadas Xa04, Xa11, Xa21 e Xa26. A análise genômica revelou que essas quatro estirpes apresentam mais clusters CRISPR que outros dois genomas já sequenciados (GPEPC73 e FJ1) e que não apresentam os plasmídeos já descritos em literatura. Ao mesmo tempo, encontraram-se mais regiões de profagos. Enquanto as estirpes Xa04 e Xa11 compartilham profagos únicos (assim como o par Xa21 e Xa26), foi possível agrupar por similaridade genômica os pares Xa04 e Xa26 e Xa11 e Xa21. Testes de halos de inibição de albicidina e as curvas de crescimento das estirpes também não mostraram correlação com a virulência observada. (Miranda *et al.*, 2023)

## Projeto GEMACana

O projeto de Mestrado está inserido no projeto temático FAPESP 2016/17545-8. O Grupo de Estudos de Microorganismos Associados à Cana-de-açúcar, GEMACana (GEMACana, 2020) é constituído por grupos de pesquisa do Instituto de Biociências da USP, da ESALQ e do Instituto Agronômico de Campinas e visa estudar a comunicação entre a planta e seus microrganismos associados, sendo tanto patogênicos quanto endofíticos. No caso, são três patógenos, sendo duas bactérias (*Leifsonia xyli* subsp *xyli* e *Xanthomonas albilineans*) e o fungo *Sporisorium scitamineum*, e uma bactéria promotora de crescimento associada às raízes, *Gluconacetobacer* sp..

## Objetivo

O objetivo deste projeto é comparar estirpes de *Xanthomonas albilineans* com diferentes graus de severidade quanto ao processo de colonização nas folhas de cana-de-açúcar (isoladas e em conjunto), utilizando microscopia de fluorescência.

## Material e Métodos

### Linhagens Bacterianas

As estirpes de *Xanthomonas albilineans* ((Ashby, 1929) Dowson, 1943) utilizadas neste estudo têm origem em linhagens recuperadas de canaviais no estado de São Paulo. Tais estirpes foram identificadas a partir do local de coleta e tiveram sua agressividade descrita por Tardiani e colaboradores (2014), baseada nos sintomas apresentados por cultivares de cana-de-açúcar suscetíveis à escaldadura de folhas. Na Tabela 1 são apresentados o local de coleta e a severidade média das estirpes utilizadas no presente estudo.

**Tabela 1.** Estirpes utilizadas no primeiro experimento de inoculação. Severidade média referente à escala proposta por Tardiani e colaboradores (2014).

Estirpe	Origem	Severidade Média	Meio de Crescimento
Xa04	Santa Adélia - SP (2010)	6,84	Wilbrink Modificado (MW)
Xa11	Conchal - SP (2010)	6,92	Wilbrink Modificado (MW)
Xa21	Araçatuba - SP (2010)	2,81	Wilbrink Modificado (MW)
Xa26	Mococa - SP (2010)	4,10	Wilbrink Modificado (MW)
Xa8044	IAC - Ribeirão Preto - SP (2021)	-	Wilbrink Modificado (MW)

Além das estirpes selvagens, também foram utilizadas linhagens transformadas das estirpes Xa11 e Xa21 com plasmídeos contendo genes das seguintes proteínas fluorescentes: mCherry, GFP e Cyan. Especificamente no caso do gene codificante para a GFP, a sequência é códon otimizada para expressão em *Xanthomonas*. O vetor episomal utilizado para a transformação foi o *pPROBE lacZ*.

### **Cultivo *Xanthomonas albilineans***

O meio utilizado para as culturas (tanto sólida quanto líquida) das *Xanthomonas albilineans* foi o meio Wilbrink modificado (Rott, 2000), cujos componentes estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Componentes do Meio Wilbrink modificado usado para o cultivo de *Xanthomonas albilineans* durante o experimento. Baseia-se no apresentado por Rott em 2000, com algumas modificações feitas no laboratório em função de reagentes comumente utilizados.

<b>Meio Wilbrink Modificado (MW) - 1L</b>	
Sacarose	10g
Triptona	5g
Fosfato Dipotássico - $K_2HPO_4$	0,352g
Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado - $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	0,25g
Sulfito de Sódio - $Na_2SO_3$	0,05g
Brometo de Potássio - KBr	5g
Ágar Bacteriológico (meio sólido)	15g
Água Destilada	q.s.p. 1L

### **Variedade de Cana-de-açúcar utilizada no estudo**

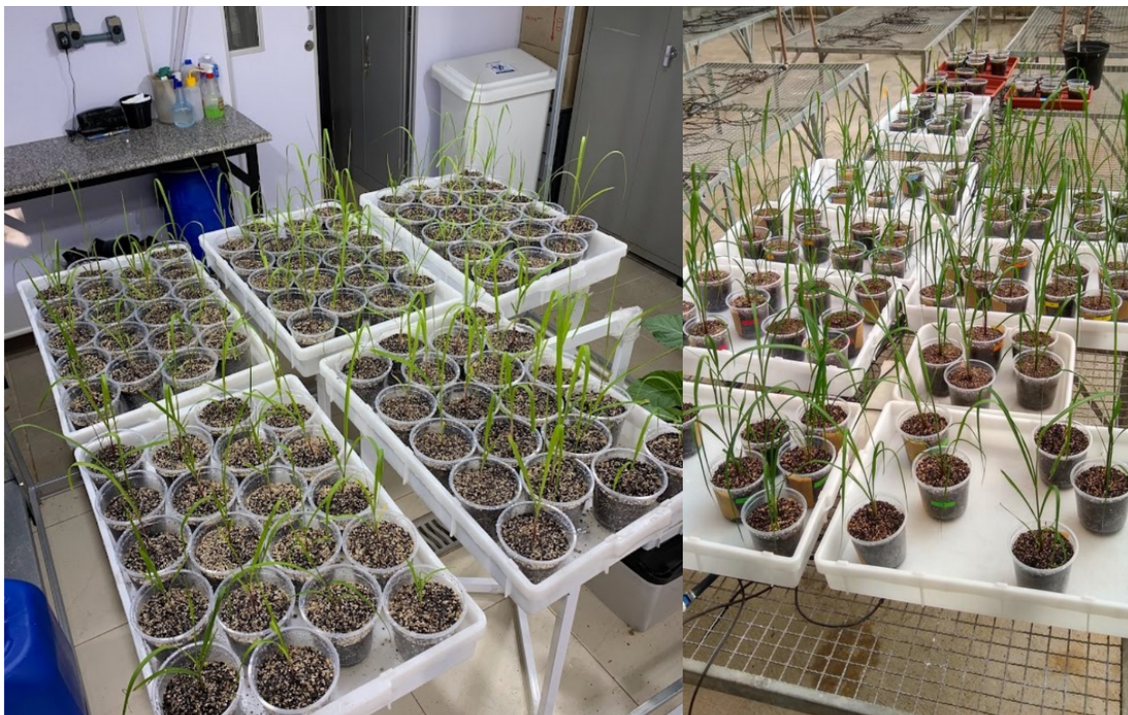
A variedade SP80-3280 foi desenvolvida pelo programa de melhoramento da Copersucar (Marin, 2022), inicialmente para uso comercial, apresentando alto teor de sacarose e boa produtividade de soqueira (Raizer & Vencovsky, 1999), além de tolerância a doenças como o carvão, o mosaico e a ferrugem. Sua suscetibilidade à broca não impediu seu uso comercial sendo utilizada também em pesquisas e em cruzamentos para originar novos cultivares. A característica-chave para o presente estudo é sua tolerância à escaldadura de folhas. (Socicana, s.i.)

### **Cultivo Cana-de-açúcar**

As mudas de cana-de-açúcar utilizadas nos diferentes experimentos foram cedidas no âmbito do Projeto Temático pelo Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, que produziu as mudas pela tecnologia Invicta<sup>®</sup>, que assegura que as mudas estejam livres de *Leifsonia xyli* e *Xanthomonas albilineans*. (Figura 4)

O substrato utilizado para o plantio das mudas de cana-de-açúcar foi o substrato comercial do tropstrato®, misturado com vermiculita fina (proporção 2:1 substrato:vermiculita) a fim de diminuir a perda de umidade do substrato.

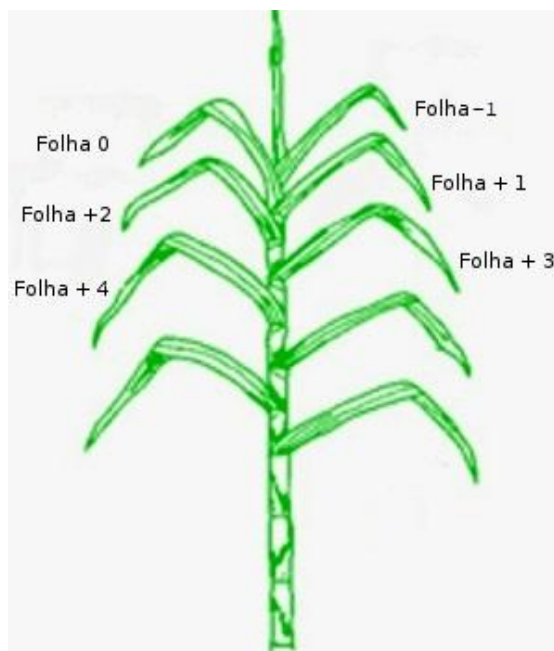
No total, 125 plantas foram utilizadas nos experimentos *in planta*, distribuídas da seguinte maneira: 63 para o primeiro experimento de inoculação, 32 para o segundo experimento de inoculação e 30 para o experimento de isolamento a partir de cana infectadas.



**Figura 4.** Mudas de cana-de-açúcar (SP80-3280) em processo de rustificação no Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (à esquerda). Mesmas plantas dois meses depois, após transplante, na casa de vegetação no IB (à direita).

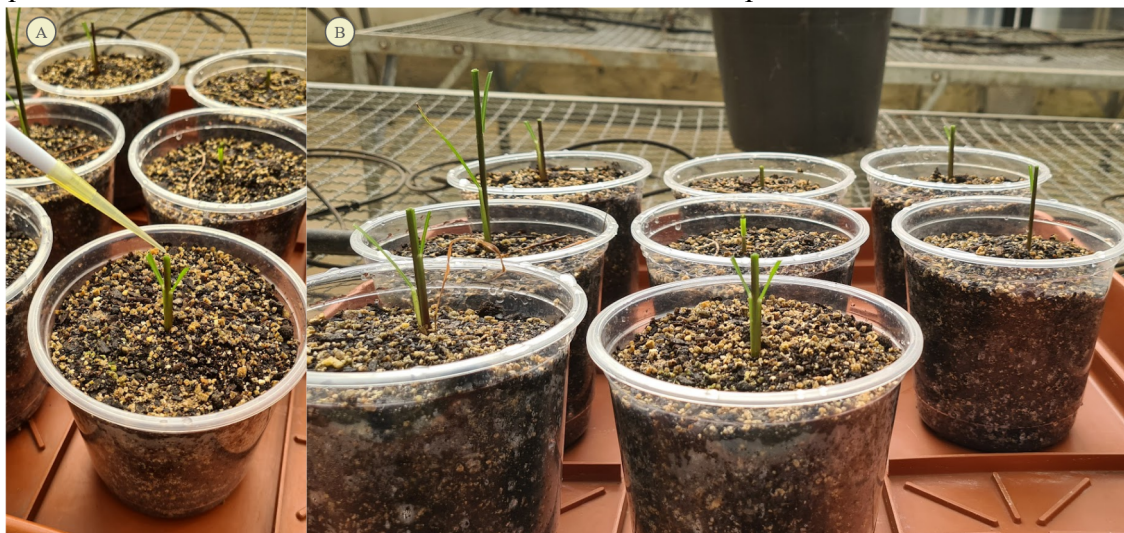
## **Inoculação**

A inoculação foi realizada em mudas ainda jovens, variando de dois a seis meses após a rustificação, uma vez que sua haste ainda pode ser cortada com uma tesoura convencional. O processo foi baseado no método de decapitação modificado descrito por Rott (1997). Uma tesoura esterilizada foi utilizada para realizar um corte transversal à haste principal da muda. A altura do corte variou entre os experimentos, pois no experimento de inoculação 1 as mudas disponíveis apresentavam altura similar e nos outros experimentos a altura das mudas variou mais. Assim, no experimento de inoculação 1 o corte foi feito a 12 cm do solo e nos outros experimentos preferiu-se fazer o corte abaixo da folha +1 (Figuras 5 e 6). Tomou-se a decisão do corte ser feito abaixo da folha +1 pois foi a posição aproximada do corte no experimento de inoculação 1.



**Figura 5.** Desenho apresentando a numeração das diferentes folhas da cana-de-açúcar, de acordo com o sistema de Kujiper. Extraído de Van Dillewijn, 1952. Adaptado por Raffaella Rossetto, 2022.

Para a inoculação das bactérias nas plantas, foi utilizada uma mistura de solução-tampão de fosfato (PBS 1X) com a cultura líquida da bactéria em estudo. A proporção da mistura foi realizada para cada amostra a fim de se alcançar uma densidade ótica ( $OD_{600}$ ) final de 0,3. A cultura líquida de *X. albilineans* utilizada nos inóculos estava com sua  $OD_{600}$  entre 0,3 e 0,6 no momento de preparo da mistura, para que as bactérias estivessem em sua fase de crescimento exponencial.



**Figura 6.** Canas-de-açúcar SP80-3280 do experimento de inoculação 2 após decapitação e inoculação. (A) Detalhe do momento da inoculação (B) Plantas recém inoculadas com Xa11-mCherry, com ressalva para a diferença de tamanho das hastes após corte realizado logo abaixo da folha +1.

### Crescimento em diferentes condições de iluminação

O crescimento em condições de luz diferentes (com luz branca, luz azul ou escuro) foi realizado em culturas em meio sólido. Os LEDs de luz azul emitem a 450nm com potência total de 144 watts. A lâmpada branca utilizada foi de LED de tubo de 9W, 6500K e 900 lúmens.

**Tabela 3.** Organização dos grupos experimentais para o Experimento Luz Azul.

<b>Grupo</b>	<b>Características</b>
<b>Claro</b>	Lâmpada de LED branca
<b>Escuro</b>	Caixa de isopor fechada
<b>Azul</b>	LEDs de luz azul
<b>Flash</b>	10 min de exposição aos LEDs de luz azul, seguido de 48h em caixa de isopor fechada

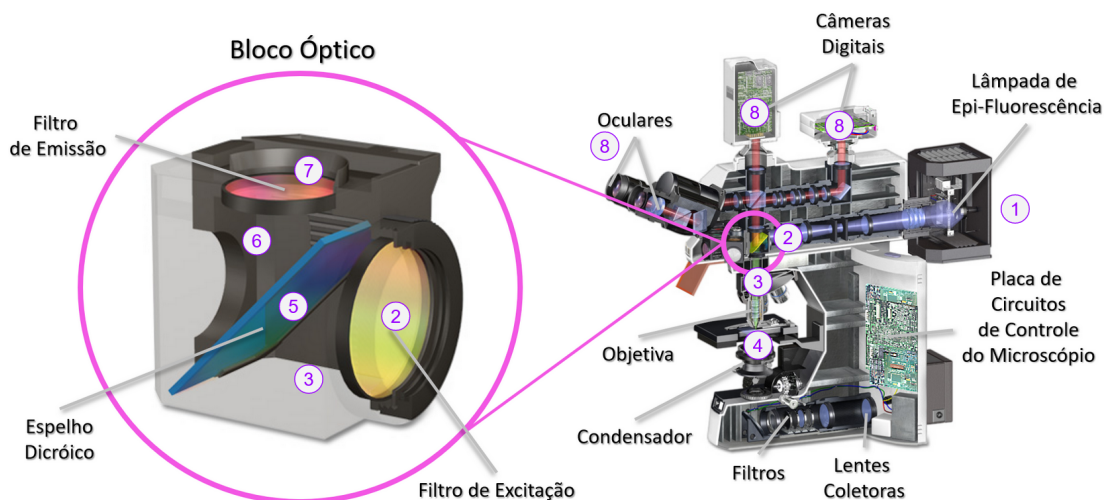
### Microscopia de fluorescência

A captura das imagens apresentadas no estudo foi realizada em microscópio de fluorescência do modelo Carl Zeiss Axio Imager.A2. O software utilizado para a aquisição e ajuste das imagens foi o Zen 2.6 (Blue Edition). O funcionamento do microscópio se baseia na diferença entre o comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão característicos da molécula fluorescente (neste caso, proteínas). O fluxo de luz dentro de um microscópio do tipo pode ser visto na Figura 7. O microscópio conta com um conjunto de filtros para fluorescência, dentre os quais foram utilizados neste trabalho os filtros: DAPI, eGFP, Cy5, PropIod e Rhodamine (Tabela 4). Esses filtros são blocos ópticos, contendo espelhos dicróticos, que funcionam baseados em um par de comprimentos de onda de excitação e emissão específicos, baseados na molécula fluorescente a ser detectada. Seus nomes se referem à principal molécula desse par excitação/emissão. Juntamente com Henrique Dias e Dora Bonadio, foi composto um capítulo para o curso de Botânica no Inverno em 2021, que está disponível no Anexo 1.

**Tabela 4.** Características dos blocos ópticos Zeiss<sup>®</sup> disponíveis para o experimento.

<b>Designação</b>	<b>Código</b>	<b>Excitation</b>	<b>Beamsplitter</b>	<b>Emission</b>
<b>DAPI</b>	49 488049-9901	G 365	FT 395	BP 445/50
<b>eGFP</b>	38 1031-346	BP 470/40	FT 495	BP 525/50
<b>Rhodamine</b>	20 488020-9901	BP 546/12	FT 560	BP 575-640
<b>Cy5</b>	50 488050-9901	BP 640/030	FT 660	BP 690/50
<b>PropIod</b>	00 488000-0000	BP 530-585	FT 600	LP 615





**Figura 7.** Esquema básico de um bloco óptico e de um microscópio de fluorescência. A luz segue o seguinte percurso: 1. um feixe de luz dentro do espectro do ultravioleta é emitido pela lâmpada de epi-fluorescência; 2. chega ao bloco óptico e passa pelo filtro de excitação, que seleciona a faixa de comprimento de onda específica para o bloco; 3. o feixe de luz é refletido pelo espelho dicroico, passando pela objetiva em direção à amostra; 4. o feixe de luz é absorvido e reemitido pela amostra, num comprimento de onda menor do que o original devido à perda de energia do processo; 5. o feixe reemitido passa novamente pela objetiva, em sentido contrário ao anterior e atinge o espelho dicroico; 6. devido à natureza do espelho, o comprimento de onda menor permite que o feixe de luz passe através do espelho, e seja filtrado pelo filtro de emissão; 7. o filtro de emissão permite que apenas o feixe de luz dentro da faixa-alvo de comprimento de onda passe; 8. o feixe de luz é então captado pelas câmeras digitais ou direcionado às oculares, dependendo da configuração do microscópio no momento.

Para a montagem das lâminas a serem analisadas sob o microscópio, foram feitos cortes transversais das folhas coletadas. No primeiro experimento de inoculação, foi utilizado MW líquido com adição de ágar bacteriológico a 0,15%. Devido a fluorescência do meio, tal meio de montagem da lâmina foi substituído por PBS 1X com adição de ágar a 0,15% no segundo experimento de inoculação.

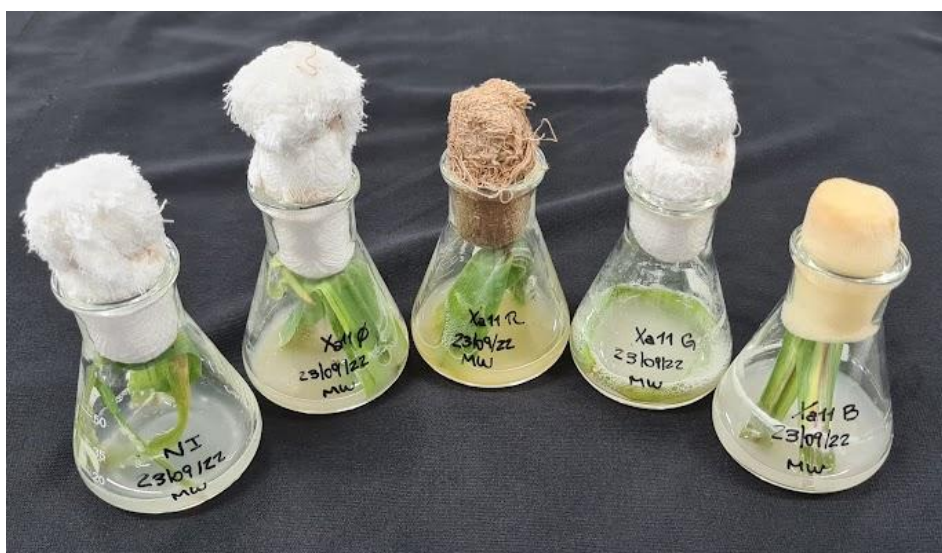
### Isolamento de microrganismos das plantas inoculadas

A permanência da fluorescência nas linhagens transformadas com os genes que codificam para as proteínas fluorescentes foi averiguada para a linhagem Xa11. Três linhagens de Xa11 transformadas com pPROBE*lacZ*-mCherry, pPROBE*lacZ*-GFP e pPROBE*lacZ*-Cyan foram inoculadas em plântulas de SP80-3280. As amostras foram coletadas de folhas em tempos determinados.

O isolamento das bactérias transformadas a partir dessas amostras de folhas foi realizado seguindo o procedimento: coleta de folhas, preferencialmente com sintomas, utilizando uma tesoura desinfetada com álcool 70%. Essa folha foi colocada num frasco de Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL de MW líquido. O frasco foi colocado num *shaker* a 180 rpm e 28°C por 24 horas (Figura 8). Após esse período, 20µL dessa cultura foi espalhada sobre uma placa contendo meio MW sólido de isolamento (Tabela 5), que foi colocada em estufa a 28°C por 48 horas para crescer. Para análise em microscópio, a lâmina foi montada fazendo o esfregaço de uma das colônias de *X. albilineans* que cresceram na placa.

**Tabela 5.** Antibióticos e fungicida adicionados ao meio MW para isolamento de *X. albilineans* a partir de amostras de tecidos de cana-de-açúcar.

Aditivos ao meio MW para isolamento		
Tipo	Nome	Concentração final no meio
Antibiótico	Ciclohexamida	100µg/mL
Antibiótico	Cefalexina	25µg/mL
Antibiótico	Novobiocina	30µg/mL
Fungicida	Kasumyn <sup>®</sup>	50µg/mL



**Figura 8.** Frascos de Erlenmeyer (contendo meio de cultura MW líquido) utilizados no estudo de isolamento de microrganismos a partir de amostra de folhas de cana-de-açúcar infectadas.

## Resultados e Discussão

### Estudos *in planta*

#### Isolamento a partir de canas inoculadas

Com o objetivo de averiguar a persistência da fluorescência nas estirpes transformadas *in vivo*, foi realizada nova inoculação em canas. Além da linhagem selvagem da Xa11, foram utilizadas 3 linhagens transformadas com o vetor *pPROBE*, cada uma contendo um gene codificante para as seguintes proteínas fluorescentes: GFP, mCherry e Cyan. Também foi utilizado um controle que não foi inoculado e apenas sofreu decapitação. Assim, tivemos 30 plantas divididas em 5 grupos experimentais neste estudo.

