

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ÑJÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE CITROS
CAPAZES DE INTERROMPER O QUÓRUM SENSING EM
Xanthomonas citri subsp. citri

Juan Carlos Caicedo Cepeda
Bacteriologista

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ãJÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CÂMPUS DE
JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE CITROS
CAPAZES DE INTERROMPER O QUÓRUM SENSING EM
Xanthomonas citri subsp. citri

Juan Carlos Caicedo Cepeda

Orientadora: Profa. Dra. Katia Cristina Kupper

Co-orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Teses apresentada a faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias ã Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

2015

C134i Caicedo, Cepeda Juan Carlos
Identificação de bactérias do filo *Planctomycetes* do citros capazes de interromper o quorum sensing em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Juan Carlos Caicedo Cepeda. – – Jaboticabal, 2015
lx, 74 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Kátia C. Kupper
Corientador: Jesus Aparecido Ferro
Banca examinadora: Silvio Lopes, Fabrício Jaciani, Antonio De Goes

Bibliografia

1. Quorum Sensing. 2. Xanthomonas. 3. Citros. 4. Cancro. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.23:634.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JUAN CARLOS CAICEDO CEPEDA ï Nascido em Duitama- Boyaca (Colômbia), em 15 de novembro de 1970, graduado em Bacteriologia pela Universidade Industrial de Santander-UIS (Colômbia), no ano 1996. Possui mestrado em Microbiologia pela UniversitatAutonoma de Barcelona-UAB (Espanha), no ano 2008. Em 2011 ingressou no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista ãúlio de Mesquita Filhoò (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no Câmpus de Jaboticabal (SP).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO FILOPLANO DE CITROS CAPAZES DE INTERROMPER O QUÓRUM SENSING EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

AUTOR: JUAN CARLOS CAÍCEDO CEPEDA

ORIENTADORA: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER
Instituto Agronômico de Campinas / Cordeiropolis/SP

Prof. Dr. SILVIO APARECIDO LOPES
Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP

Prof. Dr. FABRÍCIO JOSE JACIANI
Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP

Prof. Dr. ANTONIO DE GOES
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. TIAGO SANTANA BALBUENA
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 19 de junho de 2015.

Todo es medible y medir es el fin de la ciencia. Se puede medir una bacteria, el átomo, el núcleo del átomo, el electrón, la opinión pública, la inteligencia, la distancia que nos separa de la estrella Alfa del Centauro.... Todo se puede medir. ¿Por que no habremos de medir entonces la impostura, la maliciosa capacidad de mentir del ser humano que es su esencia?

Fernando Vallejo

Tudo é mensurável e medir é o fim da ciência. As bactérias podem ser medidas, o átomo, o núcleo do átomo, os elétrons, a opinião pública, a inteligência, a distância que nos separa da estrela Alfa Centauro Tudo pode ser medido. Por que não devemos então medir o engano? a maldosa capacidade do ser humano que é a sua essência

Fernando Vallejo

.....A mí amadísima esposa Sonia Villamizar, quien no para de alegrarme la existencia día a día, me complementa y equilibra, solo ella puede evitar que mis escasas virtudes se transformen en debilidades...

....A mí madre Rosa Cepeda, por enseñarme que las deudas hay que pagarlas y que se vive mejor sin ellas....

AGRADECIMENTOS

A o Povo Brasileiro, por que seus impostos pagaram minha bolsa, fico em dívida com cada um de eles.

A Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela confiança e sugestões técnicas. Sua gentileza e acolhimento facilitaram enormemente nossa adaptação a uma nova sociedade acadêmica e civil. A o Professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela oportunidade para desenvolver um projeto em uma área em que poucos acreditavam, minha eterna gratidão por acreditar em mim, pelos conhecimentos cedidos e a dedicação.

A minha orientadora Profa. Dra. Katia C. Kupper, pela amizade.

A todas as pessoas que fizeram parte direta ou indireta na realização deste projeto. Especial gratidão a o pessoal do CREBIO, pela valiosíssima ajuda, especialmente no sequenciamento de DNA, e finalmente a Renata Tezza, pelo precioso apoio no ambiente profissional e pessoal.

SUMARIO

Página

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1.INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	8
2.1.1 Determinantes da virulência em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	9
2.2 Cancro cítrico	19
2.3 Quórum sensing generalidades	22
2.3.1. Tipos de quórum sensing bacteriano.....	24
2.4 Quórum sensing em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i> autoindutor DSF.....	27
2.5 Interferências no quórum sensing bacteriano (quórum quenching).....	34
3.0 OBJETIVOS	35
4.0 METODOLOGIA	35
4.1 Construção dos bioreporteros de DSF	35
4.2 Isolamento e identificação de bactérias inibidoras DSF	40
4.3 Teste de virulência	42
4.4 Ensaios de formação de biofilme e aderência bacteriana <i>in planta</i>	43
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.0 CONCLUSÕES	54
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

RESUMO- A bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xcc) é o agente causal do cancro cítrico, uma doença que afeta quase todos os tipos de culturas de citros. A produção de determinados fatores de patogenicidade em Xcc é regulado por um grupo de genes chamados *rpf*, que codificam elementos de um sistema de comunicação célula-célula chamada de quórum sensing (QS), mediado por moléculas da família do fator difusível de sinal (DSF). A interferência com a sinalização célula-célula, também denominado quórum quenching, seja por degradação do sinal ou excesso de produção tem sido sugerido como estratégia para controlar doenças bacterianas. Nesse estudo, foram isoladas três cepas provenientes de folhas de citros que apresentaram alta capacidade de perturbar a sinalização QS em Xcc. Ensaio de patogenicidade em laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) mostraram que as bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* têm forte capacidade de reduzir a severidade da doença. Estes efeitos foram associados a alteração na aderência bacteriana e a formação de biofilme, fatores que são conhecidos por contribuir para a virulência de Xcc. Essas bactérias quórum-quenching podem ser um instrumento extremamente útil para o processo de controle biológico e oferecer uma alternativa para o tratamento tradicional de cobre, atualmente utilizado para o tratamento do cancro cítrico.

Palavras chaves: Biofilme, cancro cítrico, DSF, quórum quenching

ABSTRACT

ABSTRACT-The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) is the causal agent of citrus canker, a disease that affects almost all types of citrus crops. The production of particular pathogenicity factors in *Xcc* is controlled by a cluster of genes named *rpf*, which encode elements of cell-cell communication system called Quorum Sensing (QS), mediated by molecules of the Diffusible Signal Factor (DSF) family. Interference with cell-cell signaling, also termed quorum quenching, either by signal degradation or over-production has been suggested as strategy to control bacterial disease. In this study, we isolated three bacterial strains from citrus leaves that displayed a high ability to disrupt QS signaling in *Xcc*. Pathogenicity assays in sweet orange (*Citrus sinensis*(L.) Osbeck) showed that bacteria belonging to the genera *Pseudomonas* and *Bacillus* also have a strong ability to reduce the severity of citrus canker disease. These effects were associated with alteration in bacterial attachment and biofilm formation, factors that are known to contribute to *Xcc* virulence. These quorum-quenching bacteria may represent a highly valuable tool in the process of biological control and offer an alternative to the traditional copper treatment currently used for the treatment of citrus canker disease.

Key words: biofilm, citrus canker, DSF, quorum quenching

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de suco de laranja no mundo, as exportações abrangem de US\$ 1,5 bilhão a US\$ 2,5 bilhões por ano. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, 230.000 vagas e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões. Durante a última década, quatro doenças (Morte Súbita, greening, clorose variegada dos citros e o cancro cítrico) foram responsáveis pela erradicação de 39 milhões de árvores do parque citrícola de São Paulo e do Triângulo Mineiro (NEVES et al., 2010). Dentre essas doenças o cancro cítrico afeta quase todas as variedades de citros comercialmente importantes. A doença provoca extensos danos à cultura e a gravidade de infecção varia de acordo com as diferentes espécies bacterianas e as condições climáticas prevalentes. No Brasil o primeiro caso de cancro cítrico foi reportado em 1957 no município de Presidente Prudente, estado do São Paulo (BITANCURT 1957); e posteriormente em 1979 a doença foi detectada no município de Monte Alto, área considerada tradicional de cultivo de citros (SANTOS 1991).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) (syn. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* *Xanthomonas citri* ou *Xanthomonas aspersa* pv. *citri*) é o agente etiológico da doença conhecida como cancro cítrico. A invasão e a colonização do hospedeiro são realizadas através das aberturas naturais das folhas (estômatos) e por ferimentos nos tecidos vegetais (GABRIEL et al., 1989). O patógeno se multiplica nos espaços intercelulares para causar o cancro. Os sintomas típicos incluem lesões corticosas necróticas, rodeadas por uma margem embebida de água, de aspecto oleoso em folhas, caules e frutos, seguidos da desfolha induzida, geral declínio de árvores, frutos deteriorados e queda prematura de frutos em árvores severamente infectadas. O controle é difícil em áreas onde a doença já está estabelecida e é baseado no uso intensivo de compostos contendo cobre. Ataques recorrentes e graves da doença são responsáveis por sérios prejuízos econômicos em cultivares de citros (FAWCETT e JENKINS 1933).

A produção dos fatores de patogenicidade na bactéria *Xcc* é mediada por um cluster de genes chamado de *rpf* (regulação dos fatores da patogenicidade). Alguns

destes genes são regulados por um delicado sistema de comunicação célula-célula chamado quórum sensing (QS) (BARBER et al., 1997). O QS envolve a troca de moléculas sinalizadoras difusíveis entre os membros de uma população localizada. Se a produção de sinal por parte da população é maior que a sua perda por difusão ou inativação, o sinal se acumula a um nível de limiar e ativa proteínas receptoras cognatas. A comunicação célula-célula por meio de pequenas moléculas sinalizadoras desempenha um papel essencial na sincronização da expressão dos genes e na coordenação funcional entre as bactérias, além de ser um fator chave para manter suas vantagens competitivas.

A molécula sinalizadora, conhecida como fator sinalizador difusível (DSF) é um ácido graxo *cis*-insaturado de cadeia curta, que foi descrito pela primeira vez no fitopatógeno *Xanthomonas campestris*. O DSF é responsável por regular uma ampla gama de funções que incluem a virulência, formação de biofilme e motilidade (HE et al., 2006). Não é infrequente que os sinais de QS produzidos por um microrganismo interfira eficazmente na sinalização de QS em outros organismos. Os sistemas bacterianos QS comumente apresentam um alto grau de especificidade do sinal, por causa das diferenças estruturais das moléculas sinalizadoras e nos domínios ligante das proteínas receptoras. Da mesma forma, a capacidade de um microrganismo para combater a sinalização QS de seus concorrentes também poderia aumentar significativamente a sua força de competitividade no ecossistema, desta forma a interferência de sinal de QS só poderia agir unilateralmente (ZHANG et al., 2004). Nos últimos anos tem-se um interesse crescente na avaliação dos mecanismos de perturbação da sinalização no patógeno, como um meio de controle das doenças. Tal fenômeno é também referido como quórum-quenching, em que as características que normalmente seriam expressas quando existem densidades celulares altas são suprimidas pela alteração na estrutura e na abundância das moléculas de sinalização. É provável que os microrganismos também podem ter desenvolvido certos mecanismos, para desarmar os sistemas de QS de seus concorrentes, para aumentar sua força competitiva num ecossistema (UROZ et al., 2009).

Um estudo prévio (NEWMAN et al., 2008) mostrou o potencial de extinção do sinal DSF (quórum quenching) no controle de doenças causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Segundo os autores as bactérias isoladas da filosfera de plantas cultivadas no campo, hospedeiros naturais para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* rapidamente poderiam modificar e/ou degradar o DSF *in vitro*, reduzindo os sintomas causados pela bactéria fitopatogênica em crucíferas. Atualmente, não há nenhuma informação sobre o isolamento e identificação de bactérias capazes de perturbar a sinalização DSF em *Xcc*, ou sobre o uso de bactérias quórum quenchers, como uma ferramenta para reduzir o cancro cítrico.

Nesse estudo, foram identificadas bactérias isoladas a partir da filosfera dos citros, que apresentam a capacidade de interromper o sistema QS em *Xcc* e reduzir a severidade do cancro cítrico em laranja doce. Os resultados indicam que os membros da microbiota autóctone de citros poderiam ter um efeito benéfico sobre a saúde da planta. Estas bactérias podem representar uma ferramenta muito valiosa no processo de controle biológico e oferecer uma alternativa em substituição aos produtos cúpricos, tradicionalmente usados para o controle da doença, com implicações ambientais, econômicas e de saúde pública significativas para o mundo todo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O gênero *Xanthomonas* [de *xanthos* significado grego amarelo (DOWSON 1939)] compreende um grande grupo de bactérias fitopatogênicas pertencentes ao grupo das γ -proteobactérias que infectam 124 espécies de plantas monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas (CHAN e GOODWIN, 1999). São bactérias gram-negativas com formato de bastonetes com um único flagelo polar, e múltiplos pili (Figura 1). As colônias bacterianas apresentam uma coloração amarela, por causa de um pigmento conhecido como xanthomonadina e têm aparência brilhante devido a um exopolissacarídeo conhecido como gomaxantana (STARR 1981; JANSSEN et al., 1975). Embora o gênero tenha uma ampla gama de hospedeiros, membros individuais são em geral especializados para causar doença em um número limitado de hospedeiros

taxonomicamente relacionados. Muitas espécies de *Xanthomonas* também são encontradas associadas a plantas, de forma epífita ou saprófita, sem causar sintomas de doença. Vários fatores de virulência especializados são empregados por *Xanthomonas* para invadir com sucesso os tecidos de seus hospedeiros, se multiplicar dentro deles e causar doença.

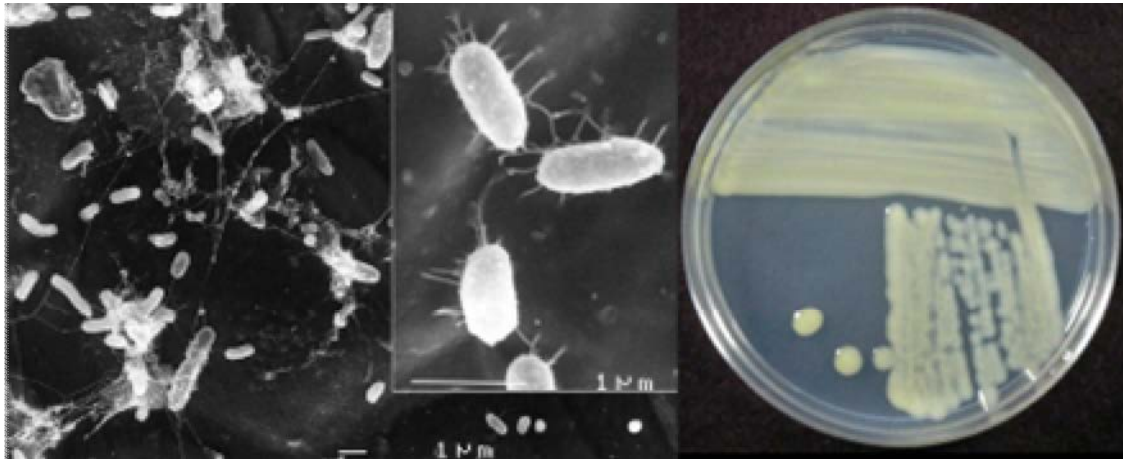


Figura 1. Morfologia micro e macroscópica da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Linke e Goldmann 2011).

2.1.1 Determinantes da virulência em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Adesinas.

Um passo fundamental na colonização do hospedeiro é a capacidade da bactéria para aderir à superfície da célula hospedeira. Os componentes da superfície bacteriana que medeiam a adesão são chamados adesinas. Adesinas bacterianas são, em geral de natureza polissacáridica, mas também podem ser proteicas tipo fímbrias-pilus (como adesinas fimbriais) ou outras proteínas de superfície (adesinas não-fimbriais) (SOTO e HULTGREN, 1999). Apesar de seu papel na virulência tem sido bem caracterizado em patógenos animais, existe pouca informação disponível sobre o papel das adesinas proteicas na patogenicidade de fitopatógenos. *X. citri* subsp. *citri* tem em seu genoma, pelo menos, um gene homólogo ao sistema de secreção tipo V TPS (Two Partner Secretion), encarregado de secretar uma proteína tipo hemaglutinina FhaB, que codifica uma proteína 4753-aa denominado XacFhaB. O gene presente a upstream do *XacFhaB*, chamado *XacFhaC* codifica uma proteína transportadora da

proteína XacFhaB. É notável que todos os resíduos que foram encontrados para ser determinante para o secretor tipo TPS em *Bordetella pertussis* também estão presentes no domínio XacFhaB TPS (HODAK et al., 2006). Num estudo feito por GOTTING et al., 2009, foi mostrado que, quando mutantes de $\Delta XacFhaB$ são inoculados na superfície foliar, eles exibem uma falta geral de adesão como pode ser observado nas provas de adesão bacteriana feitas em folhas de laranja doce tingidas com cristal violeta (Figura. 2a). Isto também leva a um menor número de lesões de cancro em comparação com a bactéria do tipo selvagem (Figura. 2b). A falta de gene *XacFhaB* também prejudica a fixação bacteriana-bactérias (agregação bacteriana); este mutante exibe lesões mais dispersas e em número menor. Contrariamente, os mutantes *XacFhaC* que codificam para a proteína transportadora XacFhaC mostram um fenótipo de virulência semelhante à infecção do tipo selvagem, sugerindo que XacFhaB poderia ser secretada também por outro parceiro diferente de XacFhaC (Figura 2). Em resumo, esta proteína de adesina não-fimbrial é crucial para as fases iniciais do processo de infecção, que permite a fixação do tecido da planta.

