

## Efeitos de Extratos de planta hospedeira na fisiologia e secreção de proteínas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Camila Y. Ratagami\*, Ícaro B. Dias, Cristina E. Alvarez-Martinez

### Resumo

A bactéria *Xanthomonas citri* pv *citri* é o fitopatógeno causador do cancro cítrico. O projeto consiste na análise os efeitos de sinais químicos presentes em extratos de plantas hospedeiras na fisiologia da *X.citri*. Os resultados obtidos indicam que o cultivo da bactéria na presença de extratos de laranja induz a secreção de proteínas potencialmente importantes para a virulência e colonização. Além disto, observamos diferenças importantes no padrão de formação de biofilme em superfície abiótica.

### Palavras-chave:

*Xanthomonas*, sinalização, secreção.

### Introdução

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp *citri* (*Xac*), é uma doença que atinge espécies de citros e é caracterizada pela formação de lesões necróticas com halos cloróticos em folhas e frutos. Estudos recentes têm mostrado a existência de mecanismos de percepção de sinais químicos eliminados pelo hospedeiro em bactérias, através do sistema de “quorum-sensing” (1), a chamada sinalização “interkingdom” (2). Alguns estudos já demonstraram a indução de alterações metabólicas e no perfil de expressão gênica devido a presença de extratos de folha da planta hospedeira em outras bactérias do gênero *Xanthomonas* (3,4) Portanto, o foco desse trabalho é a identificação de proteínas diferencialmente secretadas na presença de extrato de plantas hospedeiras, através do gel bidimensional e espectrometria de massas, além da análise dos efeitos do extrato em aspectos da fisiologia de *Xac*, como a formação de biofilme e motilidade.

### Resultados e Discussão

Inicialmente foi necessário estabelecer protocolos adequados de extração de proteínas secretadas em sobrenadante de culturas de *Xac*, em 3 condições: na ausência de extratos, na presença de extrato da planta hospedeira (laranja) e de extrato de tabaco (planta não hospedeira). Foi possível obter extratos proteicos de alta qualidade, sem contaminação com proteínas intracelulares, conforme confirmado em ensaios de imunoblot usando anticorpo específico para a ribonuclease citoplasmática RnhA. Além disto, é possível perceber claramente o aparecimento de uma banda exclusiva em amostras obtidas após cultivo em meio suplementado com extrato de laranja. Observamos também que essa banda não foi encontrada em sobrenadante de culturas suplementadas com extrato de folha de tabaco, planta não hospedeira de *Xac*. Portanto, esses resultados indicam a presença de moléculas sinalizadoras nos extratos capazes de induzir a secreção de pelo menos uma proteína no sobrenadante de *Xanthomonas*.

Diante dos resultados obtidos, realizamos análises das amostras através de gel bidimensional que revelou a presença de um “spot” mais abundante na amostra cultivada em meio suplementado com extrato de laranja, em comparação com a amostra obtida por cultivo na

ausência de extratos. A região que contém o “spot” foi recortada dos géis e as proteínas presentes foram identificadas por espectrometria de massas. Os resultados demonstraram a presença de três proteínas com características de proteínas extracelulares e/ou de membrana externa de bactérias Gram-negativas. Além disto, a análise da produção de biofilme em superfícies abióticas demonstrou um aumento na formação de biofilme pela adição de extratos de plantas hospedeiras, enquanto o uso de extratos de tabaco não afeta significativamente esta função.

### Conclusões

Nossos resultados demonstram que extratos de plantas hospedeiras induzem mecanismos de sinalização em *Xanthomonas citri* pv *citri*, levando a alterações fisiológicas e fenotípicas importantes, como formação de biofilme e secreção de proteínas.

### Agradecimentos

A aluna foi bolsista de Iniciação Científica FAEPEX-PRP/UNICAMP. Apoio financeiro da Fapesp (2014/19720-6) e FAEPEX/PRP-UNICAMP.

1. Fuqua, W. C. Winans, S. C. Greenberg, E. P.. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 1994;176(2):269-275.
2. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP.. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*. 2001;35:429-68.
3. Mehta A, Rosato YB. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant.. *Proteomics*. 2001;1(9):1111-1118.
4. Tahara, Sandra T Mehta, Angela Rosato, Yoko B. Proteins induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* with leaf extract of the host plant (*Passiflorae edulis*). *Proteomics*. 2003;3(1):95-102.