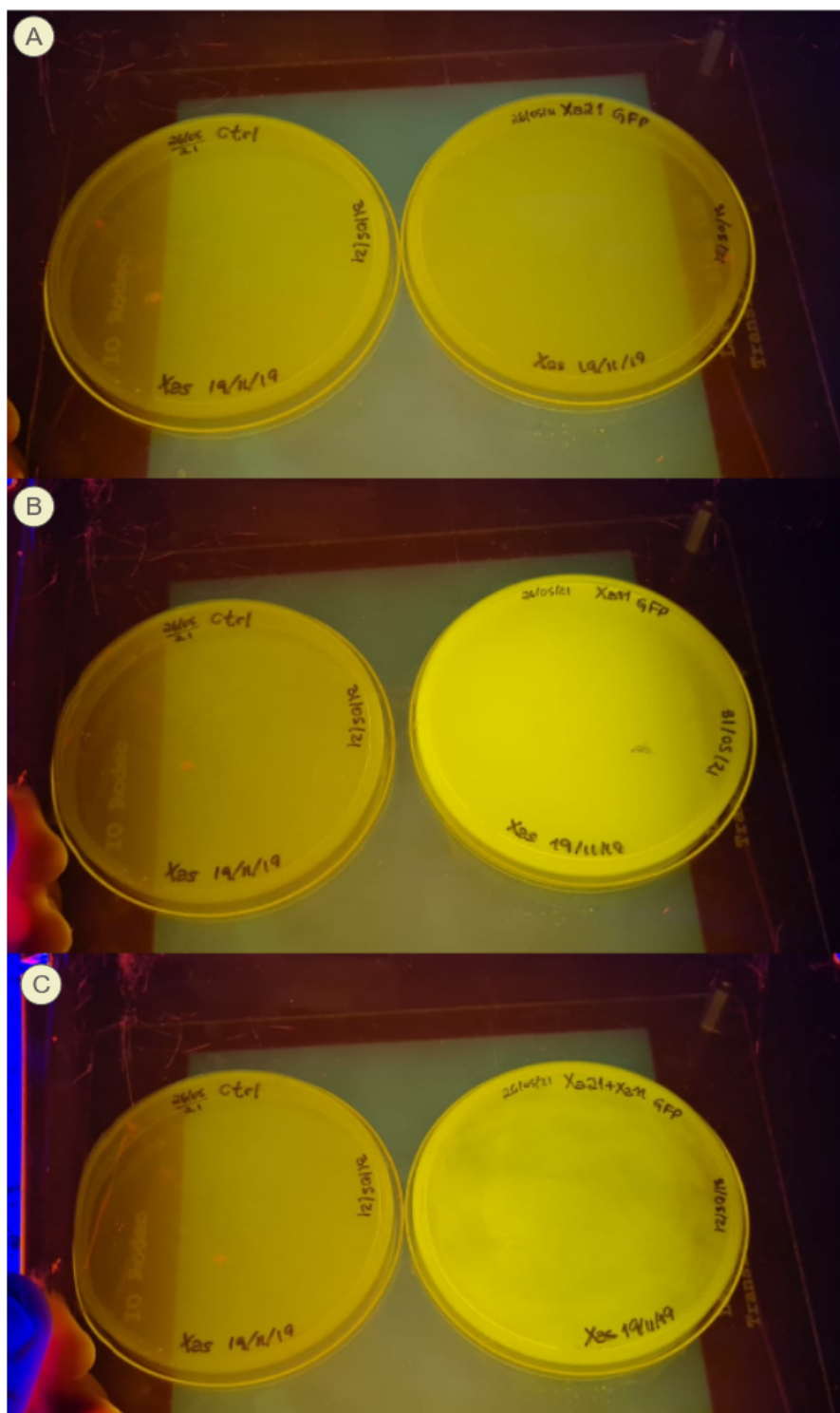
Após alguns intervalos de tempo, foram feitas coletas de folhas das canas dos grupos experimentais. Os intervalos exatos podem ser vistos na tabela isolamento. Dessas folhas, colocadas em meio líquido, foram plaqueadas bactérias em meio sólido, cujas colônias foram posteriormente analisadas sob microscopia de fluorescência. As lâminas analisadas foram montadas a partir do esfregaço dessas colônias. Os resultados resumidos podem ser vistos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Visualização de bactérias fluorescentes (por microscopia de fluorescência) nas amostras coletadas de 8 dias até três meses após a infecção. Legenda: ✓. visualização; *dpi*. dias após infecção; *n.c.* ausência de colônias na placa.

	8dpi	14dpi	21dpi	28dpi	44dpi	91dpi
<b>Xa11-mCherry</b>	n.c.			✓		
<b>Xa11-GFP</b>	n.c.			✓	✓	✓
<b>Xa11-Cyan</b>	n.c.	✓	✓	✓	✓	

Da coleta do oitavo dia após infecção, nenhuma colônia de *X. albilineans* pôde ser recuperada. O grupo infectado com Xa11-mCherry gerou uma amostra com bactérias fluorescentes apenas na coleta do 28º dia após infecção. O grupo infectado com Xa11-GFP gerou amostras com bactérias nas coletas do 28º, 44º e 91º dia após infecção e o grupo infectado com Xa11-Cyan gerou amostras com bactérias fluorescentes na maior parte das coletas, sendo o único ponto de ausência o da coleta do 91º dia após infecção.

Cada amostra foi coletada de um indivíduo diferente a cada dia e coleta, sendo o processo de amostragem destrutivo. Os resultados apresentados sugerem a possibilidade da permanência da fluorescência das estirpes transformadas *in planta* por pelo menos por 28 dias após infecção, independente da proteína fluorescente utilizada. Um teste para o experimento foi realizado com uma planta do primeiro experimento de inoculação, isolando de uma planta inoculada 7 meses antes com Xa11-GFP, que apresentou fluorescência em todas as colônias (Figura 9). Um resultado similar foi descrito em *Xylella fastidiosa* por Newman e colaboradores em 2003, não reportando perda de fluorescência da bactéria transformada mesmo 6 meses após inoculação inicial.



**Figura 9.** Comparação visual de placas com tapetes de bactérias isoladas a partir de canas-de-açúcar inoculadas 7 meses antes, sobre lâmpada de luz azul de alta intensidade, com filtro (alaranjado) para visualizar fluorescência . (A) grupo controle (não inoculadas) à esquerda e grupo com Xa21-GFP à direita, ambas sem fluorescência. (B) grupo controle à esquerda e Xa11-GFP à direita, apenas Xa11-GFP fluorescente. (C) grupo controle à esquerda e grupo com Xa11-GFP e Xa21-GFP à direita, apenas Xa11-GFP + Xa21-GFP fluorescente.

## Experimento de Inoculação 1

No segundo semestre de 2020 foi realizado o primeiro experimento de inoculação a fim de avaliar as técnicas propostas no projeto. O desenho experimental envolveu duas estirpes de *Xanthomonas albilineans*, Xa11 e Xa21.

A inoculação foi realizada em 63 plantas de SP80-3280, com 4 meses após aclimatação *ex vitro*, organizadas em 7 grupos experimentais de acordo com as estirpes utilizadas:

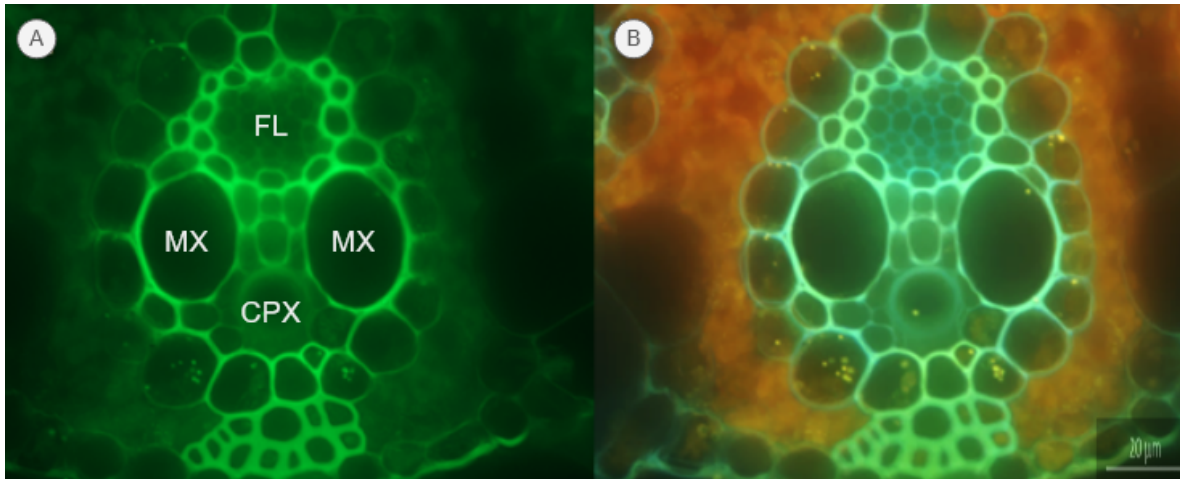
- I. Controle
- II. Xa11 selvagem
- III. Xa21 selvagem
- IV. Dupla inoculação Xa11 e Xa21 selvagens
- V. Xa11-GFP
- VI. Xa21-GFP
- VII. Dupla inoculação Xa11-GFP e Xa21-GFP

A inoculação das plantas se deu após decapitação das canas-de-açúcar, de acordo com protocolo proposto por Rott e colaboradores em 1997 (Rott *et al.*, 1997), a 12 cm do solo. Foram inoculados 25  $\mu$ L de meio de cultura (no caso dos grupos experimentais) e 25  $\mu$ L de PBS (no caso do grupo controle). Um esquema do preparo do experimento até a inoculação pode ser conferido na Figura 12.

A primeira coleta foi realizada após 13 dias da inoculação, no período da tarde, em que uma das folhas cortadas na decapitação foi escolhida, estando em boas condições. A análise dos tecidos se deu pela observação de cortes transversais obtidos à mão livre, usando uma lâmina de barbear. Os cortes foram colocados sobre uma gota de meio MW líquido depositada sobre a lâmina. A lâmina dessa coleta e as posteriores o filtro de fluorescência para eGFP. Foi possível visualizar as bactérias fluorescentes, mas devido à baixa viscosidade do meio, elas apareceram de forma dispersa, fora de seu local original quando do momento do corte. Ao mesmo tempo, foi possível observar movimento flagelado das bactérias, evento este que também foi visualizado com montagem da lâmina com meio mais viscoso. Como apenas um filtro foi utilizado e pela natureza auto-fluorescente do material vegetal, havia pouco contraste nas imagens. Desse modo para as análises subsequentes duas modificações foram introduzidas:

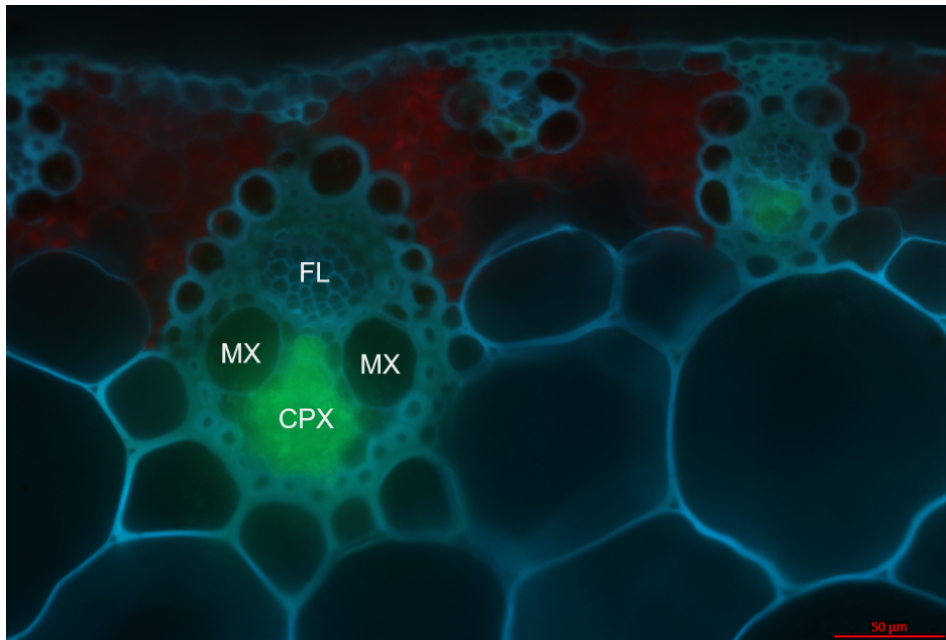
- I. A montagem da lâmina foi realizada com meio MW líquido com adição de 1,5% em massa de ágar bacteriológico;
- II. Para a visualização, foram sobrepostas imagens tiradas com diferentes filtros de fluorescência, sendo eles DAPI, eGFP e Rhodamine.

As coletas posteriores ocorreram de maneira similar à descrita acima. Durante a visualização ao microscópio, pode-se notar a diferença com a sobreposição das imagens com diferentes filtros, como visto na Figura 10.

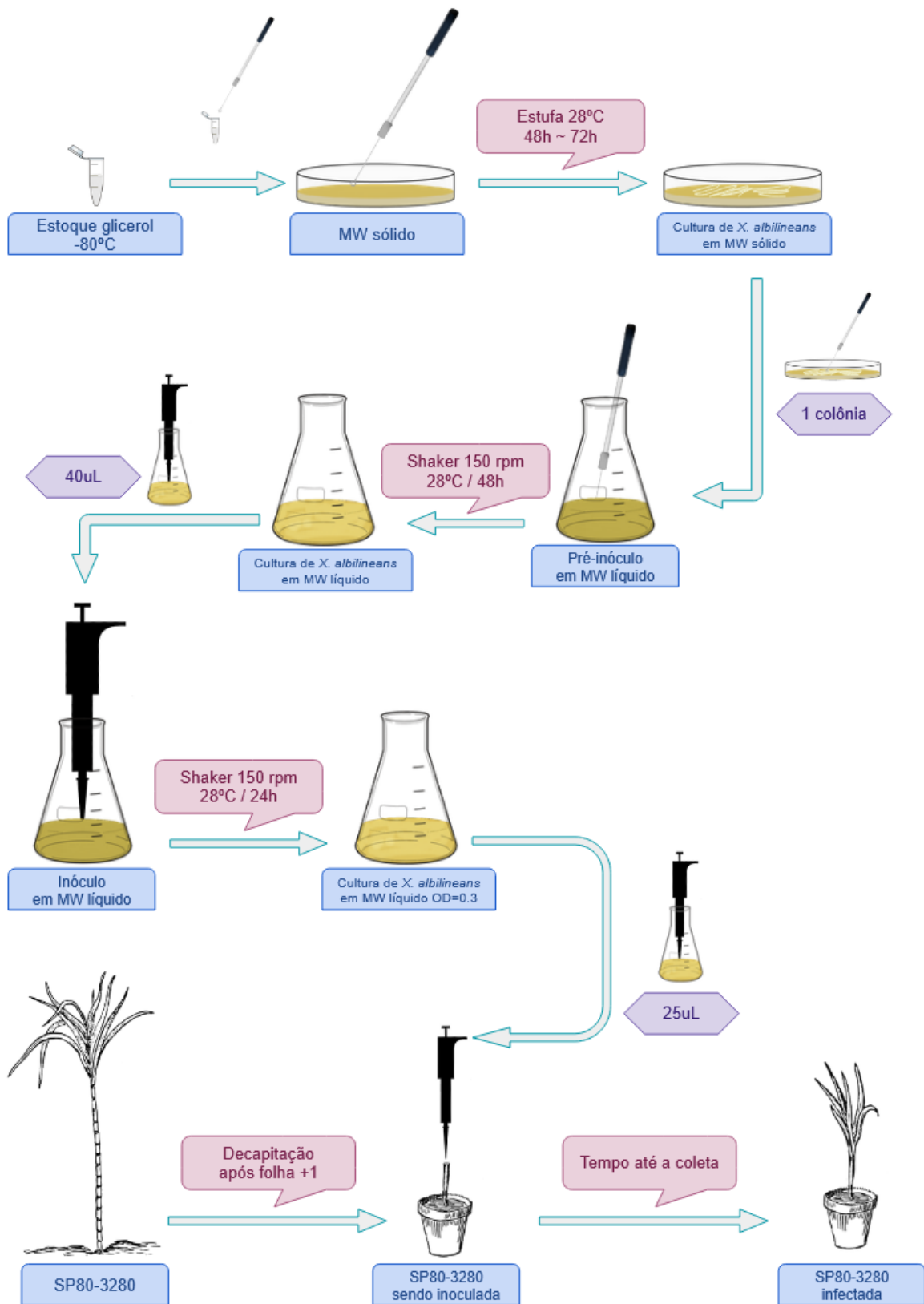


**Figura 10.** Corte transversal à mão livre de folha de cana-de-açúcar do grupo controle (não-infectado), coletada 20 dias após inoculação. Aumento de 400x. (A) Filtro utilizado: eGFP. (B) Filtros utilizados: eGFP, DAPI e Rhodamine. Legenda: FL - Floema; MX - Metaxilema; CPX - Coluna do Protoxilema.

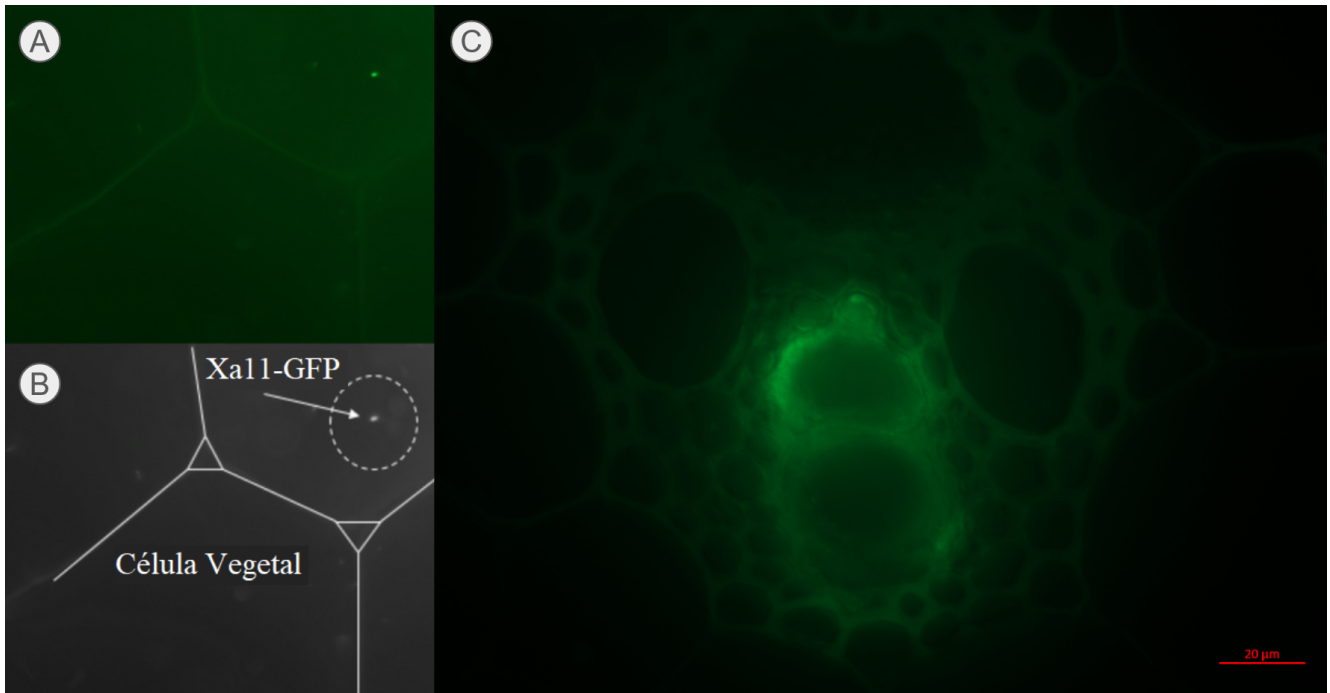
Durante a realização das coletas, ocorreram mudanças progressivas, compatíveis com a curva de aprendizado, tanto na técnica de montagem da lâmina quanto na utilização dos recursos do microscópio e visualização do material. Assim, a imagem escolhida vem de uma planta do grupo infectado apenas com Xa11-GFP, mostrando a colonização por *Xanthomonas albilineans* (Figura 11) da coluna do protoxilema. Outros casos de colonização foram observados (Figura 13), assim como feixes não colonizados (que se assemelhavam aos cortes do grupo controle, como apresentado na Figura 10).



**Figura 11.** Corte transversal de folha de SP80-3280 inoculada com Xa11-GFP, 25 dias após a inoculação. Aumento de 200x. Nota-se a presença de uma grande quantidade de células bacterianas fluorescentes na coluna do protoxilema (CPX) do feixe vascular maior. É possível ver outros feixes menores também colonizados. Filtros utilizados: AF488, eGFP, DAPI e Cy5. Legenda: FL - Floema; MX - Metaxilema.



**Figura 12.** Desenho esquemático da preparação do inóculo utilizado para infectar as mudas de cana-de-açúcar para os experimentos de infecção.



**Figura 13.** Cortes transversais de folha de SP80-3280 inoculada com Xa11-GFP. (A) e (B) Coleta aos 13 dias após a inoculação. Nota-se uma célula bacteriana de Xa11-GFP, que apresentou movimento livre-natante durante a observação. Aumento de 630x. (C) Coleta aos 25 dias após a inoculação. Aumento de 400x. Nota-se a presença de um filme bacteriano fluorescente na região correspondente ao protoxilema no feixe vascular. Filtros utilizados: eGFP

O experimento foi interrompido após 30 dias devido a uma infestação por ácaros que acometeu a casa de vegetação onde o mesmo estava sendo realizado, não sendo possível acompanhar o aparecimento do fenótipo foliar de escaldadura de folhas. As plantas começaram a apresentar sintomas de uma virose, aparentemente, vírus do mosaico. Assim, a observação dos sintomas de escaldadura de folhas foi interrompido e novo experimento foi realizado.

### Experimento de Inoculação 2

Este experimento contou com 32 plantas, divididas em quatro grupos experimentais, correspondentes ao conteúdo inoculado. As canas do grupo controle foram inoculadas apenas com o meio MW líquido; o grupo Green foi inoculado com cultura em MW líquido de Xa21-GFP; o grupo Red foi infectado com cultura em MW líquido de Xa11-mCherry; e o grupo Mix foi inoculado com uma mistura das culturas em MW líquido de Xa11-mCherry e Xa21-GFP.

Para que o intervalo entre a infecção e a coleta fosse semelhante entre os grupos e que a observação pudesse ser mais detalhada, foi feito um cronograma de coleta (Tabela 7). Por ser uma coleta por dia, foi possível transportar as plantas da casa de vegetação onde estavam sendo mantidas até o laboratório, diminuindo o tempo entre o corte da folha e a preparação da lâmina para observação no microscópio.



**Tabela 7.** Cronograma de inoculação e coleta do experimento de infecção realizado entre julho e agosto de 2022. Aqui, Xa11 refere-se à Xa11-mCherry e Xa21 refere-se à Xa21-GFP.

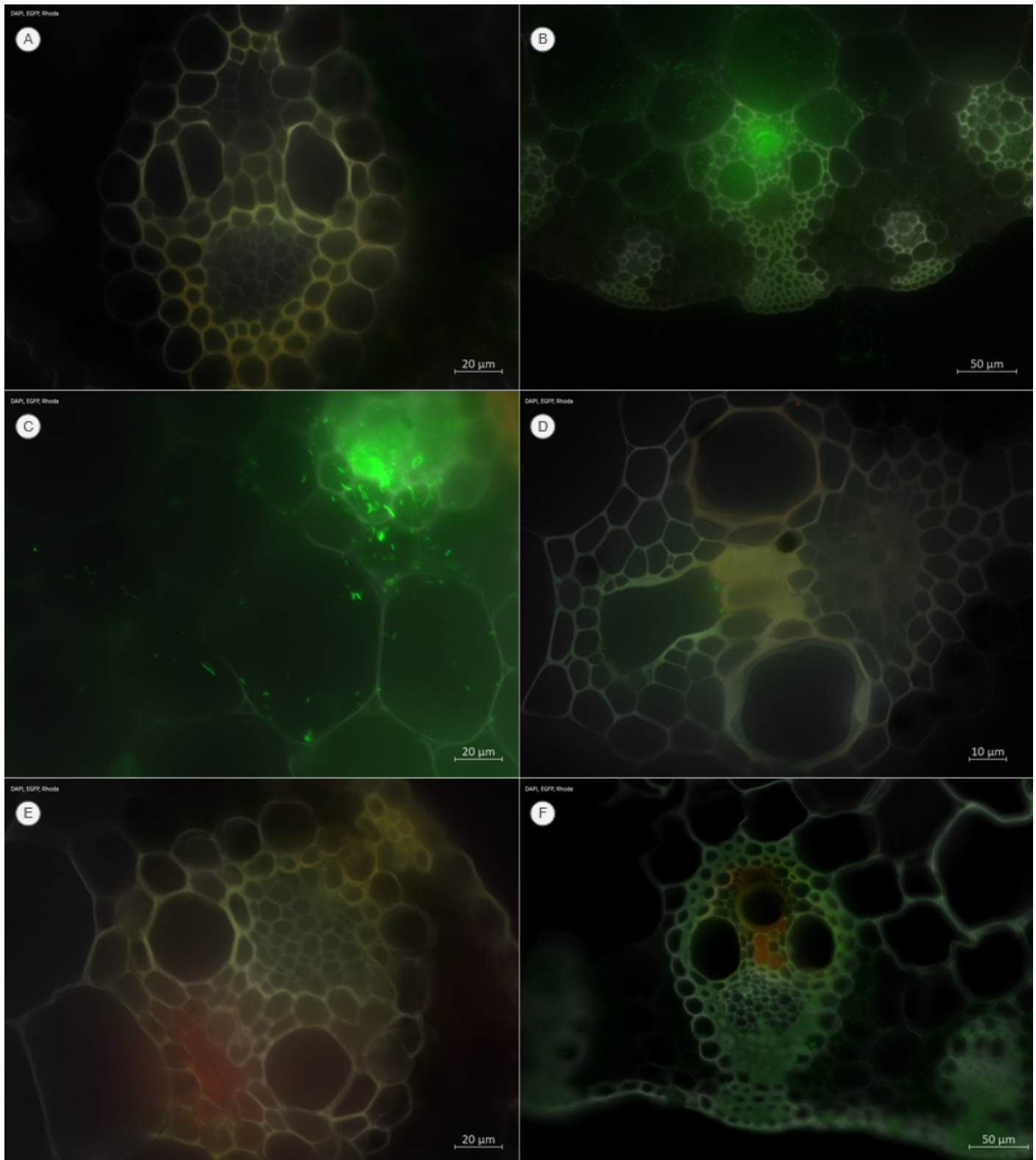
Semana	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
<b>1.Manhã</b>	Inoculação Controle	Inoculação Xa11	Inoculação Xa21	Inoculação Xa11/Xa21		
<b>1.Tarde</b>			Coleta 48h Controle	Coleta 48h Xa11	Coleta 48h Xa21	Coleta 48h Xa11/Xa21
<b>2</b>	Coleta 7dpi Controle	Coleta 7dpi Xa11	Coleta 7dpi Xa21	Coleta 7dpi Xa11/Xa21		
<b>3</b>	Coleta 14dpi Controle	Coleta 14dpi Xa11	Coleta 14dpi Xa21	Coleta 14dpi Xa11/Xa21		
<b>4</b>	Coleta 21dpi Controle	Coleta 21dpi Xa11	Coleta 21dpi Xa21	Coleta 21dpi Xa11/Xa21		

Para a coleta, a folha escolhida foi, preferencialmente, aquela que apresentava sintomas. No entanto, nem todas as amostras apresentaram sintomas, logo, foi decidido coletar a folha +1 nesses casos.

