

BRUNA MARIA MAGRO PEREIRA

**FENÓTIPOS RELACIONADOS À AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DO
COMPLEXO DE ESPÉCIE *Ralstonia solanacearum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini

Coorientadoras: Maria Cristina Dantas Vanetti
Flávia de Souza Oliveira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Viçosa

T

P436f
2022

Pereira, Bruna Maria Magro, 1993-
Fenótipos relacionados à agressividade de isolados do complexo
de espécie *Ralstonia solanacearum* / Bruna Maria Magro Pereira. -
Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (98 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Microbiologia, 2022.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.791>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bactérias fitopatogênicas. 2. Biofilmes. 3. *Quorum sensing*
(Microbiologia). 4. *Ralstonia solanacearum*. I. Zerbini, Poliane
Alfenas, 1977-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 571.99312

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


BRUNA MARIA MAGRO PEREIRA

**FENÓTIPOS RELACIONADOS À VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DO COMPLEXO
DE ESPÉCIES *Ralstonia solanacearum* OBTIDOS NO BRASIL**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 07 de dezembro de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 BRUNA MARIA MAGRO PEREIRA
Data: 25/01/2023 09:13:16-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Bruna Maria Magro Pereira
Autora

Documento assinado digitalmente
 POLIANE ALFENAS ZERBINI
Data: 26/01/2023 17:25:54-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Poliane Alfenas Zerbini
Orientadora

Dedico

Primeiramente a Deus.

À minha família, pelo apoio contínuo.

A meu marido Leonardo, pelo amor e pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado nessa grande e longa jornada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela infraestrutura para realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálises onde realizei parte desse trabalho.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas e ao Professor Humberto pela realização de importantes análises deste trabalho.

À minha orientadora Professora Poliane Alfenas Zerbini, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, carinho, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis dessa jornada.

A todos os que passaram pelo Laboratório de Vírus, que direta ou indiretamente passaram pelo meu caminho durante essa jornada de pós-graduação.

Ao Rafael e à Flávia pela parceria nos times vírus e biofilme.

Ao meu amado esposo Leonardo, que esteve comigo nos piores e melhores momentos da minha vida e possibilitou que eu chegasse até aqui com seu carinho, acolhimento e constante suporte.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, pela amizade e companheirismo durante esses anos.

A todos que torceram por mim nesta batalha.

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

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas
pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que
todo mundo vê”*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

MAGRO-PEREIRA, Bruna Maria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Fenótipos relacionados à agressividade de isolados do Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum***. Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini. Coorientadoras: Maria Cristina Dantas Vanetti e Flávia de Souza Oliveira.

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) agrupa isolados bacterianos de *Ralstonia* sp. que infectam uma ampla gama de hospedeiros com impacto econômico mundial, infecta mais de 250 espécies de plantas em 54 famílias botânicas. Seus mecanismos de virulência têm se mostrado diversos e podem ser adaptáveis ao hospedeiro e ao ambiente. A formação do biofilme considerada o principal fator que resulta no aparecimento dos sintomas de murcha nas plantas. A formação do biofilme requer uma série de sinalizações e sistemas regulatórios, entre eles, sistemas de comunicação *Quorum Sensing* (QS). Conhecer os fenótipos relacionados à virulência das espécies desse complexo é fundamental para o desenvolvimento de métodos de controle. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar os fenótipos relacionados à virulência de isolados obtidos de todo o Brasil e caracterizar a formação do biofilme desses isolados em relação à sua morfologia e capacidade de formação de biofilme, bem como avaliar a motilidade e agressividade em plantas susceptíveis de tomate. Além disso, determinar a produção de moléculas de *N*- Acil-Homoserina Lactona (AHL) por esses isolados, identificar essa molécula e entender os fenótipos que podem ser regulados pelo mecanismo de QS mediado por AHLs. Neste estudo a diversidade de morfotipos de biofilmes obtidos por microscopia confocal de varredura a laser, além de diferentes padrões de motilidade e morfologia de colônia em vermelho de Congo foi determinada. Observou-se que isolados formadores fracos de biofilme *in vitro*, podem ser agressivos e formar biofilme na parede do xilema vascular de plantas de tomate. Grande parte dos isolados foram produtores de AHLs. Dois isolados (IBSBF2576 e LPF750) utilizados para a detecção apresentaram a *N*-butanoil-AHL (C4-AHL), revelando um sistema de QS AI-1 ainda não descrito em *R. solanacearum*. Para determinar o efeito fenotípico da ausência de AHLs produzidas pelos isolados de *R. solanacearum*, foi inserido nos isolados IBSBF2576 e LPF750 um plasmídeo expressando uma lactonase que realiza a quebra do anel lactona das AHLs. Foi observado importante alteração da formação do biofilme *in vitro*, além de redução expressiva das motilidades *twitching*, *swarming* e *swimming*, aumento da resistência ao estresse oxidativo e manutenção da ausência de agressividade em tomates. Esses resultados reforçam que a diversidade genética presente no CERS é refletida nos fenótipos de virulência e formação do biofilme, além disso a descoberta

de uma nova molécula de AHL produzida por *R. solanacearum* demonstra à existência de uma grande diversidade de mecanismos de comunicação *QS*. Ambos, virulência e *QS* precisam ser amplamente estudados para conhecer cada vez mais os fatores que estão relacionados com a agressividade de *R. solanacearum* e sua variabilidade.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*. *Quorum sensing*. Agressividade.

ABSTRACT

MAGRO-PEREIRA, Bruna Maria, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2022. **Aggressiveness-related phenotypes of *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. Advisor: Poliane Alfenas Zerbini. Co-advisors: Maria Cristina Dantas Vanetti and Flávia de Souza Oliveira.

The *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC) groups bacterial isolates of *Ralstonia* sp. that infect a wide range of hosts with worldwide economic impact infect more than 250 plant species in 54 botanical families. Its virulence mechanisms have been shown to be diverse and may be adaptable to the host and the environment. Biofilm formation is considered the main factor that results in the appearance of wilting symptoms in plants. Biofilm formation requires a series of signaling and regulatory systems, including Quorum Sensing (QS) communication systems. Knowing the phenotypes related to the virulence of the species of this complex is fundamental for developing control methods. Thus, the objectives of the present study were to evaluate the virulence-related phenotypes of isolates obtained from all over Brazil and to characterize the biofilm formation of these isolates about their morphology and biofilm formation capacity, as well as to evaluate the motility and aggressiveness in plants likely tomato. Furthermore, to determine the production of N-Acyl-Homoserine Lactone (AHL) molecules by these isolates, identify this molecule and understand the phenotypes that can be regulated by the QS mechanism mediated by AHLs. In this study, the diversity of biofilm morphotypes obtained by confocal laser scanning microscopy and different patterns of motility and colony morphology in Congo red was determined. It was observed that in vitro, weak biofilm forming isolates can be aggressive and form biofilm in the vascular xylem wall of tomato plants. Most of the isolates produced AHLs. Two isolates (IBSBF2576 and LPF750) used for detection showed N-butanol-AHL (C4-AHL), revealing an AI-1 QS system not yet described in *R. solanacearum*. To determine the phenotypic effect of the absence of AHLs produced by the *R. solanacearum* isolates, a plasmid expressing a lactonase that breaks the lactone ring of the AHLs was inserted into the IBSBF2576 and LPF750 isolates. An important change in biofilm formation in vitro was observed, in addition to a significant reduction in twitching, swarming and swimming motility, increased resistance to oxidative stress and maintenance of the absence of aggressiveness in tomatoes. These results reinforce that the genetic diversity present in the RSSC is reflected in the phenotypes of virulence and biofilm formation; in addition, the discovery of a new AHL molecule produced by *R. solanacearum* demonstrates the existence of a great diversity of QS communication mechanisms. Both,

virulence and QS need to be widely studied to know more and more the factors related to the aggressiveness of *R. solanacearum* and its variability.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*. Quorum sensing. Aggressiveness.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1	14
1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
1.1 O Complexo de Espécies <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
1.2 Mecanismos de virulência de <i>R. solanacearum</i>	17
2. Visão geral do mecanismo de <i>Quorum Sensing</i>	19
2.1 Sistema de <i>quorum sensing</i> descritos em CERS	20
2.2 Métodos de detecção de AHLs	22
2.3 Alvos biotecnológicos do <i>quorum sensing</i> para controle do CERS	23
3. Conclusões e perspectivas	24
4. Referências	25
CAPÍTULO 2	31
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	34
2.1. Condições de crescimento dos isolados	34
2.2. Identificação da espécie por PCR	34
2.3. Identificação do filotipo por PCR	35
2.4. Determinação do biovar	35
2.5. Curva de crescimento	35
2.6. Ensaio de motilidade	36
2.7. Ensaio de vermelho de Congo	36
2.8. Ensaio de formação do biofilme	36
2.9. Microscopia Confocal	37
2.10. Agressividade em plantas de tomates	37
2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura	37

2.12. Análises estatísticas	38
3. Resultados	38
3.1. Diversidade de isolados do Complexo de Espécies <i>Ralstonia solanacearum</i> (CERS) 38	
3.2. Formação de biofilme dos isolados de CERS.....	41
3.3. Avaliação morfológica do biofilme dos isolados em cupom de poliestireno por Microscopia Confocal.....	44
3.4. Motilidade <i>twitching</i> e <i>swarming</i> dos isolados do CERS	46
3.5. Determinação da agressividade dos isolados em plantas de tomates susceptíveis	50
3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura do xilema vascular de tomateiro infectado com isolados do CERS	52
4. Discussão	54
5. Conclusões e perspectivas futuras	58
6. Referências	58
CAPÍTULO 3	68
1. Introdução.....	70
2. Materiais e métodos	71
2.1. Culturas e condições de crescimento	71
2.2. Detecção de AHLs utilizando diferentes biosensoras.....	71
2.3. Extração de AHLs.....	72
2.4. Detecção e identificação de AHLs.....	72
2.5. Determinação das alterações fenotípicas dos isolados IBSBF2576 e LPF750 na ausência de moléculas AHLs	73
2.5.1. Obtenção dos transconjugantes IBSBF2576-T e LPF750-T expressando <i>aiiA</i> lactonase.....	73
2.5.2. Identificação por PCR	73
2.5.3. Confirmação da ausência de moléculas AHLs	73
2.5.4. Formação de biofilme	74

2.5.5.	Microscopia Confocal.....	74
2.5.6.	Ensaio de motilidade.....	74
2.5.7.	Ensaio de teste de tolerância ao estresse oxidativo	75
2.5.8.	Agressividade dos isolados em tomate.....	75
2.5.9.	Análises estatísticas	75
3.	Resultados	75
3.1.	Detecção de AHLs por indução de bactérias biosensoras e confirmação por LS-MS 75	
3.2.	Determinação das alterações fenotípicas dos isolados IBSBF2576 e LPF750 na ausência de moléculas AHLs	79
4.	Discussão	90
5.	Conclusões e perspectivas futuras	93
6.	Referências.....	94
	CONCLUSÕES FINAIS GERAIS.....	98

INTRODUÇÃO GERAL

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) agrupa as três espécies, distinguíveis geneticamente, *R. solanacearum* (filotipo IIA e IIB), *R. pseudosolanacearum* (filotipo I e III) e *R. syzygi* subespécies (filotipo IV, incluindo *R. syzygi* R24 e Blood disease bacterium; BDB). São bactérias fitopatogênicas de grande impacto econômico, sendo classificadas como pragas quarentenárias em diversos países. Sua gama de hospedeiro é ampla, infectando mais de 250 espécies de plantas de diferentes famílias botânicas, entre elas, culturas de grande importância agrícola, como batata, tomate, pimentão, eucalipto e banana.

São bactérias Gram-negativas, no formato de bastonetes, móveis, aeróbias e com flagelos polares. Habitantes naturais no solo, podem ser classificadas como persistentes ao se manterem viáveis por longos períodos, colonizando plantas daninhas não hospedeiras. Sua invasão ocorre por feridas ou aberturas naturais nas raízes das plantas e se deslocam pelo tecido vegetal por devido a sua motilidade. Sua propagação no tecido vegetal requer a liberação de enzimas degradadoras do tecido vegetal e de proteínas efetoras de sinal (T3S), mediado pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS).

A virulência é desencadeada por mecanismos dependentes de *quorum*, como o sistema de comunicação *QS pchBSRQ*, que produz moléculas sinais 3-OH-PAME ou 3-OH-MAME, que, em elevadas populações, ativam o regulador transcricional global *phcA*. PhcA desencadeia uma série de respostas à indução de virulência, como síntese de exopolissacarídeos, produção de adesinas, alteração de motilidade e expressão do sistema *vsr*, relacionado à virulência, assim levando ao surgimento dos sintomas de murcha na planta.

A diversidade genética do CERS, refletida na classificação filogenética dos isolados, parece influenciar nos fenótipos de virulência, resultando em variações entre isolados em mecanismos de virulência e em fenótipos. Estudos de metagenômica e proteômica ajudam a entender essas variações, entretanto o impacto *in vitro* e *in vivo* precisa ser continuamente estudado, para possibilitar conhecer a dinâmica de agressividade dos isolados em diferentes plantas hospedeiras e criar ferramentas úteis de controle biológico. Assim, este estudo avalia fenótipos de virulência de uma gama de isolados do Brasil, buscando caracterizar os padrões fenotípicos *in vitro* e *in vivo*, e determina o efeito fenotípico da degradação de AHLs produzidas por dois isolados de *R. solanacearum*.

CAPÍTULO 1

Revisão textual: O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* e os mecanismos de comunicação *Quorum Sensing*

MAGRO-PEREIRA, B. M., ALFENAS-ZERBINI, P REVISÃO TEXTUAL: O complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* e os mecanismos de comunicação *Quorum Sensing*.

1. *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é uma bactéria pertencente ao filo Gracilicutes, classe β -*Proteobacteria* e gênero *Ralstonia*. É um bastonete, Gram-negativo, aeróbio, móvel, com flagelos polares, não fluorescente e habitante natural do solo. Inicialmente nomeada *Bacillus solanacearum* e posteriormente como *Pseudomonas solanacearum*, sua classificação passou por mudanças ao longo dos anos até a classificação atualmente utilizada (OEPP/EPPO 2004; Paudel et al. 2020). A discriminação dos isolados em raças e biovars foi adotada em 1962 por Budenhagen, considerando a diversidade de plantas hospedeiras e distribuição geográfica. A raça 1 ocorre em regiões tropicais e infecta tabaco, *Solanaceae* e outras famílias de plantas. A raça 2 ocorre predominantemente em áreas tropicais na América do Sul, atacando predominantemente bananeira e Helicônia. A raça 3 ocorre em regiões tropicais, subtropicais e equatoriais de elevadas altitudes, afetando batata, tomate, ocasionalmente *Pelargonium zonale*, berinjela, capsicum e algumas solanáceas como *Solanum nigrum* e *Solanum dulcamara*. As raças 4 e 5 são agressivas em gengibre e *Morus*, respectivamente. Hayward, em 2000, propôs a classificação em dois grupos, a Divisão I, que agrupa os biovars 3, 4, e 5 da Ásia, e a Divisão II, com os biovars 1, 2A (região dos Andes) e 2T (região dos Trópicos) da América do Sul (Álvarez et al. 2010; Paudel et al. 2020).

O avanço dos estudos moleculares revelou uma grande variabilidade genética entre as cepas de *P. solanacearum* e uma elevada similaridade entre as espécies *P. solanacearum* e *Pseudomonas syzygi*, resultando na proposta de nomeação de “complexo de espécies”. Em 1996 uma análise englobando 21 cepas confirmou a relação dessas espécies entre si e sua correlação genética, corroborando a proposta de uma nova classificação em um complexo de espécies que posteriormente foi nomeado como “Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum*” (CERS) (Paudel et al. 2020).

1.1 O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum*

O CERS foi originado em função de diferentes análises de diversidade e conteúdo gênico de vários isolados em distintos trabalhos, que corroboram a necessidade de se agrupar esses isolados em espécies geneticamente relacionadas.

Análises filogenéticas baseadas no DNA possibilitaram a classificação de *R. solanacearum* em quatro grandes grupos, os filotipos, subdivididos em sequevares. Esse sistema foi proposto por Prior e Fegan (2005) e sugere uma classificação hierárquica em espécie, filotipo, sequevar e clone. Segundo os autores, o filotipo é um agrupamento

monofilético de cepas baseados em análises filogenéticas de dados de sequência da região ITS (Internal Transcribed Spacer), do gene *hrpB* e do gene da endoglucanase, enquanto sequevar, ou sequência variante, é definida como um grupo de cepas com sequência altamente conservada em uma mesma região sequenciada (Prior and Fegan 2005). Um estudo de diversidade genômica e proteômica realizado por Prior (2016) deu suporte para a proposta de classificação do CERS em filotipos ao analisar o genoma completo de 23 isolados e realizar a proteômica de 73 isolados. Seus dados suportam a divisão em filotipos, além de proporem a criação do filotipo IV, neste trabalho (Prior et al. 2016).