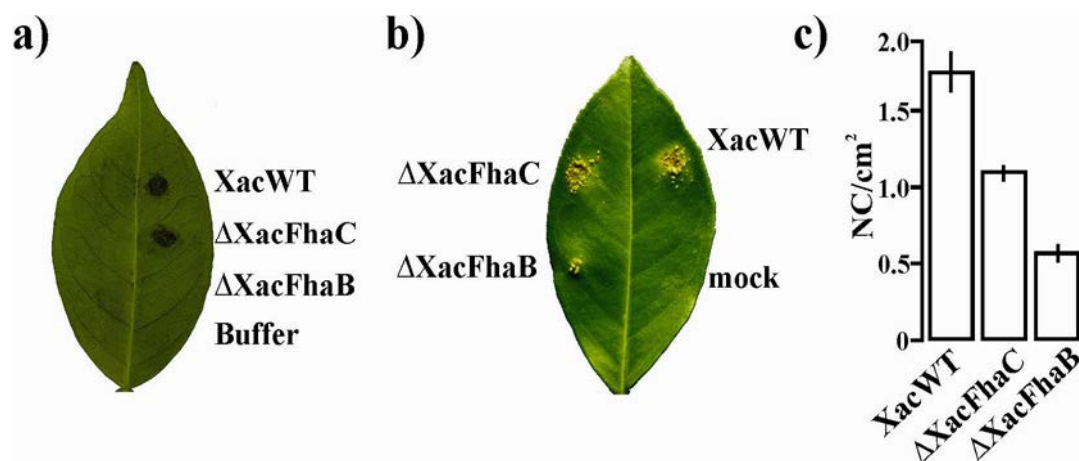


Figura 2. Provas de aderência e virulência bacteriana, mostrando a importância da expressão de XacFhaB nas fases iniciais da patogênese no estabelecimento do cancro cítrico. a) Provas de aderência na superfície biótica. b) Efeito no desenvolvimento de sintomas. c) Número de lesões por cm² (Gotting et al., 2010)

Polissacarídeo extracelular (EPS)

Muitas bactérias gram-negativas têm uma camada de EPS que é externo à

membrana exterior, mas ligado a ela. As *Xanthomonas* produzem grandes quantidades de EPS, levando ao aparecimento de muco característico das colônias. A estrutura do EPS em Xcc (comercialmente conhecido como goma de xantana) é constituído por uma cadeia repetida de um pentâmero, composta por duas moléculas de glucose e manose com uma molécula de ácido glucurônico que são, por sua vez modificado por acetilação e piruvilação (JANSSON et al.,1975).

TSENG et al. (1999) relataram que 8 loci cromossômico podem estar envolvidos na biossíntese de goma xantana. Um destes locus é o operon *gum* de Xcc que contém 12 genes, *gumB* ate *GumM*, os quais estão implicados nas primeiras fases da biossíntese e montagem das repetições de pentâmero de goma xantana (KATZENet al., 1996). Uma mutação no gene *gumD* de Xcc causou uma deficiência grave na virulência quando inoculado em seus hospedeiros (CHOU et al., 1997). A expressão na planta do operon *gum* em Xcc foi estudada usando β -glucuronidase como repórter (VOJNOV et al., 2001). Os autores descobriram que as bactérias isoladas de folhas e posteriormente inoculadas no tecido mesófilico, apresentam um aumento na expressão de genes *gum* nas fases tardias do crescimento bacteriano, sugerindo a exigência da produção de EPS nas fases posteriores da infecção.

Lipopolisacarideo (LPS)

As bactérias gram-negativas têm uma membrana interior e uma membrana exterior separadas por um espaço periplasmático. O LPS é um componente importante da membrana exterior e está presente na parte exterior da membrana. LPS é feito de uma porção lipídica chamada Lipídeo A, que está inserida na membrana externa, e de uma parte polissacarídica que está exposta na superfície bacteriana. A parte polissacarodíca faz parte do core interior e exterior e do O-polissacárido também chamado O-antígeno.

O LPS é considerado como uma das principais moléculas derivadas dos agentes patogênicos reconhecidos pelas plantas hospedeiras, a fim de armar respostas de defesa (DOW et al., 2000). O tratamento prévio de folhas com LPS (isolados a partir de qualquer Xcc ou bactérias entéricas, como *Escherichia coli*) antes da inoculação com culturas Xcc ou *Xanthomonas campestris* pv. *vessicatoria* (Xcv), suprime resposta de

hipersensibilidade (HR), altera a expressão de genes de defesa da planta e retarda o crescimento bacteriano (NEWMAN et al., 2002). Estes resultados sugerem que o tratamento anterior das plantas com LPS pode induzir respostas de defesa e limitar a propagação do agente patogênico, sem RH visível. O LPS de Xcc também tem sido demonstrado por induzir uma reação de stress oxidativo em culturas de células de suspensão da planta do tabaco (MEYER et al., 2001). A explosão oxidativa é considerada parte importante da resposta de defesa da planta contra patógenos microbianos (WOJTASEK, 1997). Vários estudos mostram que o LPS tem um duplo papel na interação planta-micróbio. É um indutor das respostas de defesa da planta e ao mesmo tempo parece estar envolvido na promoção de virulência. A última função pode originar-se a partir da sua função como uma barreira contra compostos antimicrobianos que são produzidos pelo hospedeiro. Xcc é capaz de suprimir as respostas de defesa da planta que são induzidos por LPS. A maneira pela qual estas bactérias provocam a supressão da resposta de defesa induzido por LPS não é clara, mas acreditasse que pode ser provocada por efetores secretadas através do sistema de secreção bacteriana tipo III.

Aparelho flagelar

Os flagelos são estruturas filamentosas ligadas à superfície da célula bacteriana que ajudam na motilidade. Muitas bactérias detectam a presença de determinados produtos químicos no meio ambiente e apresentam movimento quimiotático com o auxílio dos seus flagelos. A motilidade é considerada um fator importante para patogenicidade em diversas bactérias (JOSEPHANS e SUERBAUM, 2002). A análise das sequências do genoma de Xcc revela a presença de um conjunto completo de genes necessários para a síntese, regulação e quimiotaxia do aparelho flagelar. Em Xcc estes genes estão presentes em quatro agrupamentos de genes que totalizam a um comprimento de 150 Kb em seus genomas (DA SILVA et al., 2002).

A bactéria Xcc têm 8 cópias quase idênticas de um gene da proteína *Methyl-accepting chemotaxis* (MCP). Em adição a isto, Xcc tem vários parálogos de MCP distribuídos aleatoriamente ao longo do genoma. Este tipo de conteúdo genético sugere um papel muito importante para os genes de motilidade na biologia, e, possivelmente

O pigmento

Os membros do grupo das bactérias *Xanthomonas spp* produzem o pigmento polieno aril, amarelo, localizado na membrana externa, chamado xanthomonadinas. Um grupo de genes (*IgA -PIGG*) necessários para a biossíntese de pigmentos foi primeiro clonado a partir de *Xanthomonas campestris* spv. *campestris*. O fenótipo deficiente na produção de pigmento, causado por mutações em um dos genes, *PIGB*, parece ser devido à perda de produção de uma feromona chamada de DF (fator difusível). Este fator é necessário para os níveis normais de pigmentação assim como à formação de EPS (POPLAWSKY e CHUN., 1998).

Os mutantes no gene *PIGB* foram incapazes de sobreviver na superfície das folhas, e também a infecção de folhas de couve-flor foi severamente reduzida, quando a infecção foi através dos hidatódios, embora o mesmo mutante *PIGB* tem sido tão virulento como a cepa do tipo selvagem após inoculação por um ferimento na folha, indicando que a feromona DF é necessária para a infecção epifítica, mas não é obrigatório para o crescimento dentro da planta hospedeira, o que indica que xanthomonadina não é necessária para o crescimento dentro da planta hospedeira (POPLAWSKY et al., 2000).

Sistema de secreção tipo I (T1SS)

Em bactérias Gram negativas, o sistema de secreção tipo I (T1SS) está envolvido na exportação de proteínas através das duas membranas bacterianas para o ambiente extracelular (HOLLAND et al., 2005). O T1SS é composto de: um transportador ABC (adenosinebindingcassete), que fornece energia para o transporte por hidrólise de ATP e forma um canal através da membrana interna, uma proteína de membrana de Fusão (MFP), que se estende desde o periplasma até a membrana externa, e de uma proteína de membrana externa, chamada TolC/OMP que completa o canal e forma o poro de saída do substrato como é mostrado na Figura 3 (HOLLAND et al., 2005). Em Xcc ainda não é definitivamente caracterizado o papel na virulência do TS1, DELEPELAIRE et al., (2004), mostraram que uma proteína de 66.000 Da é transportada por TSS1 e tem uma função de muraminidase.

A análise da sequência do genoma revelou que algumas *Xanthomonas sp.* estão equipadas com um (*X. oryzae*pv. *oryzae*, *X. oryzae*pv. *oryzicola*) ou dois (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri* subsp. *citri*) aparelhos de secreção T2SS, que são codificados por clusters de genes *xcs* e *xps*. Até agora, as mutações que afetam a virulência bacteriana apenas foram mapeadas para o grupo de genes *xps*. As proteínas segregadas pelos sistemas XPS-T2S de *Xcc* e *X. campestris* pv. *campestris*, incluem enzimas de degradação, tais como celulasas, lipases, celobiosidases, xilanases, endoglucanases, poligalacturonases e proteases (DOWet al., 1987; LUet al.,2008).

Resultados indicam que mutações individuais em genes que codificam para proteínas secretadas por T2S, têm efeitos ligeiros na virulência e, que mais do que uma mutação nos genes que codificam para dois as mais proteínas secretadas pelo sistema T2SS, leva a efeitos mais graves sobre a virulência. Isso sugere que há redundância funcional entre as proteínas secretadas pelo sistema T2SS. A redundância pode surgir do fato de que as proteínas individuais secretadas por T2S, têm como alvo diferentes componentes da parede celular das plantas, a incapacidade de degradar só um desses componentes pode não afetar seriamente a virulência. A redundância também pode surgir do fato de que *Xanthomonas sp.* pode produzir múltiplas iso-formas de várias enzimas degradantes da parede celular. A análise da sequência do genoma prevê a presença de sete celulasas, quatro xilanases e duas liases de pectato, para ser codificadas no genoma de *Xcc* (DA SILVA et al., 2002).

Sistema de secreção tipo III e seus efetores (T3SS)

As bactérias patogênicas empregam o aparelho de transporte T3SS, assim chamada agulha, para fornecer fatores de virulência (efetores), diretamente nas células hospedeiras. Inicialmente, o T3SS foi identificado e estudado em bactérias patogênicas de origem animal, como *Yersinia*sp, *Shigella*sp e *Salmonella*sp, onde foram encontrados a secretar em células hospedeiras uma série de determinantes de virulência chamados Yops (YersiniaOuterProteins), Ipas (InvasionPlasmidAssociated-Protein) e Sips (SalmonellaInvasionProteíns). Estudos anteriores relataram a presença

de um homólogo de T3SS em *Ralstonia solanacearum*, um agente patogênico de plantas da família *Solanaceae*, bem como entre vários outros fitopatogênicos, incluindo *Xcc* (GOUGH et al., 1992). Como em outras bactérias fitopatogênicas genes que codificam componentes do T3SS em *Xcc* estão organizados em clusters (DA SILVA et al., 2002). Mutações nestes genes resultam na perda de patogenicidade nas plantas hospedeiras e na perda da resposta de hipersensibilidade nas plantas não hospedeiras (BONAS et al., 1991).

Cerca de nove genes neste cluster são referidos como *hrc* (resposta de hipersensibilidade conservado) incluindo-se genes conservados entre bactérias patogênicas de animais e vegetais. Mutações nestes genes resultam na perda de patogenicidade em hospedeiros e HR sobre a não hospedeiros. Homólogos destes genes que não estão presentes em bactérias patogênicas animais são referidos como genes *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade). Os genes que codificam para as T3S foram encontrados por ser, de um modo geral, funcionalmente conservado e relacionado com o aparelho flagelar (BOGDANOVE et al., 1996; VAN GIJSEGEM et al., 1995). Estruturalmente conservados chaperonas do T3SS também desempenham um papel importante na secreção regulada (KARLINSEY et al., 2000).

Um dos principais efetores transportado pelo sistema T3SS em *Xcc* pertencem à família AvrBs3/PthA. Esses efetores contêm domínios funcionais característicos de ativadores de transcrição eucarióticos e são assim chamados de TALE (Transcription Activators Like Effector) (YANG et al., 2006). Em particular TALE contem um domínio de repetição central que reconhece o DNA do hospedeiro de uma forma altamente específica (KAY et al., 2007). Cada unidade de repetição contém 34 aminoácidos, com 12 e 13 aminoácidos hipervariáveis VRD (Variable repeat diresidue) (Figura 4). Assim, a composição e arranjo dos diferentes VRDs dotam os TALEs com uma enorme capacidade de reconhecimento do DNA hospedeiro, e se ligando com um elevado grau de especificidade a uma região específica no promotor do gene alvo conhecida como EBE (Effector Binding Element).

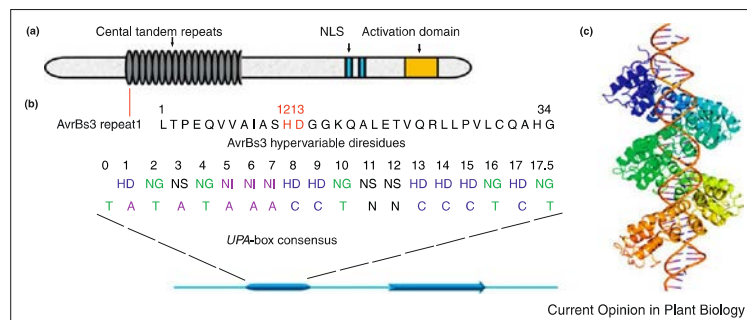


Figura 4. (a) Representação esquemática do AvrBs3 em *Xcc*. (b) Sequência dos aminoácidos (c) Estrutura cristalizada do TALE unido a o DNA do hospedeiro. (FengFengandJian-Min Zhou 2012).

Xcc contém quatro genes TALE (*pthA*), dos quais *pthA4* é conhecido por ser necessário para a formação de pústulas características das lesões cancrosas. Hipoteticamente o TALE de *Xcc* codificado por *pthA4* induzem um gene no hospedeiro que resultam na formação de pústulas. As investigações feitas por YANG HU et al., (2014), sobre a expressão gênica no hospedeiro sob o efeito do TALE, codificado pelo gene *pthA4*, revelou um notável e constante sondagem por espécies de *Xanthomonas* em busca de vulnerabilidades na fisiologia do hospedeiro. Com base nos resultados, foi proposto que a formação de pústula envolve o recrutamento e expressão de um único gene no hospedeiro chamado de CsLOB1. A indução deste gene por conta do efector TALE codificado por o gene *pthA4*, foi confirmada em duas espécies hospedeira para *Xcc* diferentes: laranja doce e uva (YANG HU et al., 2014). Embora as funções específicas de CsLOB1 são desconhecidas, estudos prévios revelaram que as proteínas de domínio LOB (Lateral Organ Boundaries) estão envolvidos na regulação do desenvolvimento de órgãos lateral, metabolismo do nitrogênio e antocianina, e respondem a hormônios vegetais: auxina, citocinina, giberelina, além de respostas a estímulos ambientais (MAJER, 2011).

Sistema de secreção tipo IV.

O aparelho translocador designado como o sistema de secreção de tipo IV (T4SS) é um fator de virulência importante em certas bactérias patogênicas de animais

e vegetais, envolvendo a secreção de proteínas ou DNA nas células hospedeiras (CASCALES e CHRISTIE, 2003). O T4SS se estende a partir da membrana interior bacteriana, através do periplasma e termina na membrana externa numa estrutura tipo pilus, que se projeta a partir da superfície da célula bacteriana (Figura 3). Entre os diferentes fitopatógenos numerosos estudos sobre o lócus *virB* de *Agrobacterium tumefaciens*, revelaram que 11 proteínas compreendem o aparelho T4SS (ZHU et al., 2000). *Xcc* tem dois grupos de genes que podem cada um potencialmente codificar componentes do T4SS: um no cromossoma e o outro no plasmídeo, pXac64 (DA SILVA et al., 2002).

O aparelho T4SSs é composto de um conjunto de core de 12 proteínas, chamado de VirB1-VirB11 mais VirD4. A organização estrutural só até agora está sendo elucidado em: (i) um conjunto de três ATPases citoplasmáticas (VirB4, VirB11 e VirD4) que energizam o processo de secreção; (ii) um complexo core periplasmático constituído por 14 repetições do trímero VirB7-VirB9-virB10, em que virB10 se insere nas membranas interna e externa, e VirB7 é uma lipoproteína de membrana externa; (iii) um complexo de membrana interna que inclui VirB3, VirB6 e VirB8 (iv) um pilus extracelular formada por VirB2 e VirB5; e (v) o VirB1 que é uma transglicosilase periplasmática (LOW et al., 2014). Uma das características que diferenciais em *Xcc* é que produz uma proteína chamada VirD4 (VirD4XAC2623), esta proteína interage com um conjunto de proteínas não caracterizadas chamadas de *Xanthomonas VirD4-interacting protein* (XVIPs). Um recente estudo feito por SOUZA et al., (2015), mostraram que as proteínas XVIPs ou x-Tfes (XAC 2609) secretadas pelo aparelho transportador T4SS de *Xcc*, são toxinas que matam outras bactérias no habitat, sendo o alvo destas proteínas o peptidoglicano que faz parte da parede celular bacteriana.

O peptídeo natriurético (PNP)

Xcc, mas nenhuma outra bactéria fitopatogênica, tem um gene que codifica para um peptídeo natriurético semelhante à da planta (XacPNP) (Gotting et al., 2008), que se expressa durante a infecção de *Xcc* no hospedeiro. Nas plantas superiores, PNP provoca uma série de respostas que contribuem para a regulação da homeostase e

[illegible]

de deleção inoculado a mesma concentração da estirpe selvagem (Gottinger et al., 2010).