Os resultados das observações permitiram duas conclusões: é possível ver as duas estirpes colonizando tecidos da folha (independentemente) e a fluorescência permanece *in planta* para além dos dias iniciais após inoculação. No caso do grupo experimental Mix, não foi encontrada a Xa11-mCherry, sendo visível apenas a Xa21-GFP, na coleta de sete dias após inoculação (7dpi). Nos outros grupos, as observações positivas não foram em coletas sequenciais, tendo interrupções. A Tabela 8 ilustra os pontos de observação das respectivas estirpes em cada grupo.

**Tabela 8.** Observação das estirpes transformadas em diferentes amostras ao longo do tempo. As células assinaladas com “+” se referem a observações positivas, com detalhe para a posição 7dpi do grupo Mix, em que apenas a estirpe Xa21 GFP pode ser observada. Legenda: *hpi*: horas após inoculação; *dpi*: dias após inoculação; *mpi*: meses após inoculação.

Grupos Experimentais	48hpi	7dpi	14dpi	21dpi	28dpi	3mpi
<b>Red</b> Xa11 mCherry				+		+
<b>Green</b> Xa21 GFP	+		+			
<b>Mix</b> Xa11 mCherry & Xa21 GFP		+ (Xa21 GFP)				



**Figura 14.** Cortes transversais de SP80-3280. (A) Folha do grupo Controle. Aumento 400x. (B) Folha do grupo Green coletada 48 horas após inoculação com Xa21-GFP. Aumento 200x. (C) Colmo do grupo Mix, próximo ao local de inoculação, coletado 7 dias após inoculação com Xa11-mCherry e Xa21-GFP. Aumento 400x. (D) Folha do grupo Green coletada 14 dias após inoculação com Xa21-GFP. Aumento 630x. (E) Folha do grupo Red coletada 21 dias após inoculação com Xa11-mCherry. aumento 400x. (F) Folha do grupo Red coletada 3 meses após inoculação com Xa11-mCherry. Aumento 200x.

As observações estão de acordo com a literatura. O início da colonização se dá pela coluna do protoxilema e pode invadir tecidos vizinhos, principalmente o mesofilo, com o avanço da infecção. O presente estudo estendeu o período de coleta para 91 dias (em comparação com os 50 dias de Mensi e colaboradores em 2014), na qual foi confirmada para as estirpes brasileiras que a colonização continua nos tecidos vizinhos mesmo sem a obstrução da coluna do protoxilema. Além disso, os presentes resultados concordam com um estudo realizado em repolhos, com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Samal & Chatterjee, 2019) que propôs um modelo de colonização baseado em *quorum sensing* (QS). Nele, a progressão da colonização estaria acoplada a uma mudança na proporção de células que respondem a sinais de QS. Assim, com o avanço da colonização, as células mudariam seu padrão nutricional e de movimento (o que seria vantajoso em um ambiente saturado e com menor disponibilidade de nutrientes) e iniciaria a secreção de enzimas de degradação de parede celular vegetal, possibilitando a colonização de novos tecidos. Seria uma possível explicação, inclusive, para a maior incidência de células bacterianas fluorescentes dispersas vistas nos primeiros pontos de coleta (Figura 14 B e C) em comparação com as mais tardias (Figura 14 D, E e F).

Em relação aos sintomas, apenas os grupos Red e Mix os apresentaram, sendo que o aparecimento não ocorreu ao mesmo tempo em ambos os grupos. Enquanto plantas do grupo Red já apresentavam sintomas 14 dias após a inoculação (Figura 15) e linhas cloróticas mais avançadas aos 28 dias após inoculação (Figura 16 A e B), plantas do grupo Mix apresentaram sintomas equivalentes a tais linhas cloróticas apenas 58 dias após inoculação (Figura 16 C e D).



**Figura 15.** (A) Cana-de-açúcar SP80-3280 14 dias após inoculação com Xa11-mCherry apresentando cinco estrias brancas e finas e encaixando no grau 4 no supracitado índice de severidade de Tardiani (B) Detalhe da face abaxial da folha.



**Figura 16.** Canas-de-açúcar SP80-3280 apresentando sintomas de escaldadura de folhas. (A) e (B): Grupo Red 28 dias após inoculação com a estirpe Xa11-mCherry, apresentando linhas cloróticas (cinco estrias brancas e finas e encaixando no grau 4 no supracitado índice de severidade de Tardiani). © e (D): Grupo Mix 58 dias após inoculação com as duas estirpes de *X. albilineans*: Xa11-mCherry e Xa21-GFP. Algumas folhas já apresentavam linhas mais espessas, indicando possível grau 5 no índice de severidade de Tardiani.

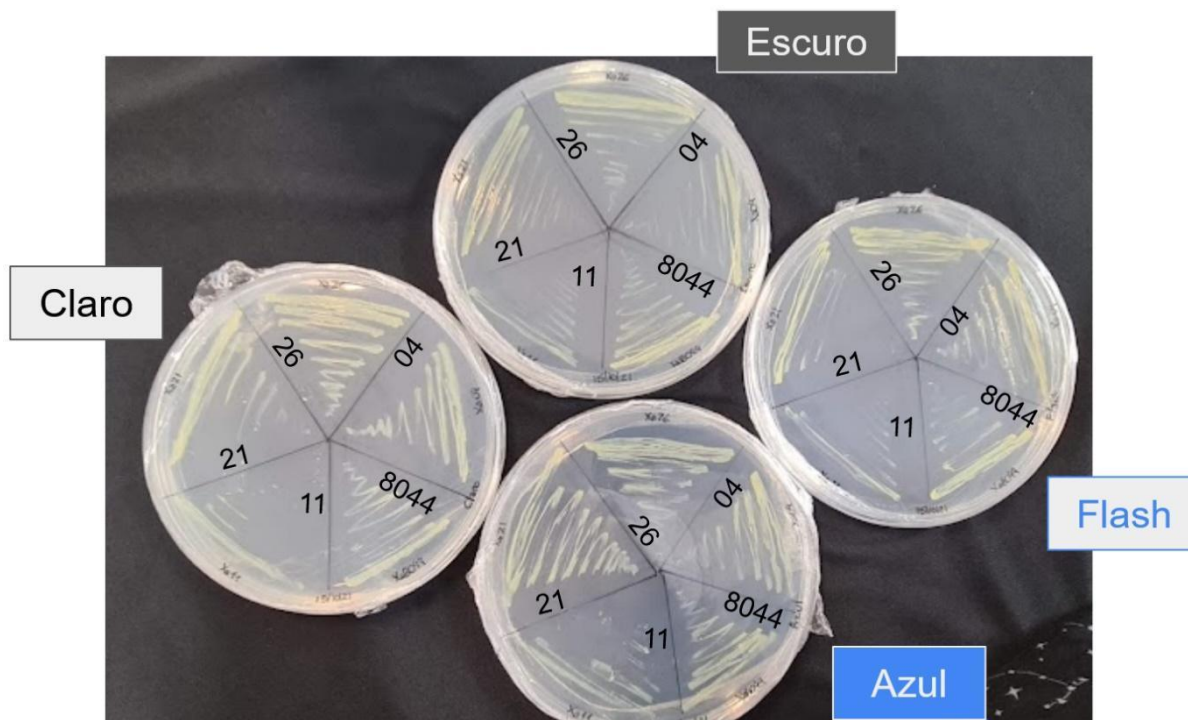
## Estudos *in vitro*

### Experimento Luz Azul

De acordo com um estudo realizado por Santamaría-Hernando e colaboradores em 2020 (Santamaría-Hernando *et al.*, 2020), há um mecanismo de *shift* de perfil de expressão gênica relacionado à percepção de luz azul em *Pseudomonas syringae*, que marca a transição do modo de vida epifítico da bactéria para o parasítico, que ocorre quando ela passa de um ambiente externo (sobre a folha) para o interno da planta (quando se inicia a colonização do hospedeiro).

Após a confirmação da presença de genes codificantes para receptores de luz azul no genoma das estirpes trabalhadas no laboratório (Miranda e colaboradores., aprovado para publicação), foram realizados dois testes de crescimento em meio MW sólido das estirpes Xa04, Xa11, Xa21, Xa26 e Xa8044 em diferentes condições de iluminação.

O experimento foi realizado na Sala de Crescimento Vegetal, localizada no UNEXPLANT. Cada placa continha as 5 estirpes, a fim de facilitar a visualização do resultado. Como visto na Figura 17, o mais notável é uma diferença entre o crescimento no escuro total e os outros grupos, sendo que este apresenta um crescimento mais lento.

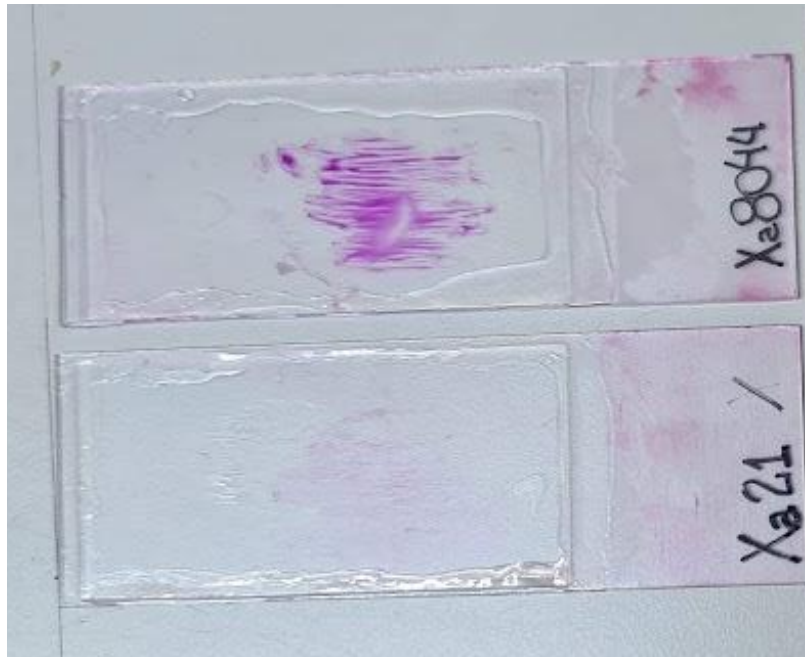


**Figura 17.** Resultado do experimento de crescimento bacteriano de cinco diferentes estirpes de *X. albilineans* em quatro tipos de iluminação. Os números 04, 11, 21, 26 e 8044 nas placas se referem às estirpes Xa04, Xa11, Xa21, Xa26 e Xa8044, respectivamente.

### Coloração Polissacarídeos

A fim de explorar uma das suposições sobre a nova estirpe, Xa8044, de que sua produção e secreção de polissacarídeos para a formação de biofilme seria um diferencial em relação às estudadas no laboratório até o momento, foi realizada a coloração dessa estirpe com o reagente de Schiff (Foster, 1981).

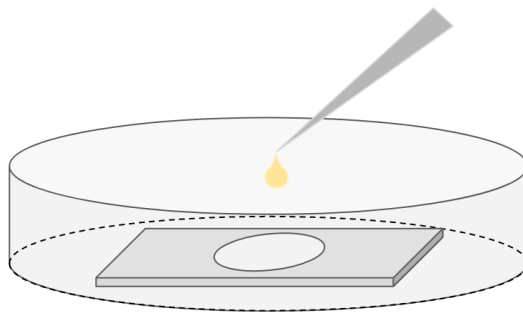
Com a orientação da doutoranda Maria Camila Medina, a coloração foi realizada em amostra de esfregaço feito a partir de cultura líquida em meio MW de Xa8044 (usando Xa21 como controle), cujo resultado pode ser visto na Figura 18. A coloração revelou-se mais intensa na amostra de Xa8044, um indicativo de que essa estirpe poderia apresentar uma secreção maior ou mais intensa de seu biofilme em comparação à Xa21. No entanto, por se tratar de uma teste meramente qualitativo, seria necessária uma abordagem complementar e quantitativa para se afirmar com propriedade, como a quantificação de polissacarídeos produzidos em culturas líquidas, por meio de cromatografia líquida.



**Figura 18.** Lâminas das estirpes de *X. albilineans* Xa8044 (acima) e Xa21 (abaixo) preparados usando o método de esfregaço e coradas com reagente de Schiff, que tingem polissacarídeos de magenta.

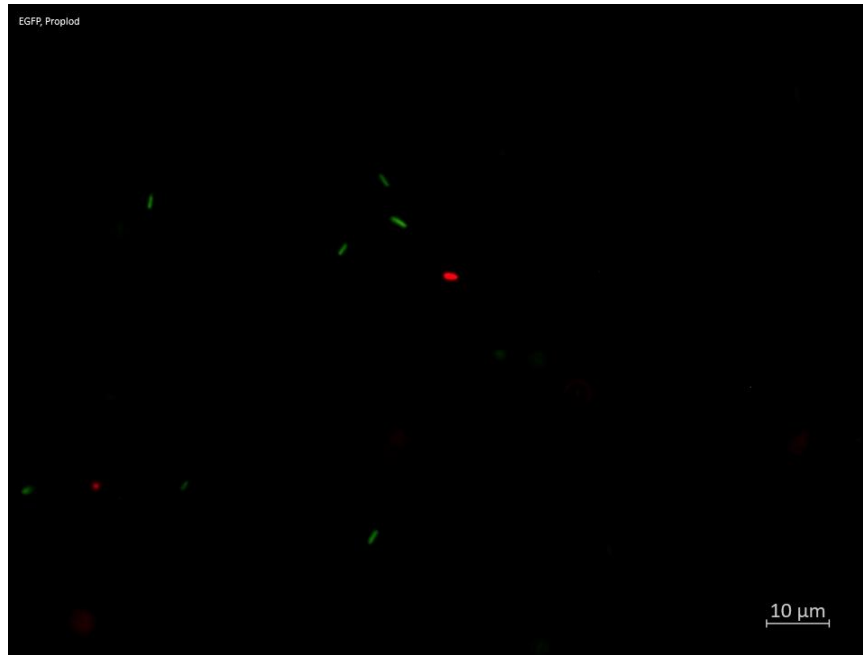
### **Co-crescimento *in vitro***

Para a visualização do crescimento concomitante de Xa11 e Xa21 *in vitro*, foi realizado um experimento com as linhagens transformadas dessas estirpes (Xa11-mCherry e Xa21-GFP). Após crescimento independente em meio MW líquido, as culturas foram diluídas para uma mesma contagem de células ( $OD_{600} = 0,3$ ), misturadas a meio MW *Soft Agar* e depositadas em lâmina escavada para microscópio (Figura 19).



**Figura 19.** Esquema do preparo da lâmina para a visualização do experimento de co-crescimento, em que 20  $\mu$ L de cada cultura líquida foi adicionado a meio MW *Soft Agar* (na proporção em que cada cultura bacteriana atingisse  $OD_{600}$  de 0,3). Procedimento realizado em fluxo vertical. A montagem foi então alocada em uma placa petri fechada e deixada por 72h em estufa a 28°C.

Após 72h de crescimento a 28°C, a lâmina foi analisada sob microscopia de fluorescência a fim de ver se ambas cresceram igualmente. O panorama geral da lâmina demonstra prevalência da estirpe Xa21-GFP em relação à Xa11-mCherry (como ilustrado na Figura 20), sem que tenham sido encontradas evidências de aproximação física entre células das diferentes estirpes. Tal prevalência provavelmente está atrelada à maior velocidade de crescimento da estirpe Xa21.

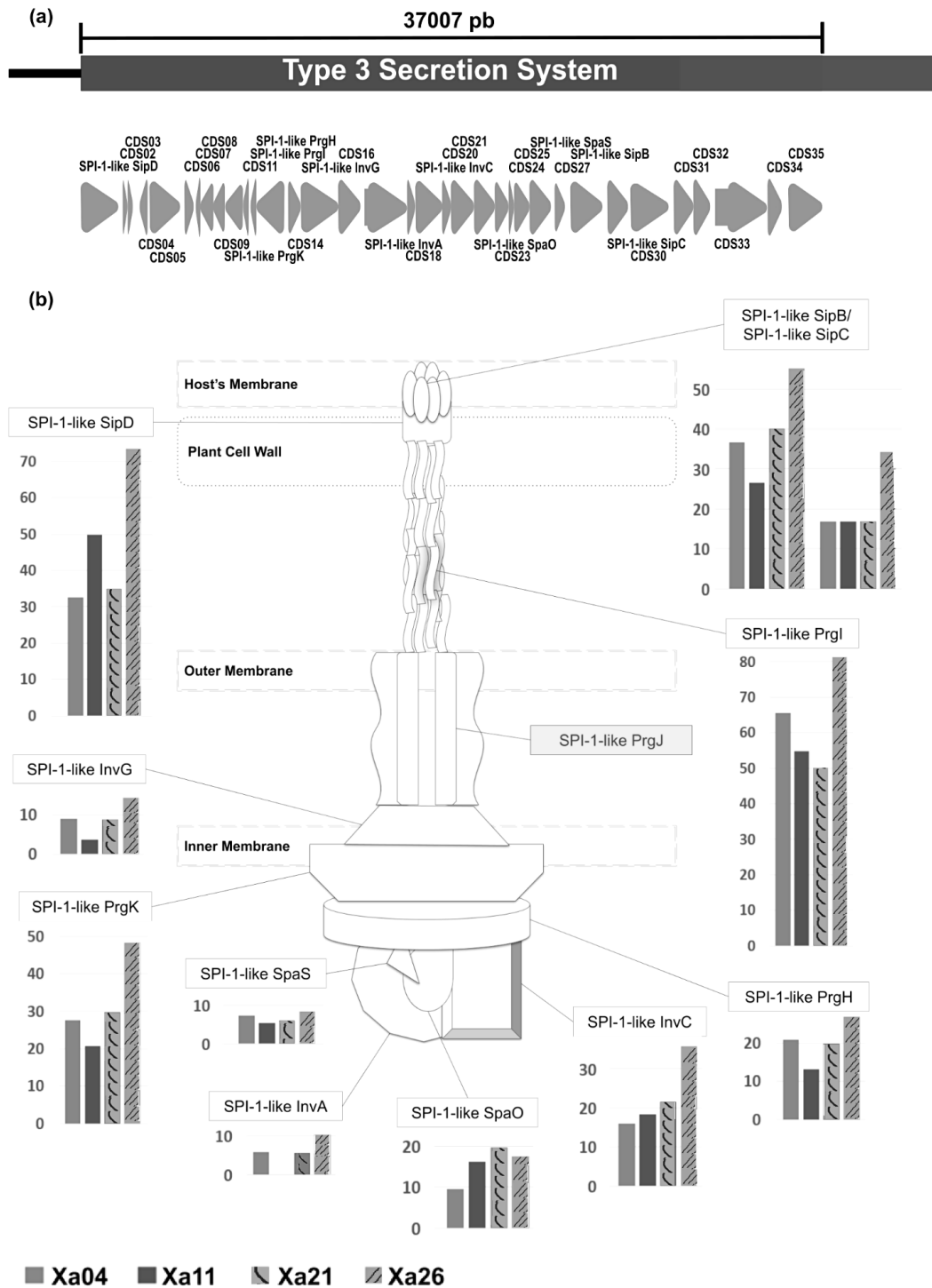


**Figura 20.** Imagem de microscopia de fluorescência mostrando as estirpes transformadas Xa11 e Xa21 (com mCherry e GFP, respectivamente) com aumento de 630x e com os filtros EGFP e PropIod de fluorescência.

## ***Estudos in silico***

### ***Análise T3SS em X. albilineans***

Em paralelo ao primeiro experimento, foi realizada a análise de transcriptoma total de 4 estirpes de *Xanthomonas albilineans*, designadas Xa04, Xa11, Xa21 e Xa26, como descrito por Tardiani e colaboradores em 2014 (Tardiani *et al.*, 2014). Esta análise foi encabeçada pela doutoranda Raquel Paulini Miranda e minha participação foi auxiliar na anotação da região referente aos componentes do sistema de secreção de tipo III (T3SS), o que resultou numa proposta para a estrutura possivelmente composta por proteínas expressas pelos genes codificados nesta região. A representação da estrutura foi de minha autoria (Figura 21 a e b). A compilação destes resultados com outros estudos realizados em paralelo sobre esse transcriptoma resultaram num artigo aceito para publicação na revista *Microbiology Spectrum*, com o título “*Genome organization of four Brazilian Xanthomonas albilineans strains does not correlates with aggressiveness*” (Miranda *et al.*, 2023).



**Figura 21.** Perfil de expressão gênica das proteínas estruturais de T3SS SPI-1 das quatro estirpes de *Xanthomonas albilineans* (Xa11, Xa04, Xa26 e Xa21, em ordem da mais agressiva para a menos agressiva). Em destaque (sombreado), gene estrutural de T3SS SPI-1 não identificado. Extraído de Miranda *et al.*, 2023.



## Conclusão

---

A principal conclusão advinda dos experimentos de infecção é a de que as técnicas propostas, com pequenos ajustes, foram capazes de gerar resultados qualitativos suficientes para aprimorar a metodologia de investigação.

1. Estudos de colonização *in planta*
  - a. A visualização pelo microscópio de fluorescência mostrou-se suficiente para identificar a colonização da coluna do protoxilema de feixes vasculares em folhas.
  - b. A visualização de ambas as estirpes transformadas num mesmo indivíduo não foi possível, mas tê-las visto separadamente abre espaço para a explorar e expandir o uso da microscopia de fluorescência.
  
2. Estudos de comportamento *in vitro*:
  - a. A luz parece influenciar o crescimento *in vitro* das diferentes linhagens de *X. albilineans*, sendo que, no escuro, é mais lento. Seria interessante destrinchar quais outras condições de iluminação influenciam.
  - b. O experimento da coloração de polissacarídeos indicou a necessidade de se adotar uma abordagem quantitativa a fim de se obter resultados precisos.
  - c. O co-crescimento *in vitro* não indicou aproximação entre as células bacterianas de Xa11-mChery e Xa21-GFP sob essas condições.
  - d. O isolamento demonstrou que a fluorescência permanece *in planta*, potencialmente, por sete meses, sugerindo a possibilidade de observação das bactérias transformadas durante esse período.

## Resumo

---

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, atualmente, uma das doenças que mais causa preocupação entre os produtores é a escaldadura de folhas. Tendo como agente etiológico a bactéria *Xanthomonas albilineans*, a doença é caracterizada pelo aparecimento de linhas cloróticas nas folhas, que podem expandir para todo o órgão, dando-lhe um aspecto esbranquiçado. Isso se dá pela atuação da toxina albicidina, secretada pela bactéria. Apesar de ser capaz de colonizar tecidos ao redor, o início da colonização por *X. albilineans* se dá pela coluna do protoxilema. Diferentes estirpes coletadas em localizações variadas no Estado de São Paulo apresentam diferentes graus de severidade dos sintomas quando inoculadas em um cultivar suscetível à escaldadura de folhas. O mecanismo por trás dessa diferença ainda não é totalmente compreendido. Fatores como a capacidade de produção de albicidina e secreção de enzimas extracelulares não puderam ser diretamente correlacionados ao grau de severidade observado. O objetivo do presente estudo foi o de comparar estirpes que apresentam graus de severidade diferentes quanto à colonização nas folhas, por meio de microscopia de fluorescência. A investigação valeu-se tanto de estudos *in planta* quanto de estudos *in vitro*. Para os estudos *in planta*, as estirpes Xa11 (maior grau de severidade) e Xa21 (menor grau de severidade), transformadas para produzirem proteínas fluorescentes, foram inoculadas em plantas de um cultivar de cana-de-açúcar tolerante à escaldadura de folhas (SP80-3280). Cortes realizados ao longo de 3 meses foram analisados em microscópio de fluorescência e mostraram a colonização da coluna do protoxilema e tecidos vizinhos, como visto na literatura. Para os estudos *in vitro*, foi realizado experimento de co-crescimento da Xa11 com a Xa21 e os resultados não mostraram interação física entre as células das duas estirpes, apenas a predominância visual da Xa21. A maior presença de células de Xa21 é corroborado por ensaio prévio de curva de crescimento, em que Xa21 apresentou menor tempo de duplicação. Além disso, foi realizado o crescimento de cinco estirpes de *X. albilineans* em diferentes condições de iluminação, cujos resultados indicaram um crescimento mais lento de todas as estirpes no escuro.