Mais recentemente, Safni et al. (2014) realizaram um extenso estudo com mais de 50 isolados de *R. solanacearum* classificando-as de acordo com o estudo proposto por Prior e Fegan (2005). Baseados nesses estudos, os filotipos foram divididos em quatro grupos, que, segundo as análises filogenéticas, correspondem à sua origem geográfica. O filotipo I inclui cepas originárias principalmente da Ásia, o filotipo II as da América, o filotipo III as da África e o filotipo IV as da Indonésia, Austrália e Japão. Com base nas relações filogenéticas, *R. solanacearum* foi dividida em três espécies formando o Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (*Ralstonia Solanacearum* Species Complex — RSSC) que engloba as espécies, geneticamente distintas, *R. solanacearum* (filotipo IIA e IIB), *R. pseudosolanacearum* (filotipo I e III) e *R. syzygi* subespécies (filotipo IV, incluindo *R. syzygi* R24 e BDB; *Blood Disease Bacterium*) (Safni et al. 2014; Prior et al. 2016).

Bactérias do CERS podem ser identificadas em laboratório usando meios de cultura semi-seletivos, métodos sorológicos, testes bioquímicos, análise de proteínas e ácidos graxos e, métodos baseados no ácido nucleico. O uso de meios semi-seletivos como o SMSA (Sequeira Medium South Africa) ou TZC (Triphenil Tetrazolium Choride) são mais comumente usados para isolamento e análise de virulência das cepas (García et al. 2019). Esses meios podem ser usados em conjunto com métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) com amplificação de regiões específicas do 16S e 23S rRNA, que podem ser úteis para identificação do patógeno já isolado do meio ou direto de uma amostra ambiental (Máfia 2005; Rodrigues 2010; García et al. 2019).

A determinação da presença de *R. solanacearum* no solo é realizada pelo uso de testes imunológicos rápidos ou por plaqueamento em meio semi-seletivo SMSA. O isolamento a partir de plantas sintomáticas pode ser realizado utilizando qualquer parte da planta, visto que, estando estabelecida, *R. solanacearum* se locomove por todos os tecidos vegetais (Lowe-Power et al. 2018b; García et al. 2019). A determinação do tamanho da população requer maior cuidado, uma vez que métodos tradicionais de contagem e métodos sorológicos possuem baixa

exatidão, detectando as bactérias apenas em populações superiores a 10^3 . Técnicas moleculares são amplamente utilizadas, como PCR e PCR em tempo real, que irão detectar a presença de células bacterianas a uma precisão de até uma única célula (Máfia 2005; García et al. 2019).

A classificação dentro do CERS é realizada pela utilização de *primers* específicos desenhados para a divisão em filotipos. Esses *primers* foram propostos por Fegan e Prior em 2005 e continuam sendo utilizados até o presente momento. Além da classificação dentro de filotipos, pode ser feita a identificação em sequevar, que consiste na amplificação do fragmento do gene *egl* por PCR e, subsequente, é realizado o sequenciamento e alinhamento filogenético para, assim, agrupar os novos isolados em espécie e identificar o sequevar correspondente. Essas descrições taxonômicas são importantes para a constante identificação de novos isolados e para o estudo da evolução genética do CERS (Genin e Denny 2012; Safni et al. 2014; Prior et al. 2016; Lowe-Power et al. 2018b; Paudel et al. 2020).

1.2 Mecanismos de virulência de *R. solanacearum*

O CERS infecta as plantas por aberturas naturais e feridas existentes nas raízes. A bactéria reconhece a planta hospedeira por meio de mecanismos mediados por substâncias quimiotáticas produzidas pela planta (Lowe-Power et al. 2018b; Xue et al. 2020). Isso resulta na ativação de sistemas de locomoção via flagelo, permitindo que o patógeno atinja a raiz da planta, onde forma microcolônias e assim penetram a raiz (Genin e Denny 2012; Hikichi et al. 2017). Para realizar a infecção, *R. solanacearum* possui mecanismos de evasão dos sistemas de defesa das plantas hospedeiras, possibilitando sua invasão e colonização. As plantas possuem mecanismos que dificultam o acesso de patógenos à raiz, como produção de uma matriz composta de polissacarídeos, proteínas e DNA. Tran et al. (2016) demonstraram a capacidade de *R. solanacearum* produzir DNases e, assim, ser capaz de atravessar a matriz polimérica que recobre a raiz das plantas hospedeiras.

Uma vez dentro da planta, *R. solanacearum* precisa evadir da imunidade desencadeada por receptores de reconhecimento de padrões (sistema PTI), que é mediado por PAMPs/MAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns/ Microbe-Associated Molecular Patterns) distribuídos pela superfície celular da bactéria. Apesar de pouco se saber sobre o reconhecimento dos PAMPs, a capacidade de *R. solanacearum* em alterar seus PAMPs resultou em eficiente evasão do sistema de defesa PTI, garantindo a colonização do tecido vegetal (Xue et al. 2020). Diversos trabalhos descrevem um polimorfismo de sequência na flagelina de *R. solanacearum* *flg22*, que a torna indetectável pelas plantas hospedeiras *Arabidopsis*, tomate,

pimenta, berinjela, tabaco e *Nicotiana benthamiana* (Pfund et al. 2007; Mueller et al. 2012; Wei et al. 2018). Outro mecanismo do sistema imune das plantas é a produção de espécies reativas de oxigênio. A *R. solanacearum* parece contrapor esse sistema de defesa ao produzir enzimas degradadoras de espécies reativas de oxigênio, como superóxido dismutase, sendo que a síntese dessas enzimas é regulada por mecanismos de comunicação célula a célula, conhecido como *quorum sensing* (QS) (Genin e Denny 2012).

Ao se locomover pela planta *R. solanacearum* utiliza movimentos como *twitching* e *swimming* para atingir diferentes tecidos vegetais (Lowe-Power et al. 2018b; Corral et al. 2020). A penetração no tecido vegetal ocorre pela expressão de uma série de genes *hrp* que irão formar o sistema de secreção do tipo III (T3SS). Esse sistema é responsável pela translocação de enzimas, que irão degradar a parede celular vegetal, e de fatores de evasão do sistema imune da planta, permitindo sua colonização na planta hospedeira (Landry et al. 2020). Além disso, como mecanismo de evasão do sistema imune das plantas, o T3SS induz a produção de proteínas efetoras (T3Es). Essas proteínas são importantes fatores de virulência de fitopatógenos, pois são responsáveis por manipular as funções celulares e alterar a transdução de sinal da planta, o que garante a proliferação bacteriana e desenvolvimento dos sintomas da doença (Lowe-Power et al. 2018b; Landry et al. 2020; Corral et al. 2020).

Por movimentos *twitching* e *swimming*, as células bacterianas se deslocam pelo tecido vegetal até atingir os vasos do xilema. Uma vez no xilema da planta, *R. solanacearum* pode se comportar como célula planctônica, deslocando-se no fluxo da seiva do xilema ou movendo-se por motilidade *twitching* na parede do vaso, ou se manter aderida à parede do vaso do xilema (Lowe-Power et al. 2018b). Essas células aderidas à parede do xilema irão se multiplicar e ativar o mecanismo de *quorum sensing*, dando início ao processo de formação do biofilme. A adesão à parede do xilema ocorre por ação de proteínas adesinas, apêndices celulares, como o pili, e produção de exopolissacarídeos. Esse espesso exopolímero produzido pelo biofilme bacteriano, junto com o aumento progressivo desse biofilme, leva à obstrução dos vasos do xilema da planta, impedindo, assim, o fluxo de água e minerais às partes superiores da planta, que morre em poucos dias por murcha (Genin and Denny 2012; Tran et al. 2016; Hikichi et al. 2017; Mina et al. 2019).

Observações por técnicas de microscopia demonstram a colonização do xilema de plantas hospedeiras, apresentando biofilme compacto e denso ao longo da parede dos vasos (Tran et al. 2016; Caldwell et al. 2017; Khokhani et al. 2017). Além disso, estudos têm demonstrado que diversos genes são fundamentais para a eficiente formação do biofilme. A mutação do gene *phcA*, o fator de transcrição global, resulta em drástica redução do biofilme,

alteração do biofilme no xilema, redução da virulência, alteração na motilidade, entre outros (Khokhani et al. 2017). A produção de DNAses é um fator importante de regulação da formação do biofilme de *R. solanacearum* e mutantes de GMI1000 DnucA/B apresentaram um biofilme no xilema vascular de plantas de tomates com matriz mais fibrosa, frouxa e maior que a apresentada pelo isolado selvagem, confirmando a importância desses genes no controle da formação do biofilme (Tran et al. 2016). O gene *epsB* é relacionado com a síntese do exopolissacarídeo. Mutantes de EpsB foram menos virulentos e alteraram a expressão dos genes *xpsR*, *phcA*, *epsE*, *vsrC* e *vsrB*, que estão relacionados à formação do biofilme e virulência (Li et al. 2022b).

Muito ainda precisa ser estudado para compreender, com detalhes, os fatores-chaves para a virulência de *R. solanacearum*. Estudos de metagenômica e proteômica apresentam um panorama amplo de genes envolvidos com a virulência, mas o papel essencial de cada gene ainda é melhor descrito com pesquisas direcionadas a genes-alvo (Bocsanczy et al. 2014; Ailloud et al. 2015). Por fim, a diversidade genética entre os isolados de *R. solanacearum* vem mostrando a capacidade do CERS em se adaptar ao ambiente e também desenvolver estratégias de escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro, conseguindo, assim, suplantá-los e garantir seu sucesso na infecção e agressividade.

Muitos desses processos de adaptabilidade e patogenicidade de diferentes fitopatógenos podem ser controlados pelo mecanismo de QS. Alguns estudos mostram que o QS está envolvido na regulação de múltiplos fenótipos, incluindo formação de biofilme e virulência. No entanto, são pouco compreendidos os mecanismos genéticos e moleculares desse sistema na virulência e sobrevivência de *R. solanacearum* em condições adversas. Isso torna o bloqueio do QS um possível alvo para o desenvolvimento de estratégias de controle deste fitopatógeno de grande importância mundial.

2. Visão geral do mecanismo de *Quorum Sensing*

O QS é um sistema de comunicação molecular que permite a regulação da expressão gênica em resposta a mudanças na densidade populacional, contribuindo para uma organização coordenada da comunidade microbiana (Fuqua et al. 1994). Na década de 1970, Nealson et al. (1970) observaram que em *Vibrio fischeri*, agora *Aliivibrio fischeri*, a bioluminescência era ativada quando a densidade da população celular era suficiente para produzir uma alta concentração de moléculas denominadas de autoindutores (AIs) que controlavam a transcrição do *operon* luciferase. Os AIs são nomeados desta forma pois parte de sua função é estimular a própria produção (Fuqua et al. 1994; Kendall and Sperandio 2014).

Muitas espécies de bactérias usam esse sistema de comunicação célula a célula para organizar seu comportamento coletivo em diversos ambientes (Azimi et al. 2020). Essa regulação de genes específicos é extremamente vantajosa, pois pode favorecer a ativação ou repressão de diferentes processos biológicos, como conjugação, produção de compostos secundários, formação de biofilme, motilidade, sobrevivência ao estresse oxidativo e virulência (Darch et al. 2012). Assim, esses AIs podem ser utilizados para a comunicação durante o processo de infecção bacteriana, a fim de superar as barreiras encontradas no hospedeiro. Essa adaptabilidade está diretamente relacionada ao controle da expressão gênica pela detecção de mudanças nas condições ambientais circundantes (Prescott e Decho 2020; Sikdar e Elias 2020).

Quatro grupos de AIs são bem descritos na literatura. O primeiro é o AI-1, também conhecido como *N*-acil homosserina lactonas (AHLs), utilizado para comunicação apenas por bactérias Gram-negativas. O segundo é o AI-2, que é um grupo de moléculas produzidas e utilizadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O terceiro é o AI-3, usado para comunicação entre os reinos e o quarto são os peptídeos autoindutores, usados para comunicação apenas por bactérias Gram-positivas (Kendall e Sperandio 2014; Verbeke et al. 2017; Wang et al. 2020). No entanto, com o avanço de novas pesquisas foram encontradas diferentes substâncias utilizadas para sentir o ambiente externo e regular a expressão de genes e que fogem desse agrupamento mencionado anteriormente, especialmente no CERS.

2.1 Sistema de *quorum sensing* descritos em CERS

Os Als-1, também conhecidos como AHLs, são derivados de ácidos graxos produzidos por uma AHL sintase a partir dos substratos S-adenosil-L-metionina (SAM) e proteína transportadora de acila acilada (acil-ACP) (Watson et al. 2002). Duas proteínas pertencentes às famílias LuxI-LuxR são necessárias para que o *QS* mediado por AHL ocorra. As proteínas LuxI ou proteínas homólogas são responsáveis pela síntese de AHLs, enquanto LuxR ou proteínas homólogas são reguladores transcricionais que se ligam a AHLs e regulam a expressão de genes alvo (Reading and Sperandio 2006).

A molécula AHL contém um anel lactona homoserina e uma cadeia lateral acila variando entre 4-20 átomos de carbono e pode ter modificações, como a presença de grupos hidroxila, oxo, metil ou até insaturações na cadeia carbônica. Essas variações são importantes para distinguir os tipos de AHLs e para seu papel biológico (Arashida et al. 2018; Saurav et al. 2020). Quando a comunidade bacteriana se encontra em baixas densidades populacionais, ocorre a produção basal de AHL, que é diluída no meio de crescimento. Com o aumento

populacional, o número de células produtoras de AHL aumenta e, conseqüentemente, há o acúmulo dessas moléculas no meio até atingirem um limiar. As AHLs podem se difundir livremente pelo envelope celular, sem a necessidade de uma proteína transmembrana. A regulação gênica ocorre após a AHL se ligar diretamente às proteínas da família LuxR e esse complexo se liga ao DNA, ativando ou reprimindo genes-alvos (Kumar et al. 2022a).

Apesar dos estudos sobre o *QS* terem sido intensificados a partir da década 1990, em *R. solanacearum* muitos mecanismos que envolvem o *QS* mediado por AHLs ainda precisam ser elucidados. *R. solanacearum* possui proteínas homólogas a LuxI e LuxR, denominadas de SolI e SolR, respectivamente. SolI é responsável pela síntese de *N*-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-AHL) e *N*-octanoil-L-homoserina lactona (C8-AHL). Foi demonstrado que o sistema SolI-SolR controla a expressão de *aidA*, um gene importante envolvido na adaptação do patógeno à variação da temperatura (Flavier et al. 1997b; Meng et al. 2015).

Recentemente outro sistema de *QS* mediado por AHLs foi descrito em um isolado de *R. solanacearum*. Esse isolado, chamado de *R. solanacearum* EP1, possui o sistema RasI e RasR e tem a capacidade de produzir dois tipos de AHLs, *N*-3-hidroxidodecanoil-homoserina lactona (3-OH-C12-AHL) em alta concentração e *N*-3-hidroxitetradecanoil-homoserina lactona (3-OH-C14-AHL) em menor concentração. O sistema RasI-RasR desempenha um papel importante na fisiologia do isolado EP1, regulando a expressão de mais de 154 genes. Vários fenótipos foram afetados com a mutação dos genes *rasI* e/ou *rasR*, como a formação de biofilme, produção de celulose, resistência ao estresse oxidativo, motilidade e virulência, indicando que esse sistema é fundamental na sobrevivência desse fitopatógeno em condições estressantes (Yan et al. 2022). Assim, esses resultados claramente mostram que possivelmente vários sistemas de *QS* mediado por AHLs ainda não foram descobertos.