2.2 Cancro cítrico

Uma das mais importantes doenças dos citros é o cancro cítrico, afetando quase todos as espécies cítricas. A doença provoca extensos danos à citricultura e a gravidade da infecção varia de acordo com as diferentes espécies bacterianas e com as condições climáticas prevalecentes. A origem geográfica do cancro cítrico é uma questão de controvérsia. LEE et al., (1918) relatou que o cancro cítrico pode ter surgido no sul da China. No entanto, de acordo com FAWCETT e JENKINS (1933) a doença teve sua origem em regiões da Índia e Java. Esses relatos sugerem, portanto, que a origem da doença tenha ocorrido nas áreas tropicais da Ásia, onde se presume que as espécies cítricas tenham se originado e sido distribuídas para outras áreas por meio de material de propagação vegetativa (DAS, A.K 2002).

Na América, o primeiro relato da doença ocorreu em 1915 nos EUA (DOPSON 1964), sendo que, no Brasil o cancro cítrico foi observado em 1957 no município de Presidente Prudente (SP) (BITANCOURT, 1957). No ano de 1979 foi detectado o primeiro caso de ocorrência da doença no município de Monte Alto (SP), área tradicional de cultivo de citros (SANTOS, 1991). Atualmente, cancro cítrico ocorre em mais de 30 países da Ásia, ilhas do Oceano Índico e Pacífico, América do Sul e Sudeste dos EUA (DAS, A.K 2002). Produtos à base de cobre são usados rotineiramente como medida de controle padrão para o cancro cítrico. Cobre reduz populações bacterianas na superfície das folhas e múltiplas aplicações são necessárias para alcançar o controle adequado no campo. Em condições de vento e chuva, a eficácia das aplicações de cobre é bastante reduzida. As desvantagens do uso a longo prazo de compostos de cobre para controlar patógenos de plantas no campo incluem a seleção de resistência ao cobre e por transferência horizontal nas populações bacterianas (RYAN et al., 2007).

Ciclo da doença e mecanismos de transmissão

A bactéria se propaga em lesões nas folhas, caules e frutos. Quando existe umidade alta sobre as lesões, as bactérias são exsudadas para o exterior do tecido mesofílico e podem ser dispersas para outras folhas e plantas. A água da chuva coletada de folhagem com lesões contém entre 111 a 118 ufc/mL (STALL et al., 1980).

Chuva com vento é o principal agente de dispersão natural, as larvas do inseto minador dos citros causam extensos ferimentos nos tecidos folhares e ampliam enormemente a disseminação da doença (DAS, A.K 2002).

21

Formas da doença

Existem três formas diferentes de cancro cítrico causadas por duas espécies de *Xanthomonas*: cancro cítrico tipo A, B e C. A diferenciação dessas formas é baseada principalmente na distribuição geográfica e gama de hospedeiros do patógeno, (STALL e SEYMOUR, 1983). A forma asiática de cancro (cancroses A) é causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2005) é a mais comum e generalizada. A sua distribuição geográfica continua em aumento. A doença é endêmica em mais de trinta países: a Ásia, no pacífico da Índia, Paquistão, as ilhas do Oceano Índico, Sudeste Asiático, e ilhas do Oceano Índico, na América do Sul, e do Sudeste da China e Japão. Xcc tem um ampla faixa de hospedeiro, causando a doença na grande maioria das espécies cítricas: *C. paradisi*, *C. aurantifoli*, *C. sinensis* e *C. reticulata*. A cancrose tipo B, causada pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifoli* tipo B (XauB) (MOREIRA et al., 2010), tem sintomas similares aos sintomas presentes no cancro A, mas os sintomas demoram mais tempo em aparecer como consequência do crescimento mais lento de XauB, a faixa de hospedeiro está restrito a *C. limon*, mas também tem sido isolado esporadicamente de *C. sinensis* e *C. paradisi* (NAMEKATA T. 1971; CIVERLO E.L 1984). A cancrose tipo B, foi inicialmente isolada na Argentina, mas até hoje tem sido reportados casos de doença também no Uruguai e Paraguai (CIVERLO, E.L, 1984). A cancrose tipo C só tem sido identificada no estado de São Paulo, Brasil (MALAVOLTA et al., 1984) e tem os mesmos sintomas que o cancro cítrico tipo A, é causada por *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifoli* tipo C (XauC) tem como principal hospedeiro a *C. aurantifoli* (MOREIRA et al., 2010).

Sintomatologia

As plantas doentes são caracterizadas pela ocorrência de lesões necróticas conspícuas levantadas que se desenvolvem em folhas, galhos e frutos. Nas folhas, a primeira aparição são manchas circulares de 2-10 mm de diâmetro, seu aspecto é

oleoso e geralmente aparecem na superfície abaxial refletindo entrada estômatal, as lesões são muitas vezes de forma e tamanho semelhante. Mais tarde, ambas as superfícies epidérmicas podem tornar-se rompidas por hiperplasia de tecido induzida pelo patógeno. Nas folhas, caules, espinhos e frutas, lesões circulares tornaram como bolha levantada, crescendo em pústulas esponjosas brancas ou amarelas. Estas pústulas então escurecem e engrossam, semelhantes a rolha de cor marrom, que são ásperas ao toque. Muitas vezes, uma margem de água encharcada desenvolve ao redor do tecido necrosado e é facilmente visualizado com luz transmitida (Figura 6)

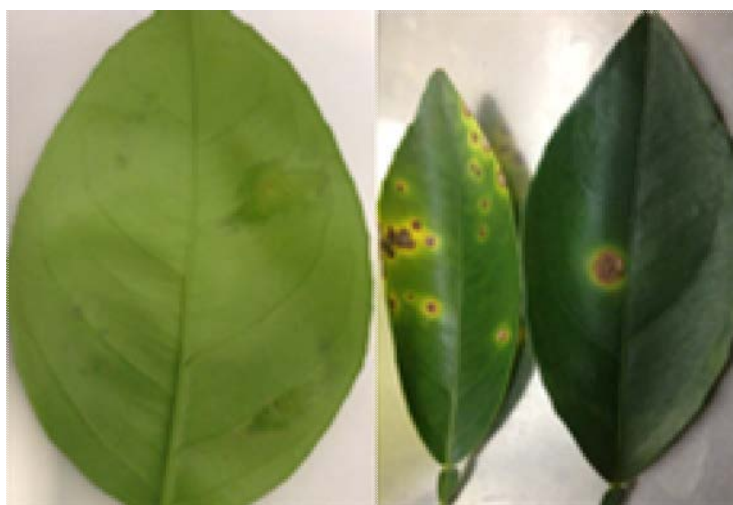


Figura 6. Sintomas característicos do cancro cítrico. Esquerda, fase inicial da doença, direita, hiperplasia e ruptura do tecido folhar.

2.3 Quórum sensing generalidades

Entender os comportamentos altruístas, como aquelas ações que aumentam a adaptação de um outro indivíduo, a um custo próprio, é um dos maiores desafios para os biólogos evolucionistas, pois a seleção natural parece favorecer indivíduos egoístas e não cooperativos (HAMILTON, 1963). Apesar disso, há muitos exemplos no reino animal, onde esta forma de cooperação foi demonstrada com sucesso. No entanto, só recentemente é que o comportamento social em microrganismos tem sido estudada em relação à teoria evolutiva (CRESPI, 2001)

Ao longo das duas últimas décadas, a nossa compreensão do comportamento

microbiano passou por uma mudança paradigmática, esta mudança baseia-se no fato de se reconhecer que os organismos unicelulares simples não são células isoladas, porém, estão dotados de uma extraordinária capacidade de comportamento social cooperativo. Consequentemente, a comunicação e o trabalho em equipe são tão importantes como a concorrência na corrida para colonizar novos nichos, explorar os recursos alimentares disponíveis, e combater as defesas do hospedeiro (GALLIO et al., 2002). Alguns exemplos do comportamento cooperativo bacteriano envolvem aspectos defensivos, nutricionais e reprodutivos (Tabela 1).

Tabela 1. Características sociais exibidos pelas bactérias

comportamento cooperativo	Benefícios do grupo	Microorganismos exemplo
Comunicação química Quorum Sensing	comportamento populacional coordenado	<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , etc.
Formação do biofilme	Proteção de condições ambientais adversas	muitas espécies bacterianas grampositivas e gramnegativas
fixação de nitrogênio: comportamento mutualista	disponibilidade de nutrientes e proteção em nódulos	<i>Rhizobium</i> spp
procura de alimento/caça	crescimento e colonização melhorados, por vezes, em nichos especializados	Produção de sideróforos para aquisição de ferro em muitas espécies bacterianas
Resistencia a os antibióticos	produção de enzimas extra-celulares tipo B lactamases, para quebrar os antimicrobianos	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp

Esse talento para o comportamento multicelular cooperativo depende da implantação e reconhecimento de moléculas sinalizadoras difusíveis através de um sistema conhecido como Quórum Sensing (QS). Funcionalmente o QS é um mecanismo de tradução de sinal para coordenar a expressão de genes a nível populacional (WILLIAMS et al, 2007). QS é um mecanismo sofisticado de comunicações célula-célula, que permite as bactérias responder em concordância com sua densidade populacional, mediante a produção, detecção, acumulação e resposta a moléculas de sinalização difusíveis que são exportadas por elas a seu ambiente. Essas moléculas sinalizadoras difusíveis são chamados auto-indutores (AI) (FUQUA e GREENBERG, 2002; BASSLER e LOSICK, 2006).

Os AI mediam o sistema de QS. Os diversos AI são sintetizados intracelularmente pelas bactérias durante todo seu crescimento e são constantemente liberados para o meio ambiente próximo; consequentemente, os AI normalmente se acumulam em proporção à densidade celular da população bacteriana (BASSLER e LOSICK, 2006); uma vez que a concentração extracelular de AI atinge um determinado nível de limiar (no ponto em que a população é considerado 'quórum'), e percebido pelo receptor cognato e uma cascata de tradução de sinal é disparada levando a alterações na população em geral (Figura 7). A expressão de genes regulados por o sistema QS e o início de comportamentos cooperativos que beneficiam a comunidade como um todo (MCINNIS e BLACKWELL, 2011).

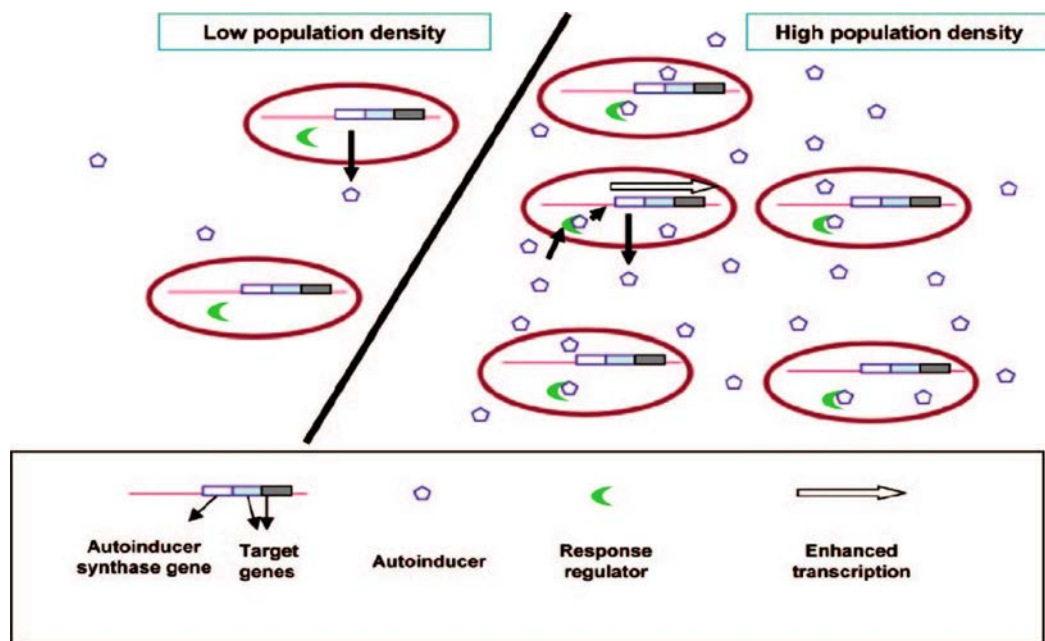


Figura 7. Representação esquemática do quórum sensing bacteriano (Gonzales e Keshavan 2006).

2.3.1. Tipos de quórum sensing bacteriano.

Entre as diferentes espécies bacterianas existe uma variação em um ou mais aspectos deste processo de sinalização, isto é, a natureza exata dos AI, os receptores para os AIs, os mecanismos de tradução de sinal, e as consequências fenotípicas (WATER e BESSLER 2008). Uma notável variedade de moléculas de sinalização funcionam como sensores locais para comunicar a densidade populacional das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Estes sinais moleculares e os seus receptores são agrupadas em até quatro sistemas QS

Auto-indutores Tipo 1 N-acilhomoserinelactona (AHL)

O sistema de auto-indutor do tipo 1 é amplamente usado em vários gêneros de bactérias Gram-negativas, definida pela primeira vez em *V. fischeri* (BEUTLER et al.,2006). AHL é uma molécula sinalizadora altamente solúvel e difusível, a família de moléculas AHL varia no comprimento da cadeia *acil* (4 até 18 carbonos), grau de saturação e número de oxigênio substituídos. O gene *luxI* ou os seus homólogos codificam as sequências que medeiam a formação da molécula de sinalização AHL. O receptor de AHL é codificado pelo gene *luxR*, o produto traduzido é a molécula do receptor LuxR. Em *V. fischeri*, o resultado final é a bioluminescência; para determinadas bactérias patogênicas, o produto final é a ativação de muitos fatores de virulência (WILLIAMS, 2007)

Auto-indutores Tipo 2. Sistema luxS/luxQ

Uma segunda via de QS foi descoberto inicialmente no sistema de bioluminescência em *V. harveyi* e é mediada pelos lócus do gene *luxS/luxQ* (Bassler 2002). Elementos do sistema de auto-indutor tipo 2 (AI-2) são detectáveis em cerca da metade de todos os genomas bacterianos sequenciados, e este sistema é agora reconhecido como o sistema de sinalização mais ubíquo empregado pelas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. AI-2 é descrito como uma molécula de sinal global para comunicação interespecies (HERMANN 2007). A sinalização do tipo AI-2 é envolta na regulação da bioluminescência em *V. harveyi*, sistema de secreção de proteínas tipo III em *Escherichia coli* O157: H7, o fator de virulência VirB em *Shigella flexneri*, e mais

de 400 genes, tal como indicado por análise de micro arranjos realizados com estirpes de *E. coli* (DELISA et al., 2001). O papel exato da sinalização mediada por IA-2 na patogênese bacteriana não é clara, mas acredita-se que atividade de transcrição regulada por os sistemas AI-2 esta focada na regulação das vias metabólicas (ZHAO et al., 2010).

Auto-indutores Tipo 3

Este sistema QS recém-descoberto é talvez a mais complicada de todas as vias de sinalização até agora descobertos. O tipo auto-indutor 3 (AI-3) compartilha muitas características com o sistema AI-2, já que usa um sistema de dois componentes, um receptor quinase intracelular complexo de sinalização para ativar genes do virulome. No entanto, em contraste com a AI-2, o sistema de IA-3 pode utilizar hormônios de stress humano: epinefrina ou norepinefrina para sinalizar o sistema (KENDALL et al., 2007). O sistema de sinalização AI-3 é essencial na patogênese de *E. coli* enterohemorrágica e *Shigella*. Os componentes da via de sinalização da AI-3 foram detectados em estirpes de *E. coli* enteropatogênicas, de *E. coli* comensais e um número de outros organismos entéricos, Gram-negativos, mas, até agora, não foi detectado em bactérias Gram-positivas (KENDALL et al., 2007).

Peptídeos curtos sinalizadores. Sinalização nas bactérias Gram-positivas (AIP)

Uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas são também conhecidas por empregar sistemas quórum sensing. A natureza das moléculas de sinal utilizadas nestes sistemas difere da de organismos Gram-negativos. Muitos sistemas de sinalização célula-célula em bactérias Gram-positivas usam peptídeos modificados como sinais para regular funções como virulência: sistema *agr* em estafilococos (Jlet al., 1995) e sistema FSR em enterococos (HAASE et al., 2002), competência: sistema com no bacilos, e produção bacteriocinas: sistemas *pin* e *ssp* em bactérias ácidoláticas (HAMOEN et al., 2003).

A maioria dos peptídeos auto-indutores (AIP) são gerados por clivagem de peptídeos precursores maiores, e modificações subsequentes, incluindo substituição com grupos isoprenilo e formação de anéis lactona e tiolactona (ANSALDI et al., 2002).

A liberação de AIP a partir da célula requer um exportador de oligopéptidos dedicado, enquanto que a percepção do sinal é mediada por um sensor quinases de histidina, localizado na membrana citoplasmática. Muitas bactérias Gram-positivas se comunicam com vários AIP em combinação com outros tipos de sinais de quórum sensing. Em alguns casos, o AIP pode ser reconhecido, não só pela sua espécie cognata, mas também por diferentes estirpes da mesma ou de espécies relacionadas (THOENDEL e HORSWILL 2010).

2.4 Quórum sensing em *Xanthomonas citri* autoindutor DSF

Além dos sistemas QS acima mencionados, o sistema fator sinalizador difusível (DSF) foi originalmente identificado em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (BARBER *et al.*, 1997), mostrou-se comum na maioria de espécies do gênero *Xanthomonas* e representa um outro tipo de sistema de sinal QS, amplamente distribuído e encontrado em diferentes bactérias Gram-negativas fitopatogênicas e patogênicas oportunistas em humanos; *Xyllela fastidiosa*, *Burkholderia cenocepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*, entre outras (HE e ZANG 2008; RYAN *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2009).