Palavras-chave: 1. Escaldadura de folhas 2. Cana-de-açúcar 3. *Xanthomonas albilineans*

## Abstract

---

Brazil is the world's biggest sugarcane producer and one of the main diseases that affect plantations is the leaf scald. Its etiologic agent is the bacteria *Xanthomonas albilineans* and the main symptom is the appearance of white stripes in the leaf, that may progress to a full bleaching of the leaf, giving it a scalded appearance, hence the disease's name. The main cause for this is albicidin, a toxin secreted by the bacteria. Although it is capable of colonizing neighboring tissues, *X. albilineans*' infection begins by colonizing the column left after the protoxylem's death. Different strains, collected in various locations in the state of São Paulo, show different degrees of severity of symptoms when inoculated in a sugarcane crop that is susceptible to leaf scald. The exact mechanism behind this variation is not yet fully understood. Main suspected factors like the albicidin's production and extracellular enzymes secretion were found not to directly correlate to the observed degree of severity. The present study's objective was to compare different strains, known to cause different degrees of severity of symptoms, in terms of leaf colonization, by the means of fluorescence microscopy. The investigation encompassed different types of study, like *in planta* and *in vitro* experiments, to answer this question. Concerning the *in planta* studies, two *X. albilineans* strains, Xa11 (higher degree of severity) and Xa21 (lower degree of severity), transformed in order to produce fluorescent proteins, were inoculated in a sugarcane crop (SP80-3280) which exhibits tolerance to leaf scald. Leaf sections were taken throughout three months and analyzed under fluorescence microscopy showing the colonization of the protoxylem column and neighboring tissues, in accordance with the literature. One of the *in vitro* studies involved the joint culture of Xa11 e Xa21 and the results did not show physical interaction between the bacterial cells. The main observation was a predominance of Xa21 cells compared to Xa11 cells. This predominance of Xa21 cells is in accordance with a previous growth curve essay, in which was shown that the duplication rate of Xa21 was higher than that of Xa11. Furthermore, a test was run to compare the growth of five different *X. albilineans* strains under different light conditions and the results yielded indicate an overall slower duplication rate under dark conditions.

Keywords: 1. Leaf scald 2. Sugarcane 3. *Xanthomonas albilineans*

## Referências

---

- Arruda, S. C. "A "escaldadura das fôlhas", doença da cana de açúcar, nova no Brasil." *Arquivos do Instituto Biológico* 15 (1944): 141-195.
- Birch, R. G., and Patil, S. S. "Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*." *Microbiology* 131.5 (1985): 1069-1075.
- Daugrois, Jean-Heinrich, et al. "Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*." *European journal of plant pathology* 109 (2003): 445-458.
- D'Hont, Angélique, et al. "A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the *Andropogoneae* tribe." *Genome* 37.2 (1994): 222-230.
- European Commission - Sugar. In: *European Commission* [Internet]. 26 Sep 2017 [cited 05 Jan 2023]. Available: [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/sugar\\_en](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/sugar_en)
- FAOSTAT. [cited 05 Jan 2023]. Available: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Foster, R. C. "Polysaccharides in soil fabrics." *Science* 214.4521 (1981): 665-667.
- Garsmeur, Olivier, et al. "A monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane." ISSCT, 2018.
- GEMACana - Grupo de Estudo de Microrganismos Associados à Cana, GaTE Lab, YouTube, 19 de setembro de 2020, 8 minutos e 39 segundos, (Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=I8B4GiywJw>). Acesso em 30 de maio de 2021
- Govindaraju, Muralidharan, Yisha Li, and Muqing Zhang. "Emerging bacterial disease (leaf scald) of sugarcane in China: pathogenesis, diagnosis, and management." *Plant diseases-current threats and management trends* (2019).
- Hashimi, Saeed M., et al. "The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51.1 (2007): 181-187.
- Heinz, D. J. (1987) *Sugarcane Improvement through Breeding*. Developments in Crop Science.
- IBGE. "Levantamento Sistemático da Produção Agrícola". In: *SIDRA* [Internet]. 2023 [cited 5 Jan 2023]. Available: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>
- Kay, Sabine, and Ulla Bonas. "How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant." *Current opinion in microbiology* 12.1 (2009): 37-43.
- Marin, F. R. "Variedades" In: *EMBRAPA* [Internet] 2022 [cited 8 Mar 2023]. Available: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pre-producao/caracteristicas/variedades>
- Miranda, L. L. D. "Viveiro de mudas. em: leila luci dinardo-miranda; antônio carlos machado de vasconcelos; marcos guimarães de andrade landell.(org.). cana-de-açúcar." *Campinas* 1 (2008): 535-546.
- Miranda, Raquel. P. "Genome organization of four Brazilian *Xanthomonas albilineans* strains does not correlate with aggressiveness". *Microbiology Spectrum* (2023)
- Mensi, Imène, et al. "Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome." *Open biology* 4.2 (2014): 130116.
- Naushad, Sohail, et al. "A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families Algiphilaceae and Solimonadaceae to the order Nevskiales ord. nov. and to create a new family within the order Xanthomonadales, the family

- Rhodanobacteraceae fam. nov., containing the genus *Rhodanobacter* and its closest relatives." *Antonie van Leeuwenhoek* 107 (2015): 467-485.
- Newman, Karyn L., et al. "Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*." *Applied and Environmental Microbiology* 69.12 (2003): 7319-7327.
- Parte, Aidan C., et al. "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 70.11 (2020): 5607.
- Pieretti, Isabelle, et al. "What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads?." *Frontiers in plant science* 6 (2015): 289.
- Raizer, Arnaldo José, and Roland Vencovsky. "Estabilidade fenotípica de novas variedades de cana-de-açúcar para o Estado de São Paulo." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34 (1999): 2241-2246.
- Riaño-Pachón, Diego Mauricio, and Lucia Mattiello. "Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280." *F1000Research* 6 (2017).
- Ricaud, C., et al., eds. *Diseases of sugarcane: major diseases*. Elsevier, 2012.
- Rossetto, Raffaella. "Diagnose Foliar" In: *EMBRAPA* [Internet] 2022 [cited 10 Mar 2023]. Available: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/correcao-e-adubacao/diagnose-das-necessidades-nutricionais/diagnose-foliar>
- Rott, Philippe, et al. "Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*." *Phytopathology* 87.12 (1997): 1202-1213.
- Rott, Philippe, and Michael J. Davis. "Leaf scald." *A guide to sugarcane diseases* 38 (2000): 44.
- Ryan, Robert P., et al. "Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions." *Nature Reviews Microbiology* 9.5 (2011): 344-355.
- Samal, Biswajit, and Subhadeep Chatterjee. "New insight into bacterial social communication in natural host: Evidence for interplay of heterogeneous and unison quorum response." *PLoS genetics* 15.9 (2019): e1008395.
- Santamaría-Hernando, Saray, et al. "Blue-light perception by epiphytic *Pseudomonas syringae* drives chemoreceptor expression, enabling efficient plant infection." *Molecular Plant Pathology* 21.12 (2020): 1606-1619.
- Schreiber, Karl J., Ilea J. Chau-Ly, and Jennifer D. Lewis. "What the wild things do: mechanisms of plant host manipulation by bacterial type III-secreted effector proteins." *Microorganisms* 9.5 (2021): 1029.
- Socicana. "Variedades SP" In: *Socicana* [Internet] [cited 08 Mar 2023] Available: <https://socicana.com.br/wp-content/uploads/Variedades-SP.pdf>
- Souza, Glauca Mendes, et al. "The sugarcane genome challenge: strategies for sequencing a highly complex genome." *Tropical plant biology* 4 (2011): 145-156.
- Souza, Diorge P., et al. "Bacterial killing via a type IV secretion system." *Nature communications* 6.1 (2015): 6453
- Souza, G. M., Van Sluys, M. A., Lembke, C. G., Lee, H., Margarido, G. R. A., Hotta, C. T., ... & Heckerman, D. (2019). Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. *GigaScience*, 8(12), g129.
- Spring, K. R. & Davidson, M. W. "Introduction to Fluorescence Microscopy" In: *MicroscopyU* [Internet] [cited 12 Mar 2023] Available: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- Tardiani, Ana C., et al. "Molecular and pathogenic diversity among Brazilian isolates of *Xanthomonas albilineans* assessed with SSR marker loci." *Plant Disease* 98.4 (2014): 540-546.

Timilsina, Sujan, et al. "Xanthomonas diversity, virulence and plant–pathogen interactions." *Nature Reviews Microbiology* 18.8 (2020): 415-427.

Teper, Doron, Sheo Shankar Pandey, and Nian Wang. "The HrpG/HrpX regulon of xanthomonads—An insight to the complexity of regulation of virulence traits in phytopathogenic bacteria." *Microorganisms* 9.1 (2021): 187.

Van Dillewijn, Cornelis. "Botany of sugarcane." *Botany of sugarcane*. (1952).

Vauterin, Luc, et al. "Identification of non-pathogenic Xanthomonas strains associated with plants." *Systematic and applied microbiology* 19.1 (1996): 96-105.

Zhang, Jisen, et al. "Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L." *Nature genetics* 50.11 (2018): 1565-1573.

## Anexos

---

### **Anexo 1 - Capítulo para “Botânica no Inverno - 2021”**

#### **Ver para crer: abordagens com microscopia de fluorescência no estudo de interação planta-microrganismo**

*Arthur Peixoto Berselli (Universidade de São Paulo)*

*Dora Takiya Bonadio (Universidade de São Paulo)*

*Henrique Moura Dias (Universidade de São Paulo)*

#### **Plantas não estão sozinhas**

Plantas estão constantemente em contato com microrganismos, sejam eles representantes dos mais diversos grupos como bactérias, fungos, oomicetos, vírus, algas ou até mesmo nematóides, dentre os quais, alguns possuem capacidade de causar doenças, sendo classificados assim como fitopatogênicos. Apesar da associação de microrganismos a doenças seja recorrente, esse fenômeno ocorre como uma exceção na natureza, no qual plantas em sua maioria tendem a ser resistentes a uma parcela significativa desses microrganismos. Dada sua relevância na segurança alimentar global, a importância da interação entre plantas e microrganismos é amplamente conhecida. Destaca-se o viés prejudicial, envolvendo organismos patogênicos. No entanto, diversos organismos compõem o microambiente do solo e das partes aéreas de uma planta e têm grande influência sobre sua fisiologia e morfoanatomia vegetal, como o caso particular da associação de fungos, bactérias e raízes formando um ambiente complexo como a rizosfera (ambiente das raízes). Embora muito se tenha avançado sobre a biologia de plantas agrícolas em resposta a infecções e sobre a natureza de alguns fitopatógenos, questões ainda permanecem em aberto. Neste capítulo será apresentada a importância da microscopia no campo da interação planta-microrganismo, com ênfase na técnica de microscopia de fluorescência como possível ferramenta de investigação dessa interação.

#### **Avanços sobre lâminas e lentes**

Evidências demonstram que a interação entre plantas e microrganismos já ocorria há cerca de 450 milhões de anos, dirigindo a evolução de plantas terrestres. Contudo, não existe consenso a respeito das primeiras impressões da relação planta-microrganismo sob o olhar humano. Registros antigos que datam 1.500 a.C, já descreviam doenças e seus impactos, além de estratégias para lidar com essas adversidades. Exemplo disso são as escrituras do filósofo grego Teofrasto, com observações sobre a susceptibilidade a doenças e como variava entre espécies de plantas, até mesmo sobre como surtos de doenças em planícies são mais severos do que em encostas. Apesar das observações astutas, a natureza microscópica da maioria dos patógenos fez com que cientistas antigos tivessem dificuldades de compreender a verdadeira natureza de doenças em plantas. Somente quase dois mil anos depois de Teofrasto, quando houve avanços em abordagens científicas e microscópicas, que essa natureza começou a ser elucidada.

Fatos importantes na história contribuíram para esses avanços, como o surto de requeima da batata na Europa. Nativa dos Andes, a batata (*Solanum tuberosum*) foi introduzida na Europa, tornando-se em pouco tempo uma das bases alimentares em todo o continente. Durante o século XIX, extensas áreas de plantio foram acometidas pela doença da requeima da batata, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*, gerando ondas de fome por toda a Irlanda. Esse marco trágico motivou os cientistas da época a buscarem uma solução. O cientista Miles J. Berkeley, interessado em compreender a doença na planta, concluiu através de observações microscópicas que o agente causal era *P. infestans*, no entanto, essas conclusões não foram rapidamente aceitas. Somente anos mais tarde, quando Anton de Bary transferiu esporos de plantas doentes para plantas sadias, tornando-as infectadas e em paralelo, com as descobertas de Louis Pasteur e Robert Koch que resultaram na publicação do postulado de Koch em 1890, que se iniciou o processo de aceitação da teoria dos germes e sua relação com doenças.

No mesmo período, o pesquisador Thomas J. Burril (1878) descobriu que uma doença que afetava pêras e maçãs era causada pela bactéria *E. amylovora*, e essas descobertas tomaram relevância, sendo que sua técnica de observação com lâminas, tecidos contaminados e água é até hoje uma das abordagens mais simples e usadas para detecção de bactérias em tecidos vegetais.

Pouco tempo depois, no ano de 1890, os pesquisadores Martinus Beijerinck e Dmitri Ivanovsky identificaram através de fotomicrografia, técnica bastante inovadora para a época, o agente causal do mosaico do tabaco que a princípio fora descrito como uma bactéria atípica, sendo mais tarde revelado como um vírus. Não menos importante, a nematologia experimental começou em 1850, com nematóides das galhas que afetam mudas de pepino sendo descritos por Berkeley. Por serem macroscópicos, os nematóides parasitas de plantas foram identificados e compreendidos mais rapidamente.

Ao longo dos anos seguintes, foram realizados numerosos avanços no estudo de plantas e microorganismos, logo, é justo dizer que a fitopatologia surge a partir dessas descobertas, consolidando-a como uma área de relevância global. Além do mais, em função da constante evolução de técnicas microscópicas e abordagens moleculares, novas perguntas começaram a ser formuladas, indo além da simples identificação de agentes microscópicos e agora focando na melhor compreensão das partes que compõem a interação, tais como: O que está por trás do limiar existente entre uma interação planta-microorganismos benéfica ou prejudicial? Como as plantas efetivamente se defendem? Quais são as primeiras modificações celulares em resposta a uma infecção? Para entender como a microscopia pode nos ajudar a elucidar parte dessas perguntas, é necessário ter um claro entendimento de como funciona o sistema imune vegetal, como será apresentado a seguir.

### **Plantas contra-atacam e até mesmo manipulam!**

Com um complexo sistema imune, a relação das plantas com os patógenos pode tomar vias fascinantes. Possuidoras de receptores capazes de discriminar entre sinais (padrões moleculares) de herbívoros, patógenos e outros microrganismos, as plantas conseguem responder especificamente a cada uma dessas interações, e de maneiras distintas!

Algumas particularidades dessas interações já foram estudadas. Por exemplo, em resposta a um inseto herbívoro, as plantas podem produzir sinais voláteis que atraem o predador do mesmo. Ou então, quando em contato com bactérias benéficas na rizosfera, têm um incentivo à sua imunidade, ficando mais preparadas para combater patógenos. Recentemente, foi observado e proposto um mecanismo que explora essa relação com

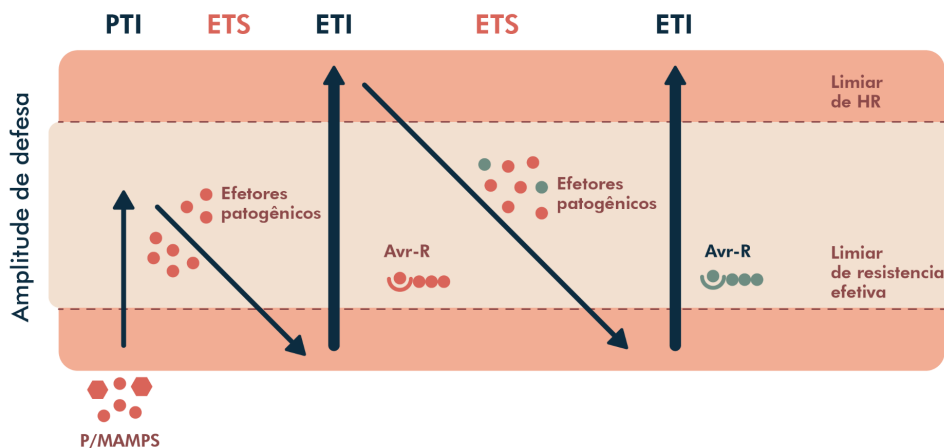


bactérias benéficas, em que os sinais oriundos de um ataque de patógenos gera a produção de exsudatos (substâncias produzidas pelas plantas e liberadas na rizosfera) que atraem bactérias benéficas. Tais bactérias produzem sinais próprios que incentivam e ativam uma resposta imune sistêmica na planta, auxiliando no combate à infecção.

Seguindo essa linha, existem diversas relações benéficas entre plantas e microorganismos. Entre elas podem ser citadas, de forma geral, o auxílio na fixação de nitrogênio a partir de associação com bactérias, absorção de fósforo pelas raízes e produção de fitormônios que promovem o crescimento das plantas. Bactérias endofíticas também compõem um complexo sistema que pode conferir proteção contra outros organismos patogênicos, quando associadas a plantas numa relação simbiótica.

O acúmulo de conhecimentos acerca dos aspectos relacionados à interação planta-microorganismos só foram possíveis graças a observações-chave de uma força tarefa de cientistas em todo o mundo, levando à compreensão de mecanismos fundamentais sobre o sistema imune vegetal. Para discutirmos metodologias de microscopia de fluorescência nesse contexto, é necessário um claro entendimento de componentes do sistema imune, que serão apresentados a seguir.

Independente da relação benéfica ou prejudicial que um microorganismo pode ter ao entrar em contato com uma planta, por trás existe um complexo sistema de reconhecimento e sinalização da planta e, posteriormente, durante a interação entre ambos. Esse processo tem sido mais bem elucidado por pouco mais de 30 anos, conhecido assim como sistema imune vegetal. A interação entre os organismos pode ser representada por um modelo “zig-zag-zig”, proposto por Dangl e Jones. Muitos microorganismos carregam moléculas nas quais denominamos de padrões moleculares associados à microrganismos ou MAMPs (do inglês, - *microbe-associated molecular patterns*). Essas moléculas microbianas são componentes que podem ser reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões ou PRRs (do inglês, - *pattern recognition receptors*) localizados na membrana celular vegetal. Essa é a primeira cascata de sinalização do sistema imune vegetal, da qual é conhecida uma amplitude de defesa baixa (Fig. 1).



**Figura 1:** Modelo zig-zag-zig do mecanismo de funcionamento do sistema imune vegetal. São apresentadas as amplitudes de defesa vegetal em diferentes estágios de infecção. Moléculas MAMPs ao serem reconhecidas pela célula vegetal, ativam o sistema imune PTI, que pode ser reprimido pela produção de efetores por parte do patógeno, reduzindo as defesas da planta, que contra-ataca com a ativação do sistema imune ETI. Dependendo da amplitude de respostas ETI, a planta pode desencadear

uma resposta de hipersensibilidade (HR - hypersensitivity response) e/ou sucessivas respostas ETI. Por Dora Bonadio

Esse reconhecimento por PRRs ativam as defesas da planta quando o sistema é compatível, resultando em uma resposta desencadeada pelo sistema imune, comumente conhecido como PTI (*pattern (or PRRs) triggered immunity*). Em contrapartida, microrganismos potencialmente patogênicos produzem moléculas e proteínas conhecidas como efetores que suprimem esse mecanismo de ativação do sistema imune PTI, dando início a um processo na planta denominado como susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS - *effector-triggered susceptibility*). Nesse processo, a planta responde com uma segunda onda de sinalização, chamada de ETI (*effector triggered immunity*), que é uma imunidade desencadeada por efetores através da expressão de genes Avr-R (genes de resistência anti-virulência). É possível que durante o processo de infecção, novas ondas de sinalização ETI possam ocorrer, sendo ativadas por novos conjuntos de efetores e Avr-R.

### **Tão longe, tão perto: unindo microscopia à bioquímica**

Desde Leeuwenhoek e suas primeiras observações em microscópios, foi descoberto um universo novo a ser explorado. A microscopia revela uma nova dimensão de estudo, seja qual for a área. No caso da interação entre plantas e microorganismos, tal técnica possibilita uma visão mais “intimista” entre os participantes. Aliada a outras análises, como fitoquímicas e as famosas ômicas, a microscopia traz um sentido espacial e biológico aos resultados obtidos. Exemplo disso é o trabalho feito em 2014 por Mensi e colaboradores, em que canas-de-açúcar foram infectadas com patógenos (*Xanthomonas albilineans*) transformados para expressar uma proteína fluorescente. Sob o microscópio confocal, foi possível confirmar que o tecido primário de colonização do patógeno é a lacuna do protoxilema e que, em contraponto ao estabelecido na literatura até o momento, que sugeria que o ambiente de colonização por esse organismo era apenas esse tecido, sob as condições apropriadas (principalmente o entupimento das lacunas do protoxilema), a bactéria também é capaz de colonizar os tecidos adjacentes. Assim, além de gerar belas imagens, a microscopia permite um vislumbre próximo da situação *in vivo* dessas interações.

As trocas de sinais entre plantas e microorganismos iniciam antes mesmo de qualquer contato. A rizosfera em particular é um ambiente onde ocorrem longas e extensas comunicações químicas entre organismos. Além do mais, um número representativo de genes de resistência (R) são encontrados no citoplasma, no qual sugere que podem ocorrer translocações de efetores de patógenos para a célula vegetal. Essas vias são extensivamente estudadas e pouco compreendidas. Isso tem chamado atenção de fitopatologistas, levando-os a abraçar o campo da transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET - *fluorescence resonance energy transfer*) em conjunto com técnicas de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC - *bimolecular fluorescence complementation*) para testar hipóteses de ETI em plantas.

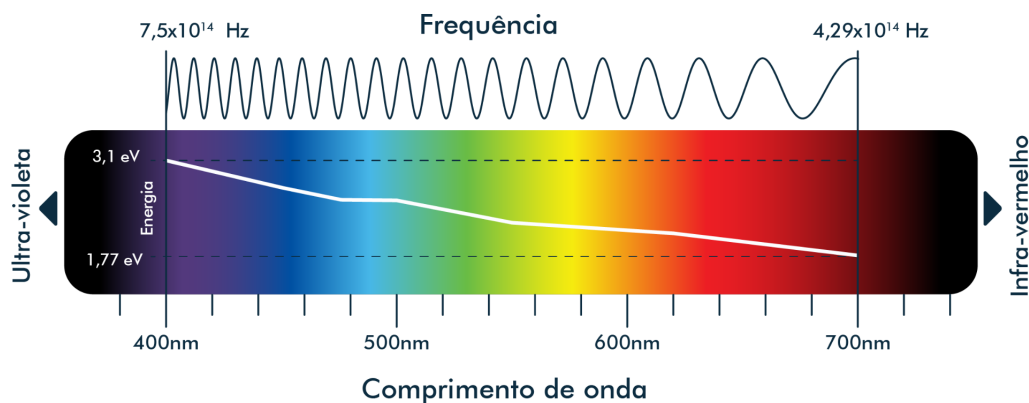
Atualmente, o “Maravilhoso Mundo da Microscopia” conta com inúmeras técnicas disponíveis, uma mais inventiva do que a outra, que vão muito além da clássica microscopia de luz. Para citar algumas dessas técnicas, temos a DIC (Contraste de Interferência Diferencial), a LSM (Microscopia de Fluorescência por Folha de Luz), a Microscopia Multifoton, a Microscopia de Contraste de Fase, a de Luz Polarizada, a de Super Resolução e a Estereomicroscopia (as famosas lupas). Este capítulo foca nas aplicações da microscopia de fluorescência e, quando oportuno, da confocal, que

geralmente aparecem juntas em trabalhos científicos além de metodologias que recrutam essas poderosas ferramentas.

