



PAPEL DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* NA RESISTÊNCIA A ESTRESSES AMBIENTAIS E FORMAÇÃO DE BIOFILME

Maria Vitoria C. Silva, Yasmin M. Alvarez, Yasmin Costa de Barreiros, Camila Yuri Ratagami, Lidia dos Passos Lima, Lucas de Moraes Ceseti, Cristina Alvarez Martinez.

Resumo

O fitopatógeno gram-negativo *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é o agente causador do cancro cítrico, doença que afeta diversos cultivares de citros acarretando em grandes perdas na agricultura. Esta bactéria possui uma série de sistemas de secreção envolvidos no transporte de macromoléculas para o meio extracelular ou para o interior de células-alvo, desempenhando importantes funções na virulência e sobrevivência ao ambiente. Neste projeto foi caracterizado o papel do Sistema de Secreção do tipo VI (SS6) na resistência a estresses ambientais (pH ácido e oxidativo) e na formação de biofilme em superfície abiótica. Nossos dados indicam um papel para o gene *ecfK* na sobrevivência a pH ácido.

Palavras-chave:

Xanthomonas citri, Estresses Ambientais, Sistemas de Secreção Bacterianos.

Introdução

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xac*) é um fitopatógeno, gram-negativo, baciliforme, com apenas um flagelo polar, causador do cancro-cítrico, doença responsável por causar lesões nos ramos, frutos e folhas em diversos citros(1). Bactérias gram-negativas podem apresentar até seis tipos de Sistemas de Secreção, que são complexos protéticos responsáveis por secretar substratos para o exterior da célula ou diretamente para o interior de uma célula-alvo (2).

Neste trabalho foi caracterizado o papel do Sistema de Secreção do tipo 6 (SS6) de *Xac* perante estresses ambientais e na formação de biofilmes, através de ensaios realizados com duas linhagens mutantes em componentes essenciais para o funcionamento do sistema em *Xac* (Δ SS6 e Δ *ecfK*).

Resultados e Discussão

Foram realizados ensaios em condições de estresse enfrentadas por *Xac* no ambiente. A sobrevivência a estresse oxidativo, pela adição de 4,4 mM de peróxido de hidrogênio, foi testada para a cepa selvagem *Xac*A306 e nas linhagens mutantes em um componente (Δ SS6) e um regulador do SSVI (Δ *ecfK*). Nestes ensaios não foram observadas diferentes taxas de sobrevivência entre as linhagens mutantes e a selvagem. Foi testada também a sobrevivência destas linhagens em pH 4,5 e 4,0 pela acidificação do meio de cultura. Em pH 4,5 não foi possível observar variação das taxas de sobrevivência entre as linhagens selvagem e mutantes. Entretanto, em pH 4,0 foi possível observar sensibilidade a acidez na linhagem mutante no regulador transcricional *ecfK*, indicando uma função deste gene na sobrevivência a esta condição. Ainda foi avaliado o papel dos genes *hcp* e *ecfK* na resposta a ácido hipocloroso nas concentrações 0,03% e 0,06%. Os resultados obtidos com uso da concentração de 0,03% mostram que as linhagens mutantes sobreviveram mais que a selvagem. Porém, não foi observada sensibilidade em nenhuma das linhagens testadas nos ensaios com 0,06% de ácido hipocloroso.

Já em relação ao biofilme, foi testada a linhagem mutante Δ SS6 em comparação à linhagem selvagem. Estas foram inoculadas em tubo de ensaio e cultivado em meio NB (5g/L peptona, 3g/L extrato de carne, pH 7,0). O biofilme formado foi quantificado após coloração com cristal violeta e solubilização em solução alcoólica pela determinação da DO_{570nm} . As medições foram feitas no terceiro e quinto dia de cultivo. Foi possível observar maior formação de biofilme na linhagem selvagem no quinto dia de cultivo. Porém será necessária a realização de mais réplicas experimentais para a confirmação do fenômeno.

Conclusões

Este trabalho mostra que o SS6 de *Xac* não está envolvido na resposta a estresse oxidativo e estresse ácido. Porém, nossos resultados demonstram que o regulador transcricional *ecfK* tem papel importante na resposta a pH 4,0. Nossos dados também apontam um papel para este sistema na formação de biofilme.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Pró-reitoria de Pesquisa UNICAMP, CNPq e FAPESP (2014/19720-6). Agradecemos aos monitores Lucas C, Lidia P, Camila R, pela ajuda no desenvolvimento do projeto e a orientadora Profa Dra Cristina Alvarez Martinez.

1. Bingle, L. E., Bailey, C. M., & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 3–8.
2. Brunings, A. M., & Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4, 141–157.