A detecção da atividade da molécula DSF foi relatada pela primeira vez há mais de duas décadas pelo grupo de pesquisa de MJ Daniels (TAN *et al.*, 1991), analisando um cluster de genes em *X. campestris* chamado *rpf* (regulação dos fatores de patogenicidade). Verificou-se que a atividade da protease e endoglucanase no mutante Δrpf , poderia ser restaurada quando foi cultivada na proximidade do seu tipo parental selvagem (BARBER *et al.*, 1997). Este resultado levou à especulação de que o tipo selvagem *X. campestris* poderia produzir um fator sinalizador difusível (DSF) que induziu a produção da protease e endoglucanase e que a enzima codificada pelo gene *rpf* estava associada com a biossíntese do DSF. O bioensaio para a comprovação de DSF, baseado em atividade da protease utiliza uma placa de ágar NA suplementada com leite em pó, em que a molécula DSF produzida por *X. campestris* de tipo selvagem difunde até proximidade de um mutante no gene *rpf* de *X. campestris* que tinha

perdido a atividade proteolítica e restaura a atividade proteolítica nestes mutantes (Figura 8).



Figura 8. Ensaio original de Barber et al., 1997. Demonstrando a capacidade do DSF para restaurar a atividade proteolítica no mutante $\Delta rpfF$ de *Xanthomonas campestris*.

Métodos de detecção da atividade DSF de segunda geração são baseados no design do bio-reporter. Tipicamente, o promotor de um operon DSF indizível *engXCA* é fundido com um gene reporter *gusA* ou *gfp* sem promotor que codifica a glucuronidase (GUS) o Green Fluorescence Proteína (GFP). Em seguida, a cassete *engXCA-gusA* ou *engXCA-gfp* são clonados num vector de larga gama de hospedeiros, e o plasmídeo resultante é mobilizado para uma espécie particular de *Xanthomonas* para gerar estirpes DSF bioreporters

Família de moléculas auto-indutoras DSF

Como foi descrito acima, o auto-indutora (AI) DSF descoberto em *X. campestris* foi caracterizado como o ácido *cis*-11-metil-dodecenóico (BARBER et al., 1997). A ligação dupla *cis*-insaturados na posição 2 é uma característica estrutural chave para a atividade. Este motivo é considerado como a assinatura para a família de DSF (Figura 9). Além disso, acredita-se que a ramificação metilo desempenha um papel importante na sinalização. Por exemplo, os ácidos não ramificados *cis*-2-dodecenóico e *cis*-2-tridecenóico são entre 60 e 120 vezes menos ativos do que *cis*-11-metil-dodecenóico DSF (RYAN e DOW, 2011).

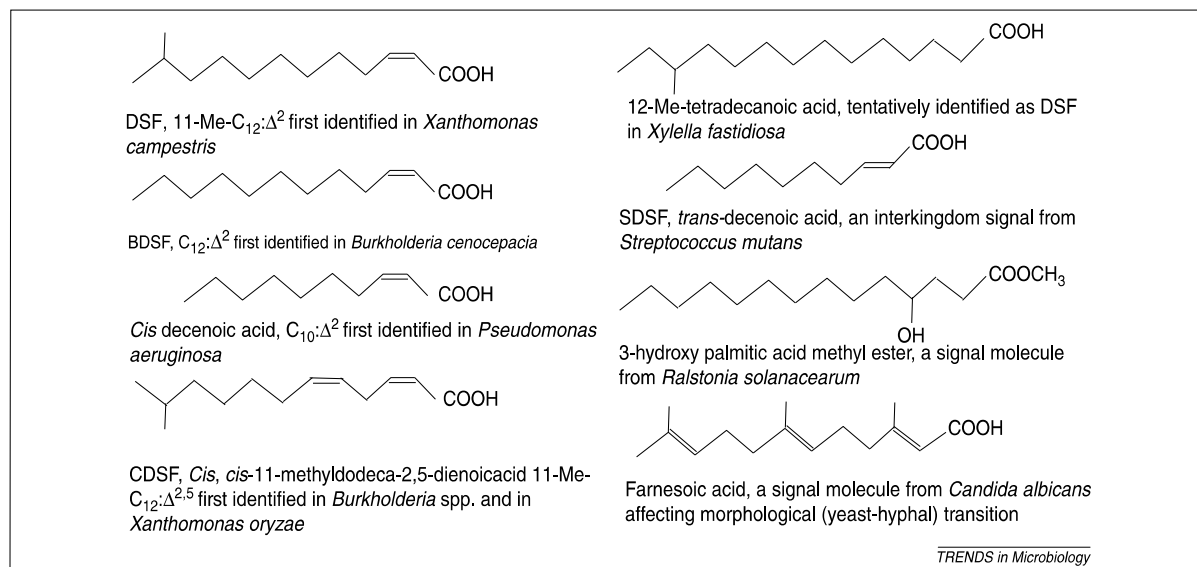


Figura 9. Estrutura da família DSF e moléculas sinalizadoras relacionadas numa variedade de bactérias que usam estas moléculas como autoindutores. (Ryan e Dow, 2011).

Evidência de que a comunicação célula-célula que envolve sinais da família DSF não se restringe as *Xanthomonas*, veio da identificação do ácido cis-2-dodecenóico (C₁₂) chamado BDSF, isolado do sobrenadante da cultura do patógeno humano *Burkholderiacenocepacia*, e da identificação de um fator responsável pela dispersão do biofilme em *Pseudomonasaeruginosa* caracterizado como ácido cis-2-decenóico (C₁₀). Moléculas AI relacionadas como SDSF e BDSF tem atividade sinalizadora interespecies e inter-reinos por exemplo; a molécula BDSF produzida por *Burkholderiacenocepacia*, patógeno oportunista causante da fibrose quística em pacientes imunocomprometidos, é capaz de ativar as respostas dependentes da DSF em *X. campestris* e de inibir a formação de tubo germinativo em *candidaalbicans*, sugerindo um eficiente rol na comunicação interespecies e inter-reinos (BOONet al., 2008).

Componentes do quórum sensing DSF em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

DSF Sintetase

30

A biossíntese de autoindutor DSF em Xcc é dependente dos genes *rpfF* e *rpfB*, que estão localizados ao lado do outro no cluster de genes de RPF. Estes dois genes codificam respectivamente uma putativa hidratase enoil-CoA (RpFF) e uma putativa acil-

CoA ligase de ácido graxo de cadeia longa (RpfB) (Barberet *et al.*, 1997). O mecanismo de produção da família sinalizadora DSF parece estar amplamente conservado. Além do RpfF em *Xcc*, o papel dos homólogos *rpf* na síntese DSF foi igualmente estabelecido em outras espécies bacterianas tais como *B. cenocepacia*, *X. oryzae*, *Xy. fastidiosa*, *S. maltophilia*, e *X. axonopodis* (BOOMet *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2010). Análise *in silico* predito que *rpfF* e *rpfB* codificam uma putativa enoil-CoA hidratase e uma putativa acil-CoA ligase de ácido graxo de cadeia longa. No entanto, os seus mecanismos catalíticos e substratos correspondentes, assim como os produtos da reação requerem mais investigações. Uma análise recente da estrutura cristalizada de RpfF tem mostrado que é estruturalmente semelhante aos membros da superfamília crotonase (CHENG *et al.*, 2010). Alinhamento de sequências e análise estrutural resultou na identificação de dois resíduos putativos catalíticos de glutamato (Glu141 e Glu161), que são conservados nas enoil-CoA hidratase/ desidratase. Como foi demonstrado por CHENG *et al.*, (2010), a substituição destes dois resíduos em RpfF aboliu completamente a produção DSF, ressaltando o seu papel crítico na biossíntese de DSF (Figura 10).

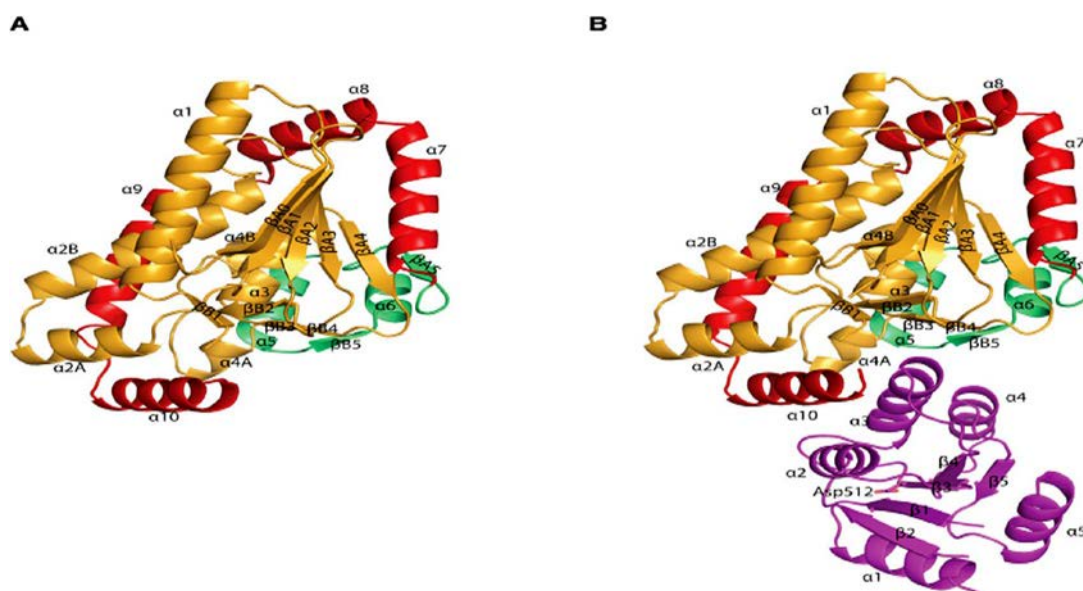


Figura 10. Estrutura do RpfF A) isolado, B) acoplado ao domínio REC de RpfC. (Cheng *et al.*, 2010).

Análises bioinformáticas predizem que o domínio de entrada sensorial no receptor RpfC compreende cinco hélices transmembranares, com loops citoplasmáticos e periplasmáticos, com menos de 20 aminoácidos. Os resíduos responsáveis pela ligação

DSF ainda não são conhecidos. Acredita-se que a ligação do sinal ativa a autofosforilação de RpfC dentro do domínio da histidina-quinase, seguida por a transferência de fosfato num resíduo de ácido aspártico no domínio REC e um resíduo de histidina no domínio HPT, e finalmente a transferência do grupo fosfato para o domínio REC do regulador RpfG (Figura 11a). Estes resultados demonstraram que o receptor RpfC utiliza um mecanismo de fosfo-transferência conservada para traduzir o sinal de DSF quando modula a produção dos fatores de virulência (DENG et al., 2011).

Embora os resíduos de aminoácidos conservados do RpfC implicados no phosphorelay são essenciais para a produção de enzimas extracelulares e EPS, eles não são necessários para uma segunda função do receptor RpfC: a repressão da biossíntese de DSF (Figura 10b). As evidências disponíveis sugerem que este último efeito é mediado por interações proteína-proteína entre o domínio REC do receptor RpfC e a sintase de DSF RpfF (CHENG et al., 2010). O sequestro de RpfF desta maneira poderia restringir a síntese de DSF, a liberação de RpfF é o resultado das mudanças na conformação em RpfC quando o DSF é percebido, a ligação do DSF com RpfC poderia atuar como um mecanismo para permitir uma rápida autoindução da síntese de DSF (HE et al., 2006). O receptor RpfC tem assim, uma dupla função na sinalização; com o processo de phosphorelay controla a síntese de enzimas extracelular e EPS, e na interação com o RpfF controla a síntese de DSF. Este último mecanismo adiciona uma dimensão aos paradigmas convencionais nos sistemas de sinalização de dois componentes (CHENG et al., 2010).

RpfG Regulador da virulência, formação de biofilme e resistência antibiótica.

RpfG é o regulador da cascata de sinalização DSF. Tem um domínio receptor CheY-like (REC) ligado a um domínio de HD-GYP com actividade fosfo-diesterase, o qual atua na degradação do segundo mensageiro di-GMP cíclico (Figura 12). A percepção do DSF em *Xcc* por RpfC está ligada a fosforilação do domínio HD-GYP do regulador RpfG e a consequente alteração nos níveis intracelulares de segundo mensageiro di-GMP cíclico (RYAN et al., 2008a). Diferentes caminhos, então agem para controlar diferentes funções de virulência regulados pelo cluster *rpf*. A interação física

de RpfG com duas proteínas que tem um domínio diguanylatociclase (GGDEF) resulta no controle da motilidade, mas não influencia a síntese das enzimas extracelulares ou, a formação de biofilme (RYAN et al., 2010). Estas interações proteína-proteína exige o motivo GYP conservado no domínio de HD-GYP RpfG e são dependentes da sinalização DSF. O efeito do RpfG na síntese de enzimas extracelulares e a formação de biofilmes poderia ser exercida através das influências sobre o di-GMP cíclico no ativador transcripcional global *Clp* (Cyclic AMP-receptor protein-like-protein) (TAO et al., 2010). A ligação de di-GMP cíclico no ativador transcripcional *Clp*, ocorre a níveis fisiologicamente relevantes do di-GMP cíclico, e tem como resultado a inibição da ligação de *Clp* a o promotor do gene *engXCA*, que codifica para a principal endoglucanase em *Xcc* (Figura 12).

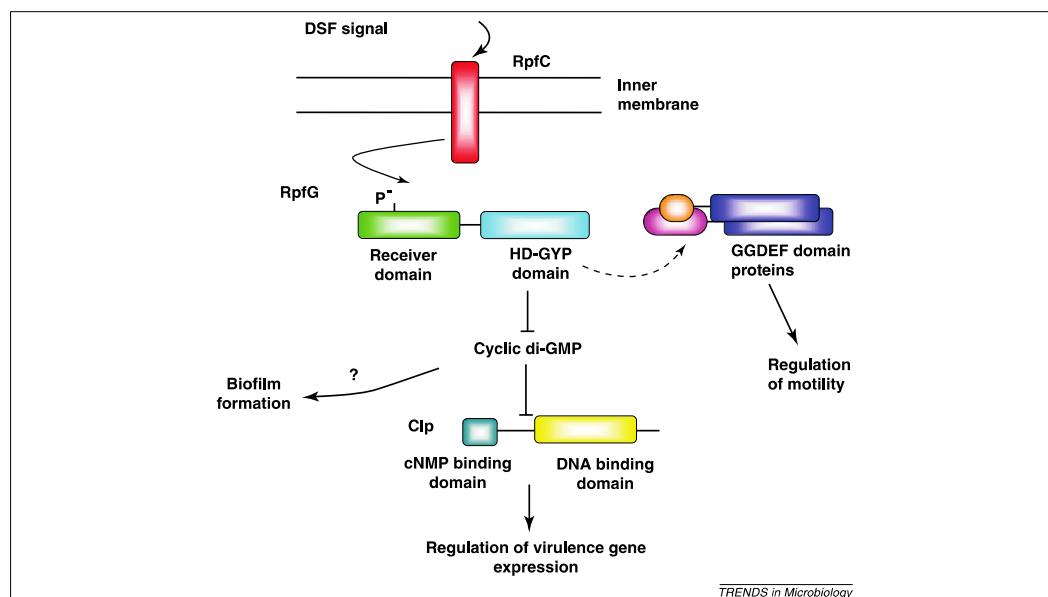


Figura 12. Mecanismo de ação do regulador RpfG mostrando a função de fosfodiesterase sobre o regulador transcripcional Clp que regula positivamente a expressão de genes de virulência, e a interação física proteína-proteína com duas proteínas com domínios diguanylatociclase, regulando positivamente a motilidade da bactéria. (Ryan & Dow 2011).

A redução nos níveis de di-GMP cíclico como resultado da percepção do DSF e a ativação da atividade fosfodiesterase de RpfG interrompe a inibição de *Clp* e possibilita a *Clp* para ativar a transcrição do gene *engXAC* (RYAN et al., 2010). Em resumo, a

sinalização DSF em Xcc controla diversas funções por vias de sinalização divergentes, dos quais alguns detalhes moleculares são bem conhecidos. Por outro lado, a nossa compreensão dos mecanismos subjacentes à tradução de sinais da família DSF em *B. cenocepaciae* *P. aeruginosa* é fragmentada.

2.5 Interferências no quórum sensing bacteriano (quórum quenching)

Quórum sensing (QS) ajuda a coordenar o comportamento bacteriano baseado na comunidade, mas não é essencial para a sobrevivência das bactérias. Portanto, a inibição de QS interrompe apenas o fenótipo desejado como por exemplo, a virulência, a formação de biofilme, e a resistência bacteriana a diferentes antibióticos.

A interferência com estes processos de QS podem proporcionar uma rota para o controle da doença. Essa interferência pode envolver a degradação do sinal (quórum-quenching) ou excesso na produção de sinal (confusão do patógeno) (ZHANG e DONG, 2004; NEWMAN et al, 2008; UROZ et al., 2009). Quórum quenching é um mecanismo adotado por um número de bactérias para romper a sinalização QS dos concorrentes, proporcionando a estes organismos uma vantagem dentro de um habitat particular (ZHANG e DONG, 2004). É racional que os microrganismos possam desenvolver mecanismos para desarmar os sistemas de QS dos organismos concorrentes, de maneira a aumentar sua força competitiva em um ecossistema (TAGA e BASSLER, 2003). Nos últimos anos, uma série de enzimas QQ e inibidores foram identificados a partir de diferentes fontes, incluindo tanto organismos procarionte como eucariontes (FREDERIX e DOWNEY, 2011).

Experimentos realizados com bactérias fitopatogênicas como *Xyllela fastidiosa* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, levaram à conclusão de que a sinalização célula-célula via DSF ocorre dentro da planta, porém, uma concentração ótima de DSF é necessária para a virulência. Este fino balanceamento da síntese de DSF pode, portanto, ser prontamente interrompido pela degradação ou superprodução do sinal, com consequências importantes para o controle de doenças (LI e WANG, 2013; NEWMAN et al., 2008).

3.0 OBJETIVOS

Geral

Reduzir a virulência da bactéria *Xanthomonascitri* subsp. *citri* em cultivares de citros susceptíveis, usando um modelo de controle biológico bacteriano baseado na interferência do processo de comunicação celular quórum sensing.