R. solanacearum ainda possui um terceiro mecanismo de *QS* que não envolve a produção de AHLs. Trata-se da síntese de duas moléculas sinalizadoras derivadas de ácidos graxos: metil 3-hidroximiristato (3-OH MAME) ou metil 3-hidroxipalmitato (3-OH PAME) (Flavier et al. 1997a). Ambas moléculas são produzidas pela ativação do sistema *phc*, que engloba o operon *phcBSRQ* e o gene *phcA*. A síntese destas substâncias é realizada pela proteína PhcB, uma metiltransferase. Quando as concentrações de PAME ou MAME atingem um nível limiar, ocorre a ativação de uma proteína histidina quinase chamada PhcS. Sequencialmente, PhcS ativada fosforila o regulador de resposta PhcR ou PhcQ que em seguida ativa a proteína PhcA, que é um fator de transcrição envolvido na regulação de muitos fenótipos de *R. solanacearum* (Genin and Denny 2012; Takemura et al. 2021).

O sistema *phc* é o mecanismo de *QS* mais estudado em *R. solanacearum*, visto que desempenha um papel importante na regulação global de diferentes fatores de virulência de *R. solanacearum*, como formação de biofilme, motilidade e síntese de exopolissacarídeos. Interessantemente, o sistema *phc* regula positivamente o sistema SolI-SolR, mostrando que existe uma conexão entre os mecanismos de *QS* (Genin and Denny 2012).

Embora pouco entendidos, os sistemas de *QS* em *R. solanacearum* desempenham papéis importantes na regulação de múltiplos fenótipos neste fitopatógeno, sendo fundamental o direcionamento de mais estudos para elucidar esses mecanismos e desenvolver medidas que possam auxiliar no controle de *R. solanacearum*. O *QS* mediado por AHLs no controle de fenótipos de virulência em *R. solanacearum* são ainda mais escassas até o presente momento. A detecção de AHLs produzidas por um determinado isolado é uma etapa importante no estudo da relação entre a produção e seu real papel na fisiologia da bactéria, visto que o *QS* mediado por AHL pode atuar de forma efetiva na virulência de um patógeno.

2.2 Métodos de detecção de AHLs

O método mais adotado para detecção de AHLs é o uso de biosensores. Esses micro-organismos são modificados geneticamente para não produzir AHLs, mas são capazes de detectar AHLs presentes no meio, como em sobrenadantes livres de células, extratos celulares ou diretamente das próprias bactérias em meio de cultura sólido. Geralmente, os biosensores produzem algum tipo de fenótipo que é ativado na presença da molécula sinalizadora, no caso a AHL (Miller and Gilmore 2020). Esses biosensores na sua grande maioria possuem uma sequência codificadora de uma proteína funcional pertencente à família LuxR clonada em conjunto com um promotor específico, que controla o fenótipo alvo (Steindler and Venturi 2007).

Por exemplo, *Chromobacterium violaceum* 026 (CV026), um dos biosensores mais usados, produz um pigmento roxo chamado de violaceína na presença de AHLs com cadeia carbônica variando entre 4 e 8, com ou sem o grupo de substituição oxo. Outro biosensor *Escherichia coli* psB403 que possui a proteína LuxR e genes de bioluminescência que são ativados na presença de C6-AHL ou C8-AHL. *Agrobacterium tumefaciens* WCF047 é um biosensor para detectar AHLs com cadeias laterais muito longas. Esta bactéria possui a enzima β -galactosidase que degrada o composto 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-galactopiranosídeo (X-gal) com produção de cor azul (Pinto et al. 2007). Desse modo, o ideal é a utilização de mais de um biosensor, visto que eles se diferem na detecção de AHLs com diferentes tamanhos na

cadeia carbônica. Em muitos casos, os biosensores podem ser aplicados juntos com o método de cromatografia em camada fina, o que permite sugerir qual o tipo de AHL produzida (Steindler e Venturi 2007; Miller e Gilmore 2020).

A utilização de biosensores é limitada por não permitir identificar a AHL que está sendo produzida e as modificações presentes na molécula. Por isso, a utilização de métodos mais modernos é essencial para descobrir qual o tipo de AHL e suas características conformacionais. A utilização de Cromatografia Líquida de Ultra-Performance (UPLC), Espectrometria de Massa (MS), Cromatografia Líquida-MS (LC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR) têm sido usados para detectar moléculas sinalizadoras em baixas concentrações, auxiliando na elucidação da estrutura molecular, e dos mecanismos fisiológicos nos patógenos (Lépine et al. 2018; Cutignano 2019).

2.3 Alvos biotecnológicos do *quorum sensing* para controle do CERS

A virulência do CERS é um problema de espectro mundial que requer contínuos estudos na busca de mecanismos de controle desses patógenos. Os estudos de metagenômica e proteômica trazem luz para potenciais alvos gênicos que podem ser usados no controle biológico de *R. solanacearum*. O conhecimento dos genes e sistemas gênicos relacionados com a patogenicidade podem criar caminhos alternativos que levem a métodos eficientes de controle e manejo desse fitopatógeno.

Um alvo que vem sendo explorado é a inibição do *QS*, por inativação de genes essenciais, pelo uso de moléculas que interfiram na comunicação, método conhecido como *Quorum Quenching (QQ)*. Estudos *in planta* têm demonstrando a capacidade de plantas hospedeiras de produzirem metabólitos secundários que atuam como *QQ* em *R. solanacearum*. A inibição do sistema de comunicação *phcBRSQ* resulta em alterações fenotípicas importantes, como redução da formação do biofilme e redução de sintomas da doença (Yang et al. 2021; Kumar et al. 2022b). Outra via a ser explorada é o uso de plantas transgênicas que expressam enzimas degradadoras de moléculas *QS* de *R. solanacearum*. Esse método foi testado em plantas hospedeiras de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, que foram clonadas com uma enzima degradadora de AHL, o resultado foi a resistência aumentada das plantas à infecção pelo fitopatógeno (Dong et al. 2001; Helman e Chernin 2015).

Kumar et al., em 2017, demonstram que bactérias que compõem a rizosfera podem ser usadas como competidoras de *R. solanacearum* e atuarem no biocontrole ao produzir enzimas degradadoras de AHLs. Nesse estudo, é possível confirmar que houve redução significativa da

formação de biofilme de *R. solanacearum* sob efeito da presença do lisado de células bacterianas que compõem a rizosfera (Kumar Jayanna e Umesha 2017). Em outro trabalho, Yoshihara et al. (2020) estudaram o efeito da inibição do sistema de comunicação *phcBRSQ* de *R. solanacearum* ao utilizar análogos de 3-OH-MAME, que competem com o receptor *phcB*. O resultado foi a obtenção de moléculas que são capazes de competir eficientemente com 3-OH-MAME e, conseqüentemente, levaram à redução da formação do biofilme e redução da virulência *in planta* nos isolados avaliados (Yoshihara et al. 2020). Mais recentemente, Kumar et al. (2022) realizaram uma análise biocomputacional onde foram modeladas as proteínas PhcA e PchR e, utilizando banco de dados de compostos naturais, buscou compostos com potencial interação com essas proteínas e que atuam como competidores potenciais e, assim, inibem o *QS* via *phcBRSQ*. Esses estudos exemplificam métodos alternativos de controle biológico do CERS utilizando o *QS* como alvo em alternativa ao uso de agentes antimicrobianos e produtos químicos (Kumar et al. 2022b).

3. Conclusões e perspectivas

Os CERS são fitopatógenos de relevância e impacto global, sendo classificados como praga quarentenária em vários países, devido às enormes perdas econômicas que eles provocam. Estudos mais completos e diversificados que vêm sendo conduzidos trazem maior clareza sobre os mecanismos que envolvem sua agressividade e virulência em tantas plantas hospedeiras. Conhecer mais sobre a diversidade dos isolados e os aspectos genotípicos e fenotípicos podem ajudar a identificar esses fitopatógenos no campo e auxiliar na busca de métodos de controle.

O *QS* de *R. solanacearum* é uma alternativa promissora como alvo para o controle biológico, em substituição ao uso de antimicrobianos, podendo ser realizado com o uso de bactérias competidoras como pelo uso de compostos naturais de plantas. Outra alternativa é o uso de plantas geneticamente modificadas, que serão capazes de resistir à infecção de *R. solanacearum* ao inibir sua comunicação *QS*. Muito há o que se explorar sobre os diversos mecanismos de comunicação *QS* de *R. solanacearum* e sua função na virulência, que pode ser útil para o desenvolvimento de métodos de controle biológico, que refletem o que já se sabe sobre a diversidade genética do CERS e como essas bactérias estão evoluindo para sobrepujar os mecanismos de defesa das plantas hospedeiras. Assim, esses estudos podem ajudar a compreender a grande gama de hospedeiros de *R. solanacearum* e fornecer conhecimentos importantes sobre a virulência desses fitopatógenos.

Espera-se que com as novas tecnologias de transcriptoma e genômica comparativa, e com o aprimoramento das técnicas de estudo de genes alvo, possamos ampliar os

conhecimentos sobre o CERS e sua constante evolução genética e, assim, fornecer informações aprofundadas sobre o complexo mecanismo de virulência dessas bactérias, que possam contribuir para a busca de alternativas de controle deste fitopatógeno.

4. Referências

- Ailloud F, Lowe T, Cellier G, Roche D, Allen C, Prior P (2015) Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. *BMC Genomics* 16:1–11. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1474-8/TABLES/2>
- Álvarez B, Biosca EG, López MM (2010) On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* 267–279. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Arashida N, Shimbo K, Terada T, Okimi T, Kikuchi Y, Hashiro S, Umekage S, Yasueda H (2018) Identification of novel long chain *N*-acylhomoserine lactones of chain length c20 from the marine phototrophic bacterium *rhodovulum sulfidophilum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 82:1683–1693. https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1490168/SUPPL_FILE/TBBB_A_1490168_SM7385.PDF
- Azimi S, Klementiev AD, Whiteley M, Diggle SP (2020) Bacterial quorum sensing during infection. *Annu Rev Microbiol* 74:201–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032020-093845>
- Bocsanczy AM, Achenbach UCM, Mangravita-Novo A, Chow M, Norman DJ (2014) Proteomic comparison of *Ralstonia solanacearum* strains reveals temperature dependent virulence factors. *BMC Genomics* 15:1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-280>
- Caldwell D, Kim B-S, Iyer-Pascuzzi AS (2017) *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology* 107:528–536. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0353-R>
- Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbé J, Aranda J, Valls M (2020) Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity. *mSphere* 5:1–16. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00740-19/SUPPL_FILE/MSPHERE.00740-19-SF007.TIF
- Cutignano A (2019) Analytical approaches for the identification of quorum sensing molecules.

In: Quorum Sensing. Elsevier, pp 29–53

- Darch SE, West SA, Winzer K, Diggle SP (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci* 109:8259–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118131109>
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nat* 2001 4116839 411:813–817. <https://doi.org/10.1038/35081101>
- Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP (1997a) Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26:251–259. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1997.5661945.X>
- Flavier AB, Ganova-Raeva LM, Schell MA, Denny TP (1997b) Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 179:7089–7097. <https://doi.org/10.1128/JB.179.22.7089-7097.1997>
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- García RO, Kerns JP, Thiessen L (2019) *Ralstonia solanacearum* species complex: A quick diagnostic guide. *Plant Heal Prog* 20:7–13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- Genin S, Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Phytopathol* 50:67–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>
- Helman Y, Chernin L (2015) Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Mol Plant Pathol* 16:316–329. <https://doi.org/10.1111/MPP.12180>
- Kendall MM, Sperandio V (2014) Cell-to-Cell Signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus* 6. https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0002-2013/ASSET/88491922-CE1B-4442-A0E5-0D35CDBD8120/ASSETS/GRAPHIC/ESP-0002-2013_FIG_010.JPG
- Khokhani D, Lowe-Power TM, Tran TM, Allen C (2017) A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MBio* 8:20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00895-17>

- Kumar Jayanna S, Umesha S (2017) Quorum quenching activity of rhizosphere bacteria against *Ralstonia solanacearum*. *Rhizosphere* 4:22–24. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.007>
- Kumar L, Patel SKS, Kharga K, Kumar R, Kumar P, Pandohee J, Kulshresha S, Harjai K, Chhibber S (2022a) Molecular mechanisms and applications of *N*-Acyl Homoserine Lactone-mediated quorum sensing in bacteria. *Molecules* 27:7584. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217584>
- Kumar S, Ahmad K, Behera SK, Nagrale DT, Chaurasia A, Yadav MK, Murmu S, Jha Y, Rajawat MVS, Malviya D, Singh UB, Shankar R, Tripathy M, Singh HV (2022b) Biocomputational assessment of natural compounds as a potent inhibitor to quorum sensors in *Ralstonia solanacearum*. *Molecules* 27:3034. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27093034>
- Landry D, González-fuente M, Deslandes L, Peeters N (2020) The large , diverse , and robust arsenal of *Ralstonia solanacearum* type III effectors and their in planta functions. *Mol Plant Pathol* 21:1377–1388. <https://doi.org/10.1111/mpp.12977>
- Lépine F, Milot S, Groleau M-C, Déziel E (2018) Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS) for the detection and quantification of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactones (AHLs) and 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines (HAQs). In: *Quorum Sensing*. pp 49–59
- Li S, Yang L, Ran Y, Ding W (2022) A *epsB* mutant of *Ralstonia solanacearum* as novel biocontrol agent of tobacco bacterial wilt via activating salicylic acid signalling. *Physiol Mol Plant Pathol* 119:101834. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2022.101834>
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C (2018) How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. *Trends Microbiol* 26:929–942. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.06.002>
- Máfia RG (2005) Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Universidade Federal de Viçosa
- Meng F, Babujee L, Jacobs JM, Allen C (2015) Comparative transcriptome analysis reveals cool virulence factors of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2. *PLoS One* 10:e0139090. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139090>
- Miller C, Gilmore J (2020) Detection of quorum-sensing molecules for pathogenic molecules

- using cell-based and cell-free biosensors. *Antibiotics* 9:1–23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050259>
- Mueller K, Bittel P, Chinchill D, Jehle AK, Albert M, Boller T, Felix G (2012) Chimeric FLS2 receptors reveal the basis for differential flagellin perception in arabidopsis and tomato. *Plant Cell* 24:2213–2224. <https://doi.org/10.1105/TPC.112.096073>
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular Control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313–322. <https://doi.org/10.1128/JB.104.1.313-322.1970>
- OEPP/EPPO B 34 (2004) *Ralstonia solanacearum*. In: Diagnostic protocols for regulated pests. pp 173–178
- Paudel S, Dobhal S, Alvarez AM, Arif M (2020) Taxonomy and phylogenetic research on *Ralstonia solanacearum* species complex: A complex pathogen with extraordinary economic consequences. *Pathogens* 9:1–26. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110886>
- Pfund C, Tans-Kersten J, Dunning FM, Alonso JM, Ecker JR, Allen C, Bent AF (2007) Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* Cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:696–706. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.696>
- Pinto UM, de Souza Viana E, Martins ML, Vanetti MCD (2007) Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control* 18:1322–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.09.005>
- Prescott RD, Decho AW (2020) Flexibility and adaptability of quorum sensing in nature. *Trends Microbiol* 28:436–444. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.12.004>
- Prior P (Philippe), Fegan M (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum* species complex. pp 449–461
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B, Allen C (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>
- Reading NC, Sperandio V (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS*

Microbiol Lett 254:1–11. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2005.00001.X>

- Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: Proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., R. s. Int J Syst Evol Microbiol 64:3087–3103. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.066712-0>
- Saurav K, Borbone N, Burgsdorf I, Teta R, Caso A, Bar-Shalom R, Esposito G, Britstein M, Steindler L, Costantino V (2020) Identification of quorum sensing activators and inhibitors in the marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. Mar Drugs 18:127. <https://doi.org/10.3390/md18020127>
- Sikdar R, Elias M (2020) Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm, and microbiomes: a review of recent advances. Expert Rev Anti Infect Ther 18:1221–1233. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1794815>
- Steindler L, Venturi V (2007) Detection of quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. FEMS Microbiol Lett 266:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>
- Takemura C, Senuma W, Hayashi K, Minami A, Terazawa Y, Kaneoka C, Sakata M, Chen M, Zhang Y, Nobori T, Sato M, Kiba A, Ohnishi K, Tsuda K, Kai K, Hikichi Y (2021) PhcQ mainly contributes to the regulation of quorum sensing-dependent genes, in which PhcR is partially involved, in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1. Mol Plant Pathol 22:1538–1552. <https://doi.org/10.1111/MPP.13124>
- Tran TM, MacIntyre A, Hawes M, Allen C (2016a) Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. PLOS Pathog 12:e1005686. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005686>
- Tran TM, Macintyre A, Khokhani D, Hawes M, Allen C (2016b) Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. Environ Microbiol 18:4103–4117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13446>