### Microscopia de fluorescência para leigos

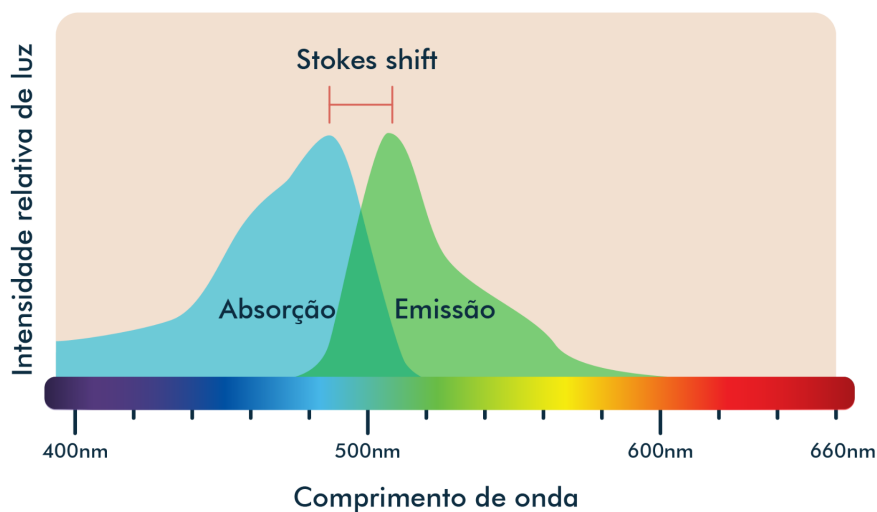
Entre as diversas técnicas utilizadas de microscopia, podemos destacar a microscopia de fluorescência. Essa técnica possui a vantagem de proporcionar uma grande precisão de alvo, como proteínas específicas, compartimentos e estruturas celulares, que possuem fluorescência própria ou que podem ser marcados com pigmentos ou proteínas hibridizadas com proteínas fluorescentes.

Para entender do que se trata a técnica, é necessário entender o que significa fluorescência e seus princípios físicos. A fluorescência é um fenômeno em que um determinado material, devido às suas propriedades, é capaz de absorver a energia da luz de um determinado comprimento de onda, e reemiti-la em um comprimento de onda diferente. Ao receber uma emissão de luz, as moléculas atingem um estado de excitação em que seus elétrons passam para um estado de maior energia, absorvendo a energia dos fótons. Logo em seguida, os elétrons retornam ao seu estado inicial, emitindo uma quantidade de energia no processo. Essa emissão se dá na forma de luz, produzindo um espectro de luz, que é diferente da inicial devido a uma perda de energia natural do processo. Portanto, a fluorescência necessita de uma fonte de luz para ocorrer, se diferenciando de reações químicas que produzem luz própria. Vale destacar que a emissão do material fluorescente é geralmente em um comprimento maior de luz do que a emitida sobre a amostra, ou seja, a energia emitida é menor do que a absorvida. A esse fenômeno é dado o nome de “Stokes Shift”, do inglês. Sendo assim, diversos pigmentos e proteínas fluorescentes, chamados de fluoróforos, possuem excitação na faixa do UV e do azul, já que sua emissão ocorre na faixa da luz visível (Fig. 2), o que facilita a sua observação em microscopia.



**Figura 2:** Espectro da luz visível. A partir de aproximadamente 400 nm (roxo) até aproximadamente 700 nm. Quanto menor é o comprimento de onda maior é a sua frequência e a energia contida pela luz. Comprimentos de onda maiores possuem menor frequência e menos energia. *Por Dora Bonadio*

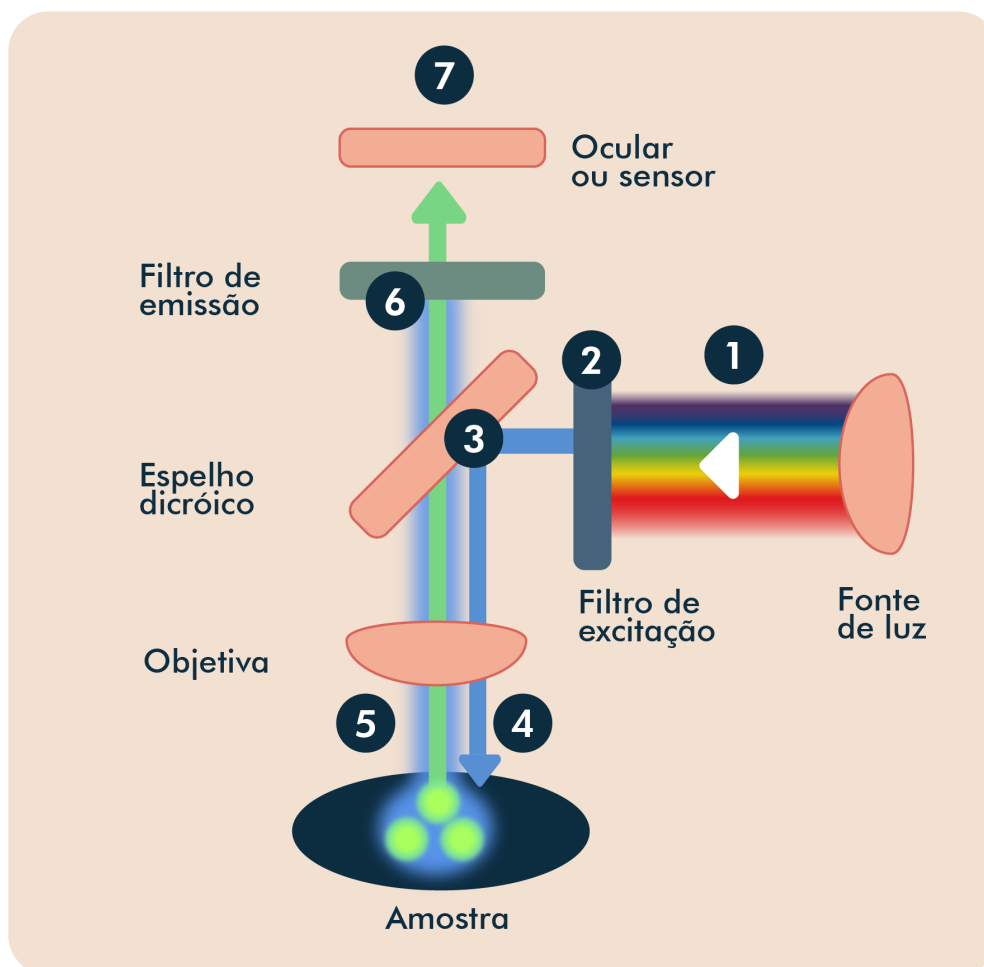
Como exemplificado para a GFP (Fig. 3), tanto os comprimentos absorvidos (ou de excitação) quanto os emitidos, formam um espectro contínuo, que possui maior absorção ou emissão em um determinado comprimento de onda.



**Figura 3:** *Stokes shift* da proteína fluorescente GFP. A faixa de absorção (em azul) tem comprimentos de onda maiores que a de emissão (em verde). *Por Dora Bonadio*

Assim, existe um ponto de excitação e emissão máximos para cada material fluorescente, e que é próprio de cada fluoróforo. Por isso é necessário conhecer as propriedades específicas do material que se está utilizando. Além disso, já que a emissão é diferente da excitação, é possível filtrar a imagem de forma a destacar apenas a luz emitida por fluorescência da amostra (da, possivelmente, refletida pelo material).

A partir do mecanismo de fluorescência pode-se entender como a microscopia de fluorescência deve operar. A Figura 4 esquematiza de forma simplificada como é o funcionamento de um microscópio de fluorescência.



**Figura 4:** Esquema do funcionamento de um microscópio de epifluorescência: Primeiramente, é necessário que haja uma fonte de luz (1). Em seguida, a luz deve ser filtrada (2) para permitir que apenas a faixa de luz de excitação do material atinja a amostra (no exemplo, a luz azul), por um filtro que pode ser trocado a depender do material. Após ser filtrada, a luz é direcionada por um espelho dicróico (3) para a amostra. Quando atinge a amostra (4), esta é iluminada e fluoresce (5) em outro comprimento de onda (no caso, verde). A luz da amostra, tanto nos comprimentos de onda de emissão quanto de excitação, passa pela objetiva, e novamente por um filtro (6), que deixa passar apenas o espectro da luz emitida, de forma a selecionar apenas a imagem desejada da amostra. A imagem filtrada então pode ser observada pelo ocular ou captada por sensores do microscópio (7). Por Dora Bonadio

O bom emprego da microscopia de fluorescência requer o conhecimento de componentes essenciais, como os fluoróforos que serão apresentados a seguir.

## **Tipos de fluoróforos**

Assim, dado o mecanismo de funcionamento da técnica de microscopia, fica evidente a importância de alguns fatores. O primeiro deles é o fluoróforo. É necessário entender primeiramente o que se quer destacar na amostra. Pode-se dividir os compostos fluorescentes em autofluorescentes, ou seja, compostos presentes no material biológico que fluorescem sem nenhuma marcação adicional; corantes, pequenas moléculas orgânicas que se ligam a determinadas regiões da amostra; proteínas fluorescentes, que podem ser hibridizadas com proteínas dos organismos ou expressas separadamente; e anticorpos ligados a pequenas substâncias fluorescentes que se ligam a proteínas específicas da amostra, o que é chamado de imunofluorescência.

### **Autofluorescência**

Apesar de não ser um fluoróforo específico, a autofluorescência do material observado é algo a ser levado em conta. A própria composição vegetal permite a observação de algumas estruturas que são autofluorescentes, ou seja, quando expostas a determinados comprimentos de onda e observados sob os filtros certos, emitem luz em determinados comprimentos de onda, destacando-se no material biológico. Os cloroplastos, por exemplo, possuem autofluorescência a aproximadamente 680 nm, ou seja, vermelha, devido aos seus pigmentos, como a clorofila e carotenóides. Essa característica dos cloroplastos pode ser utilizada como referência para a localização da estrutura na célula vegetal. Porém em alguns casos ela pode atrapalhar a visualização de outros pigmentos que se deseja observar. Além disso, a fluorescência dos cloroplastos pode ser acessada para identificação de regiões necróticas nos tecidos, já que a ausência de fluorescência indica a morte celular e a perda de função dos cloroplastos. No contexto da fitopatologia, essa característica permite acessar regiões da planta onde ocorreu reação hipersensível (*Hypersensitive response*, do inglês), que é uma resposta da planta a infecção por patógenos em que as células sofrem morte celular de forma a impedir o avanço da infecção para os tecidos vizinhos.

### **Corantes**

Diversos marcadores fluorescentes são utilizados na microscopia de fluorescência, entre eles, alguns corantes, sendo um dos mais comuns o DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), uma pequena molécula orgânica, que se liga ao DNA, com um pico de absorção na faixa do ultravioleta, aproximadamente 350 nm, e emissão no azul, aproximadamente 500 nm. Assim, é muito utilizado para marcação do núcleo celular.

### **Proteínas fluorescentes**

Atualmente diversas proteínas fluorescentes são utilizadas em microscopia de fluorescência. A proteína fluorescente clássica é a GFP (*Green Fluorescent Protein*) que foi originalmente isolada de uma água-viva (*Aequorea victoria*). Essa proteína possui pico de absorção no ultravioleta (aproximadamente 400 nm) e de emissão no verde (aproximadamente 500 nm). Após ser sequenciada e clonada, passou a ser muito utilizada, e diversas variações da proteína foram desenvolvidas, tornando-a mais estável ou modificando seu pico de absorção e emissão. Diversas variantes dessas proteínas

podem apresentar cores de fluorescência diferentes, como a YFP (*Yellow fluorescent protein*) e a CFP (*Cyan fluorescent protein*).

As proteínas fluorescentes podem ser utilizadas para a visualização de um determinado microrganismo de interesse na planta. Basta que essa proteína seja clonada na sequência do microrganismo de forma que este passe a expressar a proteína e possa ser facilmente identificado por microscopia. Assim, é possível observar em que regiões do tecido, por exemplo, ele está presente.

## Imunofluorescência

Outro tipo de fluoróforos são os utilizados na técnica de imunofluorescência. O princípio é o mesmo das outras técnicas citadas anteriormente, mas a particularidade é o método pelo qual o alvo de estudo é marcado com a fluorescência. Nesse caso, o fluoróforo interage com o alvo (geralmente proteínas celulares) através de um anticorpo. Essa associação pode ser direta, em que o fluoróforo está conjugado (conectado) ao anticorpo que identifica o alvo (mais precisamente o epítipo), ou indireta, em que o anticorpo conjugado ao fluoróforo reconhece o anticorpo que identifica o alvo (Fig. 5).



**Figura 5:** Comparação dos métodos de imunofluorescência direta e indireta. A principal diferença entre a imunofluorescência direta e a indireta é que, na primeira, o fluoróforo está conjugado ao anticorpo que reconhece o epítipo do alvo/antígeno (anticorpo primário) e, na indireta, o anticorpo conjugado ao fluoróforo (anticorpo secundário) reconhece o anticorpo primário (que reconhece o epítipo do alvo). *Por Dora Bonadio*

O caráter específico dos anticorpos possibilita estudos precisos, até mesmo proteínas pouco expressas dentro de células. A imunofluorescência geralmente é utilizada para marcar estruturas e componentes celulares. Vale citar que a técnica pode ir além do estudo com microscopia, tendo sido propostos métodos de detecção de patógenos em campo utilizando kits baseados em imunofluorescência, como para a detecção de *Acidovorax citrulli* proposto pela equipe de Zeng em 2017.

## Estudos de caso com microscopia

Um exemplo recente do uso da técnica de microscopia de fluorescência associada a GFP é o trabalho desenvolvido por Steentjes, publicado este ano, em que são estudados três fungos patogênicos de cebola, taxonomicamente próximos, mas com diferentes estratégias de colonização. Separadamente, os fungos foram transformados a fim de expressarem a proteína fluorescente (GFP) e posteriormente germinados e postos em contato com as plantas hospedeiras. A microscopia de fluorescência permitiu evidenciar as diferentes estratégias: um patógeno lança suas hifas através dos estômatos e de paredes anticlinais da epiderme, outro apenas forma massas de hifas sobre a epiderme da planta, enquanto o terceiro infecta a planta através das raízes, que, após completamente tomadas, parte para outras partes do vegetal. Ademais, ao infectar uma planta não-suscetível (tomateiro) com um dos patógenos, foi possível ver, pela perda de fluorescência do tecido fúngico, que o sistema imune da planta reagiu à infecção, induzindo morte celular das estruturas invasoras, sem afetar as estruturas externas à planta.

Mas não só de patógenos vivem os estudos com microscopia de fluorescência. Em 2020, Wang e colaboradores buscaram compreender como uma bactéria (no caso, *Bacillus*) influenciava positivamente o crescimento de cana-de-açúcar. E como a interação se dava. Com uma cepa transformada com GFP, notaram que a interação ocorre principalmente na superfície da raiz, em forma de agregados de células. Graças a uma investigação mais profunda e às bactérias transformadas, foi possível observar que também estavam presentes no mesofilo. Outras análises e um ensaio de crescimento em casa de vegetação mostraram que as bactérias promovem o crescimento através de uma “fertilização biológica”, com os metabólitos secretados, assim como alguns desses metabólitos apresentam ação anti-fúngica. Considerando que elas se beneficiam dos exsudatos da cana-de-açúcar, podemos dizer que é um recrutamento mais do que vantajoso para ambas as partes.

E a técnica não está restrita a microrganismos transformados. Há mais de 30 anos, Wolf e colaboradores demonstraram o efeito que um vírus (no caso o vírus mosaico do tabaco) possui na permeabilidade de plasmodesmos. Tal resultado foi possível ao monitorar o transporte de dextranas (polissacarídeos de alto peso molecular) marcadas com fluoróforos em células de plantas de tabaco transgênicas (expressando a maquinaria viral que atuava nos plasmodesmos). Ou seja, este é um exemplo de estudo focado num aspecto específico da interação. Alguns anos mais tarde, em 1995, Heinlein e colaboradores estudaram mais diretamente o movimento do mesmo vírus (dessa vez transformado com GFP) dentro de células de uma planta de tabaco e notaram a interação e o alinhamento dos filamentos formados com a rede de microtúbulos, elucidando o possível método de transporte do vírus dentro da célula.

Apesar de termos focado na identificação e comportamento dos microrganismos, as técnicas citadas também auxiliam na compreensão das estratégias de defesa das plantas. Em 2020, o grupo de Ropitiaux, na França, usou, entre outras técnicas, imunofluorescência para estudar e descrever um mecanismo celular de defesa de plantas de soja. Investigando tipos específicos de moléculas secretadas e que compõem células de borda de raiz, o grupo caracterizou a natureza desse sistema de defesa. Baseando-se nos dados presentes na literatura, foram preparados anticorpos cujos alvos foram epítopos associados a polissacarídeos e glicoproteínas de parede celular, além de DNA extracelular e proteína histona H4. Associado a um ensaio a parte, que viu o efeito desses produtos no oomiceto patogênico *Phytophthora parasitica*, o grupo concluiu a



efetividade dessa complexa “armadilha” produzida na raiz, tanto como uma barreira física quanto química a patógenos.

## Conclusão

O objetivo deste capítulo foi apresentar a microscopia de fluorescência como uma ferramenta para o estudo das interações planta-microrganismos, revelando brevemente suas várias possibilidades de aplicação. Mas o que está contido neste capítulo é apenas uma amostra. Além do que foi escrito aqui, há uma miríade de estudos já feitos e ainda há trabalhos sendo realizados a fim de refinar e expandir a tecnologia e a metodologia baseada no que já existe. Então, que esta leitura tenha servido de convite a uma busca mais profunda nesta técnica, que ainda tem tanto a revelar sobre o íntimo da relação entre as plantas e os microrganismos.

## Referências

- American Phytopathological Society (2011). ASPnet ([www.aspnet.org](http://www.aspnet.org)).
- Buchanan, B. B.; Gruissem W.; Jones, R. L (2015). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 2. ed., p. 696-705.
- Deeks, M., & Sánchez-Rodríguez, C. (2016). Seeing is believing: cell biology at the plant-microbe interface. *New Phytologist*, 211(1), 16–19.
- Delaux, P. M., & Schornack, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science*, 371(6531).
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321(1), 35-59.
- Joshi, S., & Yu, D. (2017). Immunofluorescence. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 135-150). Academic Press.
- Krause, G.H., Weis, E., 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynthesis Research* Vol 5, 139–157. <https://doi.org/10.1007/BF00028527>
- Krueger, B., Fleming, G., Longworth, J., 2018. Photochemical reaction - Consequences of photoexcitation | Enciclopédia Britannica. Disponível em <https://www.britannica.com/science/photochemical-reaction> Acesso 22/03/2021.
- Lambert, T., FPbase: The Fluorescent Protein Database. *FPbase*. Disponível em <https://www.fpbases.org> Acesso 22/03/21.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.
- Mensi, I., Vernerey, M. S., Gargani, D., Nicole, M., & Rott, P. (2014). Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. *Open biology*, 4(2), 130116.
- Nassau, K., 2020. Colour - The visible spectrum | Enciclopédia Britannica. Br. Disponível em <https://www.britannica.com/science/color/The-visible-spectrum>. Acesso 22/03/2021.
- Park, Y. S., & Ryu, C. M. (2021). Understanding Plant Social Networking System: Avoiding Deleterious Microbiota but Calling Beneficials. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3319.

- Randall, P. J., Hayes, J. E., Hocking, P. J., & Richardson, A. E. (2001). Root exudates in phosphorus acquisition by plants. In *Plant Nutrient Acquisition* (pp. 71-100). Springer, Tokyo.
- Ropitiaux, M., Bernard, S., Schapman, D., Follet-Gueye, M. L., Vicré, M., Boulogne, I., & Driouich, A. (2020). Root Border Cells and Mucilage Secretions of Soybean, *Glycine Max* (Merr) L.: Characterization and Role in Interactions with the Oomycete *Phytophthora Parasitica*. *Cells*, *9*(10), 2215.
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2014*(10), 36. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Schumann, G.L., andand D'Arcy, C.J. (2010). *Essential Plant Pathology*. (St. Paul, MN: The American Phytopathological Society)
- Sliney, D.H., (2016). What is light? The visible spectrum and beyond. *Eye* *30*, 222–229. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.252>
- Steentjes, M. B., Tonn, S., Coolman, H., Langebeeke, S., Scholten, O. E., & van Kan, J. A. (2021). Visualization of three sclerotiniaceae species pathogenic on onion reveals distinct biology and infection strategies. *International journal of molecular sciences*, *22*(4), 1865.
- Techniques. Nikon's Microscopy. Disponível em <https://www.microscopyu.com/techniques> Acesso em 30 de março de 2021
- ThermoFisher. The Light Spectrum and Its Relationship With Fluorescence. Disponível em [www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/fluorescence-fundamentals/light-spectrum-fluorescence.html](http://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/fluorescence-fundamentals/light-spectrum-fluorescence.html) Acesso 22/03/2021,
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied biochemistry and microbiology*, *42*(2), 117-126.
- Wang, Z., Yu, Z. X., Solanki, M. K., Yang, L. T., Xing, Y. X., Dong, D. F., & Li, Y. R. (2020). Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth. *Journal of applied microbiology*, *128*(3), 814-827.
- Wolf, S., LUCAS, W. J., DEOM, C. M., & BEACHY, R. N. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science*, *246*(4928), 377-379.
- Zeng, H., Zhai, X., Xie, M., & Liu, Q. (2018). Fluorescein isothiocyanate labeling antigen-based immunoassay strip for rapid detection of *Acidovorax citrulli*. *Plant disease*, *102*(3), 527-532.

## **Anexo 2 - Artigo Miranda *et al.*, 2023**

Raquel P. Miranda, Paula C. G. Turrini, Dora T. Bonadio, Marcelo M. Zerillo , Arthur P. Berselli, Silvana Creste and Marie-Anne Van Sluys

### **GENOME ORGANIZATION OF FOUR BRAZILIAN *XANTHOMONAS ALBILINEANS* STRAINS DOES NOT CORRELATE WITH AGGRESSIVENESS**

Microbiol Spectr. 2023 May-Jun; 11(3): e02802-22.

Published online 2023 Apr 13. doi: [10.1128/spectrum.02802-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.02802-22)



# Genome Organization of Four Brazilian *Xanthomonas albilineans* Strains Does Not Correlate with Aggressiveness

Raquel P. Miranda,<sup>a</sup> Paula C. G. Turrini,<sup>a</sup> Dora T. Bonadio,<sup>a</sup> Marcelo M. Zerillo,<sup>a\*</sup> Arthur P. Berselli,<sup>a</sup> Silvana Creste,<sup>b</sup>  
 Marie-Anne Van Sluys<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), Butanta, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Cana, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, São Paulo, Brazil

**ABSTRACT** An integrative approach combining genomics, transcriptomics, and cell biology is presented to address leaf scald disease, a major problem for the sugarcane industry. To gain insight into the biology of the causal agent, the complete genome sequences of four Brazilian *Xanthomonas albilineans* strains with differing virulence capabilities are presented and compared to the GPEPC73 reference strain and FJ1. Based on the aggressiveness index, different strains were compared: Xa04 and Xa11 are highly aggressive, Xa26 is intermediate, and Xa21 is the least, while, based on genome structure, Xa04 shares most of its genomic features with Xa26, and Xa11 share most of its genomic features with Xa21. In addition to presenting more clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) clusters, four more novel prophage insertions are present than the previously sequenced GPEPC73 and FJ1 strains. Incorporating the aggressiveness index and *in vitro* cell biology into these genome features indicates that disease establishment is not a result of a single determinant factor, as in most other *Xanthomonas* species. The Brazilian strains lack the previously described plasmids but present more prophage regions. In pairs, the most virulent and the least virulent share unique prophages. *In vitro* transcriptomics shed light on the 54 most highly expressed genes among the 4 strains compared to ribosomal proteins (RPs), of these, 3 outer membrane proteins. Finally, comparative albicidin inhibition rings and *in vitro* growth curves of the four strains also do not correlate with pathogenicity. In conclusion, the results disclose that leaf scald disease is not associated with a single shared characteristic between the most or the least pathogenic strains.

**IMPORTANCE** An integrative approach is presented which combines genomics, transcriptomics, and cell biology to address leaf scald disease. The results presented here disclose that the disease is not associated with a single shared characteristic between the most pathogenic strains or a unique genomic pattern. Sequence data from four Brazilian strains are presented that differ in pathogenicity index: Xa04 and Xa11 are highly virulent, Xa26 is intermediate, and Xa21 is the least pathogenic strain, while, based on genome structure, Xa04 shares with Xa26, and Xa11 shares with X21 most of the genome features. Other than presenting more CRISPR clusters and prophages than the previously sequenced strains, the integration of aggressiveness and cell biology points out that disease establishment is not a result of a single determinant factor as in other xanthomonads.

**KEYWORDS** comparative genomics, *in vitro* transcriptome, mobile genetic elements, SPI-1 T3SS, pangenome, whole-genome SNP, Brazilian isolates, sugarcane fields

*Xanthomonas* is a Gram-negative *Proteobacteria* lineage with several phytopathogenic strains responsible for huge losses in grain production, including rice as well as vegetable crops (1–3). These bacteria are distributed worldwide and invade their hosts through natural apertures such as stomata and hydathodes, by entering through wounds on plant tissues, or by hitchhiking on sap-feeding insects and others (2, 4).

**Editor** Lindsey Price Burbank, USDA - San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center

**Copyright** © 2023 Miranda et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Marie-Anne Van Sluys, mavsluys@usp.br.