Específicos

- Construir bioreporters bacterianos capazes de evidenciar a produção da molécula DSF, auto indutor do processo de comunicação celular quórum sensing em *Xanthomonascitri* subsp. *citri*.
- Isolar e caracterizar do filoplano de citros, bactérias que apresentam capacidade para interferir na produção e reconhecimento da molécula sinalizadora DSF produzida por *Xanthomonascitri* subsp. *citri*.
- Avaliar *in vivo* o potencial das bactérias isoladas, que apresentaram capacidade de interferência na produção e reconhecimento da molécula sinalizadora DSF produzida por *Xanthomonascitri* subsp. *citri*. para reduzir a severidade do cancro cítrico em hospedeiros susceptíveis.

4.0 METODOLOGIA

4.1 Construção dos bioreporters de DSF

Para identificar as bactérias isoladas do filoplano de citros, que mostraram capacidade para interferir na sinalização QS via DSF em *Xanthomonascitri* subsp. *citri*, a bactéria Xcc 306 (DA SILVA et al, 2002), produtora natural da molécula auto-indutora DSF, foi transformada por electroporação com o plasmídeo pKLN55 (Figura 13), que alberga a fusão genética reporter *eng:gfp*, em que o promotor da enzima endoglucanase de *X. campestris*, dirige a expressão do gene que codifica para proteína verde fluorescente GFP. Como mencionado anteriormente a enzima endoglucase produzida pelas *Xanthomonas* é induzível pela molécula DSF e desse modo, o nível de fluorescência produzido por GFP refletirá o nível de DSF percebida pelo bioreporter (NEWMAN et al., 2004).

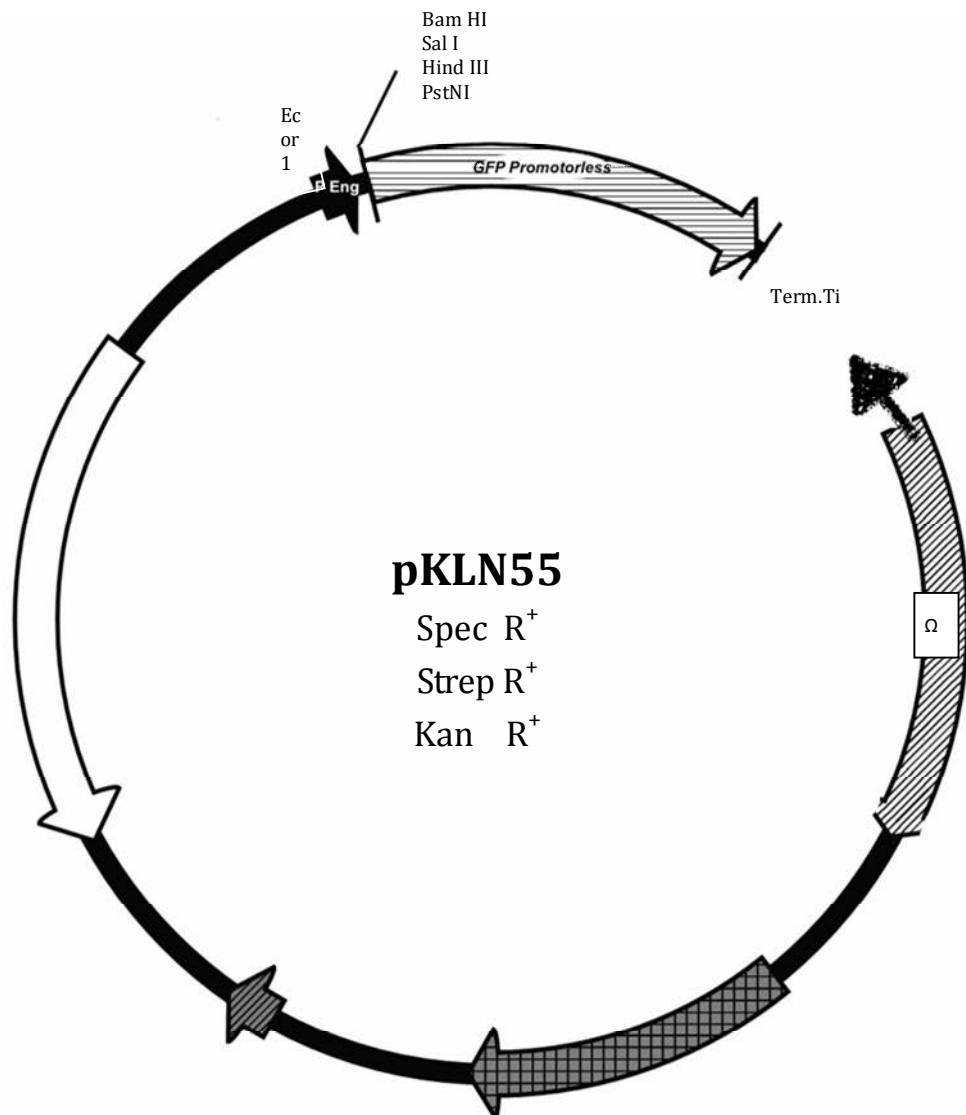


Figura 13. Mapa do plasmídeo pKLN54, adiferença com pKLN55baseia-se em que o gene de resistência a estreptomicina foi substituído por o gene de resistência a Kanamicina.

Células electrocompetentes foram preparadas de acordo com DO AMARAL et al., (2005), com algumas modificações. Resumidamente, uma colônia isolada de Xcc 306 foi transferida para 200 mL de caldo nutriente (NB) (8 g de NB e 5 g de NaCl por litro, pH 7,0) para o crescimento sob agitação rotativa (160 rpm) a 28 °C durante 6 h, até alcançar uma concentração final DO₆₀₀ = 0,6 correspondente a metade do crescimento na fase logarítmica. As células bacterianas foram mantidas em gelo durante 1 h e,

posteriormente, foram submetidas a duas lavagens com 1 e 0.5 volumes de 10% de glicerol frio estéril durante 10 min a 4000 g e 4 °C. Uma lavagem final foi realizada com 1 ml de 10% glicerol frio estéril centrifugando a 13.000 g durante 2 minutos a 4 °C. A concentração final de células foi ajustada para 4×10^{10} UFC/mL.

As condições de electroporação foram: intensidade de campo (12,5 kV.cm⁻¹), capacitância 25εF, resistência 50q e tempo de 2,66 ms. 80 ng do plasmídeo total foram electroporados com 40 ml de Xcc electrocompetentes 4×10^{10} UFC/ml. A electroporação foi feita usando o The Gene PulserXcell[®] system de Biorad. As células transformadas foram recuperadas em 1 ml de meio microbiológico NBY (0,8% de caldo nutriente, 0,2% de extrato de levedura, 0,2% K₂HPO₄, 0,05% de KH₂PO₄) suplementado com 20 ml de glucose (10%) e 1 ml de MgSO₄ 1 M por litro e incubado a 28 °C durante 3 h com agitação constante (180 rpm). Para permitir a expressão da resistência aos antibióticos, as células transformantes foram selecionadas em meio de NA suplementado com Kanamicina 50 ug/ml, resultando na estirpe, DSF repórter Xcc 306 (pKLN55), que permite a detecção de sua própria molécula DSF, evidenciado pela produção de GFP.

A fim de construir um bioreporter capaz de evidenciar só DSF de fonte exógena para avaliar atividade biológica da molécula DSF, um mutante *qppfF* de Xcc 306 foi construído, utilizando uma estratégia de mutagênese sitio dirigida, baseado no uso da PCR por sobreposição (OE-PCR). A mutagênese por OE-PCR é essencialmente um método composto por dois passos sequenciais de PCR. No primeiro passo, normalmente dois pares de iniciadores são utilizados para gerar fragmentos de DNA com extremidades sobrepostas contendo a alteração pretendida. O primeiro passo envolve dois PCRs independentes para gerar dois fragmentos de PCR que são utilizadas como molde para a segunda etapa de PCR (Figura 14). Os dois produtos de PCR gerados a partir do primeiro passo correspondem às regiões que flanqueiam o cassete de deleção.

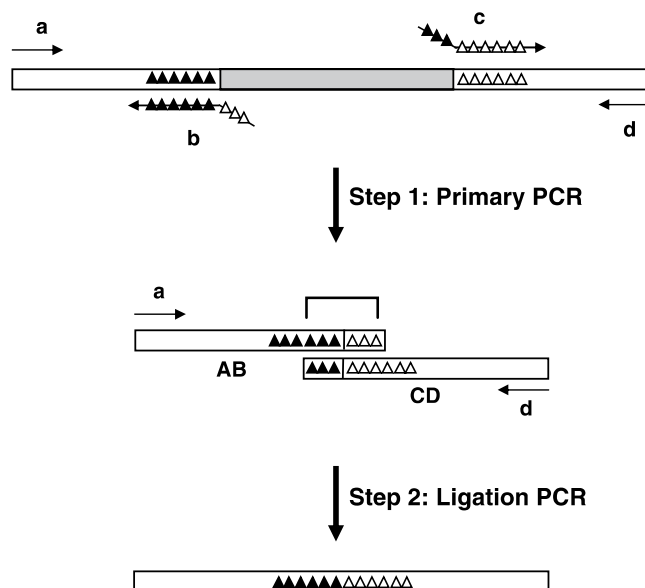


Figura 14. Representação esquemática da estratégia OE-PCR para mutagênese.(Lee et al., 2004).

Em outras palavras, a eliminação é essencialmente uma ligação ou recombinação de dois fragmentos de DNA separados. No segundo passo, estes dois fragmentos de DNA são então misturados e usados como template para obter produtos de PCR recombinados que podem ser diretamente clonados num vector plasmídeo adequado (LEE et al., 2004).

Os 4 primers usados nas reações de PCR incluem dois primers com caudas quiméricas (b-c) e dois iniciadores não quiméricos (a-d). As sequências dos dois primers quiméricos são derivadas, parcialmente do template a ser amplificado e em parte a partir do fragmento a ser recombinado para conseguir a deleção. Especificamente, os primers quiméricos são concebidos para conter 18 nt derivados das sequências template e 9 nt a partir do fragmento a ser recombinado (Figura 14). Além disso, os primers de flanqueamento periféricos (Primers a-d) são usados no segundo passo de amplificação PCR. Os iniciadores de flanqueamento podem incluir locais de restrição nas extremidades para facilitar a clonagem subsequente do produto de PCR ligado.

Para construir um mutante no gene *rpfF* que codifica para a sintetase do auto indutor DSF. DNA genômico de *Xcc* 306 foi extraído segundo as instruções do fabricante usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de promega. Um fragmento de 1610 pb foi amplificado a partir do genômico, utilizando primers que flanqueiam o gene *rpfF* (XAC 1879). Este fragmento foi utilizado como template para duas reações de PCR independentes, utilizando dois pares de iniciadores concebidos com extremidades quiméricas e sobrepostas entre si (Tabela 2). Os tamanhos dos produtos de PCR foram 102 e 105 pb (posições 242-349 e 705-809). As condições de amplificação foram como se segue: 96 °C durante 2 minutos para a desnaturação inicial, 20 ciclos de 96 °C durante 30 seg, 62 ° C durante 30 segundos, e 72 ° C durante 1 min e uma extensão final de 72 ° C durante 5 min. Estes fragmentos foram então utilizados como templates para o segundo passo de PCR, para se obter produtos de PCR recombinados contendo a deleção interna de 164 pb do gene *rpfF*. As condições de amplificação foram como se segue: 96 °C durante 2 minutos para a desnaturação inicial, 25 ciclos de 96 °C durante 30 seg, 54 ° C durante 30 segundos, e 72 ° C durante 1 min e uma extensão final de 72 ° C durante 10 min. Este fragmento foi digerido com Sall - Mbol de New England Biolabs, segundo as instruções do fabricante. Posteriormente este fragmento foi clonado no vector suicida, o plasmídeo pOK1 (Kaniga *et al.*, 1991) digerido com Sall-BamHI de New England Biolabs. Para a reação de ligação a relação molar usada foi 1:3 vector/inserto, sendo usados 4 ng de inserto DNA (0.2 kb), 66 ng de vector pOK1 (7 kb) e 200 unidades de T4 ligase New England Biolabs. A reação de ligação foi realizada a 16 °C durante 8 h, resultando em pOK1 Δ rpfF. A fim de confirmar a deleção do construto pOK1 Δ rpfF foi sequenciado. Este vector foi usado para transformar *Xcc* 306 por electroporação. As condições de electroporação usadas foram as mesmas mencionadas anteriormente. Porém, a concentração de total de DNA plasmídico usado foi de 120 ng. As células transformadas foram recuperadas como foi descrito anteriormente. A seguir as células transformantes foram selecionadas em meio microbiológico NA suplementado com espectinomicina 100 ug/mL. Resultando na estirpe *Xcc* 306 Δ rpfF, incapaz de produzir DSF. *Xcc* 306 Δ rpfF foi posteriormente transformada por electroporação com o plasmídeo pKLN55, resultando no segundo

bioreporter de DSF *Xcc* 306 α rpfF/pKLN55 incapaz de detectar a produção de sua própria DSF, mas ainda capaz de perceber o DSF de fonte externa. As condições de electroporação foram as mesmas mencionadas acima.

Tabela 1. Primer usados neste estúdio.

Primer	Sequencia do primer (5'-3')	Produto	Uso	Referencia
<i>rpfF</i>	F GGGCGAAATCGTCAAGGTGGTCAT R GCGAGTTCATCCAGCAATGCCTCAG	1610 bp	mutagenesis	Guo et al. 2012
AB	F TGTTCGCACGGCTGATCCGC R cgacgcggcCCGCCGAAGCCGACATGCA	102 bp	mutagenesis	Este estudio
CD	F cttcggcggGCCGCGTCGCCCCTCAACT R GGCACCAGCACGTCGACGAT	105 bp	mutagenesis	Este estudio
A1 PC5B	F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R TACTTTGTTACGACTT	1486 bp	16S rDNA	Kuske et al. 1997

O uso do plasmídeo suicida pOK1 para realizar a mutação sitio dirigida baseou-se na aplicação do conceito de genética reversa, em que a troca alélica por recombinações homólogas, é facilitada pela utilização de vetores plasmídiais incapazes de se replicar no hospedeiro onde mutações serão introduzidas (MILLER e MEKALANOS 1988). A integração no genoma do hospedeiro de um gene mutante clonado num vector suicida é prontamente obtido, selecionando as células clonadas com o marcador de resistência a antibióticos codificado no vector, porém uma população celular diploide para o gene de interesse também poderia ser selecionada e a mutação poderia ser revertida. Para evitar isto o plasmídeo pOK1 tem contido um marcador de seleção negativa (selectionmarkless) que permite selecionar exclusivamente a população celular haploide para o gene de interesse (Figura 15). pOK1 usa como selectionmarkless o gene *SacB*, isolado da bactéria *Bacillus subtilis*. O gene *SacB* codifica para a enzima levan-sucrase. Essa enzima catalisa a hidrólise de sacarose e produz levan. O levan é um polímero que é acumulado na parede celular bacteriana, esse acúmulo de levan é letal para as bactérias Gram negativas, por que causa uma rápida lise celular (SIMON et al., 1991).

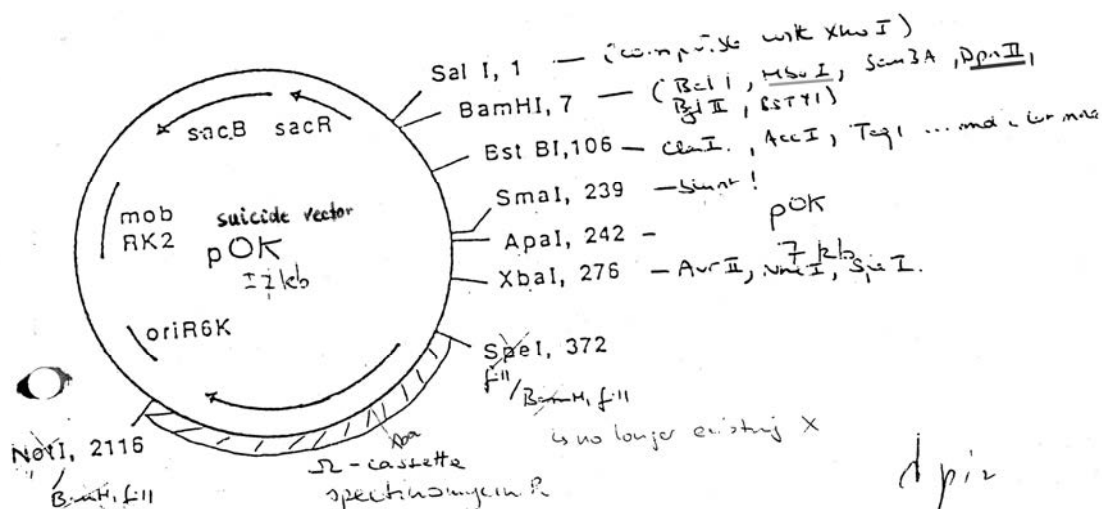


Figura 15. Mapa do vector suicida pOK1. Usado para o intercâmbio alelico no processo de mutação sitio dirigida para a construção da estirpe Xcc 306 α prfF/pKLN55 segundo bioreporter de DSF construído neste estudo.

4.2 Isolamento e identificação de bactérias inibidoras DSF

Bactérias epifíticas e endofíticas foram isolados a partir da superfície e de macerados de folhas de citros com e sem sintomas de cancro cítrico, provenientes de plantas crescidas no campo das variedades de laranja doce: Folha Murcha, Pêra Rio, IAPAR 73 e Valência. O material vegetal foi macerado num almofariz e pilão em KPO₄ 10 mM de tampão, as diluições adequadas (1:100 epifíticas e 1:10 endofítica) foram plaqueadas em ágar de tripticase de soja(TSA) 10% (Merck, Brasil). As placas foram incubadas a 28 °C durante 72 H, e as colônias individuais representando uma variedade fenotípica foram isoladas em placas de Petri contendo TSA. Essas colônias foram pulverizadas com uma suspensão da estirpe DSF bioreporter Xcc 306/pKLN55 na concentração final de 10⁶UFC/mL. Isolados bacterianos que exibiam qualquer atividade antibacteriana (redução ou inibição do crescimento) contra o DSF bioreporter Xcc 306 / pKLN55 foram excluídos do estudo.