- Verbeke F, De Craemer S, Debunne N, Janssens Y, Wynendaele E, Van de Wiele C, De Spiegeleer B (2017) Peptides as quorum sensing molecules: Measurement techniques and obtained levels *in vitro* and *in vivo*. *Front Neurosci* 11:1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00183>
- Wang S, Payne GF, Bentley WE (2020) Quorum Sensing communication: Molecularly connecting cells, their neighbors, and even devices. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 11:447–468. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CHEMBIOENG-101519-124728>
- Watson WT, Minogue TD, Val DL, von Bodman SB, Churchill MEA (2002) Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell* 9:685–694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00480-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00480-X)
- Wei Y, Caceres-Moreno C, Jimenez-Gongora T, Wang K, Sang Y, Lozano-Duran R, Macho AP (2018) The *Ralstonia solanacearum* csp22 peptide, but not flagellin-derived peptides, is perceived by plants from the *Solanaceae* family. *Plant Biotechnol J* 16:1349–1362. <https://doi.org/10.1111/PBI.12874>
- Xue H, Lozano-Durán R, Macho AP (2020) Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Plants* 9:516. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9040516>
- Yan J, Li P, Wang X, Zhu M, Shi H, Yu G, Chen X, Wang H, Zhou X, Liao L, Zhang L (2022) RasI/R quorum sensing system controls the virulence of *Ralstonia solanacearum* strain EP1. *Appl Environ Microbiol* 88:22. <https://doi.org/10.1128/aem.00325-22>
- Yang L, Wei Z, Li S, Xiao R, Xu Q, Ran Y, Ding W (2021) Plant secondary metabolite, daphnetin reduces extracellular polysaccharides production and virulence factors of *Ralstonia solanacearum*. *Pestic Biochem Physiol* 179:104948. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104948>
- Yoshihara A, Shimatani M, Sakata M, Takemura C, Senuma W, Hikichi Y, Kai K (2020) Quorum sensing inhibition attenuates the virulence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem Biol* 15:3050–3059. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00752>

CAPÍTULO 2

Caracterização de fenótipos e avaliação do padrão de formação do biofilme de isolados do Complexo de Espécies de *Ralstonia solanacearum*

MAGRO-PEREIRA, B. M., CUNHA, V. P., REZENDE, R. S.; VANETTI, M. C. D., ALFENAS-ZERBINI, P Caracterização de fenótipos e avaliação do padrão de formação do biofilme de isolados do Complexo de Espécies de *Ralstonia solanacearum*

Resumo

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) é um grupo de fitopatógenos de relevante impacto para culturas agricultáveis importantes, como tomateiro, batata, bananeira e eucalipto. Sua agressividade vem sendo estudada e a tem revelado sua complexidade e uma diversidade de fatores da relação planta-hospedeiro que influenciam no desenvolvimento da doença. Neste estudo, buscou-se avaliar um grupo de isolados que foram obtidos de diversas plantas hospedeiras no Brasil. Características bioquímicas e fenótipos relacionados à virulência, como motilidade e formação do biofilme *in vitro* e *in vivo* foram avaliadas. Observamos uma grande variedade nos fenótipos *in vitro* nos isolados analisados, corroborando o impacto da diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* nos fenótipos relacionados com a virulência. A análise da formação e morfologia do biofilme *in vitro* e *in vivo* mostra uma diversidade de tipos de biofilme e a importante diferença do biofilme formado em uma superfície abiótica para uma superfície biótica. Esses resultados demonstram a grande variabilidade fenotípica *in vitro* e *in vivo* de um grupo de isolados do CERS, corroborando com outros estudos que correlacionam a virulência de *R. solanacearum* a um conjunto complexo de fatores que vão além da forte formação do biofilme e obstrução dos vasos do xilema vascular das plantas hospedeiras.

Palavras-chave: *Ralstonia solanacearum*, virulência, biofilme.

1. Introdução

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) é um grupo de fitopatógenos de grande importância agrícola devido à elevada perda econômica causada por esses microrganismos (Genin 2010). Essas bactérias infectam diferentes tipos de plantas agricultáveis como tomate, eucalipto, batata, banana, berinjela, amendoim, gengibre, entre outras (Schell 2000; Genin 2010). Durante o processo de colonização por CERS, ocorre formação de um espesso biofilme no xilema da planta infectada, que impede o fluxo de água e nutrientes. Esse biofilme é responsável pelo desenvolvimento de murcha, sintoma típico da infecção por esses patógenos, que leva rapidamente à morte da planta (Schell 2000; Salanoubat et al. 2002; Genin and Denny 2012; Lowe-Power et al. 2018b).

Por movimentos *twitching* e *swimming*, as células bacterianas se deslocam pelo tecido vegetal até atingir os vasos do xilema (Lowe-Power et al. 2018b; Corral et al. 2020). Uma vez no xilema, as bactérias do CERS podem se comportar: como células planctônicas, deslocando-se no fluxo da seiva do xilema por movimento nadatório; movem-se por motilidade *twitching* na parede do vaso; ou se mantêm aderidas ao vaso do xilema (Lowe-Power et al. 2018b). Essas células aderidas irão se multiplicar e ativar os mecanismos de *quorum sensing*, dando início ao processo de formação do biofilme. O processo de adesão ao xilema ocorre por ação de proteínas adesinas, apêndices celulares, como o pili, e produção de exopolissacarídeos. Esse espesso exopolímero produzido pelo biofilme bacteriano, junto com seu aumento progressivo, obstrui os vasos do xilema da planta, impedindo, assim, o fluxo de água e minerais às partes superiores da planta, que morre em poucos dias por murcha (Genin and Denny 2012; Tran et al. 2016; Hikichi et al. 2017; Mina et al. 2019).

Os mecanismos de virulência são regulados por uma complexa cascata gênica, tendo como regulador central o gene *phcA*. Dependente de *quorum*, esse regulador global é reprimido ou induzido em diferentes fases do processo de infecção bacteriana no tecido vegetal. Em elevadas densidades populacionais, moléculas sinais de *quorum sensing* (QS) acumuladas no meio extracelular são internalizadas e desencadeiam uma resposta de regulação expressão gênica. O papel dos sistemas *QS phcBRSQ* e *RasI/R* mostraram ser fundamentais para a ativação dos sistemas gênicos de virulência, produção de biofilme e locomoção (Hikichi et al. 2017; Lowe-Power et al. 2018b; Takemura et al. 2021; Yan et al. 2022).

Recentes estudos de transcriptoma e metagenômica de *Ralstonia solanacearum* vêm aprofundando os conhecimentos de sistemas gênicos que estão envolvidos com os mecanismos de patogenicidade, especificidade de hospedeiro e mecanismos de virulência contribuindo para

a construção do conhecimento sobre o CERS (Peyraud et al. 2016; Perrier et al. 2018; Lowe-Power et al. 2018a; Georgoulis et al. 2021). Essas novas informações nos levaram a hipotetizar que as bactérias do CERS possuem características fenotípicas diferentes entre si, como motilidade, produção de biofilme e patogenicidade em plantas de tomate, que divergem entre isolados pertencentes ao mesmo grupamento filogenético. Para isso, este trabalho tem o objetivo de analisar um grupo de isolados, distribuídos ao longo no território brasileiro e descrever características fenotípicas relacionada com mecanismos de virulência.

2. Material e Métodos

2.1. Condições de crescimento dos isolados

Foram usados 31 isolados de *Ralstonia* sp. provenientes da coleção de doação do Laboratório de Vírus, do Departamento de Microbiologia e da coleção do Laboratório de Patologia Florestal, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Os isolados armazenados em estoque de água a temperatura ambiente, foram ativados em ágar CPG (caseína 1%, peptona bacteriológica 10% e glicose 5%) com adição de 1% de tetrazólio (Kelman) por 48 horas a 28 °C. Após o crescimento, colônias isoladas foram selecionadas e estriadas em ágar CPG e crescidas por 48 horas a 28 °C. Meio CPG líquido foi utilizado quando necessário.

2.2. Identificação da espécie por PCR

Para a determinação de espécie, o DNA total dos isolados foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo instruções do fabricante. Para a confirmação da espécie dos isolados foi realizado o PCR amplificando a região ITS de 199 pb (Rs199R – TATTCGCTTGACCCTATAA; Rs199F – AGTAACTCGGCTGTTCTTT), segundo Chen et al. (2010), com poucas modificações. Foram utilizados 2 µL de DNA (15 ng/µL), 0,1 µL de enzima Taq Pol (+) MgCl₂ (Cellco Biothec), 0,5 µL de *primer* (10uM), 1µL de dNTPs e água MilliQ q.s para uma reação final de 25 µL. O ciclo de amplificação foi de 94 °C por 2 min de desnaturação inicial, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com extensão final de 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e analisado em fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotechnology).

2.3. Identificação do filotipo por PCR

A designação de filotipo foi realizada segundo Fegan e Prior (2005). Foram usados os conjuntos de *primers* Nmult t 21:1F, Nmult 21:2F, Nmult 22:Inf e Nmult 23:AF, com sentido *forward*, e o *primer* Nmult 22:RR, com sentido *reverse*, além do par de *primers* 759/760, como marcadores para a espécie (Fegan e Prior, 2005). Foram utilizados 2 µL de DNA (15 ng/µL), 0,1 µL de enzima Taq Pol (+) MgCl₂ (Cellco Biothec), 1 µL de dNTPs, 0,5 µL de cada *primer forward* (10 µM) e 1 µL para o *primer reverse* (10 µM), para uma reação final de 25 µL. O ciclo de amplificação foi de 96 °C por 3 min de desnaturação inicial, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 90 s, com extensão final de 72 °C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram analisados como descrito no item 2.2. A identificação dos filotipos foi realizada em função da análise de tamanho de fragmentos gerados: Filotipo I – 144 pb, Filotipo II – 372 pb, Filotipo III – 91 pb e Filotipo IV – 213 pb.

2.4. Determinação do biovar

O ensaio de determinação do biovar foi realizado de acordo com Huang, Yan e Wang (2012). Sete carboidratos foram utilizados para determinação do padrão de fermentação dos isolados, sendo eles glicose, celobiose, dulcitol, maltose, sorbitol, manitol e trealose, todos na concentração final de 1% em 1 mL de meio basal (1 g de NH₂H₂PO₄, 0,2 g de KCl, 0,2 g de MgSO₄-7H₂O, 1 g de peptona bacteriológica e 0,8% de vermelho de fenol, para 1 litro). Foi utilizado 20 µL de suspensão bacteriana crescida em meio líquido CPG *overnight* a 28 °C. Os microtubos com os meios de carboidratos e o inóculo incubado de 4 a 6 dias a 28 °C para avaliação da fermentação dos carboidratos.

2.5. Curva de crescimento

Para avaliar o crescimento dos isolados foi realizada a curva em função da densidade óptica a 600 nm durante 48 horas. Os isolados foram crescidos em caldo CPG por 24 horas a 28 °C e padronizados para 0,1 na DO_{600nm}. Em poços de placa de poliestireno de 96 poços foram pipetados 198 µL de CPG líquido e 2 µL de inóculo padronizado. A placa foi incubada a 28 °C em leitor de placa Multiskan FC (Thermo Scientific) com programação de 5 s de repouso e 5 s de agitação intercalados durante todo o período de incubação. As leituras foram feitas a cada 30 min por 48 horas. O ensaio foi realizado em triplicata, com cinco réplicas cada.

2.6. Ensaios de motilidade

Para avaliar a capacidade de locomoção dos isolados, foram realizados os ensaios de motilidade *twitching* e *swarming* (Raza et al. 2016). Para o ensaio de *twitching* foram preparadas placas de 60 mm de diâmetro contendo CPG com 1,7% de ágar e, para o ensaio de *swarming*, a concentração de ágar utilizada foi de 0,7% em placas de 90 mm de diâmetro. Os isolados foram crescidos em caldo CPG por 48 h a 28 °C e, posteriormente, padronizados para a DO 600 nm de 0,1. Uma gota de 2 µL de suspensão bacteriana padronizada foi aplicada na superfície do ágar e as placas incubadas a 28 °C após completa secagem da gota. O ensaio de *twitching* foi avaliado por 5 dias em mm da colônia ao longo do tempo e, ao final de 5 dias, a projeção de bordas foi visualizada em microscópio óptico com câmera acoplada no aumento de 10x. No ensaio de *swarming* a motilidade foi avaliada pelo diâmetro das colônias ao longo de 3 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata, contendo duas réplicas cada.

2.7. Ensaio de vermelho de Congo

O ensaio de vermelho congo foi performedo em meio sólido CPG contendo 0,8% de vermelho de Congo (Freeman et al. 1989). Os isolados foram padronizados a DO 600nm de 0,1 e pipetados 2 µL de inóculo na superfície do ágar. A morfologia das colônias foi avaliada após 24 horas de crescimento em lupa com 1x de aumento.

2.8. Ensaio de formação do biofilme

Os isolados foram crescidos por 48 horas a 28 °C e padronizados para DO 600nm de 0,1 utilizando tampão PBS, 2% de inóculo foi adicionado a 198 µL de meio CPG líquido em poços de placa de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada por 24 e 48 horas a 28 °C para avaliar a formação de biofilme. Após o tempo de incubação foi realizada a leitura do crescimento na DO 600 nm e o meio foi removido dos poços cuidadosamente e lavado com tampão PBS por três vezes. Os poços foram corados com 1% de cristal violeta por 30 min a temperatura ambiente, consecutivamente, lavado gentilmente três vezes com tampão PBS. O corante aderido foi dissolvido com etanol 95% e avaliado em leitor de placa na absorbância de 590 nm. Foi avaliada a capacidade de formação do biofilme de acordo com método de Stepanovic et al. (2007) e a 590 nm.

2.9. Microscopia Confocal

Isolados com padrões distintos de formação de biofilme ao longo do tempo e um representante de cada padrão de formação de biofilme foram para avaliação da morfologia da estrutura do biofilme em microscopia confocal de varredura a laser utilizando Live/Dead (SYTHO 9 e iodeto de propídio) como corante. Cupons de poliestireno de 10 x 30 mm foram lavados por uma hora em solução de NaOH 1%, posteriormente lavados por 1 hora em solução de etanol 70% e por fim esterilizados por irradiação UV por 15 minutos para cada lado. Em um tubo tipo Falcon de 15 mL, os cupons foram posicionados verticalmente e aproximadamente 1 mL de meio de cultura com 2% de inóculo bacteriano foi adicionado (volume suficiente para a formação de uma interface líquido-ar imediatamente antes da metade do cupom). Os tubos foram incubados a 28 °C por 24 e 48 horas sem agitação. Foi utilizado o Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss, LSM510 META, com aumento de 20X/0,5 e os lasers Argon/2 (458, 477, 488, 514 nm) e HeNe543 (543 nm). Foi utilizada a ferramenta Z-stack para gerar as imagens tridimensionais com padrão de fatiamento máximo e mínimo definidos manualmente.

2.10. Agressividade em plantas de tomates

Para o ensaio de agressividade foram utilizadas plantas de tomate, *Lycopersicon lycopersicum* (L.) H.Karst, variedade Santa Clara. As sementes foram germinadas por 21 dias em substrato florestal e transplantadas para vasos, contendo uma mistura de uma parte de substrato florestal para duas partes de solo comum, onde permaneceram até atingirem a formação da terceira folha verdadeira. A inoculação dos isolados foi realizada pelo método de inoculação direta no caule via perfuração com palito, na região axial da folha entre a primeira e a segunda folha verdadeira. Os sintomas de murcha foram avaliados por 15 dias em câmara de crescimento, com temperatura variando de 25 a 28 °C, umidade regulada em média de 80% e controle fotovoltaico de 12 h claro/escuro. Como controle negativo foi utilizado água MilliQ esterilizada (Khokhani et al. 2018). O experimento foi realizado em quatro repetições com cinco réplicas cada.

2.11. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliar a formação do biofilme no xilema vascular de plantas de tomate os isolados foram classificados quanto a sua capacidade de formar biofilme *in vitro* e a sua agressividade em plantas de tomate. Um isolado de cada categoria foi selecionado segundo os critérios: um

formador forte de biofilme e agressivo (GMI1000); um formador forte de biofilme e não agressivo (UB2014); um formador fraco de biofilme e agressivo (V6); e um formador fraco de biofilme e não agressivo (LPF750). Para as bactérias agressivas, o tecido vegetal foi coletado 5 dias após inoculação e para o controle negativo e bactérias não agressivas o tecido foi coletado 15 dias após a inoculação.