\*Present address: Marcelo M. Zerillo, Departamento de Botânica e Ecologia, Instituto de Biociências, UFMT, Butanta, São Paulo, Brazil. The authors declare no conflict of interest.

**Received** 6 August 2022

**Accepted** 3 March 2023

Once the bacteria escape the host immune system, they colonize plant intercellular spaces or are dispersed systemically by moving through the transport vessels in the plants (2). Among the species, *Xanthomonas albilineans* causes leaf scald, a systemic disease that affects plants of the *Poaceae* family, especially sugarcane (*Saccharum* spp.), resulting in substantial losses in the sugarcane field productivity (4–6). Infected plants can manifest the disease symptoms at three different stages, including latent, characterized by the absence of external symptoms; chronic, characterized by the presence of multiple symptoms, such as the appearance of white streaks, lateral leaf blade chlorosis, necrosis, and death of the shoots; and acute infection, characterized by the leaf scald, from which the name of the disease is derived (5, 7, 8), that culminates with plant death. Moreover, there is no effective treatment for the disease, so prophylaxis and crop management are the best strategies to circumvent this condition (7). To date, the most effective method to recover an infected genotype is by meristem microtip culture, followed by indexation of the plants by sensitive diagnostic methods. Therefore, the use of disease-free seed cane in sugarcane nurseries followed by crop management in the field is the best practice to restrain disease propagation (7; S. Creste, personal communication).

*X. albilineans* is unique in the *Xanthomonas* genus. It is recognized for its broad host range and the absence of the classical host-pathogen interaction whereby resistance gene introgression could naturally be developed, including the lack of pathogenic and adaptation gene clusters that are common in the genomes of the other *Xanthomonadaceae* (9). The *X. albilineans* sugarcane pathosystem is not the result of the expression of typical effector molecules produced by the bacteria that interact with resistant, or susceptible, genes in the plant but the interaction between the responses driven by the complex hybrid sugarcane genome and bacterial strains that differ in virulence but share similar genomes (3, 10). Comparative studies among isolates from Guadeloupe Island (11) and other world geographical regions (12) have shown that, despite the high genomic similarity, the observed wide range of virulence between its strains confirms the existence of different pathotypes coexisting in the same geographical region. Recent genomic studies compared *X. albilineans* JG43 and *Xanthomonas sacchari* DD13 suggest quorum sensing is an important mediator of cellular communication (10). In addition, previous studies carried out by the Centro da Cana (Campinas Agronomic Institute [IAC]) detected polymorphisms when short sequence repeat markers were screened across 44 Brazilian isolates of *X. albilineans*, with reported different levels of aggressiveness when inoculated in the same susceptible sugarcane host (8). No marker was correlated with the phenotypes, with the exception of the association of two simple sequence repeat (SSR) fragments with some of the most virulent isolates. Therefore, variations were related mainly to discrete polymorphisms in the 15 genomic regions tested, such as point mutations, deletions, and insertions, apart from the existence of exclusive genomic segments or rearrangements. Furthermore, seedling health analysis in sugarcane nurseries conducted at Centro de Cana, IAC, reveal that *X. albilineans* represents the major systemic disease in Brazilian sugarcane fields, occurring silently in its latent form (S. Creste, personal communication).

To gain insight into the aggressiveness and phenotypic variation of the Brazilian *X. albilineans*, we selected four representative strains with differing virulence capabilities (DVCs) for full-genome sequencing and annotation. Strains Xa04 and Xa11 are considered highly virulent because they lead to acute leaf scald symptoms in the susceptible sugarcane genotype, while Xa21 and Xa26 cause chronic disease symptoms with various intensities (8). A single-point mid-log *in vitro* transcriptome sampling enabled accurate basecalling of the long reads used in each genome assembly. Transcriptomic data also support that the genomes express similarly. We further compared the four strains regarding their *in vitro* growth curve and albicidin production.

The chromosomal organization was conserved when all strains were compared to the previously sequenced *X. albilineans* strains. Structurally, within colinear regions, no major genomic rearrangements were observed, and only small variations accounted for their genetic diversity. Characteristics that were conserved among all strains included the albicidin

biosynthetic cluster, the *Salmonella* pathogenicity island 1 type 3 secretion system (SPI-1 T3SS), and the recently described *Pseudomonas syringae* blue-light perception system (9, 13). As few as 91 conserved genes presented single nucleotide polymorphisms (SNPs) that distinguished the Brazilian isolates from the previously described *X. albilineans* strains. Interestingly, a unique composition of mobile genetic elements (MGEs) was observed that distinguished each isolate and the reference genomes. The *in vitro* transcriptome of each isolate supports that over 75% of the predicted genes are expressed, including the previously described SSR markers. Under *in vitro* growth conditions, our data support that all strains behave similarly under controlled conditions at the gene expression level.

## RESULTS

**Assembly, annotation, and comparative analyses.** The sequencing of the Xa04 and Xa21 isolates generated 11.6 Gb of MinION high-quality data ( $N_{50}$  read length of 25,830 bp, MinION quality score of 11, average read length of 13,634 bp), while the sequencing of strains Xa11 and Xa26 generated 4.8 gigabases ( $N_{50}$  read length of 34,300 bp, MinION quality score of 10, average read length of 22,211 bp). Sequencing coverage between strains is presented in Table 1. *De novo* assembly was performed with two different methodologies, strains Xa04 and Xa11 were assembled using the Long Read Support module of the Qiagen CLC Genomics Workbench v.20.0.2 software (<https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/>) (14), while strains Xa21 and Xa26 were assembled with Canu v.2.0 software. The assembled nucleotide sequence was corrected with 6.6 Gb of Illumina HiSeq 1500 *in vitro* transcriptome trimmed data (90% of the bases with quality score >30) using the Long Read Support module of the CLC Genomics Workbench software. All genomes were assembled as circular chromosomes, and no plasmids were identified in the Brazilian *X. albilineans* isolates (Table 1).

Gene annotation was performed with Prokka v.1.12 software, by which the following gene counts were identified: 3,141 open reading frames (ORFs) in Xa04, 3,255 in Xa11, 3,283 in Xa21, and 3,257 in Xa26. Functional annotation also allowed the identification of two ribosomal (rRNA) gene clusters. tRNAscan-SE predicted 53 tRNAs in the Xa04 and Xa26 genomes as in the reference genomes, while Xa11 and Xa21 have 54 tRNA loci, both carrying an extra tRNA-Ser (CGA). All Brazilian isolates shared with the reference genomes a transfer-messenger RNA (tmRNA) locus organized as a type II toxin-antitoxin system (ratA), SsrA-binding protein (smpB), and tmRNA (ssrA) (15).

Comparative genomic analysis was performed from three perspectives, (i) global genome collinearity, (ii) feature composition analyses, and (iii) pan- and core genome evolution analysis. The global genome alignment performed with progressiveMAUVE revealed high similarity between the reference strains and the Brazilian strains of *X. albilineans* (Fig. 1a), where the absence of large deletions and insertions, as well as the presence of few rearrangements, was observed. The genome collinearity is interspersed with regions of low global similarity and unique sequences (Fig. 1a and b), particularly CRISPR regions and mobile genetic elements.

The six genomes were submitted to CRISPRCasFinder (16), which identified the existence of three CRISPR regions in each of the Brazilian strain genomes, two of which (CRISPR1 and CRISPR2) are present in all genomes, including GPE PC73 and Xa-FJ1, and located at the same conserved region (Fig. 1a). These two correspond to complete CRISPR loci from type I Cas encoding proteins. CRISPR1 is type I-C, and CRISPR2 is type I-F. CRISPR3 is present in the Xa11, Xa21, and Xa26 genomes within prophage regions prophage H and prophage I, respectively. CRISPR4 is also an incomplete version of a CRISPR locus, is unique to Xa04, and is located at the same insertion sequence (IS)-rich region as CRISPR3 from Xa11 and Xa21. Both CRISPR3 and CRISPR4 have HNH endonuclease upstream spacer and repeat regions. Of note is that CRISPR3 and CRISPR4 repeats are identical to the CRISPR2 repeat nucleotide sequence, while some spacers are shared, and others are unique to the genome. Brazilian strains have a greater number of CRISPR spacers than the two reference strains (Fig. 1b).

Prediction of the mobilome gene set was performed using ISSaga (17) and PHASTER

**TABLE 1** General information about *Xanthomonas albilineans* strains, including origin, sequencing information, and genome features<sup>b</sup>

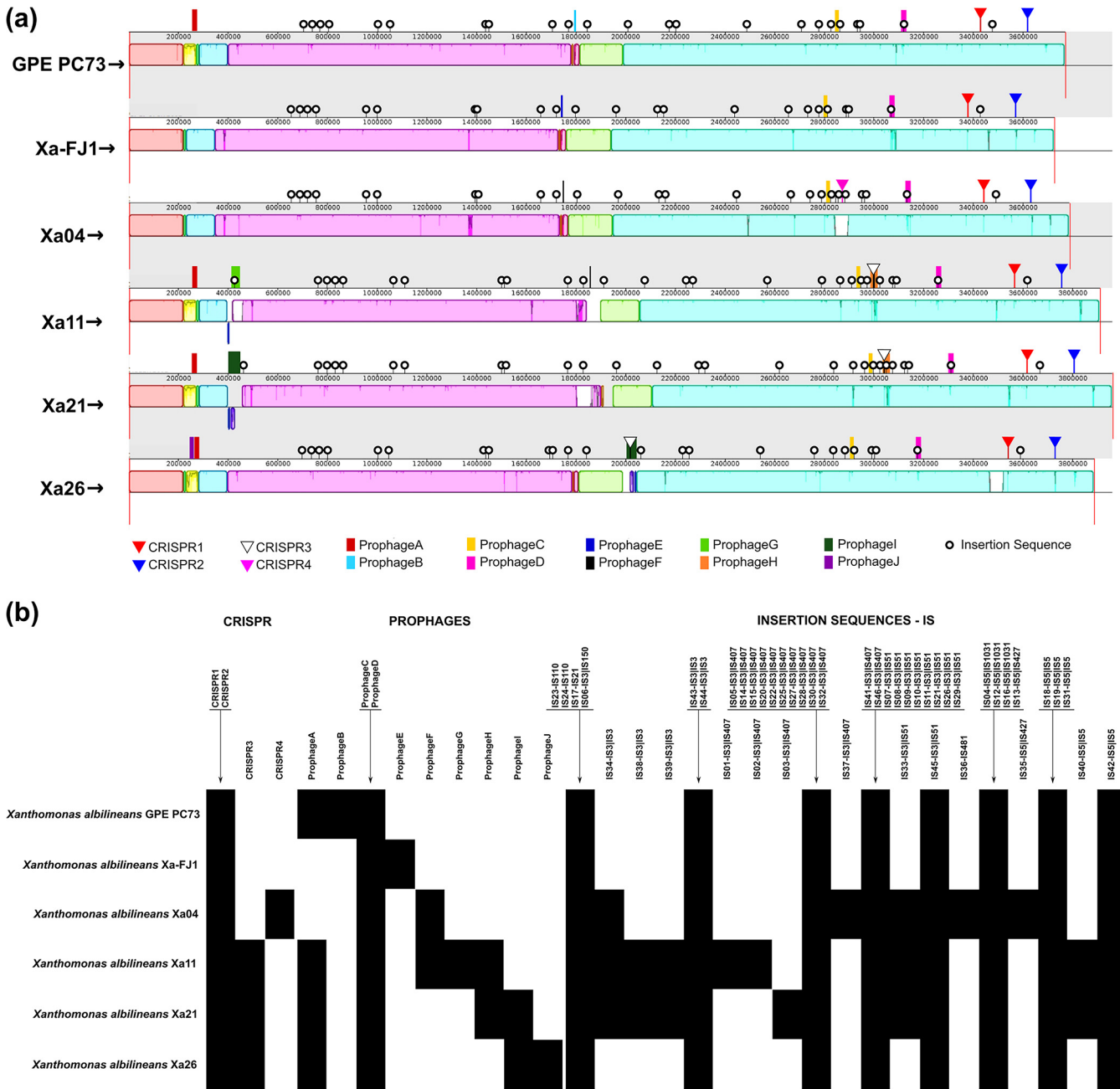
Data for <i>Xanthomonas albilineans</i> strain:						
Characteristic	GPE PC73 <sup>b</sup>	Xa-FJ1	Xa04	Xa11	Xa21	Xa26
<b>Isolation of strains</b>						
Host	H63-1418	YG48	IBSBF-2256	SP90-7027	CV5007 1791	IACSP07-4616
Site of isolation	Roujöl, Guadeloupe	Zhangzhou, China	Santa Adélia, São Paulo, Brazil	Conchal, São Paulo, Brazil	Araçatuba, São Paulo, Brazil	Mococa, São Paulo, Brazil
Yr of isolation	2003	2015	2010	2010	2010	2010
Pathogenicity degree			2.05	2.07	1.33	1.63
Symptom scale <sup>a</sup>			6.846	6.925	2.819	4.207
<b>Sequencing information</b>						
Sequencing platform	Sanger	PacBio RSII, Illumina PE150	MinION, Illumina <sup>c</sup>	MinION, Illumina <sup>c</sup>	MinION, Illumina <sup>c</sup>	MinION, Illumina <sup>c</sup>
Coverage (×)	17	206/570	1,500	417	1,200	499
Size (bp)	3,768,695	3,724,581	3,785,042	3,908,432	3,959,098	3,885,596
%GC content	62.98	63.00	62.98	62.91	62.88	62.97
No. of plasmids	3	1				
<b>Genomic features</b>						
No. of protein-coding sequences	3,115	3,176	3,141	3,255	3,283	3,257
No. of tRNAs	53	53	53	54	54	53
No. of rRNAs	4	4	4	4	4	4
No. of tmRNAs	1	1	1	1	1	1
No. of CRISPR regions	2	2	3	3	3	3
No. of prophages	4	3	3	6	5	5
No. of ISS <sup>d</sup>	35	35	40	42	41	35
Reference or source	5	23	This study	This study	This study	This study

<sup>a</sup>Symptoms scale according to reference 8.

<sup>b</sup>Used as reference genome for this study.

<sup>c</sup>Transcriptomic data from Illumina for polishing.

<sup>d</sup>Complete ISSs considered only.



**FIG 1** Comparative genomics analyses. (a) Global alignment of *X. albilineans* genomes with the progressiveMauve tool. From top to bottom are the reference strains GPE PC73 and Xa-FJ1, followed by the Brazilian strains Xa04, Xa11, Xa21, and Xa26. In the image, the sequences start and end with a red vertical bar (open genomes in dnaA). The blocks with similar colors indicate the conserved regions between the genomes; the white regions within the blocks represent sequences with low global similarity, while the white and light gray regions outside the blocks represent unique sequences. (b) Genome features present in each isolate analyzed, including CRISPR regions, prophages, and insertion sequences. Features present in the genomes are marked with black squares (similar genomic context); absences are marked with white squares. IS numbering was defined by position in the genome followed by the family and group associated with the sequence (IS01 to IS3, subgroup IS407).

(18, 19), with subsequent manual inspection to define the insertion sequences and prophages, respectively. The IS copy number varied between the genomes. In the reference strains and the Xa26 strain, 35 ISs were annotated, while in the Xa04, Xa11, and Xa21 strains, the software identified 40, 42, and 41 ISs, respectively. These ISs were characterized as belonging to 5 families and 10 subgroups, namely, IS110; IS21; IS3, subgroups IS150, IS3, IS407, and IS51; IS481; and IS5, subgroups IS1027, IS427, and IS5. The IS51 and IS407 subgroups, belonging to the IS3 family, were the most prevalent ISs, with at least nine insertions in each genome. Another important observation is the existence of a unique IS481 identified only in the Xa04 strain (Fig. 1b).



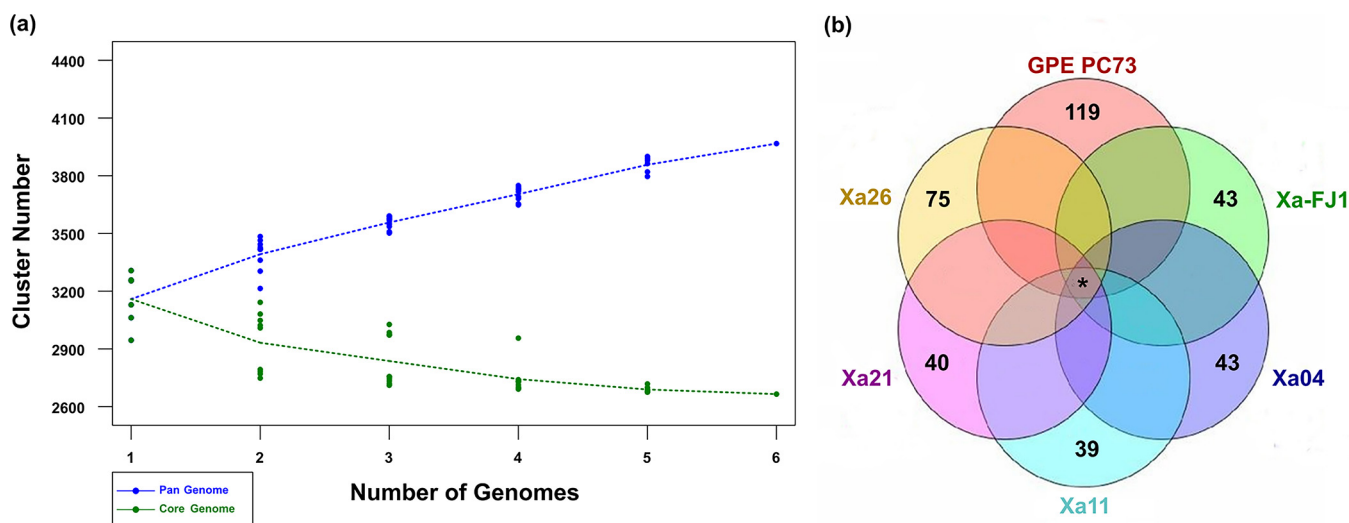
We comprehensively characterized a 1,320-bp IS element named ISXa1 that was present in equal numbers of copies (6) and sites of insertion in GPE PC73, Xa04, Xa11, and Xa21, whereas they were distributed in 11 and 8 copies in the genomes of Xa-FJ1 and Xa26, respectively. This element belongs to the IS45, IS3, and IS51 families with a perfect 27-bp-long inverted repeat (IR) and two ORFs. The first presents an in-frame stop codon, but a ribosomal  $-1$  frameshift between the two coding regions during expression might result in a functional DDE transposase. However, four of the six copies shared by all *X. albilineans* are flanked by perfect direct repeats. ISXa1 presents more than 90% of nucleotide identity along its nucleotide sequence compared with a prospected IS element in the genome of *Variovorax* sp. strain WDL1 and with ISStma17 of *Stenotrophomonas maltophilia*, including identical 3' IRs to both of them. This element is also shared with many species of *Xanthomonas* but with slightly lower nucleotide identity. Altogether, these analyses lead us to propose that ISXa1 can still be an active element or was until recently.

A total of 10 different prophages were identified in the 6 *X. albilineans* genomes, each with a unique infection history. These are named prophages A to J and are not equally distributed across all isolates; for instance, the Xa-FJ1 and Xa04 strains have three prophage loci, and the GPE PC73 strain has four prophage loci, while the Xa21 and Xa26 strains have five, and Xa11 has six. Two of these prophages (prophage C and prophage D) are common to all genomes and sit at the same location, including the references; thus, they are ancestral. Four are common to subsets: prophage A, common to GPE PC73, Xa11, Xa21, and Xa26, is located in a fragment that is unique to these strains; prophage F is found in isolates considered highly pathogenic (Xa04 and Xa11), but their genomic locations are distinct; prophage H, common to Xa11 and Xa21, is collocated with CRIPR3 in a region rich in mobile genetic elements; and prophage I, containing at least six phage-related genes, is common to strains considered less pathogenic (Xa21 and Xa26) but located in different genomic regions and orientations. Four unique prophages were also identified in the GPE PC73, Xa-FJ1, Xa11, and Xa26 genomes, namely, prophage B, prophage E, prophage G, and prophage J, respectively. Prophages B and E are unique to GPE PC73 and Xa-FJ1, respectively, but are located in the same region, and prophage G is located in the same region as Xa21.

A 51-kb region containing prophage A (yellow block in Fig. 1a) harbors six phage-related genes, more than 50 ORFs of unknown function, and four DNA methyltransferases. The latter might be involved in controlling the expression of a number of virulence genes, favoring the establishment of different phenotypes among the strains, as previously reported for various bacteria (20). The region is accompanied by an 11.5-kb fragment (green block in Fig. 1a) located up- or downstream and shared among all *X. albilineans*, which encompasses, among other genes, a tyrosine-type recombinase/integrase and two tRNA-associated genes. Those might have served as hot spots for chromosomal rearrangement or phage integration within the genome.

The core and pangenome analyses indicated that the inclusion of new genome sequences increased the pangenome size and reduced the core genome size (Fig. 2a). These results support that *X. albilineans* is an "open" and flexible genome, and its complete gene repertoire is not yet fully known. A clustering iteration with OrthoMCL (21) was used to identify the core and variable genomes. We considered the core genome to be the orthologous genes common to all completely assembled genomes and the variable genome to be the orthologous genes common to subsets of those genomes and unique genes (singletons). After processing, 3,212 ortholog groups were identified, of which 2,716 were common to all genomes, and 496 were common to subsets of them. In addition, 359 unique genes were identified among the 6 analyzed genomes (Fig. 2b). Among the 2,716 ortholog groups belonging to the core genome, 97 consisted of multicopy genes and 2,619 of single-copy genes. A total of 2,443 genes were identical (100% identity and 100% nucleotide coverage) in the single-copy gene subset and 176 similar genes, of which 70 had SNPs and 106 had indels between the sequences.

Interestingly, several genes associated with pathogenicity, such as adhesion genes,

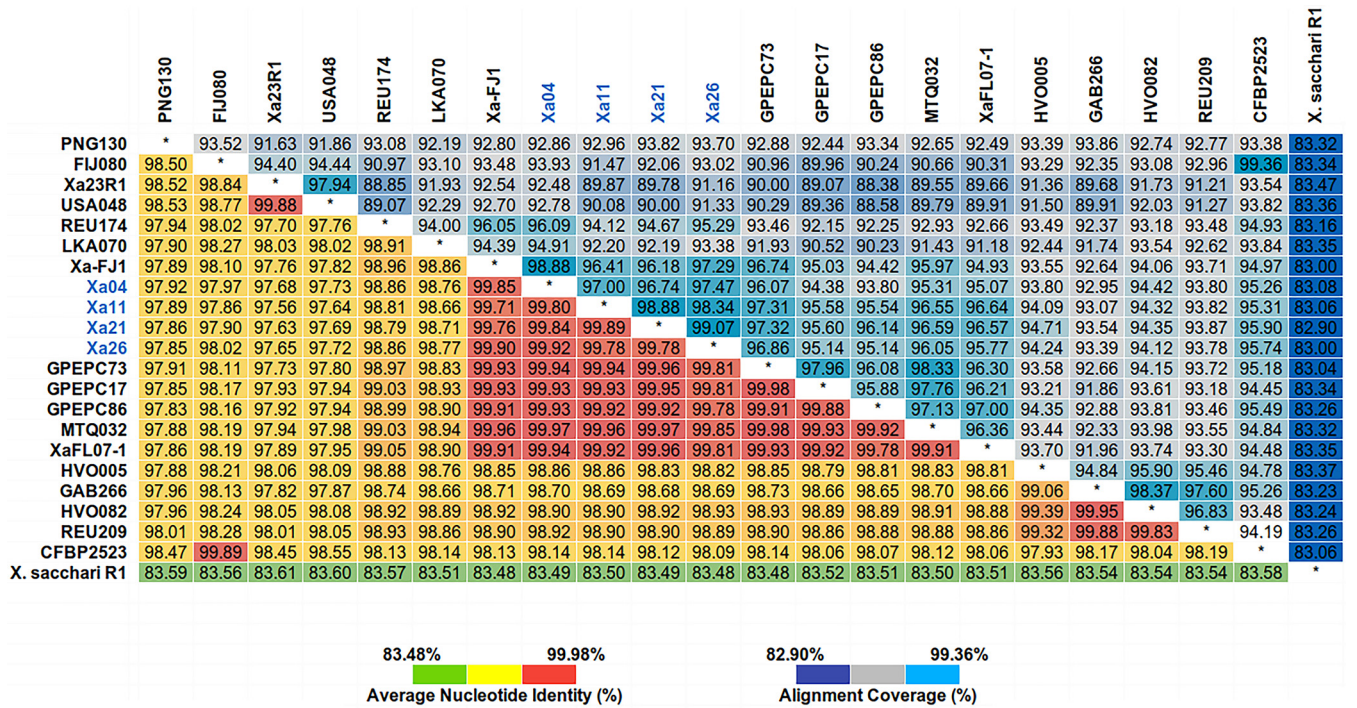


**FIG 2** Pan- and core genome identification. (a) Pan- and core genome evolution of *X. albilineans*. The inclusion of new genomes in the analysis shows an increase in the pangenome size (blue line) and a reduction in the core genome size (green line). The cluster number calculation was randomized for 6 sets, each one represented by a single point. (b) Results of the first clustering iteration organized graphically in a Venn diagram. In the center, the number of ortholog groups (orthogroups) shared by all *X. albilineans* complete genomes, showing core genome; at the ends are the numbers of unique genes present in each genome (singletons). \*, 2,716 shared genes. The number of ortholog groups shared by subsets of genomes is not presented.

cell wall-degrading enzymes, and polysaccharide synthesis, together with genes involved in secretion systems, nonribosomal peptide synthetase (NRPS), diffusible signal factor (DSF), and the flagellar operon, are amid the core genome collection. An exception is the TonB receptor gene family, which is highly diverse.