A degradação ou modificação da molécula do DSF por uma cepa vizinha, conduz a um bloqueio na detecção de DSF pelo bioreporter Xcc 306/pKLN55, produzindo uma diminuição no sinal de fluorescência de GFP, quando observada em microscópio

Olympus BX60 a 495 nm. Cada isolado de folhas de citros foi plaqueada em meio NA e próximo a DSF Bioreporter Xcc 306/pKLN55. A habilidade dos isolados para degradar ou modificar o DSF foi confirmado num segundo test qualitativo de antagonismo DSF, confrontando a potencial bactéria inibidora de DSF com o bioreporter Xcc 306/pKLN55 em placas contendo NA. As duas estirpes bacterianas foram plaqueadas próxima uma da outra, distancia de ate de 5mm, e foi novamente avaliada a produção de fluorescência no bioreporter Xcc 306/pKLN55.

A identificação das espécies bacterianas (Gram-positivas e Gram-negativas), capazes de degradar ou modificar DSF, foram feitas usando os kits de API (API® da bioMérieux) e confirmada por sequenciamento dos produtos de amplificação dos genes 16S rRNA usando os primers universais e PC5B PA (Tabela 2). As condições de amplificação foram como se segue: 94 °C durante 2 minutos para a desnaturação inicial, 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, e 72 °C durante 1 min e uma extensão final de 72 °C durante 10 min. As sequências nucleotídicas foram comparadas com as sequências do gene 16S rRNA da base de dados GenBanknucleotidecollection (BLASTn). O sequenciamento foi feito usando o sequenciador AppliedBiosystems 3730xl DNA Sequencer, desenvolvido no Centro de RecursosBiológicos e BiologiaGenômica CREBIO. UniversidadeEstadualPaulistaJaboticabal SP. Brazil.

Um ensaio semi-quantitativo de degradação DSF foi realizado usando as bactérias inibidoras de DSF previamente identificadas. O DSF presente no sobrenadante de uma cultura de Xcc após incubação de 48 horas a 28 °C em meio NB, foi extraído com acetato de etilo e diluído em 1 ml de metanol 50% (BARBER et al.,1997). O DSF extraído foi adicionado em um tubo Falcon de 15 ml contendo meio TSB e as bactérias inibidoras de DSF uma concentração final de 10^6 UFC/ml. O DSF remanescente foi extraído com acetato de etilo após 8, 12, 24 e 48 horas, e foi avaliado usando o bioreporterXcc 306 *qrpF*/pKLN55. O teste foi feito como segue: uma suspensão de bioreporterXcc 306 *qrpF*/pKLN55 na concentração final de 10^8 CFU/ml foi plaqueada na superfície da placa de meio de NA aplicando com um swab sobre toda a superfície do ágar NA estéril e, em seguida, foi incubada por 6 h a 28 °C. Um disco de papel de

filtro estéril (5 mm de diâmetro) foi embebida com a DSF extraído e em seguida colocado sobre a superfície da placa de NA que contém bioreporterXcc 306 *qrrpF*/pKLN55 previamente incubado. A distância radial a partir do centro do disco de papel para a extremidade distal do sinal de GFP na estirpe bioreporter foi medido, após incubação durante 24 h a 28 °C, e foi comparado com o de controle utilizado, ou seja, a distância radial do sinal GFP produzido pelo DSFextraído a partir do sobrenadante de cultura de Xcc 306 após 48 h de incubação a 28 °C em meio NB.

4.3 Teste de virulência

Testes de virulência foram conduzidos sob condições de crescimento controladas no laboratório de plantas do departamento de tecnologia da FCAV/Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal SP. Brasil. Foram utilizados dois métodos de infecção nas plantas: infiltração das folhas e pulverização. Todas as plantas foram cultivadas numa câmara de crescimento mantida a 28 °C e com fotoperíodo de 16 H. Os ensaios foram realizados usando as mesmas variedades de laranja doce de onde as bactérias inibidoras de DSF foram isoladas (Folha Murcha, Pera Rio e Valencia).

As bactérias antagonistas testadas foram as que mostraram capacidade maior *in vitro* para a degradação ou modificação do DSF. Todas as plantas tinham a mesma idade no momento da inoculação; folhas imaturas de citros totalmente expandidas, com a mesma idade foram infectadas na superfície abaxial, por pressão de infiltração com seringas sem agulha contendo Xcc 306 e bactérias inibidoras de DSF.

As estirpes bacterianas foram misturadas imediatamente antes da infecção e a concentração final foi ajustada a 10^4 UFC/mL em de MgCl₂ 10 mM para cada estirpe. As folhas infiltradas foram fotografadas 21 dias após a inoculação (DAI). De modo a simular uma infecção natural de cancro cítrico, as infecções foram realizadas através de um método de pulverização, usando uma metodologia adaptada de LI e WANG (2012), superfícies abaxiais de folhas imaturas completamente expandidas, foram pulverizadas com uma suspensão de mistura de cada bactéria inibidora de DSF e Xcc 306 a uma concentração final de 10^7 UFC/mL em MgCl₂ 10 mM para cada estirpe. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com sacos de plástico durante 24 h para manter

uma umidade relativa elevada maior de 90%, além de forçar a abertura dos estômatos e favorecer o desenvolvimento de sintomas. As folhas pulverizadas foram fotografadas 21 dias após a inoculação (DAI). Lesões de cancro cítrico de cinco folhas infiltradas e cinco folhas pulverizadas foram quantificadas 21 DAI, e as áreas infectadas foram calculados usando a versão 1,48 do software ImageJ(NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, EUA WAYNE RASBAND). Os ensaios foram realizados em triplicata, e a análise estatística dos dados foi realizada aplicando o test ANOVA de uma via, com teste post-hoc (Bonferroni) usando o software IBM SPSS Statistics desktop, v22.0.

4.4 Ensaios de formação de biofilme e aderência bacteriana in planta

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a formação de biofilme e adesão bacteriana em folhas. As bactérias testadas foram apenas aqueles antagonistas que mostraram uma capacidade maior in vitro para a degradação ou modificação da molécula DSF. Para avaliar a formação de biofilme, folhas de laranja doce (Folha Murcha, Pera Rio e Valência) foram infectadas por pulverização com uma suspensão da mistura de cada bactéria inibitória de DSF e Xcc 306 a uma concentração final de 10^7 UFC/ml em MgCl₂ 10 mM para cada estirpe. Sete dias após a infecção amostras escolhidas aleatoriamente (áreas de 0,8 cm²) foram dissecadas das folhas. Para preservar a morfologia original do biofilme, evitando a desidratação da camada de EPS nas amostras, um passo de prefixação foi realizado, usando 2,5% (v / v) + 75 mM de fixador lisina glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 8 min à temperatura ambiente (RATNAYAKE et al., 2012), seguido por uma fixação convencional com 3% de glutaraldeído em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,2) durante a noite. Subsequentemente, as áreas fixas foram lavadas três vezes com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), e pós-fixadas em 2% de OsO₄ em 0,1 M durante 4 h e lavadas duas vezes em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,2). Após lavagem, as amostras foram desidratadas com uma solução de etanol (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) durante 10 minutos cada, repetindo a lavagem final duas vezes. As amostras de folhas foram secadas ao ponto crítico no EMS 850 secador de ponto crítico e depois revestido com ouro usando sputtercoaterDentonVacuum Desk II.

As micrografias foram realizadas utilizando JSM-6490 Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol USA) a 15 kV. Testes adicionais utilizando os kits API 20E e API 20 NE, e a amplificação por PCR dos genes 16S rRNA, foram realizadas para identificar as bactérias formadoras de biofilme, na folhas que apresentaram alguma forma de formação de biofilme.

A fim de avaliar a aderência bacteriana a folhas, uma suspensão bacteriana de cada solução de mistura de bactérias inibidoras de DSF e Xcc 306 foi preparada como descrito anteriormente. 40 uL destas suspensões foram colocadas na superfície abaxial de folhas de laranja doce destocadas da planta e incubadas na câmara úmida durante 10 horas a 28 °C. Depois de lavar duas vezes com água de torneira esterilizada, as áreas inoculadas foram dissecadas. A observação feita usando microscopia eletrônica de varredura foi realizada sob as mesmas condições mencionadas anteriormente. O controle usado em ambos ensaios foram folhas de laranja doce (Folha Murcha, Pera Rio e Valencia) inoculadas unicamente com Xcc 306. As provas de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas três vezes, com cinco repetições.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção das estirpes bioreporters de DSF

A fim de avaliar a presença e a funcionalidade das moléculas da família DSF em Xcc, construiu-se dois bioreporters DSF por transformação de Xcc 306 de tipo selvagem e um mutante de Xcc 306 no gene *rpfF*, com o plasmídeo pKLN55 que transporta a fusão o *eng:gfp* (NEWMAN et al., 2004): onde o promotor da endoglucanase conduz a expressão de *gfp*, que codifica para a proteína verde fluorescente (GFP).

As colônias de Xcc tipo selvagem que transportam o plasmídeo pKLN55 expressaram a GFP. No entanto, não foram observadas alterações macroscópicas na morfologia das colônias desenvolvidas em meio NBY ou NA, sugerindo que a produção de pigmento e exopolissacarídeo não foi alterada em comparação com a estirpe selvagem (Figura 16). O mutante Xcc 306 de deleção no gene *rpfF* (*ppfF*) foi construído utilizando OE-PCR como foi descrito anteriormente. Como esperado a cepa Xcc 306 *ppfF* prejudicou a produção de DSF e as colônias cultivadas em NBY ou meio NA,

exibiram mudanças na forma, circular a irregular, na texturada superfície, lisa a áspero, reduzida mucosidade e perda de pigmentação (Figura 17).

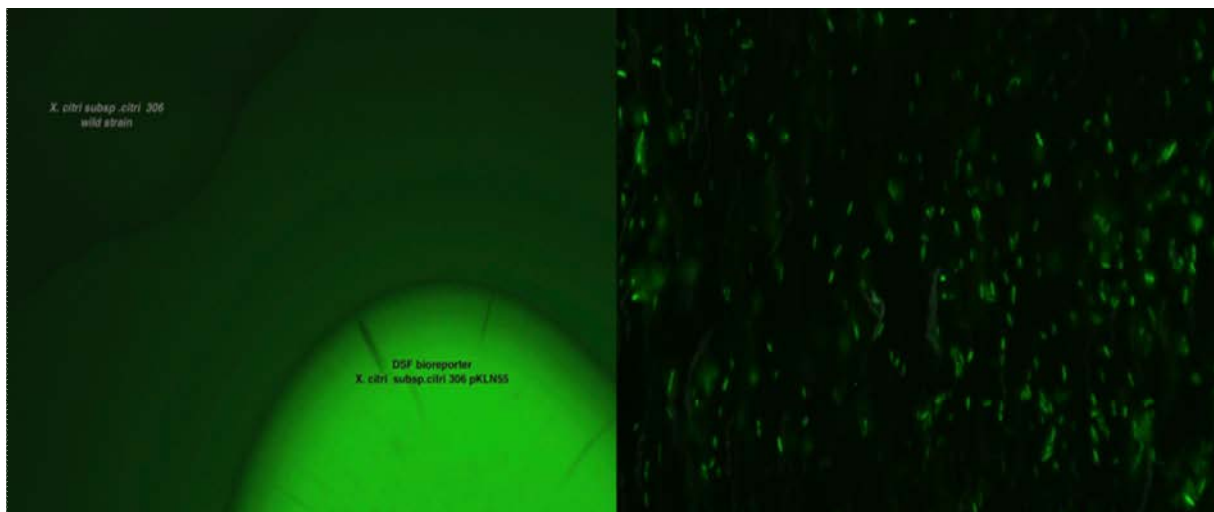


Figura 16. Xcc 306/pKLN55 Bioreporter de DSF mostrando a produção de GFP induzida pela molécula DSF (Esquerda morfologia macroscópica 50x, direita morfologia microscópica e crescimento planctônico 1000X)



Figura 17. Xcc $\Delta ppfFDSF$ bioreporter. Esquerda mostrando as alterações fenotípicas vs Xcc wt. Direita mostrando a indução na produção de GFP pelo contato com o DSF de fonte exógena.

No entanto, os mutantes *qpfF* mantiveram a capacidade de detectar e responder à adição de DSF a partir de uma fonte exógena. Especificamente o mutante *qpfF* transformado com o plasmídeo pKLN55 respondeu a DSF exógeno por expressão de GFP (figura 17). Este segundo Bioreporter foi utilizado para ensaiar os níveis e a atividade biológica de DSF nos diferentes ensaios *in vitro* com as bactérias inibidoras.

Isolamento e identificação de bactérias inibidoras DSF

Os ensaios realizados para avaliar a atividade endoglucase nas estirpes: Xcc 306/pKLN55 DSF bioreporter e Xcc 306 do tipo selvagem, mostraram níveis de atividade semelhantes em todos os meios de cultura testados, sugerindo que não há qualquer composto inibidor da expressão endoglucanase nos meios de cultura.

Um total de 114 isolados bacterianos foram recuperados a partir de folhas cítricas apresentando colônia fenotipicamente diferentes (Tabela 2). Todos os isolados obtidos foram testados *in vitro* quanto à sua capacidade de interromper a indução mediada por DSF de expressão de GFP no Bioreporter Xcc /pKLN55, excluindo-se bactérias isoladas que apresentaram qualquer atividade antibacteriana contra DSF bioreporter Xcc 306 (pKLN55).

Tabela 2. Numero de UFC com diferente padrão de crescimento isoladas dos citros e as correspondentes variedades de laranja doce donde foram isoladas.

Citros	Numero de CFUs isoladas	
	Folhas com sintomas	Folhas sem sintomas
Folha Murcha	10	16
Pera Rio	8	13
Valencia	14	24
IAPART 73	7	22

Apenas sete isolados bacterianos foram capazes de inibir a via de sinalização DSF em Xcc (Tabela3). Os isolados foram classificados utilizando kits de API (API® da bioMérieux) e por sequenciamento de produtos de amplificação por PCR dos genes 16S rRNA. Foram identificadas duas bactérias Gram-positivas

(*Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus vallismortis*) e cinco bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Raoultella planticola*, *Kosakonia cowanii* e *Citrobacter freundii*).

Tabela 3 Bactérias isoladas com atividade sobre o DSF produzido por Xcc

^a Identidade de taxa mais próxima da sequência do gene 16S rRNA base de dados de BLASTn NCBI

^b Percentagem de identidade medida usando os teste bioquímico API

^c Estimativa semiquantitativa da degradação DSF com base no ensaio de inibição em placa.

Identidade ^a	Identidade ^b	Origem	Degradação de DSF ^c
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98%	Folha murcha/ Valencia	++
<i>Bacillus vallesmortins</i>	95%	Folha murcha	++
<i>Pseudomonas oryzae</i>	99%	Folha murcha/ Pera rio	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%	Pera rio/Valencia	+++
<i>Raoultella planticola</i>	97%	Pera rio/Valencia	+
<i>Kosakonia cowanii</i>	98%	Valencia	++
<i>Citrobacter freundii</i>	99%	IAPAR 73/Valencia	+

A inibição da sinalização DSF está associada com a degradação do autoindutor DSF

A redução na ativação do promotor *eng* dependente de DSF por diferentes bactérias, pode ser devido a uma série de mecanismos. Além da degradação enzimática do sinal DSF a produção de pequenas moléculas que poderiam reprimir a expressão do promotor *eng* de uma forma independente do DSF e a produção de inibidores do crescimento da estirpe Bioreporter poderia levar a uma interferência aparente na sinalização via DSF. Por exemplo, existe evidência de que a comunicação célula-a-célula mediada por sinais da família DSF não é exclusivo das *Xanthomonas* e bactérias dos gêneros não relacionados, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, e as espécies de *Burkholderia* que produzem os mesmos sinais ou relacionados (BOON et al., 2008; DAVIES e MARQUES, 2009).

Em particular, a bactéria *P. aeruginosa* produz ácido *cis*-2-decenóico, o que induz uma resposta de dispersão em biofilmes formados por uma variedade de bactérias

Gram-negativas e Gram-positivas e leveduras (DAVIS e MARQUEZ, 2009). Até o momento, não se sabe se o ácido *cis*-2-decenóico exerce qualquer ação em Xcc, tais como a ativação ou inibição da via de sinalização DSF. Finalmente, é conhecido que muitas espécies de *Bacillus* produzem compostos antimicrobianos, que poderiam inibir o crescimento de Xcc. Além disso, a bactéria *Pseudomonasaeruginosa* e outras espécies de *Pseudomonas* produzem fenazinas antibacterianas, tais como o ácido fenazino-1-carboxílico, que é ativa contra *Xanthomonasoryzaepv. oryzae* (Xoo) agente causal do crestamento bacteriano do arroz (XUet al., 2015).

A fim de obter uma prova direta de que a perda de sinalização via DSF está associada com a degradação do DSF e não por qualquer uma das possibilidades acima mencionadas, a capacidade de cada uma das estirpes inibitórias para degradar DSF *in vitro* foi estabelecida. Para estes experimentos, DSF foi isolado a partir do sobrenadante de cultura de Xcc e adicionado a uma cultura de cada estirpe crescida em meio NB. Em diferentes tempo, o sobrenadante foi recolhido e o DSF foi extraído e testado usando o repórter Xac 306qprpfF/pKLN55. As cepas que apresentaram alta capacidade para degradar o sinal DSF *in vitro* foram: *P. oryzihabitans*, *P. aeruginosa* e *B. amyloliquefaciens*. A atividade máxima foi registrada após 8 horas de adição do DSF. As cepas restantes *B. vallesmortins*, *R. planticola*, *K. cowanii* e *C. Freundii*, apresentaram fraca capacidade de degradação da via de sinalização DSF e sua atividade foi detectada após 24 H de adição do DSF (Tabela 3).