Tecidos de aproximadamente 10 mm de diâmetro foram coletados a uma distância de 5 cm do ponto de inoculação. Os discos de caule foram imersos, imediatamente após o corte, em solução fixadora de Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5% e Paraformaldeído 2,0% cacodilato de sódio 0,05 M) e mantidos em geladeira por, no mínimo, 24 horas. Os tecidos foram lavados com solução de cacodilato de sódio 0,05 M duas vezes e imersos em óxido de ósmio 0,1 M por uma hora. Após a imersão em óxido de ósmio, os tecidos foram lavados mais três vezes com solução de cacodilato de sódio 0,05 M e desidratados em concentrações seriadas de álcool (30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%), sendo mantidos em álcool 100%. Os tecidos desidratados foram cortados e submetidos a ponto crítico e metalização. Os cortes foram fixados em stubs e analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO 1430VP.

2.12. Análises estatísticas

Os dados foram analisados por comparação par a par entre os tempos avaliados. Foi adotado o teste t e teste de Turkey com n-value de 5 % de significância, para todos os ensaios realizados, em software GraphPad Prisma 5.00.

3. Resultados

3.1. Diversidade de isolados do Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS)

Primeiramente, foram selecionados 31 isolados de CERS obtidos de diferentes hospedeiros e do Brasil, incluindo as espécies tipo para o filotipo I, GMI1000, e do filotipo IV, Psi07. Esses isolados foram confirmados como sendo CERS e seu filotipo foi confirmado ou primeiramente determinado. Dos 29 isolados obtidos de hospedeiros coletados no Brasil, 25 foram classificados como pertencentes ao filotipo II, os outros quatro foram classificados como pertencentes ao filotipo I (Tabela 1).

Para conhecer o padrão de metabolismo de açúcares e álcoois como fonte de carbono e classificá-los quanto ao seu biovar, foi realizado o ensaio de fermentação de acordo com Huang et. al (2011). O padrão de fermentação (Tabela 1 e Tabela 1S) mostrou que 20 dos 31 isolados são do biovar 3, encontrado globalmente, e os demais isolados foram identificados biovar 2A

(2 isolado) e 2T (9 isolados). Dentre os isolados do Brasil, o biovar 2A foi encontrado no Ceará e em Alagoas, enquanto o biovar 2T agrupa isolados encontrados na Amazônia, no Pará, em Alagoas e no Amapá. Como mostrado na Tabela 1, os isolados de biovar 3 são encontrados em todas as regiões de onde os isolados foram obtidos.

Tabela 1: Isolados de CERS analisados nesse estudo: designação em filotipo e biovar.

Isolado	Fonte	Hospedeiro	Origem	Filotipo**	Biovar
<i>Ralstonia solanacearum</i>					
V45	INPA	Pepino	Amazônia	II_ND*	3
V41	INPA	Berinjela	Amazônia	II_ND*	3
V6	INPA	Tomate	Amazônia	II_ND*	2T
V43	INPA	Berinjela	Amazônia	II_ND*	3
V20	INPA	Tomate	Amazônia	II_ND*	3
V1	INPA	Tomate	Amazônia	II_ND*	3
AMC22	LPF/UFV	Eucalipto	Amapá	IIA_ND	3
RSCOI	MIND/UFV	Tomate	Minas Gerais	II_ND*	3
RSB1	MIND/UFV	Eucalipto	Bahia	IIA_38	3
B11	UFRPE	Banana	Amazônia	IIA_24	2T
RS480	EMBRAPA	Gerânio	São Paulo	IIIB_NS	3
RS467	INPA	Tomate	Amazônia	IIA_ND	3
RSB1+INOVÍRUS	MIND/UFV	Eucalipto	Bahia	IIA_38	3
IBSBF2576	LPF/UFV	Eucalipto	Santa Catarina	IIA_ND	3
LPF 750	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	II_ND*	3
LPF 751	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	II_ND*	2T
LPF 753	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	II_ND*	3
LPF 754	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	II_ND*	3
LPF 755	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	IIA_41	2T
LPF 755	LPV/UFV	Eucalipto	Pará	IIA_41	2T
LPF 756	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	II_ND*	2T
UB2014	EMBRAPA	Berinjela	Ceará	II_ND*	2A
LPF 710	LPF/UFV	Eucalipto	Alagoas	II_A	2T
LPF 718	LPF/UFV	Eucalipto	Alagoas	II_B	2A
LPF 807	LPF/UFV	Eucalipto	Amapá	II_B	2T
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>					
V4	INPA	Tomate	Amazônia	I_ND*	3
RS424	EMBRAPA	Tomate	Acre	I_NS	3
LPF 752	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	I_ND*	3
GMI 1000	UW	Tomate	Guiana Francesa	I-18	3
GMI 1000 + INOVÍRUS	MIND/UFV	Tomate	Guiana Francesa	I-18	3
<i>Ralstonia syzygii</i>					
Psi07	UW-M	tomate	Indonésia	IV_10	2T

* Filotipo determinado neste estudo

** Número após filotipo indica sua classificação em sequevar

ND- Sequevar não determinado

Esses dados mostram que os biovars 3 e 2T são distribuídos em todo o território brasileiro, principalmente na região norte. Além disso, são encontrados isolados com diferentes classificações em biovar obtidos em um mesmo estado e colonizando o mesmo tipo de hospedeiro, como LPF 755 e LPF753, no Pará, ou LPF710 e LPF807, em Alagoas. (Tabela 1).

3.2. Formação de biofilme dos isolados de CERS

A patogenicidade das bactérias do CERS está relacionada a produção de biofilme. A capacidade de formação de biofilme desses isolados foi avaliada utilizando o método estabelecido por Stepanovic (2007) para classificar os isolados em quatro tipos: forte, moderado, fraco e não formador (Tabela 2). Por meio desse método pode-se constatar que muitos isolados não foram capazes de formar biofilme na superfície de poliestireno. Essa observação foi confirmada no ensaio de formação do biofilme pelo método de cristal-violeta (Figura 1).

Tabela 2: Classificação da formação do biofilme de acordo com método Stepanovic.

Isolados	Adesão 24h	Adesão 48h
<i>R. solanacearum</i>		
V45		
V41		
V6		
V43		
V20		
V1		
AMC22		
RSCOI		
RSB1		
B11		
RS480		
RS467		
RSB1+INOVÍRUS		
IBSBF2576		
LPF750		
LPF751		
LPF753		
LPF754		
LPF755M		
LPF755S		
LPF756		
UB2014		
LPF 710		
LPF 718		
LPF 807		
<i>R. pseudosolanacearum</i>		
V4		
RS424		
LPF752		
GMI1000		
GMI1000 + INOVIRUS		
<i>R. syzygi</i>		
Psi07		

Legenda

	Não formador
	Formador Fraco
	Formador Moderado
	Forte formador

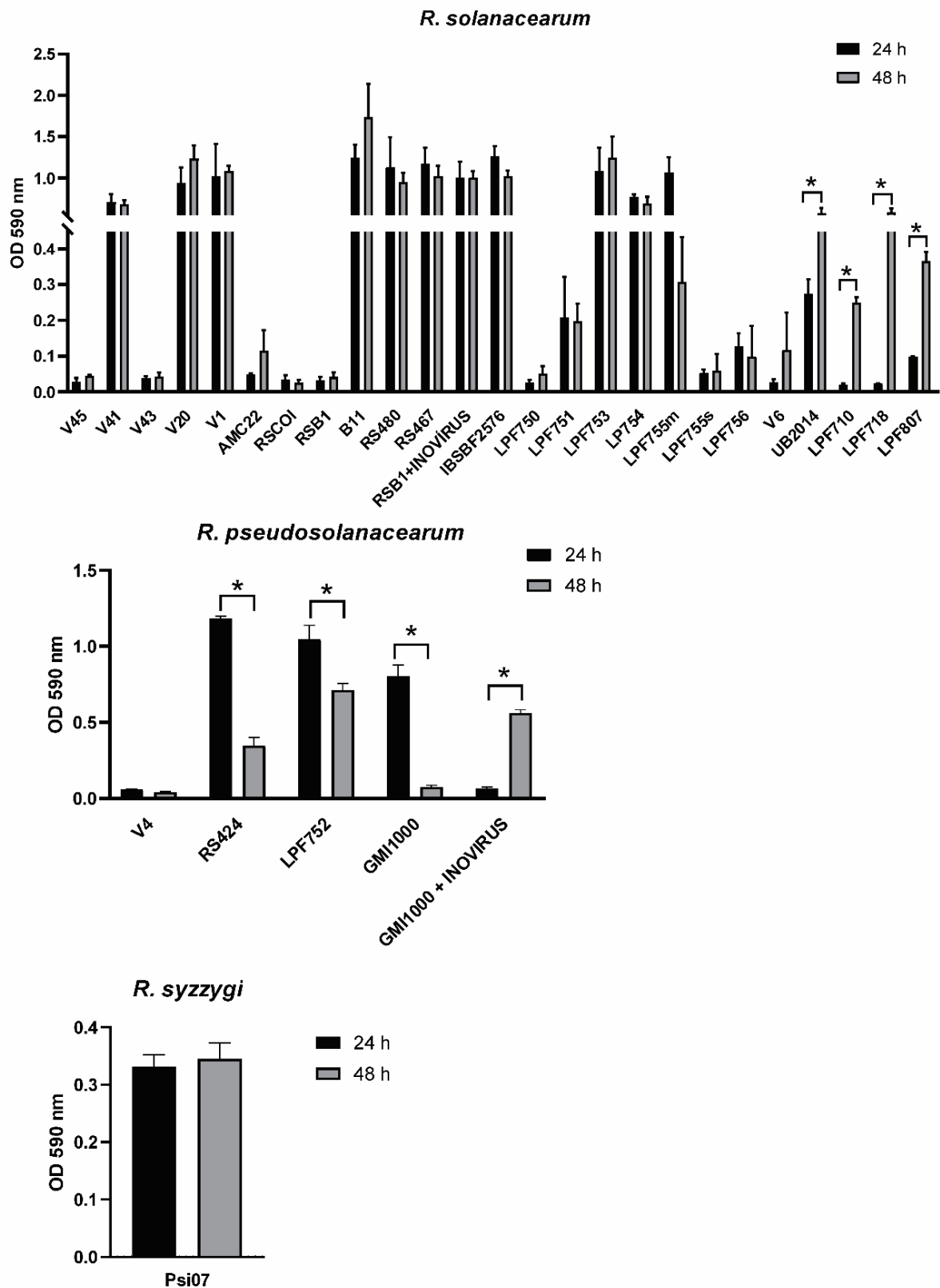


Figura 1: Avaliação formação de biofilme em superfície de poliestireno. Determinação formação do biofilme por retenção de cristal violeta 0,1% na DO 590 nm, nos tempos de 24 e 48 horas a 28 °C. Asteriscos indicam diferença significativa a um n-value de 5 % de significância entre os tempos 24 e 48 horas pelo método de teste t.

Para determinar a formação do biofilme, foi levado em consideração a curva de crescimento na densidade óptica 600nm (Figura 1S). A formação do biofilme foi avaliada nos tempos de 24 e 48 horas. Os resultados mostraram que para os isolados, UB2014, LPF710, LPF718, LPF807 e GMI1000+INOVIRUS, o biofilme se estabelece ao longo do tempo, sendo observado pelo aumento dos valores em relação a 24 horas (Figura 1). Comportamento diferente foi observado com GMI1000, LPF702 e RS424, onde o biofilme foi menor em 48 horas quando comparado com 24 horas (Figura 1). Os demais isolados mantêm uma conformidade ao longo dos períodos avaliados. Dos 31 isolados analisados, três são infectados por um tubulavírus, o inovírus *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1 (de Almeida et al. 2022). Esses isolados são GMI1000+INOVIRUS, RSB1+INOVIRUS e UB2014, sendo UB2014 é o isolado original de onde esse vírus foi isolado e caracterizado (de Almeida et al. 2022). Ao comparar a formação do biofilme dos isolados selvagens com os seus respectivos isolados infectados por esse tubulavírus podemos notar que há um incremento nos valores obtidos. Esse padrão de incremento na formação do biofilme já foi analisado em um estudo anterior realizado por De Rezende (2022), onde foi avaliado o efeito da infecção desse tubulavírus na modulação do biofilme do isolado GMI1000.

3.3. Avaliação morfológica do biofilme dos isolados em cupom de poliestireno por Microscopia Confocal

Com os dados obtidos pelo método de Stepanovic, no tempo de 24 horas, sete isolados foram selecionados para avaliar a morfologia do biofilme formado em cupom de poliestireno, seguindo os critérios de: dois formadores fortes, dois formadores moderados, um formador fraco e dois não formadores (Figura 2). A microscopia revelou que o biofilme de CERS possui diferentes morfologias e varia grandemente entre os isolados.

Assim como o observado no ensaio de formação do biofilme, o biofilme dos isolados de GMI1000 e IBSBF2576 (Figura 2A) apresentam-se compactos com poucos espaços entre os aglomerados celulares. Esses resultados revelam que o biofilme de bactérias do CERS é muito diverso, podendo variar de tapetes compactos, como observado no isolado IBDBF2576 (2A), à aglomerados celulares e estruturas tipo cogumelo, apresentado no isolado UB2014 em 2C.

Os isolados classificados como formadores moderados de biofilme (Figura 2B) mostraram aderência, com formação de fino tapete bacteriano no tempo de 24 horas que reduz no tempo de 48 horas. O biofilme do isolado UB2014 (Figura 2C) aumentou no tempo de 48

horas, assim como no ensaio de formação do biofilme. A estrutura do biofilme de UB2014 se assemelha a estruturas tipo cogumelo, com canais entre os aglomerados celulares.

O isolado V6 (Figura 2D), apesar de ter sido classificado como um isolado não formador de biofilme, apresentou pontos de aglomeração celular, sem estruturas altas e com muitos espaços vazios entre os aglomerados, sendo um biofilme pequeno e pouco compacto. O isolado LPF 807 (Figura 2D), por sua vez não apresentou aglomerados no tempo de 24 horas, sendo esse biofilme visualizado no tempo de 48 horas, como demonstrado no ensaio de formação do biofilme (Figura 1) e pelo método de Stepanovic (Tabela 2).

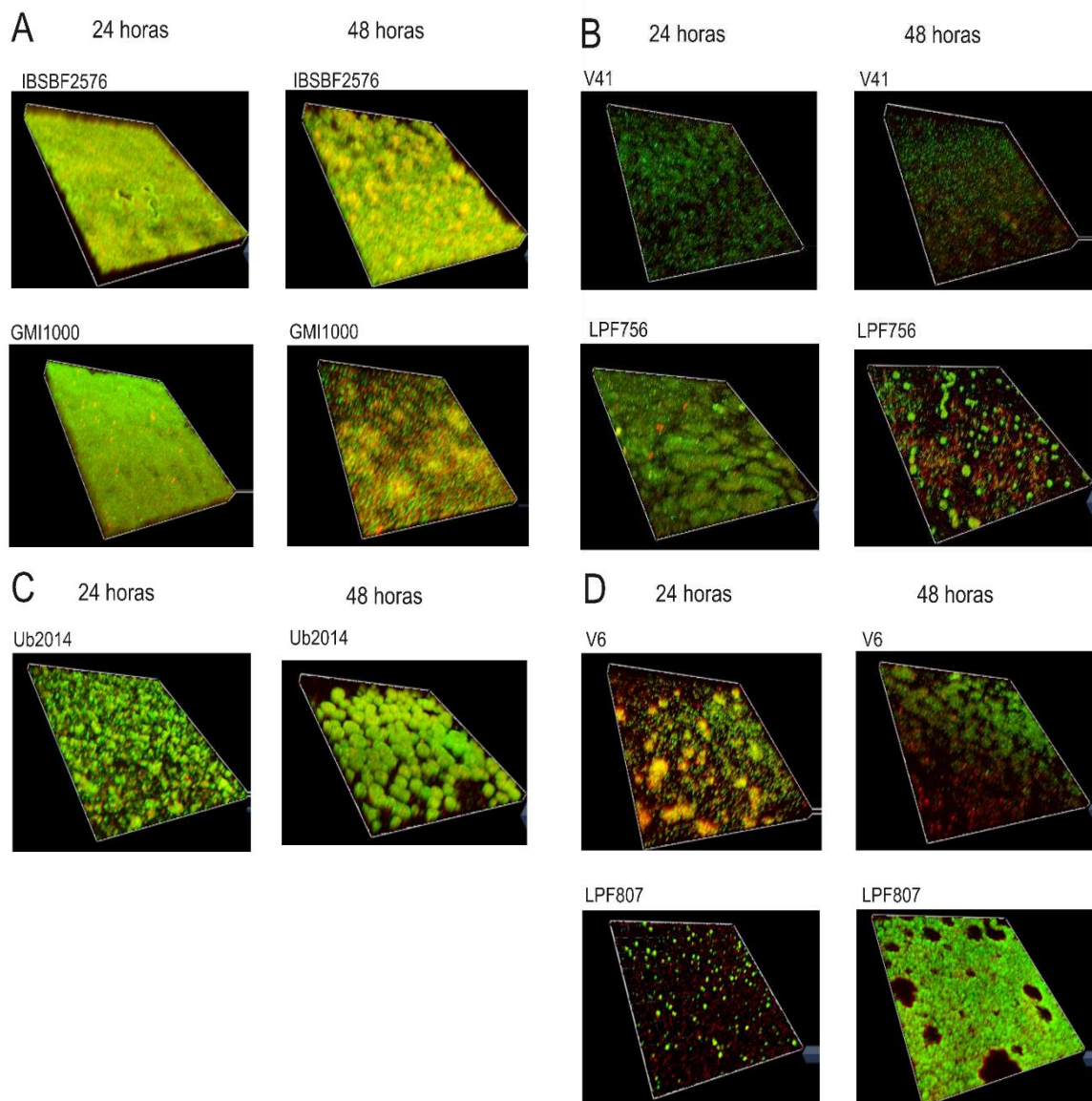


Figura 2: Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A formação de biofilme de isolados foi avaliada em cupons de poliestireno nos tempos de 24 e 48 horas. A- Isolados fortes formadores de biofilme; B- isolados moderados formadores de biofilme; C- isolado

fraco formador de biofilme; D- isolados não formadores de biofilme. As imagens foram obtidas com o uso do corante LIVE/DEAD e geradas pelo software ZEN Blue 3.5.