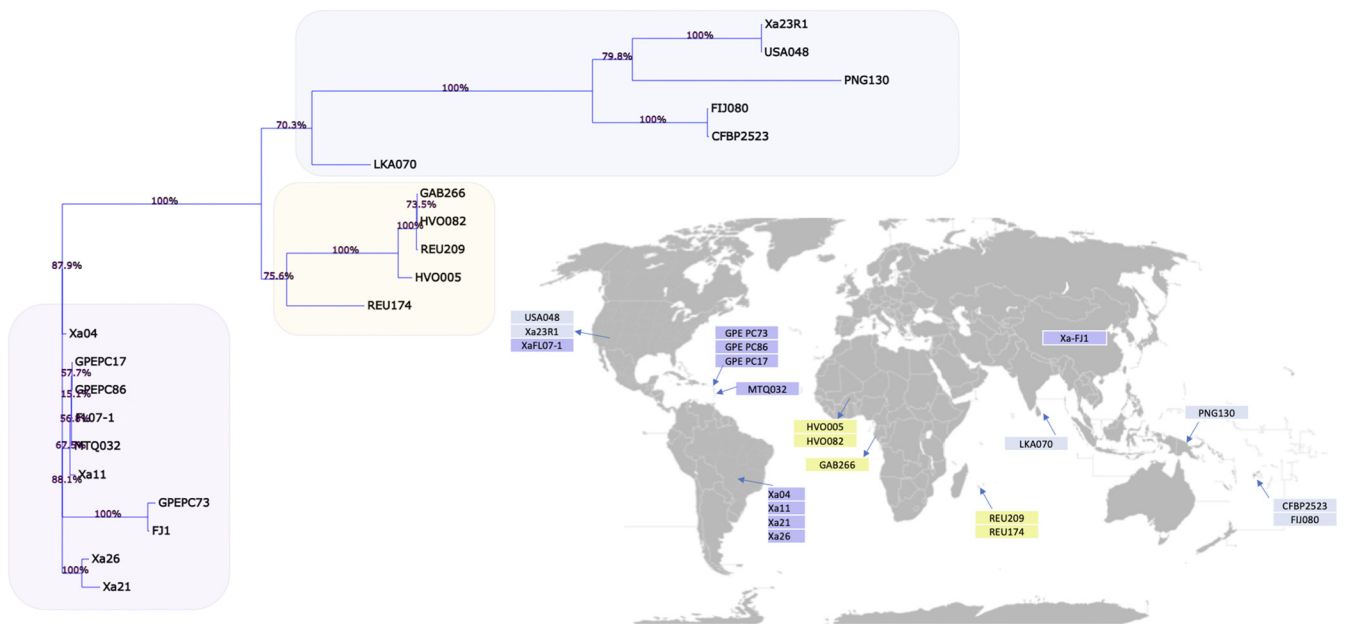
**Evolutionary and genetic diversity.** Based on a second OrthoMCL clustering iteration to determine the gene set shared between the 4 Brazilian strains and the 17 public strains of *X. albilineans*, as well as the selected outgroup R1 strain of *X. sacchari* (22) (see Table S1 in the supplemental material), a common gene set of 91 genes across the strains and *X. sacchari* were identified (Table S3). The average nucleotide identity (ANI) calculation was based on the total genome sequence of all *X. albilineans* strains and the *X. sacchari* R1 strain (Fig. 3). The values ranged from 83.48 to 99.98% among all genomes analyzed, whereas, for *X. albilineans*, ANI values ranged from 97.56 to 99.98%. In addition, the *X. albilineans* strains share 83.48 to 83.61% ANI with strain R1 of *X. sacchari*. The Brazilian strains ( $\geq 99.78\%$ ), together with the Guadeloupe Island strains (GPE PC73, GPE PC17, and GPE PC86) (ANI values, 99.81 to 99.96%, 99.81 to 99.95%, and 99.78 to 99.93%, respectively), the Martinique Island strain (MTQ032) (ANI values, 99.85 to 99.97%), one strain from the United States (XaFL07-1) (ANI values, 99.81 to 99.96%), and the Chinese strain (Xa-FJ1) (ANI values, 99.71 to 99.90%), shared higher ANI values. The less similar strains to the Brazilian strains are PNG130 (ANI values, 97.85 to 97.92%), FIJ080 (ANI values, 97.96 to 98.02%), CFBP2523 (ANI values, 98.09 to 98.14%), and two U.S. strains (Xa23R1 ANI values, 97.56 to 97.68%, and U.S. 048 ANI values, 97.64 to 97.73%, respectively).

Genetic diversity within an informative sample of the 91 genes previously described was also examined among the 21 *X. albilineans* strains over 67,654 nucleotide sites, of which 65,796 (97.25%) are conserved and did not present any polymorphism. Figure 4 presents the resulting phylogenetic tree associated with the strain sampling locality. First, tree branches reveal a geographical emerging pattern with Asiatic, African, and American strains clustering each together, with the exception of Xa23R1 (U.S.), USA048 (U.S.), and XaFJ1 (Chinese) strains. Within the American clade, the Brazilian strains fall in two distinct branches, both poorly supported. The branch lengths of the Brazilian isolates, as well as the American strains, are exceedingly short, which indicates a close genetic relationship with the neighboring lineages but also prevents further resolution of the tree due to a lack of phylogenetically informative signals.



**FIG 3** Heatmap of average nucleotide identity (ANI) and alignment coverage based on the total genome sequence of 21 strains of *X. albilineans* and 1 *X. sacchari* strain (outgroup). Brazilian strains are marked in blue. ANI values (%) for each two genome comparisons can be seen in the lower triangle of the matrix. The alignment coverage values (%) are arranged in the upper triangle.

**In vitro transcriptomics.** As described above, we found that, to some extent, their genomes do not echo differences from the most to least aggressive Brazilian *X. albilineans* strains. Additionally, for the genomes of the most pathogenic isolate group, with a corresponding less pathogenic isolate as duplet, Xa04 groups with Xa26 and Xa11 with Xa21. To further investigate, a transcriptomic approach was undertaken in which



**FIG 4** Phylogenetic tree of 21 *X. albilineans* strains. BioNJ tree topology is presented with bootstrap values indicated on top of the branches. Strains are mapped to countries following data collection as described in Table S1 in the supplemental material. Strain names appear in colored boxes matching tree topology inference. The worldmap can be found at the link [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/47/Mapa\\_mundi\\_divisiones\\_blanco.PNG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/47/Mapa_mundi_divisiones_blanco.PNG), and it is nested under the Wikimedia initiative (<https://www.wikimedia.org/>).

the four strains were grown to mid-log phase under *in vitro* conditions to explore whether differences in expression under controlled conditions could underlie differences in gene expression capabilities.

The total RNA transcriptome of the four *X. albilineans* strains grown *in vitro* (see conditions described below) yielded together over 29 million reads. After filtering and trimming, they resulted in 6.3, 7.2, 8.2, and 7.2 million paired-end (PE) reads and 487, 562, 638, and 557 Mbp of Xa04, Xa11, Xa21, and Xa26, respectively. Overall, 99.98% of the bases had PHRED quality scores higher than 20, and 94% had scores higher than 30. When mapped onto their respective genomes, the distance between 90% of the paired reads varied from 60 to 200 bp, in agreement with the fragment size selection of the cDNA selected prior to sequencing.

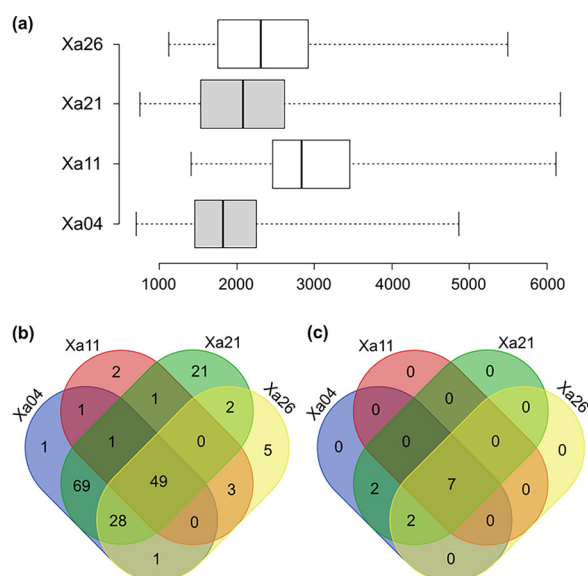
Compared with the references, approximately 75% of the PE reads were mapped onto annotated ORFs, 10% were mapped onto regions not assigned as coding genes, 0.3% were mapped onto the ribosomal DNA gene cluster, and 14.7% were not mapped anywhere, mainly because, according to our parameters, unpaired reads were not counted. Based on read mapping, the ratio of total RNA (excluding rRNA) to rRNA of all sequences was 280:1, supporting that our in-house rRNA depletion protocol and probes worked very efficiently. Most of the annotated ORFs are supported by reads mapped against them, adding biological evidence to those. Only a few genes did not exhibit some level of expression *in vitro*, namely, 19, 23, 35, and 40 ORFs from a total of 3,188, 3,312, 3,365, and 3,316 predicted genes in the genomes of Xa04, Xa11, Xa21, and Xa26, respectively. Most of the insubstantial ORFs corresponded to hypothetical proteins or faulty tRNA predictions and the SSR IACXa09, which is predicted to encode an autotransporter serine protease.

**Using ribosomal proteins to assess differences in transcriptome and TPM values.** As these strains show little genomic differences and most of the annotated genes had mapped reads, we used the transcripts per million (TPM) values of ribosomal proteins (RPs) to assess the efficacy of the transcriptome profile among the strains. The rationale undertaken is that this set of 54 ribosomal protein-coding genes would present similar TPM values since they are single copy, constitutive, and nearly identical among the four strains and because the cells were all grown *in vitro* under the same conditions and harvested in the log growth phase for the transcriptome experiment. Both the median and variance of TPM values for this set of proteins fall within a comparable range (Fig. 5a).

Ribosomal proteins are canonically found to be highly expressed in cells. Using ribosomal protein as a proxy for high gene expression, we ranked all chromosomal genes by their TPM values and further identified genes for which TPM values fall in the range of the ribosomal protein set and therefore infer significant expression in the cell. The ranking was performed independently for each *X. albilineans* strain, and we identified 49 genes with high expression (Fig. 5b and Table S3). Among those genes, there are five hypothetical proteins (ortholog groups [orthogroups] 179, 886, 1576, 1778, and 2646). Orthogroups 1576 and 1778 are among the most highly expressed genes in the transcriptome compared to ribosomal protein-encoding genes.

Additionally, we also determined which genes could be considered to have very high expression by determining the genes for which TPM values are higher than the highest ribosomal protein TPM value. Seven genes were common to all four strains, a DNA binding protein; three members of the large outer membrane protein (OMP) family, orthogroup 480 (*ompA*), orthogroup 2140 (Ax21), and orthogroup 2036 (outer membrane beta-barrel protein); orthogroup 872 (*cspA*); and two hypothetical proteins (orthogroup 1576 and 1778) previously mentioned (Fig. 5c and Table S3).

**T3SS and *X. albilineans* 1 gene clusters.** Unlike other genus members, *X. albilineans* has some unusual genomic features. The most relevant are the absence of hypersensitive response and pathogenicity type III secretion system (Hrp-T3SS), the presence of *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system (SPI-1 T3SS), and the ability to produce the phytotoxin albicidin from the *X. albilineans* 1 gene cluster (9, 23). The analysis of these structures showed that SPI-1 T3SS and *X. albilineans* 1 are adjacent to



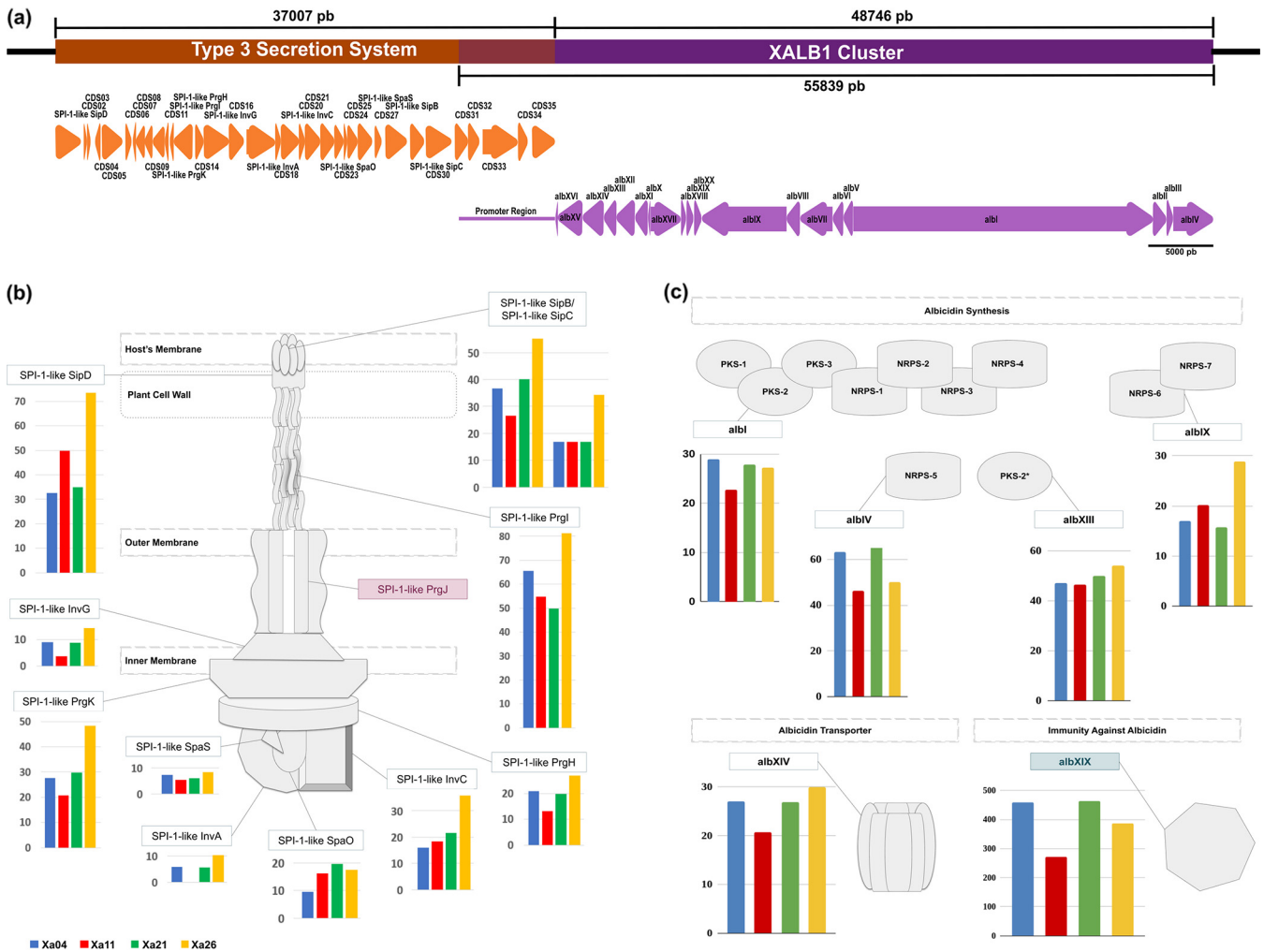
**FIG 5** Transcriptome analysis and Venn diagram. (a) Center lines show the medians, box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software, and whiskers extend to minimum and maximum values.  $n = 54$  sample points. (b) Venn diagram showing the shared genes among the four Brazilian *X. albilineans* strains for which TPM values fall in the range of the ribosomal protein set. Genes in the range and above ribosomal protein TPM values are included (Table S3 in the supplemental material). (c) Venn diagram showing the shared genes among the four Brazilian *X. albilineans* strains for which TPM values are above those of ribosomal proteins, supporting very high expression in the cell. Included are genes above ribosomal protein TPM values (Table S3).

each other and have an overlapping region, a sequence of 7,093 bp that encodes coding sequences (CDSs) 31 to 35 of the SPI-1 T3SS and also corresponds to the promoter region of the *X. albilineans* 1 cluster (Fig. 6a).

The gene expression profiles of the T3SS structural proteins from the four Brazilian strains were similar and low, as the highest expression level was just below 90 TPM and corresponded to the gene that encodes the SPI-1-like PrgI protein, which, in multiple copies, forms the pilus. Considering that the samples were collected from *in vitro* bacterial suspension cultures, future experiments from an *in planta* sampling could provide insights into the relevance of the T3SS in the disease establishment. Despite low expression levels compared to ribosomal proteins, most of the genes from the T3SS cluster are expressed (Fig. 6b), suggesting that the apparatus may also contribute to the *in vitro* growth survival. T3SS from Xa11 displays the lowest expression in addition to being the only one that presents null expression of T3SS-CDS17 (SPI-1-like *invA*, an export apparatus protein composing the gate) and T3SS-CDS33 (a yet-uncharacterized protein, with low similarity to a hydrolase).

Expression of the *X. albilineans* 1 gene cluster *in vitro* is supported in all four Brazilian isolates (Fig. 6c), with TPM values ranging from null expression to 465. Genes responsible for synthesis (*albI*, *albIV*, *albIX*, and *albXIII*) and resistance to albicidin (*albXIV* and *albXIX*) are actively transcribed in the bacterial cells, suggesting that the phytotoxin is synthesized under *in vitro* growth conditions (Fig. 6c). The *albXIX* gene, which encodes an immunity protein against albicidin, is expressed in all strains, as is albicidin synthesis supported by the inhibition ring text described below. The TPM bars presented in Fig. 6b and c are only used as a reference supporting similar expression across the strains.

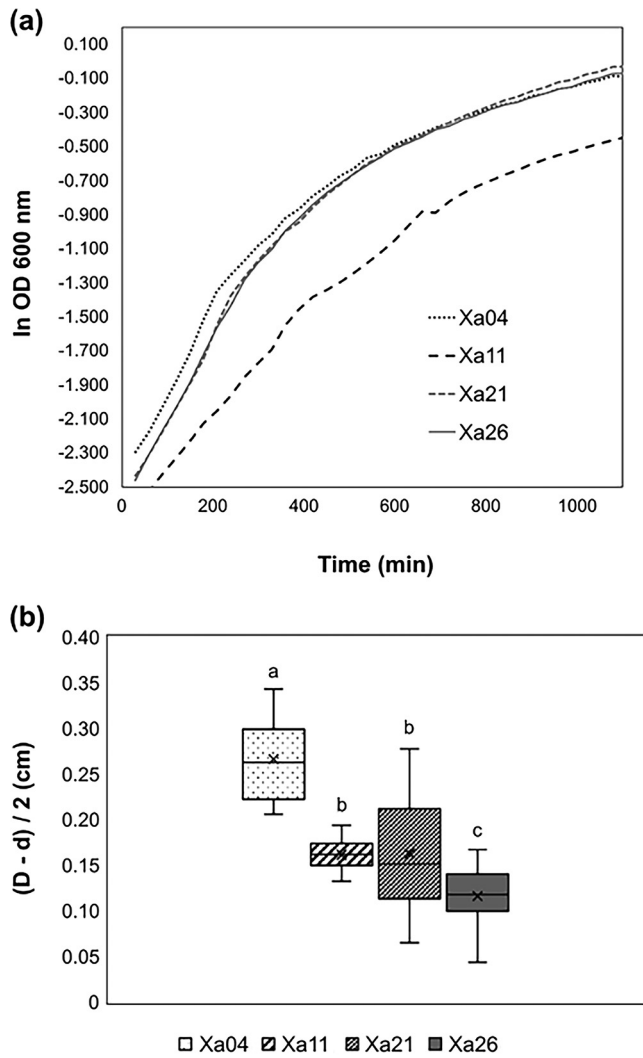
***In vitro* growth studies and albicidin production.** The Brazilian strains were classified into four pathotypes, based on a symptom rating scale after inoculation of a susceptible sugarcane genotype growing at a greenhouse (8). To expand knowledge into the biology of those strains, we defined their growth rates and growth curve (Fig. 7a). Xa11, the most aggressive strain, presented the lowest growth rate, whereas the Xa04 growth rate was close to the growth rates of Xa21 and Xa26, the less aggressive strains



**FIG 6** SPI-1 T3SS and the *X. albilineans* 1 cluster analysis. (a) Representation of the genomic region containing the SPI-1 T3SS (orange) and the *X. albilineans* 1 cluster (purple); the image is plotted proportionally. The overlap region between the structures is marked by the overlap of orange and purple boxes. The orange arrows represent the SPI-1 T3SS ORFs, while the purple arrows represent the *X. albilineans* 1 cluster ORFs. The arrow direction indicates the ORF direction within the genomes. (b) Gene expression profile of SPI-1 T3SS structural proteins from the four Brazilian strains. The most aggressive strains, Xa04 (blue) and Xa11 (red), are plotted on the left, while the less aggressive strains, Xa21 (green) and Xa26 (yellow), are plotted on the right. Structural genes not identified in the SPI-1 T3SS are marked in red. (c) Gene expression profile from the four Brazilian strains of synthesis and resistance genes to albidin phytotoxin (representation shows the PKS and NRPS modules encoded by each synthesis-related ORF). The albXIX gene with the highest TPM among all genes in the *X. albilineans* 1 cluster is marked in light blue. The TPM bars presented in panels b and c are only used as a reference supporting similar expression across the strains.

(8), indicating that for *X. albilineans*, the *in vitro* growth rate does not correlate with aggressiveness.

We further inspected the *in vitro* albidin production by testing the inhibition ring formed when *Escherichia coli* was inoculated in *X. albilineans* cultures (12). Xa04 has the highest values for inhibition rings, while Xa11 values are similar to Xa21. A one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's test grouped the strains into three classes, a (Xa04), b (Xa21 and Xa11), and c (Xa26) (Fig. 7b). Interestingly, the aggressive strains (Xa04 and Xa11) produce dissimilar inhibition rings, suggesting that albidin production is different (Fig. 7b). Xa11 and Xa21, with similar genomes, are clustered together with regard to the inhibition ring test. However, Xa04 and Xa26, which also share similar genome structures, have the most distant inhibition ring test values, Xa04 is the second most aggressive, and Xa26 is intermediate between the most aggressive ones and Xa21. Our results do not correlate aggressiveness with the albidin inhibition ring, supporting previous studies (12). Despite no correlation being observed, we found significant differences between strains regarding *E. coli* inhibition of halo production.



**FIG 7** Growth curves and albicidin. (a) Growth curve of four Brazilian strains of *X. albilineans*. (b) Albicidin inhibition ring of four Brazilian strains of *X. albilineans* in *E. coli*. The inhibition ring is given by  $D$  (diameter of the *E. coli* growth inhibition halo) minus  $d$  (diameter of the *X. albilineans* culture).

**DISCUSSION**

Comparative genomics has been used for the last 2 decades as a powerful tool to gain insight into microbial genomes, especially to understand the genome variation related to niche occupation, be it a pathogen, a symbiont, or a specialized environmental adaptation. The present work describes the sequencing of four *X. albilineans* isolates recovered from sugarcane cultivars grown in Brazilian fields with differing leaf scald symptoms. The genome structure is highly conserved between isolates as well as compared to the other previously sequenced strains. The mobile portion revealed some unique features, such as how prophage F, which harbors a ZOT-like encoding gene, is present in the most virulent strains. The ZOT-like encoding gene is also described in XFJ1. Prophage I is shared by the two least virulent strains, and prophage G is present only in Xa11. Several unique genes are present in these prophage regions, most of which are hypothetical. In addition, the study of the CRISPR regions revealed that the Brazilian isolates were subjected to unique bacteriophage infections that resulted in the addition of unique spacer regions. Only CRISPR1 and CRISPR2 possess complete type 1 Cas-containing loci. Interestingly, CRISPR3 and CRISPR4 contain repeats identical to CRISPR2 but are located in different genomic environments with a predicted HNH endonuclease upstream of the initial repeat. CRISPR3, present in the Xa11, Xa21, and Xa26 genomes, is located at the same genomic position in

the first two isolates but not in Xa26. This specific region from Xa11 and Xa21 is highly populated with insertion sequences (ISs). CRISPR4 is an acquisition unique to Xa04, and it is located in the same IS-rich region as CRISPR3. In conclusion, MGE and CRISPR regions provide genomic differentiation to these bacterial strains.