Efeito das cepas inibidoras de DSF sobre a virulência de Xcc306

Ensaio de virulência foram conduzidos sob condições de crescimento controladas e lesões do cancro foram quantificadas aos 21 dias após a inoculação. Esses ensaios demonstraram que, quando as folhas de citros foram inoculadas com misturas de Xcc e as diversas bactérias inibidoras do DSF por pulverização, o número de lesões de cancro diminuiu significativamente quando foram usadas as bactérias: *P. oryzihabitans*, *P. aeruginosa* e *B. amyloliquefaciens* e aumentou quando foi utilizada a bactéria *B*

.vallismortis, em relação ao controle (folhas pulverizadas unicamente com Xcc) (Figuras 18 e 19).

Quando os efeitos das bactérias inibidoras de DSF sobre a virulência de Xcc foram testados, segundo o método de infiltração, as bactérias *Pseudomonasoryzihabitans* e *Bacillusamyloliquefaciens*, ainda conferiu uma redução de 2,5 vezes no número de lesões do cancro, quando com parado com *P.aeruginosa* mostrou um ligeiro aumento do número de lesões da doença, enquanto que *B. vallismortis* mostrou uma ligeira diminuição (Fig. 18B).

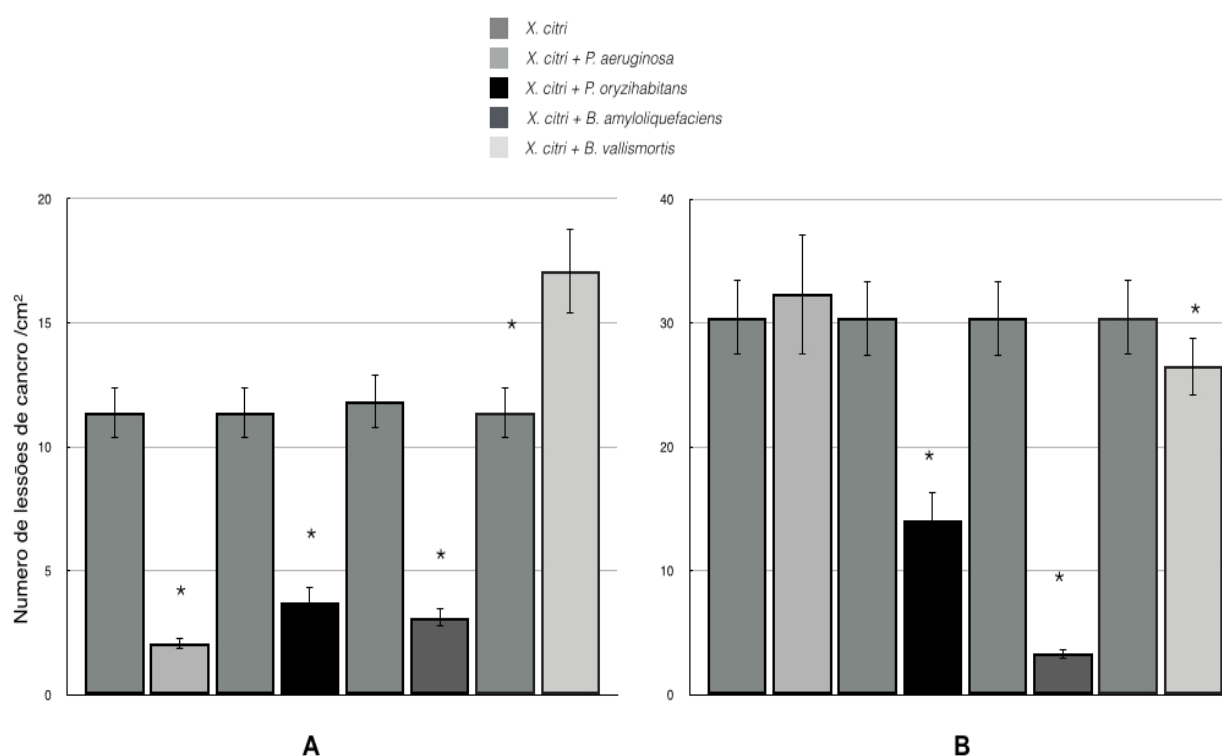


Figura 18 Quantificação de lesões do cancro citrico em folhas 21 DAI. **A.** Folhas Infectadas por pulverização com as diferentes bactérias (10^4 UFC/ml) **B.** Folhas infectadas por infiltração por pressão (10^7 UFC/ml). As barras de erro representam o desvio padrão. Os dados marcados com um asterisco são significativamente diferentes $P < 0,05$ usando ANOVA oneway com teste post-hoc (Bonferroni) com um software IBM SPSS Statistics desktop, v22.0.

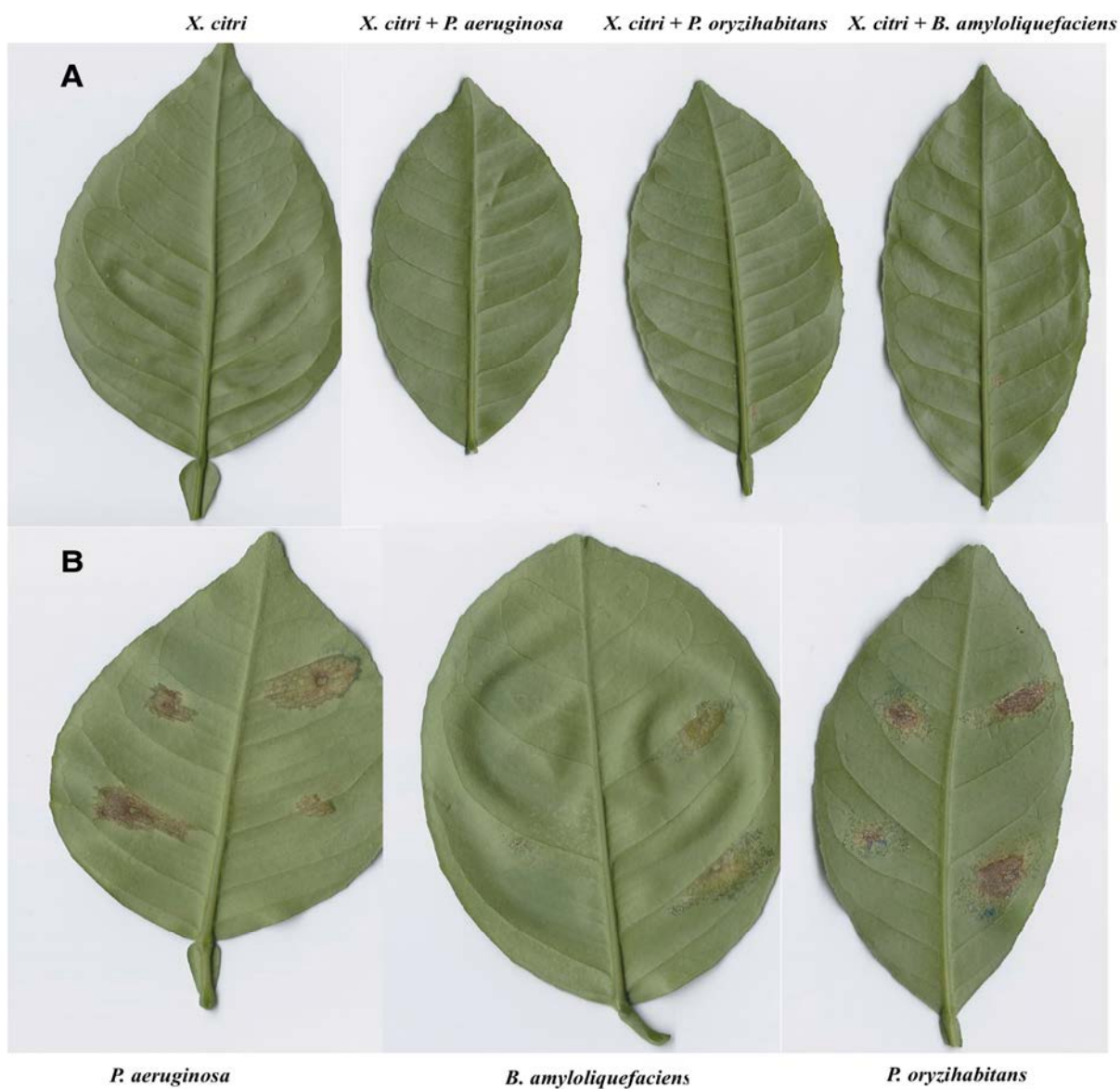


Figura 19. Redução na severidade do cancro cítrico pelas bactérias inibidoras do QS. **A.** Pulverização na superfície abaxial da folha de citros, ambas as bactérias foram co-inoculadas a uma concentração de 10^7 CFU / mL. As folhas inoculadas foram fotografadas em 21 DAI. **B.** Folhas infectadas por infiltração. Lado direito da folha: Xcc na concentração de 10^4 UFC / mL, lado esquerdo da folha: bactérias inibidoras de DSF misturadas com Xcc. Ambas as bactérias foram co-infiltrada com a mesma concentração de 10^4 CFU / mL.

Efeitos das cepas inibidoras de DSF na fixação bacteriana e formação de biofilme em Xcc306.

Para a maioria das bactérias patogênicas, a fixação nas superfícies e, posteriormente, a formação de biofilme, são etapas essenciais na manutenção, sobrevivência e estabelecimento inicial de patogenicidade nos tecidos. Na verdade, é completamente aceito que o QS desempenha um importante papel na formação de biofilme bacteriano (BRANDA et al., 2005).

Devido à incapacidade do nosso mutante *Xcc 306 qrrpF* para formar biofilmes bem estabelecidos, nós investigamos se existe uma relação entre a redução da virulência de *Xcc* no hospedeiro susceptível, e a sua capacidade para fixação e formação de biofilme na superfície das folhas cítricas co-inoculadas com bactérias inibidoras de DSF.

Análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram realizadas em diferentes tempos após a inoculação das folhas por pulverização, com uma suspensão de mistura de cada bactéria inibidora de DSF e *Xcc 306*, a uma concentração final de 10^7 CFU/mL em $MgCl_2$ 10 mM para cada estirpe. Assim, 10 horas após para avaliar adesão bacteriana, e 7 dias após, para avaliar a formação de biofilme. Pela visualização em SEM foi verificado uma redução substancial na capacidade de aderência de *Xcc* depois de 10 horas, quando as folhas foram co-inoculadas com as bactérias *P. oryzae*, *P. aeruginosa* e *B. amyloliquefaciens*, em relação ao controle utilizado, folhas infectadas com *Xcc* unicamente (Figura 20a e 20d).

Após 7 dias da infecção com *Xcc* e as bactérias inibidoras de DSF, análises de SEM mostraram a ausência de formação de biofilme na superfície das folhas co-inoculadas com *P. oryzae* e *B. amyloliquefaciens*, em relação ao controle utilizado, folhas infectadas com *Xcc* unicamente (Figura 18e, 18f). Ao contrário de um biofilme bem estruturado que foi evidente na superfície das folhas co-inoculadas com *Xcc* e *P. aeruginosa*; a caracterização bioquímica e molecular das bactérias recuperadas a partir das superfícies das folhas mostraram a ausência de *Xcc* e a prevalência de *P. aeruginosa*.

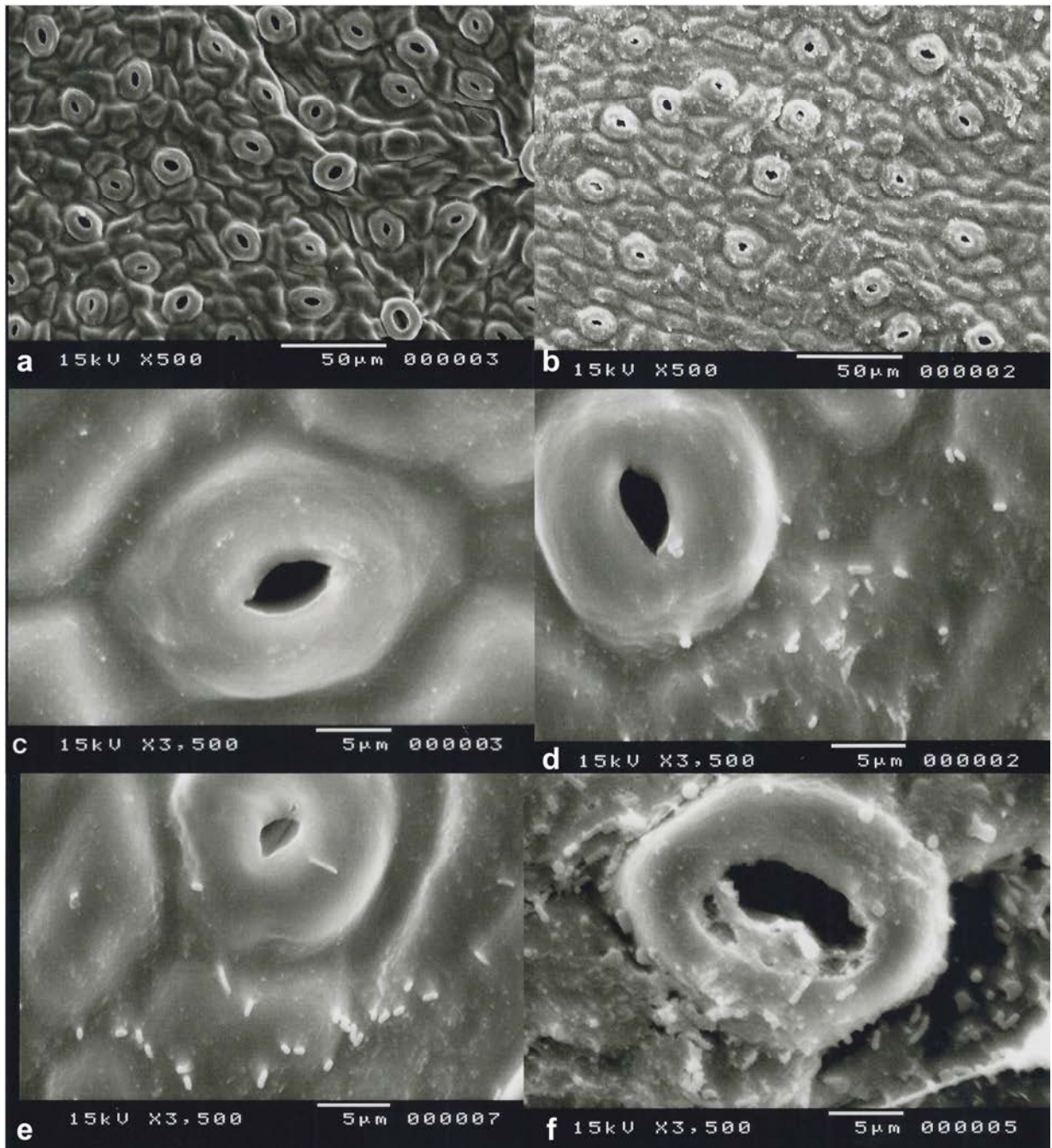


Figura 20. Análises de microscopia eletrônica de varredura da fixação bacteriana na superfície das folhas dos citros. **a-d:** fixação bacteriana após 10 horas de incubação. **a,c** *Pseudomonasoryzihabitans* mais *X. citri* 306. **b,d** *X. citri* 306. Imagens em duas ampliações diferentes. **e:** *Pseudomonasoryzihabitans* e **f:** *X. citri* 306, sete dias após da infecção. As estirpes foram inoculadas com a mesma concentração de 10^7 UFC/ml.

O quórum sensing é um sistema de comunicação célula-a-célula que permite a uma comunidade bacteriana agir de uma forma coordenada e tirar proveito dos concorrentes num habitat particular, mas não é absolutamente essencial para a sobrevivência das bactérias. A inibição de quórum sensing pode levar a algumas alterações fenotípicas, como a redução da virulência, diminuição da formação de biofilme e aumento da sensibilidade bacteriana aos tratamentos (NG e BASSLER, 2009). Nesse estudo, foram isoladas sete bactérias inibidoras DSF de folhas cítricas mostrando atividade *in vitro* contra sinalização QS em Xcc. Interessantemente, apenas três estirpes (aquelas com maior eficiência de degradação *in vitro* de DSF) foram eficazes na redução dos sintomas da doença na planta após a inoculação por pulverização. A superfície da folha é considerada um habitat restritivo e hostil para o colonizador bacteriano. Limitações de nutrientes, mudanças bruscas de temperatura e umidade relativa do ar são alguns dos fatores que determinam a microbiota da folha (LINDOW e BRANDL, 2003). A Fixação na superfície da folha e colonização são aspectos críticos da fase inicial da patogênese (GOTTIG et al., 2009). Curiosamente, a sinalização DSF em Xcc regula positivamente cinco genes que codificam as estruturas de ligação da superfície celular, tais como adesinas (hmsHR) e fímbrias (pILM) (GUO et al., 2012). A interrupção da sinalização quórum sensing pelas bactérias degradadoras de DSF, pode levar a uma diminuição da expressão desses genes com consequências para a fixação bacteriana, adequação nas superfícies epífitas e a gravidade da doença. Consistentemente com esta afirmação, observou-se uma ausência da formação de biofilme por Xcc na superfície das folhas co-infectadas com bactérias inibidoras DSF pelo método da pulverização, ao contrario do ocorrido no controle, onde foi observado biofilme bem estabelecido nas superfícies das folhas pulverizadas com Xcc 306.

Quando as folhas cítricas foram inoculadas por infiltração com *Pseudomonasoryzihabitans* e *Bacillus amyloliquefaciens*, ambas bactérias reduziram o número de lesões de cancro no hospedeiro como também foi verificado na inoculação por pulverização, no entanto, *Pseudomonas aeruginosa* mostrou um ligeiro aumento no número de lesões de cancro. As razões para esta diferença entre os dois métodos de inoculação não são claras. A ausência de um efeito inibitório pode refletir diferenças na

expressão de genes envolvidos na degradação da DSF nos dois ambientes (superfície da folha vs tecido mesófilo) mas este conceito permanece especulativo. Um mecanismo para explicar como as bactérias inibidoras degradam ou modificam a molécula DSF produzida por Xcc pode ser: a molécula DSF pode atuar como substrato potencial para as enzimas UDP-açúcar transferase. Essa enzima modifica ácidos graxos de cadeia curta por adição de uma unidade de açúcar, a partir de UDP-açúcares (UDP-glucose e UDP-galactose). Estes agrupamentos UDP-açúcar são produzidas pela atividade da enzima carbamoylphosphate sintetase, que é codificada por genes *carA* e *carB*. A sequência nucleotídica do locus *carAB* nas bactérias inibidoras de DSF *Pseudomonas* e *Bacillus* tem uma grande semelhança com as sequências de genes *carAB* presentes na estirpe de *Pseudomonas* G isoladas por NEWMAN et al., (2009) e descrita por esses autores como eficientes bactérias inibidoras DSF em *Xanthomonas campestris*.