Formação de biofilme que diferiram entre 24 e 48 horas também foram avaliados por microscopia (Figura 2S). As imagens confirmam as diferentes estruturas do biofilme nos dois tempos avaliados demonstrando que a dinâmica de formação do biofilme de bactérias do CERS difere significativamente de um isolado para o outro.

A composição do exopolímero do biofilme é um dos principais fatores que determinar a sua morfologia. Para determinar a produção de polissacarídeos dos isolados, foi realizado o ensaio de vermelho de Congo e avaliada as características morfológicas das colônias dos 31 isolados após 24 horas de crescimento (Figura 3). Colônias vermelhas indicam maior produção de polissacarídeos, como a celulose, e colônias brancas indicam ausência de produção de celulose. A grande variabilidade de produção de pigmentos e morfologia das colônias dos isolados indicam que a composição do exopolímero do biofilme difere entre isolados de mesmo filotipo e, até de mesmo hospedeiro. Esse fato é observado entre os isolados LPF718, LPF710 e LPF807, por exemplo, que foram obtidos de eucalipto e são do filotipo II. Isso corrobora que a diversidade genética de bactérias do CERS influencia na composição do biofilme de cada isolado, o que resulta em composições e, conseqüentemente, morfologias diversas.

3.4. Motilidade *twitching* e *swarming* dos isolados do CERS

A motilidade é um importante mecanismo que está diretamente relacionado com a virulência bacteriana. Foram avaliados dois tipos de motilidade comumente relatados para bactérias do CERS, o movimento *twitching*, ou de arraste, e o movimento *swarming*, ou de nado.

No ensaio de motilidade *twitching* o tamanho da colônia foi avaliado ao longo de cinco dias de incubação e, então, avaliamos a morfologia da borda dessas colônias no tempo final (Figura 4 e Figura 3S). Os resultados mostraram que alguns isolados não apresentaram uma evolução no aumento da colônia ao longo do tempo avaliado (LPF755M, LPF710, LPF807, V4, GMI1000, GMI1000+INOVIRUS), indicando que possuem movimento mediado por pili reduzido em relação aos demais isolados.

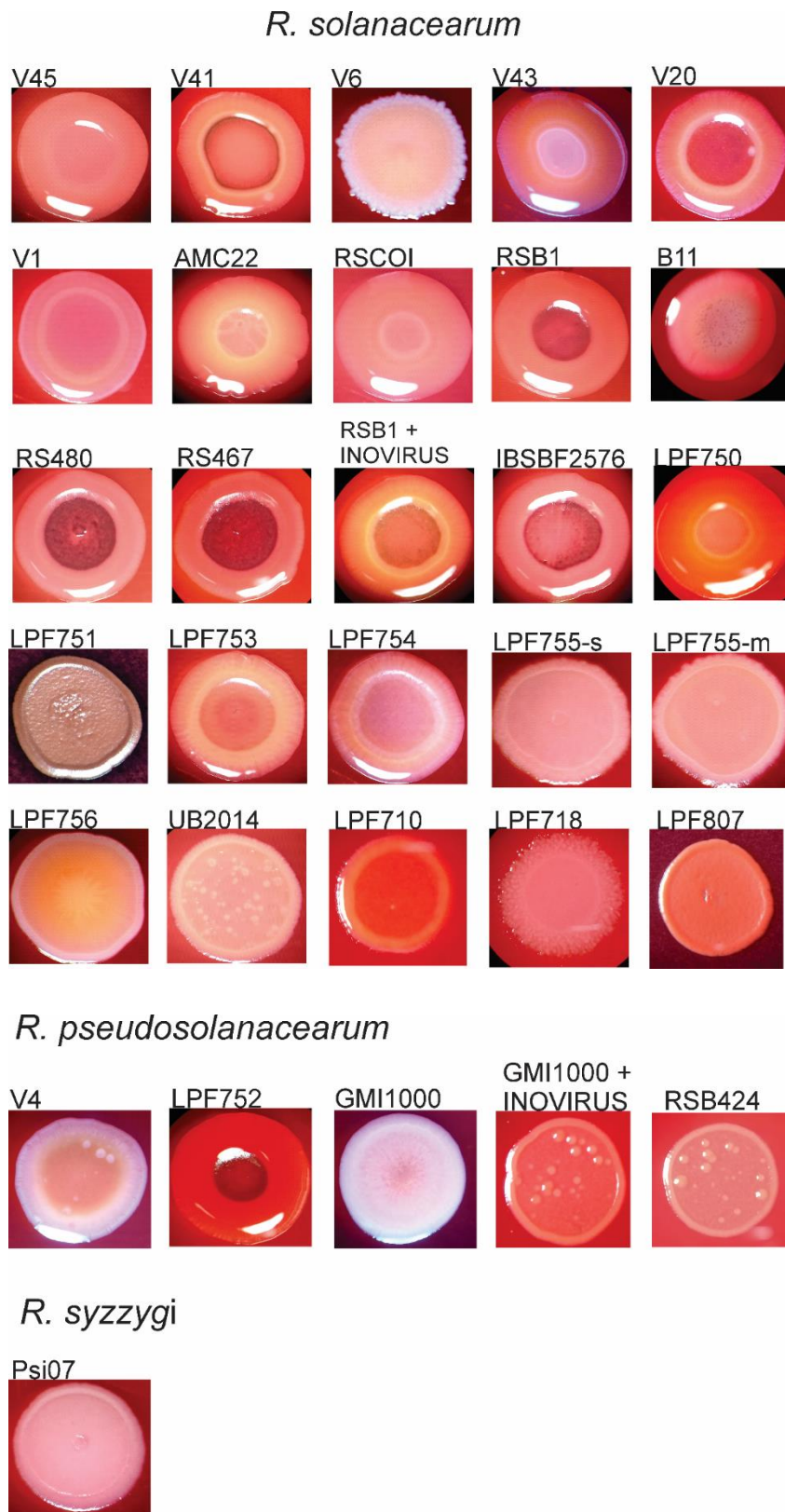


Figura 3: Morfologia de colônias em meio CPG +Vermelho de Congo. Colônias crescidas por 24 horas e observadas em lupa com aumento de 1X.

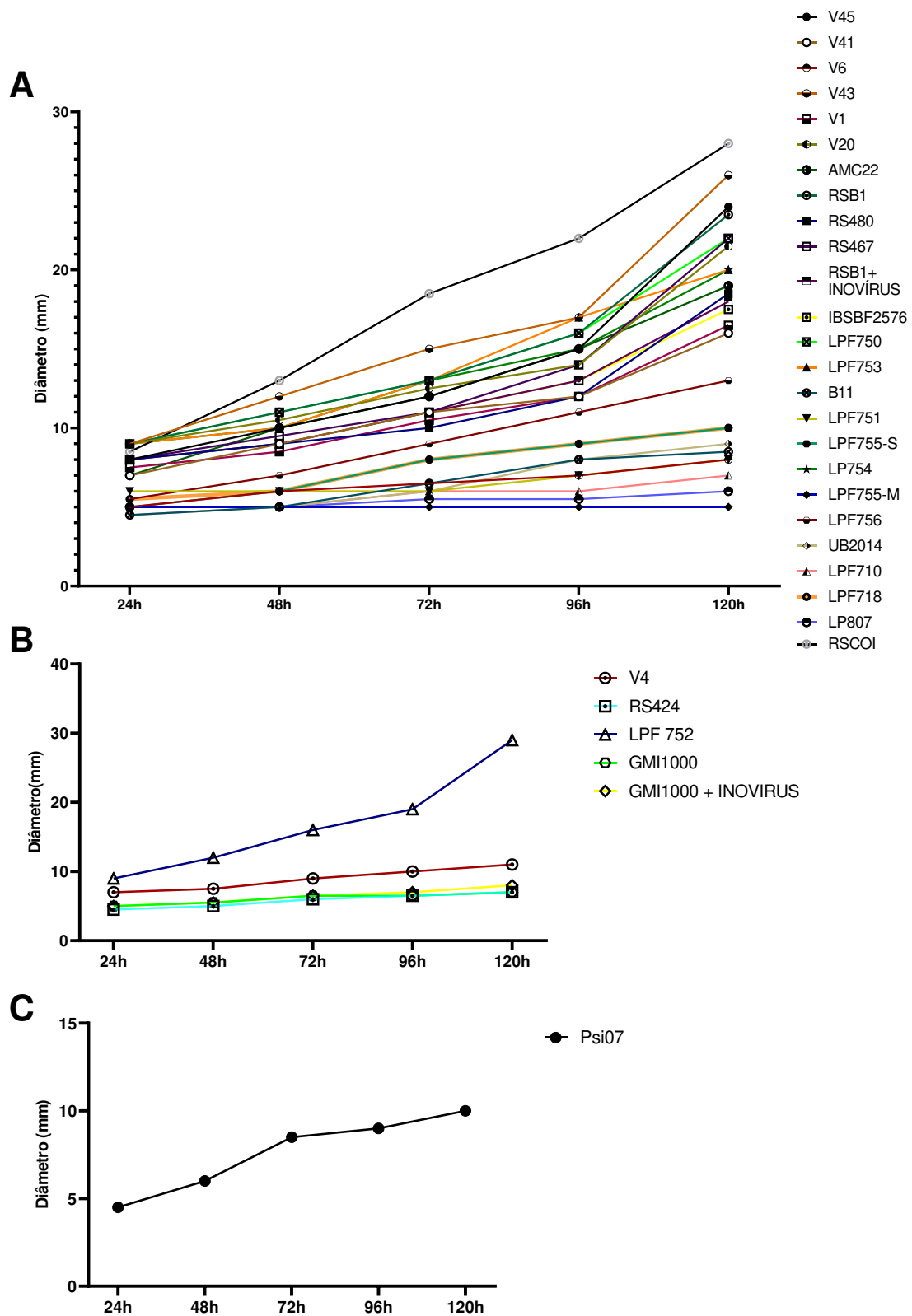


FIGURA 4: Avaliação da motilidade *twitching* em ágar CPG 1,7% durante 120 horas. O diâmetro dos halos foi medido a cada 24 horas. A- Motilidade dos isolados de *R. solanacearum*; B- motilidade dos isolados de *R. pseudosolanacearum*; C- motilidade do isolado de *R. syzygi*.

Alguns isolados apresentaram elevada motilidade *twitching*, com valores de locomoção que ultrapassaram 20 mm de diâmetro (LPF750, LPF752, LPF753, LPF754, V20, RS467, RSB1, V45 e V43). Esses resultados sugerem no CERS podemos encontrar isolados com sistema de locomoção via pili mais ativo ou funcional que outros isolados. Além disso, a locomoção via pili não está relacionada com a capacidade de formação do biofilme, pois tanto no grupo de isolados com menor motilidade quanto nos de maior motilidade tem-se isolados formadores de biofilme fortes e fracos.

No ensaio de motilidade *swarming* observou-se que grande parte dos isolados se locomove significativamente ao longo do tempo (Figura 5). Apenas os isolados V20, V1, V41, B11, RSBI+INOVIRUS LPF751, V4 e RS424, não apresentaram valores significativos de locomoção ao longo do tempo quando comparamos com o tamanho da colônia no tempo de 24 horas. Isso sugere que esses isolados não se locomovem por nado, movimento mediado pelo flagelo. Desses isolados, apenas V4 e LPF751 não são formadores de biofilme.

Esses resultados não excluem outros sistemas de locomoção que não foram avaliados, assim não se pode afirmar que os isolados que foram pouco móveis pelos mecanismos *twitching* e *swarming* não são capazes de se locomoverem.

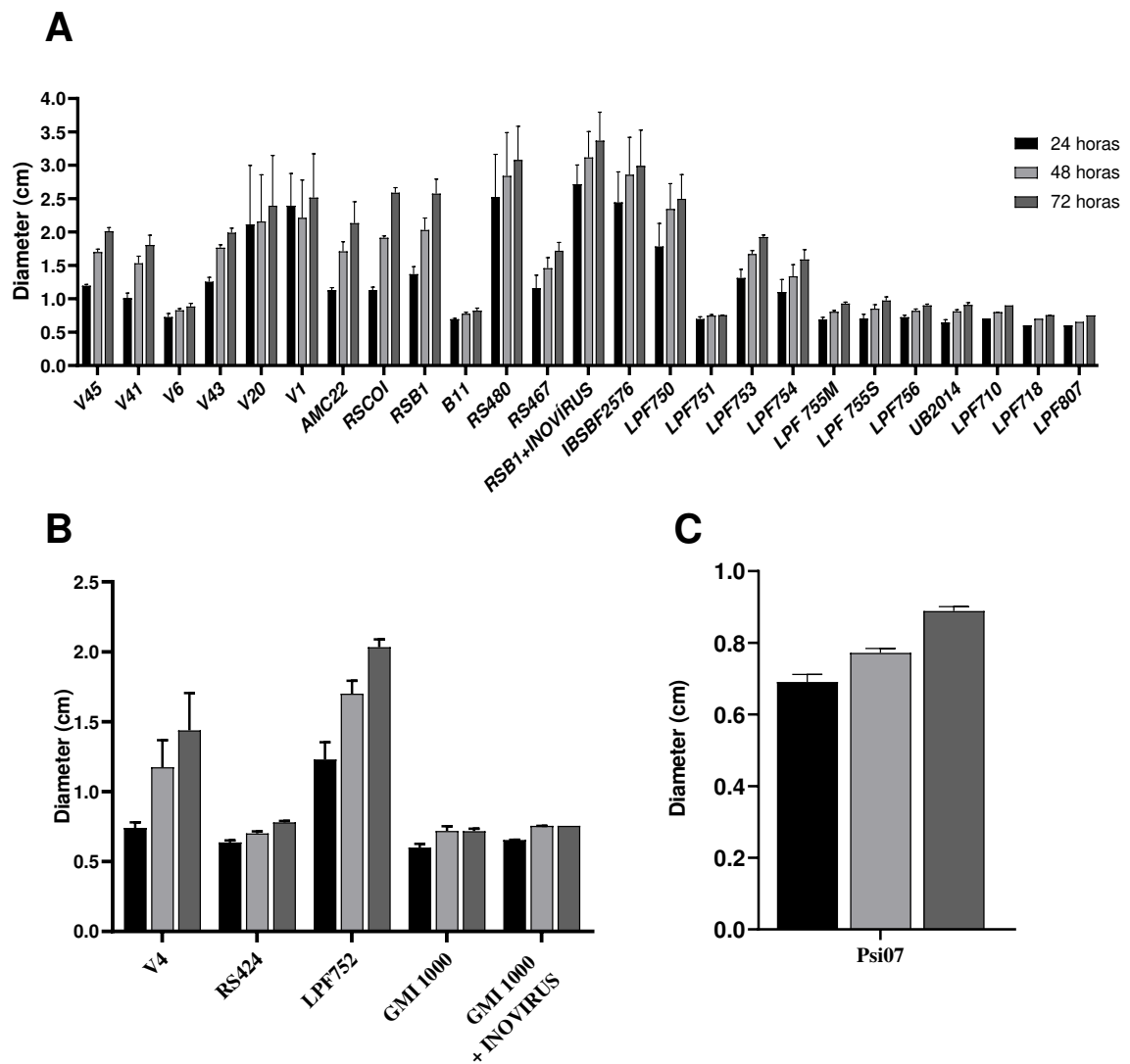


FIGURA 5: Avaliação da motilidade *swarming* de bactérias do CERS em ágar CPG 0,7% durante 72 horas. O diâmetro dos halos foi medido a cada 24 horas em duas direções. A- Motilidade dos isolados de *R. solanacearum*; B- motilidade dos isolados de *R. pseudosolanacearum*; C- motilidade do isolado de *R. syzygi*. Diferença estatística avaliada pelo teste de Turkey com significância de 0,5. Os asteriscos indicam p-value < 0,5 em relação ao tempo de 24 horas.