Pangenome evolution analysis allowed identification of gene diversity through the determination of the core genome, formed by genes present in all strains analyzed, and the variable genome, formed by genes absent in one or more strains (accessory genome), in addition to genes that are limited to a particular isolate (24, 25). In bacterial genomes, the set of exclusive genes can vary from 20% to 40% of the pangenome. This set is responsible for genome flexibility and is often described as essential for pathogenicity, interaction with the host, resistance to drugs, adaptation to specific niches, and other phenotypes of great medical, economic, and industrial importance (25, 26). The *X. albilineans* genome is "open"; that is, the incorporation of new genomic sequences in the analysis increases the pangenome size (total set of genes, core and variable genomes) and reduces the core genome size (set of genes shared by all genomes), indicating that the complete gene repertoire of the species is not yet fully known. It is necessary to include a greater number of genomes to obtain the complete pangenome of the species (26, 27). The phylogenomic tree and ANI analyses are concordant with previous analyses based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and SSR (6, 28). ANI based on the whole genome supports that all sequenced strains are a single species (>95%), with the exception of *X. sacchari*. However, a slight differentiation in the ANI values can be observed that is also supported by the phylogenomic tree where genetic diversity can be grouped based on their geographical origins (American, African, or Asiatic), with the exceptions of Xa23R1 (United States) and USA048 (United States) that cluster with the Asiatic strains and XaFJ1 (China) that clusters with the American strains close to GPE PC73. The American strains seem to have less genetic variation over time, as the MTQ032 strain was isolated in 1932, while Xa11 and Xa21 Brazilian isolates were recovered from different sugarcane plantations in 2010 (8), and GPE PC73 was isolated in 2003 (11). With the addition of complete genome sequences of these and other *Xanthomonas* strains, novel approaches will enable the understanding of the evolutive forces driving the genetic diversification in these bacterial populations.

Bacterial secretion systems are not only important means of communication and competition between bacteria and interaction with their surroundings but also valuable tools for pathogenicity (29). In addition to participating in the formation of mobility and adhesion-related structures, these systems allow the secretion of various enzymes, toxins, and effectors, essential to inter- and intraspecies competition and the invasion of host target cells (30). In particular, the type III secretion system (T3SS) primarily plays the role of an effector delivery system, which involves mainly suppressing the host immune system and promoting nutrient acquisition (31). *X. albilineans*, contrary to the other representatives of its genus, lacks an Hrp-T3SS but presents a T3SS that is closely related to SPI-1, which is near the terminus of the replication site and possibly a result of a horizontal gene transfer event (6). The SPI-1 T3SS cluster was not correlated with plant colonization or virulence, once it was absent in at least one pathogenic strain of *X. albilineans* and because knockout mutants showed no impairment in the promotion of the disease (9). The predicted effector region of the T3SS cluster is similar to toxins predicted to interact with animals. This observation and the fact that T3SS from *Salmonella* is predicted to have a shorter needle, as expected for bacteria-animal cell interaction, may suggest that it is involved in the association with potential insect vectors when human-driven spread is not the main form of propagation of this pathogen in sugarcane or other hosts.

Not previously described is the genomic position of the *X. albilineans* 1 cluster, which is head to tail with the T3SS close to the terminus of the bacterial chromosome, as presented in Fig. 6a. These gene clusters are superposed and expressed under *in vitro* conditions. The region described previously (32) as the promoter region is, in fact, the effector containing the region of the T3SS cluster. The first six genes from the *X. albilineans* 1 cluster are in opposite orientations; thus, it does not support that the previously described promoter region



is, in fact, the promoter region of *X. albilineans* 1. Albicidin, a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) toxin, synthesized by the *X. albilineans* N1 cluster, is a potent DNA gyrase inhibitor that prevents DNA replication of bacteriophages, bacteria, and plastids in plant cells (4, 33, 34). Albicidin is largely accepted as the major contributor to the leaf phenotype but is not a virulence determinant, as GPE PC73 produces symptoms but does not produce albicidin (12). Our results add that the cluster is highly conserved across distinct isolates; however, albicidin production varies among Brazilian isolates and does not correlate with virulence, as the most virulent isolates (Xa04 and Xa11) have significantly different inhibitory ring sizes. Recent results from Kortright et al. (35) demonstrate the use of albicidin as an antibiotic, which could confer an advantage to the *X. albilineans* bacterial population inside the plant tissues by inhibiting the growth of endophytes.

In pairs, Xa04 and Xa26, as well as Xa11 and Xa21, share high synteny. However, distinct phage infections are shared between the most virulent (Xa04 with Xa11) or least virulent (Xa21 with Xa26) bacterial strains, which unveils an interesting bacteria-phage dynamic in the *X. albilineans* strain differentiation. *In vitro* transcriptomics further contributed to the subtle differences among the Brazilian isolates, narrowing to a few candidate genes for functional studies. The novelty in the study presented here lies in the systems approach to combine genomics, transcriptomics, and biology of the leaf scald disease agent. Understanding bacterial population dynamics in an infected plant or field is required to better manage *Xanthomonas albilineans*'s interactions with sugarcane and other plants. Novel approaches are needed to solve this unique interaction.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Four Brazilian isolates of *X. albilineans* belonging to the *Xanthomonas albilineans* culture collection of Centro de Cana, IAC, Brazil, were used in this study (SisGeen A6C6170). These organisms were obtained from different sugarcane plantation areas in the state of São Paulo and selected according to their aggressiveness (8). Among these organisms, the two most virulent isolates (Xa04 and Xa11), an intermediate isolate (Xa26), and a low-virulence isolate (Xa21) were selected (8). Biological samples were collected, analyzed for their pathogenicity, and provided by researchers from the Centro da Cana, Campinas Agronomic Institute (IAC), in Ribeirão Preto, São Paulo. GPE PC73 (GenBank accession number [FP565176](#)) and Xa-F11 (GenBank accession number [CP046570](#)) isolates, available in public databases, were adopted as reference genomes for comparative analyses (5, 23).

***In vitro* bacterial growth assessment.** Bacteria were cultivated in modified Wilbrink's (MW) medium (sucrose, 10 g/L; tryptone, 5 g/L;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.50 g/L;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.25 g/L;  $Na_2SO_3$ , 0.05 g/L; and distilled water, and pH was adjusted to 6.8 to 7.0) (36) in solid media (agar, 15 g/L) for 4 days at 28°C. Cells were then transferred to 10 mL of MW liquid medium and incubated for 41 h with agitation at 28°C. The optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) was approximately 1.2, and 60  $\mu$ L was transferred to a new medium with a volume of 60 mL and incubated for 23 h until the  $OD_{600}$  values reached approximately 0.3 to 0.4. The inoculum was centrifuged and resuspended to an  $OD_{600}$  of 0.1 and diluted  $\times 10$ . Finally, 200  $\mu$ L of inoculum was grown in 96-well plates for 25 h with agitation at 28°C, and the  $OD_{600}$  was read at 30-minute intervals in a microplate reader. Growth rates were calculated using GrowthRates software (37).

**Albicidin inhibition assay.** Albicidin production was evaluated by measuring *X. albilineans* inhibition of *Escherichia coli* growth. For that purpose, 3  $\mu$ L of culture of *X. albilineans* ( $OD_{600} = 0.3$ ) was spotted in a petri dish with 25 mL of MW medium and incubated for 48 h at 28°C. Then, plates were overlaid with 10 mL LB soft agar (0.7%) with 100  $\mu$ L *E. coli* strain DH5 $\alpha$  ( $OD_{600} = 1$ ) and incubated for 48 h at 28°C. Inhibition was quantified by calculating the width of the *E. coli* growth inhibition ring as  $(D - d)/2$ , where  $D$  is the diameter of the *E. coli* growth inhibition ring, and  $d$  is the diameter of the *X. albilineans* culture, as described in previous work (12). We measured 15 inhibition halos per strain.

**DNA preparation and genome sequencing. (i) DNA preparation.** Whole-genome sequencing of the isolates was performed with the MinION platform (38). The libraries were prepared using the SQK-LSK109 barcoding genomic DNA kit and sequenced, two by two, in R9.4.1 FLO-MIN106 flow cells, generating single-end reads. Strains Xa04 (barcode NB01) and Xa21 (barcode NB02), as well as strains Xa11 (barcode NB03) and Xa26 (barcode NB04), were sequenced together in 48-h runs. The reads underwent quality control and were separated according to the barcode adapters through METRICOR software (39).

**(ii) Transcriptome sequencing (RNA-seq).** Freshly grown cultures of *X. albilineans* Xa4, Xa11, Xa21, and Xa26 were harvested and immediately subjected to RNA extraction. We used the Qiagen RNeasy Protect minikit (catalog no. 74124) for RNA extraction using chemical disruption of cells (proteinase K at 20 mg/mL and lysozyme at 15 mg/mL), following the manufacturer's recommendations. After RNA extraction, total RNA was treated with Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific; catalog no. AM2238) according to the manufacturer's instructions. rRNA was depleted using the selective depletion method (40), with probes custom synthesized for *Xanthomonas* rRNA sequences.

The cDNA libraries were constructed using TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant (Illumina, Inc., California, USA) according to the manufacturer's instructions. Equimolar amounts (170 nM) of cDNA fragments of the four *X. albilineans* isolates labeled with different indices (IDT for Illumina, TruSeq RNA

UD indices) were pooled and poured into one lane of the HiSeq 1500 System (Illumina) platform in order to obtain at least 20 million PE reads (~5 million PE reads/isolate), i.e., approximately 5% of the lane capacity. Sequencing was performed by using the c and TruSeq SBS kit v3-HS (200 cycles) (Illumina) for cluster generation and PE read sequencing of approximately 100 bases of each end.

Reads were demultiplexed by using BaseSpace sequence hub (Illumina) and trimmed on CLC Genomics Workbench v.20.0.4 (Qiagen) by using default parameters for cropping the adapters and for quality control, namely, a score limit of 0.05 and a maximum number of ambiguities equal to 2. Additionally, the five terminal bases of the 5' and 3' ends were discarded. PE reads were mapped onto their respective genomes with cost settings for mismatch, insertion, and deletion of 2, 3, and 3, respectively, and at least 80% coverage and 90% identity. The expression value was calculated in transcripts per million (TPM) values by using the RNA-Seq Analysis tool on CLC Genomics Workbench.

RNA-seq reads were also used for polishing the contigs obtained from genome sequencing by using the default parameters of the CLC tool Long Read Support/Polish with Reads, including window size of partial order alignments equal to 500 (41).

**Data analysis. (i) Genome assembly and polishing.** The *de novo* assembly of the genomes was performed using two methodologies. The genomes of isolates Xa04 and Xa11 were assembled with the Long Read Support module of the CLC Genomics Workbench v.20.0.2 software, which is a pipeline that uses the minimap2, miniasm, and Racon software in the assembly of long reads (alignment, assembly, and correction). The genomes of isolates Xa21 and Xa26 were assembled with the Canu v.2.0 software, a modular approach composed of three processing stages, correction, trimming, and assembly, performed in series (42). Then, the sequences were corrected with Illumina data obtained by RNA-seq of the strains grown *in vitro*. The correction was also realized using the Long Read Support module of the CLC Genomics Workbench v.20.0.2 software.

**(ii) Genome annotation.** Genome annotation was performed with the Prokka v.1.12 software, a pipeline that uses hierarchical methodology, curated databases, and several prediction tools to identify and assign a function to coding sequences (CDSs) and other genome structures, such as tRNA, rRNA, noncoding RNA (ncRNA), and CRISPR regions. Among the tools applied in the analysis are Prodigal, RNAmmer, Aragorn, SignalP, Infernal, and BLAST+ (43).

The insertion sequences (ISs) were predicted with ISsaga v.1.0; in our studies, we considered only the complete ISs (17). The prophage sequences were analyzed with PHASTER (18, 19). We performed a second prediction of transfer RNAs and CRISPR regions and their associated proteins using tRNAscan-SE v.2.0 (44) and CRISPRCasFinder v.1.1.2 (16), respectively.

**(iii) Transcriptomic analyses.** After mapping the reads and calculating the expression values in TPM, the data obtained were applied in a differential expression analysis. The determination of differentially expressed genes was based on the variation in ribosomal gene expression values; the expression data (TPM) of 54 ribosomal genes, identified in all genomes, were plotted in box plots specific to each genome, allowing the definition of the standard value range to be considered in the analysis.

Based on these results, genes whose expression values fell in the range of the ribosomal protein set were considered highly expressed genes, genes whose expression values were above this range were considered very highly expressed genes, and genes whose expression values were below this range were considered basally expressed.

**(iv) Average nucleotide identity and phylogenetic analysis.** The public genomic sequences of 17 worldwide strains of *X. albilineans*, including the reference genomes (GPE PC73 and Xa-FJ1 strains), in addition to the sequence of *Xanthomonas sacchari* R1 (used as an outgroup), were retrieved from the NCBI database (see Table S1 in the supplemental material). The average nucleotide identity (ANI) of 18 public *Xanthomonas* strains and the 4 Brazilian strains were measured by pairwise genome comparisons based on BLAST+ using JSpeciesWS Online Service (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) (45).

Orthologous gene group identification was performed with OrthoMCL v.2.0 (default parameters) (21). Two different clustering iterations were performed: the first used amino acid sequences of the complete *X. albilineans* genomes to identify core and specific genes, while the second used amino acid sequences of all the *X. albilineans* genomes and the *X. sacchari* R1 genome to determine the gene set shared between them. Based on the second clustering iteration results, 91 core single-copy genes, conserved among all genomes, were selected (Table S2). Sequences were aligned using MAFFT (in Seaview) and the IQ-TREE server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) for the construction of a maximum likelihood, 1,000 bootstraps (46). In addition, the resulting tree was compared using the T-REX web server (<http://www.trex.uqam.ca>) for the construction of neighbor joining and parsimony, 1,000 bootstraps (47), but excluding *X. sacchari* as an outgroup. Tree topology remained unchanged in all cases (data not shown).

**Comparative genomic analysis and pan- and core genomes.** Global alignment between the Brazilian strains and the reference strain genomes was carried out with the progressiveMAUVE tool of the MAUVE software v.2.4.0 (48, 49). The analysis enabled the identification of highly similar genomic regions (colinear blocks), in addition to structural variations such as inversions, deletions, and insertions, visually characterized in a linear graphical representation.

The PAN genome of *X. albilineans* was determined with the PGAP-X module (<http://pgaweb.vlcc.cn/pgapx/analyse>) of the Pan-Genome Analysis Web Server tool (<http://pgaweb.vlcc.cn/>) (50, 51). In this analysis, only complete genomes could be used, which included the reference and the four Brazilian strains of genomes.

**Data availability.** All data are under BioProject accession number PRJNA792816. GenBank accession numbers for chromosome data are SAMN24462201 (Xa04), SAMN24462202 (Xa11), SAMN24462203 (Xa21), and SAMN24462204 (Xa26). RNA-seq data are available at SRA accession number SRR19025915 Xa04, SRR19025914 (Xa11), SRR19025913 (Xa21), and SRR19025912 (Xa26).

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.2 MB.

**SUPPLEMENTAL FILE 2**, XLSX file, 0.2 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to MAVS from FAPESP (2008/52074-0 and 2016/17545-8) and CNPq 310779/2017-0. R.P.M. is the recipient of a FAPESP scholarship (2018/24646-0), P.C.G.T. was the recipient of a PNPD-CAPES fellowship (financial code 001), M.M.Z. is the recipient of a FAPESP fellowship (2018/23646-7), D.T.B. is the recipient of a FAPESP scholarship (2019/05424-0), and A.P.B. is the recipient of a CNPq fellowship.

R.P.M. performed and analyzed the bioinformatic data and wrote the manuscript; P.C.G.T. performed, collected, and analyzed the biological data and wrote the manuscript; M.M.Z. contributed to the analysis of the expression data and critically read the manuscript; D.T.B. performed *in vitro* growth experiments and albicidin and tRNA analysis; A.P.B. contributed to the annotation and analysis of T3SS; S.C. collected and characterized pathogenicity, provided the strains for the study, and critically read the manuscript; and M.-A.V.S. designed and coordinated the study, analyzed results and wrote the manuscript.

We have no competing interests.

## REFERENCES

- Assis RAB, Polloni LC, Patané JSL, Thakur S, Felestrino ÉB, Diaz-Caballero J, Digiampietri LA, Goulart LR, Almeida NF, Nascimento R, Dandekar AM, Zaini PA, Setubal JC, Guttman DS, Moreira LM. 2017. Identification and analysis of seven effector protein families with different adaptive and evolutionary histories in plant-associated members of the Xanthomonadaceae. *Sci Rep* 7:16133. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16325-1>.
- Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Sluys MAV, Bogdanove AJ, Dow M. 2011. Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Rev Microbiology* 9:344–355. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>.
- Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones JB. 2020. Xanthomonas diversity, virulence and plant-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 18:415–427. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>.
- Birch RG. 2001. Xanthomonas albilineans and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol Plant Pathol* 2:1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2001.00046.x>.
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Rott P. 2009. The complete genome sequence of Xanthomonas albilineans provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC Genomics* 10:616. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-616>.
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Gabriel DW, Rott P, Cociancich S. 2012. Genomic insights into strategies used by Xanthomonas albilineans with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* 13:658. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-658>.
- Rott P, Sandhu HS, Comstock JC, Gilbert RA. 2015. Sugarcane leaf scald. Publication SS-AGR-201. <http://edis.ifas.ufl.edu/sc001>. Retrieved 20 May 2020.
- Tardiani AC, Perecin D, Peixoto-Junior RF, Sanguino A, Landell MMG, Beriam LO, Nunes DS, Camargo LEA, Creste S. 2014. Molecular and pathogenic diversity among Brazilian isolates of Xanthomonas albilineans assessed with SSR marker loci. *Plant Dis* 98:540–546. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0762-RE>.
- Pieretti I, Pesic A, Petras D, Royer M, Süßmuth RD, Cociancich S. 2015. What makes Xanthomonas albilineans unique amongst xanthomonads? *Front Plant Sci* 6:289. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00289>.
- Li M, Bao Y, Li Y, Akbar S, Wu GY, Du JX, Wen R, Chen B, Zhang MQ. 2022. Comparative genome analysis unravels pathogenicity of Xanthomonas albilineans causing sugarcane leaf scald disease. *BMC Genomics* 23:671. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08900-2>.
- Champoiseau P, Daugrois JH, Pieretti I, Cociancich S, Royer M, Rott P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of Xanthomonas albilineans, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology* 96:1081–1091. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1081>.
- Champoiseau P, Daugrois JH, Girard JC, Royer M, Rott PC. 2006. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of Xanthomonas albilineans, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96:33–45. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0033>.
- Santamaría-Hernando S, Cerna-Vargas JP, Martínez-García PM, de Francisco Polanco S, Nebreda S, Rodríguez-Palenzuela P, Rodríguez-Herva JJ, López-Solanilla E. 2020. Blue-light perception by epiphytic Pseudomonas syringae drives chemoreceptor expression, enabling efficient plant infection. *Mol Plant Pathol* 21:1606–1619. <https://doi.org/10.1111/mpp.13001>.
- Qiagen CLC. QIAGEN CLC Genomics Workbench: NGS data analysis for any species, any platform, any workflow. <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench>. Accessed 3 February 2020.
- Okan NA, Bliska JB, Karzai AW. 2006. A role for the SmpB-SsrA system in Yersinia pseudotuberculosis pathogenesis. *PLoS Pathog* 2:e6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020006>.
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. CRISPRfinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35:W52–W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>.
- Varani AM, Siguier P, Goubeyre E, Charneau V, Chandler M. 2011. ISSAGA is an ensemble of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes. *Genome Biol* 12:R30. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-r30>.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44:W16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39:W347–W352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>.
- Aziz RK, Edwards RA, Taylor WW, Low DE, McGeer A, Kotb M. 2005. Mosaic prophages with horizontally acquired genes account for the emergence and diversification of the globally disseminated M1T1 clone of Streptococcus pyogenes. *J Bacteriol* 187:3311–3318. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3311-3318.2005>.
- Li L, Stoeckert CJ, Jr, Roos DS. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 13:2178–2189. <https://doi.org/10.1101/gr.1224503>.

22. Studholme DJ, Wasukira A, Paszkiewicz K, Aritua V, Thwaites R, Smith J, Grant M. 2011. Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated *xanthomonads* reveal insights into the *Xanthomonas* group 1 clade. *Genes (Basel)* 2:1050–1065. <https://doi.org/10.3390/genes2041050>.
23. Zhang HL, Ntambo MS, Rott PC, Chen G, Chen LL, Huang MT, Gao SJ. 2020. Complete genome sequence reveals evolutionary and comparative genomic features of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald. *Microorganisms* 8:182. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020182>.
24. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13950–13955. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102>.
25. Sherman RM, Salzberg SL. 2020. Pan-genomics in the human genome era. *Nat Rev Genet* 21:243–254. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0210-7>.
26. Guimarães LC, Florczak-Wyspianska J, de Jesus LB, Viana MV, Silva A, Ramos RT, Soares Sde C, Soares Sde C. 2015. Inside the pan-genome-methods and software overview. *Curr Genomics* 16:245–252. <https://doi.org/10.2174/1389202916666150423002311>.
27. Costa SS, Guimarães LC, Silva A, Soares SC, Baraúna RA. 2020. First steps in the analysis of prokaryotic pan-genomes. *Bioinform Biol Insights* 14: 1177932220938064. <https://doi.org/10.1177/1177932220938064>.
28. Davis MJ, Rott P, Warmuth CJ, Chatenet M, Baudin P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 87:316–324. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1997.87.3.316>.
29. Alvarez-Martinez C, Sgro GG, Araujo GG, Paiva MRN, Matsuyama BY, Guzzo CR, Andrade MO, Farah CS. 2021. Secrete or perish: the role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. *Comput Struct Biotechnol J* 19:279–302. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.020>.
30. Chang JH, Desveaux D, Creason AL. 2014. The ABCs and 123s of bacterial secretion systems in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 52: 317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-011014-015624>.
31. Feng F, Zhou JM. 2012. Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol* 15:469–476. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.004>.
32. Royer M, Costet L, Vivien E, Bes M, Cousin A, Damais A, Pieretti I, Savin A, Megessier S, Viard M, Frutos R, Gabriel DW, Rott PC. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol Plant Microbe Interact* 17:414–427. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.414>.
33. Cociancich S, Pesic A, Petras D, Uhlmann S, Kretz J, Schubert V, Vieweg L, Duplan S, Marguerettaz M, Noëll J, Pieretti I, Hügelland M, Kemper S, Mainz A, Rott P, Royer M, Süßmuth RD. 2015. The gyrase inhibitor albicidin consists of *p*-aminobenzoic acids and cyanoalanine. *Nat Chem Biol* 3: 195–197. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1734>.
34. Rott PC, Costet L, Davis MJ, Frutos R, Gabriel DW. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J Bacteriol* 178:4590–4596. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4590-4596.1996>.
35. Kortright KE, Doss-Gollin S, Chan BK, Turner PE. 2021. Evolution of bacterial cross-resistance to lytic phages and albicidin antibiotic. *Front Microbiol* 12:658374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658374>.
36. Davis MJ, Rott P, Baudin P, Dean JL. 1994. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis* 78:78–82. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0078>.
37. Hall BG, Acar H, Nandipati A, Barlow M. 2014. Growth rates made easy. *Mol Biol Evol* 31:232–238. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst187>.
38. Cao MD, Nguyen SH, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Cooper MA, Coin LJ. 2017. Scaffolding and completing genome assemblies in real-time with nanopore sequencing. *Nat Commun* 8:14515. <https://doi.org/10.1038/ncomms14515>.
39. David M, Dursi LJ, Yao D, Boutros PC, Simpson JT. 2017. Nanocall: an open source basecaller for Oxford Nanopore sequencing data. *Bioinformatics* 33:49–55. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw569>.
40. Morlan JD, Qu K, Sinicropi DV. 2012. Selective depletion of rRNA enables whole transcriptome profiling of archival fixed tissue. *PLoS One* 7:e42882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042882>.
41. Vaser R, Sović I, Nagarajan N, Sikić M. 2017. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Res* 27:737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>.
42. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* 27:722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>.
43. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
44. Lowe TM, Chan PP. 2016. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res* 44:W54–W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw413>.
45. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32:929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>.
46. Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res* 44:W232–235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>.
47. Boc A, Diallo AB, Makarenkov V. 2012. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. *Nucleic Acids Res* 40:W573–W579. <https://doi.org/10.1093/nar/gks485>.
48. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14:1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>.
49. Darling AE, Mau B, Perna NT. 2010. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5:e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>.
50. Zhao Y, Wu J, Yang J, Sun S, Xiao J, Yu J. 2012. PGAP: pan-genomes analysis pipeline. *Bioinformatics* 28:416–418. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr655>.
51. Zhao Y, Sun C, Zhao D, Zhang Y, You Y, Jia X, Yang J, Wang L, Wang J, Fu H, Kang Y, Chen F, Yu J, Wu J, Xiao J. 2018. PGAP-X: extension on pan-genome analysis pipeline. *BMC Genomics* 19:36. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4337-7>.