6.0 CONCLUSÕES

Neste estudo foram identificadas sete bactérias inibidoras do auto indutor DSF produzido por Xcc, isoladas de folhas cítricas. Estes isolados mostram atividade *in vitro* contra sinalização quórum sensing em Xcc. Apenas três de esse conjunto de estirpes (*Pseudomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus*) apresentaram maior eficiência de degradação *in vitro* de DSF, foram eficazes na redução dos sintomas da doença nas plantas susceptíveis a Xcc.

Quórum sensing é um alvo importante para intervenções profiláticas e terapêuticas. Neste estudo, foram identificadas novas bactérias que poderiam ser uma alternativa ao tratamento de cobre tradicionalmente utilizado no controle do cancro cítrico, reduzindo assim a pressão de seleção bacteriana para a resistência a esse composto. Uma vez que as bactérias caracterizadas nesse estudo foram originalmente isoladas a partir do filoplano de cítricos, o presente estudo também contribui para uma compreensão das interações potenciais das bactérias nas superfícies foliares.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANSALDI, M., MAROLT, D., STEBE, T., MANDIC-MULEC, I., and DUBNAU, D.. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. **Mol. Microbiol.** 44:1561-1573, 2002

BARBER, C. E., TANG, J. L., FENG, J. X., PAN, M. Q., WILSON, T. J., SLATER, H., DOW, J. M., WILLIAMS, P., and DANIELS, M. J. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Mol. Microbiol.** 24, 555-566, 1997.

BASSLER, B. L.. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell** 109:421-424, 2002

BASSLER BL & LOSICK R. Bacterially speaking. **Cell** 125: 237-246, 2006.

BEUTLER, B., JIANG, Z., GEORGEL, P., CROZAT, K., CROKER, B., RUTSCHMANN, S., DU, X., AND HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annu. Rev. Immunol.** 24:353-389, 2006

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. *O Biológico* 23:101-111, 1957.

BOGDANOVE, A. J., BEER, S. V., BONAS, U., BOUCHER, C. A., COLLMER, A., COPLIN D. L. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. **Mol. Microbiol.** 20, 681-683, 1996.

Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J., & Stall, R. E. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Mol. Plant Microbe Interact.** 4, 81-88, 1991.

BOON, C., Y. Y. DENG, L. H. WANG, Y. W. HE, J. L. XU, Y. FAN, S. Q. PAN, AND L. H. ZHANG. A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. **ISME J.** 2:27-36, 2008.

BRANDA STEVEN, A. SHILD VIK, LISA FRIEDMAN and ROBERTO KOLTER. Biofilms: the matrix revisited **Trends in Microbiology** Vol.13 No.1, 20-29, 2005.

CASCALES, E., and CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nat. Rev. Microbiol.** 1, 137-149, 2003.

CHAN, J. W. Y. F., & GOODWIN, P. H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances**, 17, 489-508, 1999.

CHENG ZHIHONG, HE YAWEN, LIM SIEW CHOO, QAMRA ROHINI, WALSH MARTIN A, ZHANG LIAN-HUI, and SONG HAIWEI. Structural basis of the sensor-synthase interaction in autoinduction of the quorum sensing signal DSF biosynthesis. **Structure** 18, 1199-1209, 2010.

CHOU, F. -L., CHOU, H. -C., LIN, Y. -S., YANG, B. -Y., LIN, N. -T., WENG, S. -F., & TSENG, Y. H. The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 233, 265-279, 1997.

CIVEROLO EL. Bacterial canker disease of citrus. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society*, 37:127-145, 1984.

CRESPI, B. J. The evolution of social behavior in microorganisms. **Trends Ecol. Evol.** 16, 178-183, 2001

DA SILVA, A. C., FERRO, J. A., REINACH, F. C., FARAH, C. S., FURLAN, L. R., QUAGGIO, R. B., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., VAN SLUYS, M. A., ALMEIDA, N.

F., ALVES, L. M., DO AMARAL, A. M., BERTOLINI, M. C., CAMARGO, L. E., CAMAROTTE, G., CANNAVAN, F., CARDOZO, J., CHAMBERGO, F., CIAPINA, L. P., CICARELLI, R. M., COUTINHO, L. L., CURSINO-SANTOS, J. R., EL-DORRY, H., FARIA, J. B., FERREIRA, A. J., FERREIRA, R. C., FERRO, M. I., FORMIGHIERI, E. F., FRANCO, M. C., GREGGIO, C. C., GRUBER, A., KATSUYAMA, A. M., KISHI, L. T., LEITE, R. P., LEMOS, E. G., LEMOS, M. V., LOCALI, E. C., MACHADO, M. A., MADEIRA, A. M., MARTINEZ-ROSSI, N. M., MARTINS, E. C., MEIDANIS, J., MENCK, C. F., MIYAKI, C. Y., MOON, D. H., MOREIRA, L. M., NOVO, M. T., OKURA, V. K., OLIVEIRA, M. C., OLIVEIRA, V. R., PEREIRA, H. A., ROSSI, A., SENA, J. A., SILVA, C., DE SOUZA, R. F., SPINOLA, L. A., TAKITA, M. A., TAMURA, R. E., TEIXEIRA, E. C., TEZZA, R. I., TRINDADE DOS SANTOS, M., TRUFFI, D., TSAI, S. M., WHITE, F. F., SETUBAL, J. C., and KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417, 459-463, 2002

DAS, A.K. Pathogenic variability in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker. **J. Mycol. Pl. Pathol.** 121 98-11, 2002.

DELEPELAIRE P. Type I secretion in Gram-negative bacteria **Biochim. Biophys. Acta**, 1694, pp. 149-161, 2004.

DELISA, M. P., C. F. WU, L. WANG, J. J. VALDES, AND W. E. BENTLEY. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** Sep;183(18):5239-47, 2001.

DENG YINYUE, WU JIEN, TAO FEI, and ZHANG LIAN-HUI. Listening to a New Language: DSF-Based Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. **Chem. Rev.** 111, 160-173, 2011.

DOPSON, R.N. The eradication of citrus canker. **Plant Dis. Repr.** 48: 30-31, 1964

DOW, JM., NEWMAN, M. A., & VON ROEPENACK, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annu. Rev. Phytopathol.** 38, 241-261, 2000a.

DOW JM, MILLIGAN DE, JAISON L, BARBER CE & DANIELS MJ. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. *Physiol Mol Plant P* 31: 261-271, 1987.

DOWSON D. The systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten** 100:177-193. 1939

FAVA NEVES MARCOS, V G TROMBIN, P MILAN, F F LOPES, F CRESSONI, R KALAKI. O retrato da citricultura brasileira. **Edit, Citrus.Br.** 2010

FAWCETT, H.S. AND A.E. JENKINS. Records of citrus Canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, 23: 820-824. 1933

FUQUA C & GREENBERG EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3: 685-695.

FREDERIX M, DOWNEY AJ. Quorum sensing: regulating the regulators. **Adv Microb Physiol** 58:23-80, 2011.

GABRIEL. D.W, M.T. KINGSLEY, J.E. HUNTER, T. GOTTWALD. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 14-22. 1989

GALLIO, M., STURGILL, G., RATHER, P., AND KYLSTEN, P. A conserved mechanism for extracellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 12208-12213. 2002.

GOTTIG N, GARAVAGLIA BS, DAURELIO LD, VALENTINE A, GEHRING C, ORELLANO EG, OTTADO J. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 105:18631-18636. 2008.

GOUGH, C. L., GENIN, S., ZISCHEK, C. & BOUCHER, C. A. *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. **Mol. Plant Microbe Interact**. 5, 384-389. 1992.

HAAS, W., SHEPARD, B. D., AND GILMORE, M. S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature** 415:84-87. 2002

HAMILTON, W. D. Evolution of altruistic behavior. **Am. Nat.** 97, 354-356. 1963

HAMOEN, L. W., VENEMA, G., AND KUIPERS, O. P. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. **Microbiology** 149:9-17. 2003

HE YW, XU M, LIN K. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication dependent genes and functions. **Mol Microbiol** 59: 610-622. 2006

HE, Y.W. et al. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. **J. Biol. Chem.** 281, 33414-33421. 2006

HE, Y.W. AND ZHANG, L.H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Micro- biol Rev** 32: 842i 857.2008

HE, Y.W., WU, J., CHA, J.S., ZHANG, L.H. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae*pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. **BMC Microbiology** 2010, 10:187.2010

HERMANN, C.. Variability of hosti pathogen interaction. **J. Endotoxin Res.** 13:199i 218.2007

HODAK H, CLANTIN B, WILLERY E, VILLERET V, LOCHT C, JACOB-DUBUISSON F. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. **MolMicrobiol**61:368-382.2006

HOLLAND, I. B., SCHMITT, L., & YOUNG, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC- transporter dependent pathway. **Mol. Membr. Biol.** 22, 29-39.2005

JANSSON P-E, KENNE L, LINDBERG B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydr Res** 45(1): 275i 282. 1975

JI, G., BEAVIS, R. C., AND. NOVICK. R. P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:12055i 12059. 1995

JOHNSON TL, ABENDROTH J, HOL WGJ & SANDKVIST M () Type II secretion: from structure to function. **FEMS MicrobiolLett** 255: 175i 186.2006

JOSENHANS, C., & SUERBAUM, S. The role of motility as virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 605-614. 2002

KARLINSEY, J. E., LONNER, J., BROWN, K. L., & HUGHES, K. T. Translation/secretion coupling by type III secretion systems. *Cell*, 102, 487-49.2000

KATZEN, F., BECKER, A., ZORREGUIETA, A., PÜHLER, A., IELPI, L. Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **J. Bacteriol.** 178, 4313-4318. 1996

KAY S, HAHN S, MAROIS E, HAUSE G, BONAS U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. **Science**, 318:648-651.2007

KENDALL, M. M., RASKO, D. A., AND SPERANDIO, V.. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 75:4875-4884.2007

LEE, H.A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. **J. Agr. Res.**, 15: 661- 665. 1918

LI J, WANG N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS ONE** 6(7): e21804. doi:10.1371/journal.pone.0021804 2011

LOW, H. H. et al. Structure of a type IV secretion system. **Nature** 508, 550-553.2014

LU H, PATIL P, VAN SLUYS MA ET AL. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. **PLoS One** 3: e3828. 2008

MCINNIS, C.E. AND BLACKWELL, H.E. Design, synthesis, and biological evaluation of abiotic, non-lactone modulators of LuxR-type quorum sensing. **Bioorg. Med. Chem.** 19, 4812-4819. 2011

Majer C, Hochholdinger F. Defining the boundaries: Structure and function of LOB domain proteins. *Trends Plant Sci* 16(1):47-52, 2011.

MALAVOLTA JÚNIOR VA, YAMASHIRO T, NOGUEIRA EMC, FEICHTENBERGER E. Distribuição do tipo C de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 10:11.1984

MEYER, A., PÜHLER, A., & NIEHAUS, K. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana glauca*. **Planta**, 213, 214-222. 2001

MILLER, V.L. AND MEKALANOS, J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. **J. Bacteriol.** 170 2575-2583. 1988

MORSE M, PIRONCHEVA G, GEHRING C. AtPNP-A is a systemically mobile natriuretic peptide immunoanalogue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. **FEBS Lett.** 2004;556:99-103. 2004

NAMEKATA T. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* (Hase) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hase) Dow., n.f.sp. *aurantifolia*, agente causal da cancrose do limoeiro Galego. Piracicaba: **University of São Paulo**. 1971

POPLAWSKY, A. R., & CHUN, W. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. **Mol. Plant Microbe Interact.** 11, 466-475. 1998

NEWMAN K L. et al., Virulence of Plant Pathogenic Bacteria Attenuated by Degradation of Fatty Acid Cell-to-Cell Signaling Factors. **MPMI** 21 (3), 326-334 2008

POPLAWSKY, A. R., URBAN, S. C., & CHUN, W. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 5123-5127. 2000

RATNAYAKE K, D.C. JOYCE, R.I. WEBB. A convenient sample preparation protocol for scanning electron microscope examination of xylem-occluding bacterial biofilm on cut flowers and foliage **Scientia Horticulturae** 140, 12-18. 2012

RYAN, R.P. AND DOW, J.M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. **Microbiology** 154, 1845-1858. 2008

RYAN ROBERT P, YVONNE FOUHY, BELEN FERNANDEZ GARCIA, STEVEN A. WATT, KARSTEN NIEHAUS, LIANG YANG, TIM TOLKER-NIELSEN AND J. MAXWELL DOW. Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology** 68(1), 75-86. 2008a

RYAN, R.P. ET AL. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nat. Rev. Microbiol.** 7, 514-525. 2009

RYAN, R.P. ET AL. Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 107, 5989-5994. 2010

RYAN, R.P. AND DOW, J.M. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. **Trends in Microbiology**, Vol. 19, No. 3 145-152. 2011

SCHAAD NW, POSTNIKOVA E, LACY GH, SECHLER A, AGARKOVA I, STROMBERG PE, STROMBERG VK, VIDAVER AK. (). Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. citri (ex Hasse 1915) dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. citri (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. aurantifolii (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. citrumelo (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. malvacearum (ex smith 1901) dye 1978 as *X. smithii* subsp. smithiinov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. alfalfae (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. alfalfae (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and ñvar. fuscans of *X. campestris* pv. phaseoli (ex Smith, 1987) dye 1978 as *X. fuscans* subsp. fuscans sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 28:494-518. 2005

Santos, C. F. O..Cancrocítrico: ocorrência no Brasil e seu combate. (Ed.). Citriculturabrasileira (2ed.). **Fundação Cargill**, Campinas. p.787-823.1991

SIMON, R., HOTE, B., KLAUKE, B. AND KOSIER, B. Isolation and characterization of insertion sequence elements from Gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. **J. Bacteriol.** 173, 1502-1508. 1991

SOTO, G. E., & HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **J. Bacteriol.** 181, 1059-1071.1999

STARR MP, STOLP H, TRÜPER HG, BALOWS A, SCHLEGEL HG THE PROKARYOTES. The genus *Xanthomonas*. In: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. **Springer, New York**, pp 742-763.1981

66

TANG JL, LIU YN, BARBER CE, DOW JM, WOOTTON JC, DANIELS MJ. Genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of

extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Mol Gen Genet.** 226: 409-417, 1991.

TAO, F. et al. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. **J. Bacteriol.** 192, 1020-1029, 2010

SANDKVIST M. Biology of type II secretion. **Mol Microbiol** 40: 271-283. 2001

THOENDEL, M., AND HORSWILL, A. R. Biosynthesis of peptide signals in Gram-positive bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.** 71:91-112. 2010

SOUZA DIOGE P., OKA GABRIEL U., ALVAREZ-MARTINEZ CRISTINA E., BISSON-FILHO ALEXANDRE W., DUNGER GERMAN, HOBEIKA LISE, CAVALCANTE NAYARA S., ALEGRIA MARCOS C., BARBOSA LEANDRO R.S., SALINAS ROBERTO K., GUZZO CRISTIANE R. & FARAH CHUCK S. Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications** 6, Article number: 6453. 2015

STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, G. M., AND CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. **Proc. Fla. Hort. Soc.** 93:10-14, 1980

TSENG, Y. -H., CHOY, K. -T., HUNG, C. -H., LIN, N. -T., LIU, J. -Y., LOU, C. -H. (). Chromosome map of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17 with locations of genes involved in xanthan gum synthesis and yellow pigmentation. **J. Bacteriol.** 181, 117-125, 1999

67

UROZ S, DESSAUX Y, OGER P. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. **ChemBiochem.** 2009 Jan 26;10(2):205-16. 2009

VAN GIJSEGEN, F., GOUCH, C., ZISCHEK, C., NIQUEUX, E., ARLAT, M., GENIN, S. The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. **Mol. Microbiol.** 15, 1095-1114. 1995

VOJNOV, A. A., SLATER, H., DANIELS, M. J., & DOW, J. M. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. **Mol. Plant Microbe Interact.** 14, 768-774. 2001

WANG, L.H. et al. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. **Mol. Microbiol.** 51, 903-912, 2004

WATERS, C.M. AND BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 21, 319-346, 2005

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross kingdom signaling in the bacterial world. **Microbiology** 153:3923-3928. 2007

WILLIAMS P, WINZER K, CHAN WC & CAMARA M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 362: 1119-1134, 2007

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem. J.** 322, 681-692, 1997

68

YANG B, SUGIO A, WHITE FF. Os8N3 Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease is a host disease susceptibility gene for bacterial blight of rice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 103:10503-10508. 2006

YANG HU, JUNLI ZHANG, HONGGE JIA, DAVIDE SOSSO, TING LI, WOLF B. FROMMER, BING YANG, FRANK F. WHITE, NIAN WANG, AND JEFFREY B. JONES. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 111: E521-E529.2014

ZHANG LH AND DONG YH,. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Mol. Microbiol.** 53, 1563-1571, 2004

ZHU, J., OGER, P. M., SCHRAMMEIJER, B., HOOYKAAS, P. J. J., FARRAND, S. K., & WINANS, S. C. The bases of crown gall tumorigenesis. **J. Bacteriol.** 182, 3885-3895, 2000

ZHAO, L., XUE, T., SHANG, F., SUN, H., AND SUN, B. Staphylococcus aureus AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence. **Infect. Immun.** 78(8):3506-3511,2010