3.5. Determinação da agressividade dos isolados em plantas de tomates susceptíveis

Para determinar quais isolados são agressivos em tomates foi utilizada a variedade susceptível de tomate Santa Clara e a bactéria a ser testada foi inoculada diretamente no xilema vascular. Os sintomas foram avaliados ao longo de 15 dias. Foram poucos os isolados que causaram sintomas nas plantas de tomate. Além disso, o grau de agressividade foi dividido em 3 grupos: não agressivos, moderadamente agressivos e fortemente agressivos.

Os isolados fortemente agressivos foram aqueles que, em até 7 dias, apresentaram sintomas de murcha bacteriana. Os classificados como moderadamente agressivos mostraram sintomas de necrose ao longo do caule, porém sem sinais de murcha bacteriana durante o período de 15 dias. E os isolados não agressivos não causaram sintomas de qualquer natureza nas plantas de tomate durante o período de 15 dias de avaliação.

Uma importante evidência desses resultados é que muitos isolados que foram determinados como não agressivos são fortes produtores de biofilme *in vitro*. Da mesma forma, o isolado V6, que é agressivo em tomate (Figura 6), não foi capaz de formar biofilme *in vitro* (Figuras 1 e 2). O isolado B11, que mostrou ser um ótimo formador de biofilme e seu biofilme possui uma morfologia densa e pouco porosa em microscopia confocal (Figura 2S), causa apenas sintomas de necrose tecidual, sem causar sintomas de murcha (Figura 6).

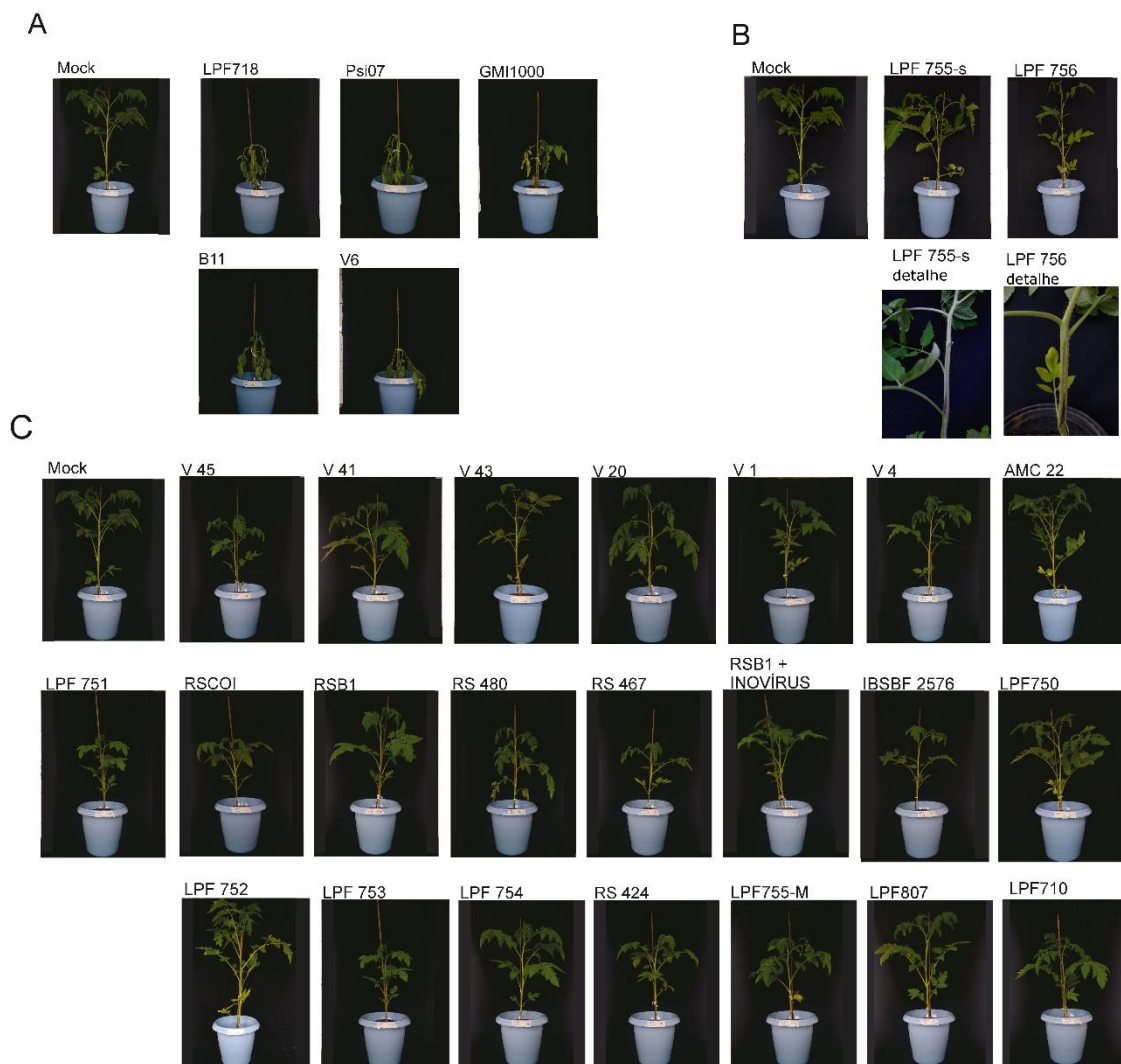


Figura 6: Ensaio de agressividade dos isolados do CERS em plantas de tomate. A- Isolados classificados como agressivos, com aparecimento de sintoma de murcha bacteriana 5 d.p.i; B- isolados classificados como

moderadamente agressivos, sem sintomas de murcha, porém com formação de lesão ao longo do caule 5 d.p.i; C- isolados classificados como não agressivos, sem sintomas 15 d.p.i.

O isolado IBSBF2576, por exemplo, foi avaliado em microscopia confocal de varredura (Figura 2) e observa-se um biofilme denso e compacto, porém esse isolado não causou sintomas de murcha nas plantas de tomate.

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura do xilema vascular de tomateiro infectado com isolados do CERS

Para determinar se o padrão de formação de biofilme observado *in vitro* correspondem ao que ocorre *in planta* coletou-se tecidos de caule de tomateiro inoculados com diferentes isolados de CERS. Bactérias classificadas como agressivas e não agressivas e com diferentes classificações de formação de biofilme *in vitro* foram avaliadas. Na figura 7, em A e B, estão os dois isolados agressivos e em C e D dois isolados não agressivos. Em A e C os isolados são formadores de biofilme *in vitro* e em B e D são isolados não formadores de biofilme *in vitro*.

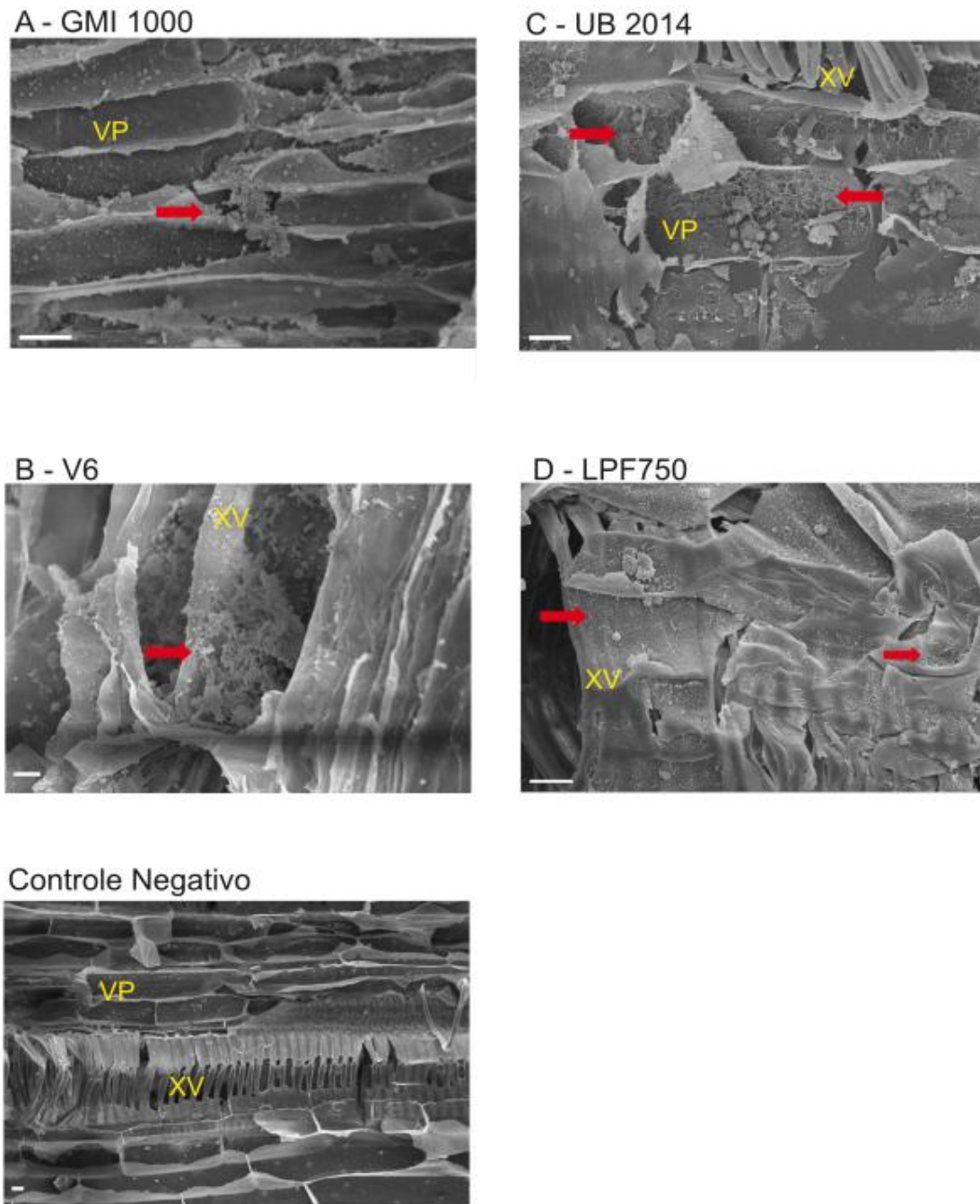


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura a Laser do xilema de tomate inoculados com isolados do CERS. A- GMI1000; B- V6; C- UB2014; D- LPF 750. Setas vermelhas indicam matriz de biofilme, XV: xilema vascular; VP: vasos parenquimais adjacentes ao xilema; Barra branca corresponde à escala de 10 μ m.

As imagens mostram que os isolados agressivos aderem nos vasos do xilema, podendo ser constatada com a presença de aglomerados bacterianos. Nas imagens C e D é possível observar agregados com aspecto similar a teias de aranha, indicativos de matriz de biofilme desassociada. Essa observação pode ser explicada pela desassociação do biofilme dos isolados UB2014 e LPF750 do xilema, seja por causas naturais inerentes ao processo de colonização do

tecido vegetal como do processo de preparo de amostra, como na secagem na câmara de ponto crítico. Outro ponto a ser destacado está no tempo de coleta das amostras, os tecidos inoculados com isolados agressivos foram coletados 5 dias após inoculação, enquanto os tecidos dos isolados não agressivos foram coletados 15 dias após inoculação. Isso pode sugerir que o biofilme dos isolados não agressivos se forma nos primeiros dias após inoculação e se desprender ao longo do tempo, o que pode explicar o reduzido número de células bacterianas no xilema vascular.

4. Discussão

O CERS agrupa fitopatógenos de grande impacto agrônômico, sendo um problema mundial. Conhecer profundamente as características específicas dos isolados pertencentes a esse grupo contribui para o conhecimento dos isolados trazendo novas informações que ajudam a conhecer um pouco mais sobre as bactérias do CERS.

O mecanismo de patogenicidade de bactérias do CERS tem revelado uma regulação complexa que envolve a interação patógeno-hospedeiro, a qual vai muito além da invasão no tecido vegetal e formação de biofilme (Hikichi et al. 2017; Lowe-Power et al. 2018b). Cada vez mais estudos têm mostrado que a diversidade genética presente no CERS influencia nos mecanismos de virulência de cada isolado, ressaltando a importância de se estudar uma maior diversidade de isolados e suas características fenotípicas, que podem ajudar a entender a diversidade fenotípica de bactérias do CERS e sua relação com o desenvolvimento de doença (Ailloud et al. 2015; Mori et al. 2016; Georgoulis et al. 2021; Li et al. 2022a).

O presente estudo buscou analisar um grupo de isolados do CERS e avaliar as características fenotípicas relacionadas à virulência, como motilidade e formação do biofilme. Primeiramente, agrupou-se os isolados em filotipos e biovars. Nesse estudo foram avaliados 29 isolados obtidos ao longo de todo o território nacional e dois isolados representantes das espécies *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygi*, totalizando 31 isolados.

No Brasil, encontram-se os filotipos I e II, com maior prevalência do segundo. Estudos de análise de diversidade de isolados de *R. solanacearum* no Brasil sugerem que o país seja um dos centros de origem do filotipo II (Santiago et al. 2017; Lopes and Rossato 2018). Assim como neste estudo, Freitas et al. (2020) caracterizou molecularmente isolados obtidos de eucalipto no Brasil, onde obteve a predominância de isolados pertencentes ao filotipo II e uma menor parte ao filotipo I. Albuquerque em 2014, caracterizou isolados obtidos de banana no Brasil, no qual o filotipo II predominante entre os isolados. Esses dados corroboram os

resultados aqui apresentados e mostram a prevalência de bactérias do CERS do filotipo II distribuído por todo o território brasileiro e em diferentes plantas hospedeiras.

Nós identificamos que dos 31 isolados 21 foram classificados como biovar 3 e 10 foram agrupados em biovar 2A ou 2T. Os isolados encontrados no Brasil pertencentes ao biovar 2A ou 2T, são sempre filotipo II, assim como os isolados desse estudo. Os isolados do biovar 2 são classificados como potenciais agentes bioterroristas devido às elevadas perdas econômicas geradas, principalmente em batata (Nouri et al. 2009; Santana et al. 2012).

As bactérias do CERS são classicamente descritas como patógenos formadores de biofilme no xilema vascular de suas plantas hospedeiras, o que resulta em murcha bacteriana. Avaliamos a formação do biofilme dos 31 isolados *in vitro* pela técnica de cristal-violeta e o método de Stepanovic foi utilizado para agrupar os isolados quanto a sua capacidade de formação de biofilme. Muitos isolados não apresentaram boa adesão em poliestireno. A adesão em poliestireno, pvc (policloreto de vinila) ou vidro vem sendo amplamente utilizada para correlacionar a formação de biofilme de isolados de CERS com sua capacidade de formar biofilme no xilema vascular, assim como o que é realizado com diversas outras espécies produtoras de biofilme (Kang et al. 2002; Hoffman et al. 2015; Khokhani et al. 2017).

A formação do biofilme foi confirmada pela observação da estrutura desses biofilmes por microscopia confocal de varredura a laser em cupons de poliestireno. As imagens revelaram que as células bacterianas formam o biofilme e se desenvolvem de formas diferentes no cupom de poliestireno, apresentando uma diversidade de morfotipos de biofilme, que variaram desde biofilmes compactos a biofilmes altos e com aspecto de cogumelo. Os isolados com baixa formação de biofilme ao poliestireno também possuem diferentes morfologias no qual, por exemplo, o isolado V6 revelou se aglomerou formando estruturas de biofilme frouxas e pouco densas.

A adesão de uma célula bacteriana a uma superfície biótica ou abiótica foi relacionada com a expressão do pili tipo IV. Tanto a autoagregação quanto a motilidade *twitching* são controladas pelo regulador global *phcA* e pode ter baixo acúmulo de pilina tipo IV durante o crescimento (Kang et al. 2002). Juntamente com o pili, adesinas, polissacarídeos e DNA extracelular irão compor a matriz inicial do biofilme e garantir a sua fixação à superfície. O biofilme de *Ralstonia* é composto principalmente por exopolissacarídeos, formado pelos açúcares N -acetil-galacto-aminoácido, 2- N -acetil-2-desoxi-galacturônico e 2 - N -acetil-4- N-(3 -hidroxibutanoil)-2,4,6-tri-desoxi- d – glicose (Prakasha et al. 2017); lipopolissacarídeos, composto de frações de L-glicero-D-mano-heptose (núcleo) ligando Kdo2-lipídio A e O-

antígeno (Li et al. 2014); adesinas e nucleases (Tran et al. 2016; Mori et al. 2016; Lowe-Power et al. 2018b).

Os resultados apresentados mostraram que o biofilme difere em sua morfologia entre os isolados, além de, para alguns casos, haver diferença também em função do tempo de formação do biofilme. Essa observação pode ser correlacionada com a velocidade de crescimento de cada isolado e a diferença na composição do biofilme. Como apresentado no experimento de vermelho de Congo, muitos isolados apresentaram colônias de coloração branca ou rosa claro, enquanto os demais eram vermelhas ou vermelhas com centro preto. Esse ensaio é presuntivo e revela a diversidade da produção de exopolímeros produzidos por esse grupo de isolados (Freeman et al. 1989; Umrao et al. 2021).

A diversidade nas morfologias e velocidades de formação e desagregação do biofilme pode ser explicada por diferentes regulações dos sistemas gênicos relacionados à formação do biofilme. Estudos têm mostrado a relação da inativação de diversos genes com a redução da formação do biofilme. Mori et al. (2016) mostraram que a mutação no gene *lecM*, responsável pela expressão da adesina lectina, resultou em redução da formação do biofilme *in vitro* e *in vivo* ao diminuir a adesão das células bacterianas às diferentes superfícies bióticas e abióticas avaliadas. No biofilme do isolado GMI1000, o DNA extracelular é um importante componente da matriz, atuando na formação de fibras entre as células que conferem aspecto mais espesso e compacto ao biofilme (Tran et al. 2016).

Diferentes padrões de motilidade *swarming* e *twitching*. O sistema de locomoção *swarming* é o responsável pelo movimento das células bacterianas ao longo do xilema vascular e é mediado via flagelo, regulado pelos genes *fli*. Já a motilidade *twitching* tem sua função atribuída à locomoção das células ao longo dos tecidos vegetais mediada por pili (Genin and Denny 2012; Lowe-Power et al. 2018b). A inativação dos genes *pilA*, *pilI* e *fliC*, ou a reduzida expressão desse gene pode explicar a diminuição tanto da motilidade *twitching* quanto da adesão de alguns isolados (Kang et al. 2002; Corral et al. 2020).

Grande parte dos isolados não foi agressivo em plantas de tomates susceptíveis. Estudos têm mostrado que isolados do CERS não patogênicos podem ser mutantes espontâneos de *phcA*. A descrição desses mutantes de *phcA* mostrou que tais isolados apresentam reduzida produção de exopolissacarídeos e celobiohidrolases, responsável por degradar parede vegetal, aumento de motilidade natatória e perda de fenótipos de virulência. Entretanto, esses mutantes continuam sendo capazes de colonizar o tecido vegetal (Brumbley et al. 1993; Peyraud et al. 2016; Khokhani et al. 2017; Perrier et al. 2018).

O gene *phcA* é um regulador global dependente de densidade populacional. Sua regulação está diretamente relacionada com os sistemas *QS phcQS*, *solI/R* e *rasI/R* (Genin and Denny 2012; Hikichi et al. 2017; Khokhani et al. 2017; Yan et al. 2022). Em altas densidades populacionais, esse gene regula diretamente a expressão de *egl* e do sistema EPS, que tem como regulador global o gene *xls*, e indiretamente a inativação dos sistemas de locomoção *swimming* e *swarming*, enquanto ativa a produção de fatores de virulência (Brumbley et al. 1993; Peyraud et al. 2016; Khokhani et al. 2017) com os sistemas de dois componentes *vrs*, *peh* e *flh* (Khokhani et al. 2017; Li et al. 2022b).

Em seu estudo Khokhani et al. (2017) compararam um isolado do tipo selvagem com seu mutante *phcA*. Neste estudo foi observado que os mutantes de *phcA* formam menos agregados de biofilme em superfície de pvc e de vidro do que o tipo selvagem. Quando esse biofilme foi avaliado no xilema vascular, foi constatado que o mutante forma agregados maiores e mais densos no xilema, além disso, esse aumento de agregação resultou em maior restrição de dispersão pelo hospedeiro comparado com o tipo selvagem (Khokhani et al. 2017). Esses resultados ajudam a explicar fenótipos observados no presente estudo. Os isolados não agressivos tenderam, em sua maioria, a ter reduzida adesão *in vitro* e apresentaram elevada locomoção *swarming*. Com esses fenótipos pode-se hipotetizar que muitos desses isolados podem ser mutantes espontâneos de *phcA*, o que explicaria a ausência de patogenicidade nos tomates. Vale ressaltar que observações obtidas *in vitro* podem não correlacionar bem fenótipos que venham a ocorrer *in vivo*, porém algumas observações ajudam a explicar determinados fenômenos na planta.

Os isolados agressivos e moderadamente agressivos apresentaram em comum a produção de exsudado marrom ao longo do caule. Esse exsudado pode ser atribuído a produção de putrecinas, descrito por Lowe-Power et al. (2018) ao relacionar a produção de putrecina pelo isolado GMI1000 com aceleração dos sintomas de murcha, mediado pela expressão do gene *speC*. As imagens de MEV mostraram que os tecidos inoculados com os isolados não agressivos apresentaram matriz de biofilme aderida nas paredes parenquimais das células e no interior do xilema com morfologia distinta da matriz compacta apresentada nos biofilmes observados nos tecidos inoculados com os isolados agressivos. De maneira similar, Khokhani et al. (2017) mostraram que os isolados mutantes de *phcA* formam um biofilme nos tecidos vegetais mais fibroso, com poucas células bacterianas e de reduzido tamanho em relação ao isolado selvagem. Mori et al. (2016) determinaram que o isolado OE1-1 forma biofilme nos espaços intercelulares do tecido vegetal, um fenômeno também observado neste trabalho.

Por fim, pode-se discutir que a heterogeneidade que as bactérias do CERS possuem contribui para a diversidade dos fenótipos apresentados neste estudo. Muito há o que entender sobre os mecanismos de formação de biofilme e de virulência do CERS. Os resultados mostraram que os isolados não agressivos podem ser formadores de biofilme e colonizar o tecido vegetal de forma diferente dos isolados agressivos e que esses fenótipos podem estar relacionados com uma regulação gênica que precisa ser devidamente explorada. Esses resultados levam a supor que a formação do biofilme não está diretamente relacionada com a agressividade de isolados do CERS, isso porque a presença do biofilme não parece, por si só, ser o causador da doença, mas a doença está relacionada com a formação de biofilme. Outra hipótese a ser testada é se o biofilme formado *in vitro* é morfologicamente diferente do biofilme formado *in vivo*. Por fim, podemos hipotetizar que a diferença da agressividade está relacionada com a composição do biofilme desses isolados, dados que podem ser sugeridos pela diversidade de morfologias de colônias obtidas no ensaio de vermelho de Congo.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Esse trabalho buscou entender alguns fenótipos de virulência de bactérias do CERS e os correlacionar com sua agressividade em plantas de tomate. A grande variabilidade genética que das bactérias do CERS possui mostrou uma diversidade de fenótipos que pouco se relacionaram entre si. Estudos mais aprofundados nos sistemas de regulação gênica necessitam ser conduzidos para explicar os fenótipos aqui observados. Estudos de análise da expressão diferencial de genes reguladores *in vitro* e *in vivo* por qRT-PCR (PCR em Tempo Real), como o sistema *phc*, *vrs*, *vre*, *hpr* e *flh*, podem ajudar a entender esses fenótipos e fornece novas informações que possam vir a ser interessantes para o uso como estratégias de controle biológico desse fitopatógeno.

Com esse estudo inicial, esperamos conhecer mais sobre a diversidade das bactérias do CERS a fim de entender a relação entre a existência de isolados agressivos e não agressivos com a capacidade de formação de biofilme. Se isolados não agressivos são capazes de formar biofilme em planta sem o aparecimento da murcha bacteriana, o que o difere do isolado agressivo? Respondendo essa pergunta será possível criar estratégias direcionadas à redução da agressividade e controle da murcha bacteriana causada por bactérias do CERS.

6. Referências

Ailloud F, Lowe T, Cellier G, Roche D, Allen C, Prior P (2015) Comparative genomic analysis

- of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. *BMC Genomics* 16:1–11. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1474-8/TABLES/2>
- Brumbley SM, Carney BF, Denny TP (1993) Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 175:5477. <https://doi.org/10.1128/JB.175.17.5477-5487.1993>
- Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbé J, Aranda J, Valls M (2020) Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity. *mSphere* 5:1–16. https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00740-19/SUPPL_FILE/MSPHERE.00740-19-SF007.TIF
- de Almeida JCF, da Silva Xavier A, Cascardo R de S, de Rezende RR, de Souza FO, Lopes CA, Alfenas-Zerbini P (2022) Genomic and biological characterization of *Ralstonia solanacearum* Inovirus Brazil 1, an inovirus that alters the pathogenicity of the phytopathogen *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Microb Ecol* 84:527–538. <https://doi.org/10.1007/S00248-021-01874-W/FIGURES/5>
- de Rezende RR (2022) Tubulavirus: Evolução, taxonomia e interação com seu hospedeiro. Universidade Federal de Viçosa
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? *Bact wilt Dis Ralstonia solanacearum* species complex 1:449–461
- Freeman DJ, Falkiner FR, Patrick S (1989) New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. *J Clin Pathol* 42:872–874
- Freitas RG, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Zauza EA V., Badel JL, Alfenas AC (2020) Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting *Eucalyptus sp.* in Brazil. *For Pathol* 50:e12593. <https://doi.org/10.1111/efp.12593>
- Genin S (2010) Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol* 187:920–928 . <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03397.x>
- Genin S, Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Phytopathol* 50:67–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>
- Georgoulis SJ, Shalvarjian KE, Helmann TC, Hamilton CD, Carlson HK, Deutschbauer AM, Lowe-Power TM (2021) Genome-wide identification of tomato xylem sap fitness factors

for three plant-pathogenic *Ralstonia* species. *mSystems* 6:1–15. https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.01229-21/SUPPL_FILE/REVIEWER-COMMENTS.PDF

Hikichi Y, Mori Y, Ishikawa S, Hayashi K, Ohnishi K, Kiba A, Kai K (2017) Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci* 8:1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00967>

Hoffman MD, Zucker LI, Brown PJB, Kysela DT, Brun Y V., Jacobson SC (2015) Timescales and frequencies of reversible and irreversible adhesion events of single bacterial cells. *Anal Chem* 87:12032–12039. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.5B02087/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2015-02087E_0005.JPEG

Huang Q, Yan X, Wang JF (2012) Improved biovar test for *Ralstonia solanacearum*. *J Microbiol Methods* 88:271–274. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.12.007>

Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA, Denny TP (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* 46:427–437. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.03187.X>

Khokhani D, Lowe-Power TM, Tran TM, Allen C (2017) A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MBio* 8:20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00895-17>

Khokhani D, Tran TM, Lowe-Power TM, Allen C (2018) Plant assays for quantifying *Ralstonia solanacearum* virulence. *Bio-protocol* 8:19. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.3028>

Li CH, Wang KC, Hong YH, Chu TH, Chu YJ, Chou IC, Lu DK, Chen CY, Yang WC, Lin YM, Cheng CP (2014) Roles of different forms of lipopolysaccharides in *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:471–478. https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0248-R/SUPPL_FILE/MPMI-08-13-0248-RE8.PDF

Li P, Cao X, Zhang L, Lv M, Zhang L-H (2022a) PhcA and PhcR regulate ralsolamycin biosynthesis oppositely in *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci* 13:903310. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.903310>

Li S, Yang L, Ran Y, Ding W (2022b) A *epsB* mutant of *Ralstonia solanacearum* as novel

- biocontrol agent of tobacco bacterial wilt via activating salicylic acid signalling. *Physiol Mol Plant Pathol* 119:101834. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2022.101834>
- Lopes CA, Rossato M (2018) History and status of selected hosts of the *Ralstonia solanacearum* species complex causing bacterial wilt in Brazil. *Front Microbiol* 9:1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01228>
- Lowe-Power TM, Hendrich CG, von Roepenack-Lahaye E, Li B, Wu D, Mitra R, Dalsing BL, Ricca P, Naidoo J, Cook D, Jancewicz A, Masson P, Thomma B, Lahaye T, Michael AJ, Allen C (2018a) Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environ Microbiol* 20:1330–1349. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14020>
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C (2018b) How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. *Trends Microbiol* 26:929–942. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.06.002>
- Mina IR, Jara NP, Criollo JE, Castillo JA (2019) The critical role of biofilms in bacterial vascular plant pathogenesis. *Plant Pathol* 68:1439–1447. <https://doi.org/10.1111/ppa.13073>
- Mori Y, Inoue K, Ikeda K, Nakayashiki H, Higashimoto C, Ohnishi K, Kiba A, Hikichi Y (2016) The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Mol Plant Pathol* 17:890–902. <https://doi.org/10.1111/MPP.12335>
- Nouri S, Bahar M, Fegan M (2009) Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. *Plant Pathol* 58:243–249. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2008.01944.X>
- Perrier A, Barlet X, Peyraud R, Rengel D, Guidot A, Genin S (2018) Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microb Pathog* 116:273–278. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.028>
- Peyraud R, Cottret L, Marmiesse L, Gouzy J, Genin S (2016) A resource allocation trade-off between virulence and proliferation drives metabolic versatility in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathog* 12:e1005939. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005939>

- Prakasha A, Darren Grice I, Vinay Kumar KS, Sadashiva MP, Shankar HN, Umesha S (2017) Extracellular polysaccharide from *Ralstonia solanacearum*; A strong inducer of eggplant defense against bacterial wilt. *Biol Control* 110:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.012>
- Raza W, Ling N, Yang L, Huang Q, Shen Q (2016) Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Sci Rep* 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep24856>
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottiert P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choisine N, Claudel-Renard C, Cunnac S, Demange N, Gaspin C, Lavie M, Moisan A, Robert C, Saurin W, Schiex T, Siguler P, Thébault P, Whalen M, Wincker P, Levy M, Weissenbach J, Boucher CA (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497–502. <https://doi.org/10.1038/415497a>
- Santana BG, Lopes CA, Alvarez E, Barreto CC, Allen C, Quirino BF (2012) Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*. *J Gen Plant Pathol* 78:190–200. <https://doi.org/10.1007/S10327-012-0369-7/FIGURES/2>
- Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anollés G, Mizubuti ESG (2017) Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathol* 66:383–392. <https://doi.org/10.1111/ppa.12586>
- Schell MA (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* 38:263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.263>
- Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G Di, Djukic´ S, Irkovic´ IC, Ruzicka F (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Apmis* 115:891–899
- Takemura C, Senuma W, Hayashi K, Minami A, Terazawa Y, Kaneoka C, Sakata M, Chen M, Zhang Y, Nobori T, Sato M, Kiba A, Ohnishi K, Tsuda K, Kai K, Hikichi Y (2021) PhcQ mainly contributes to the regulation of quorum sensing-dependent genes, in which PhcR is partially involved, in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1. *Mol Plant Pathol* 22:1538–1552. <https://doi.org/10.1111/MPP.13124>

- Tran TM, Macintyre A, Khokhani D, Hawes M, Allen C (2016) Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. *Environ Microbiol* 18:4103–4117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13446>
- Umrao PD, Kumar V, Kaistha SD (2021) Study of pathogenic traits of bacterial wilt-causing phytopathogens around kanpur and fatehpur regions, uttar pradesh, India. *J Appl Biol Biotechnol* 9:45–55. <https://doi.org/10.7324/JABB.2021.9507>
- Xue H, Lozano-Durán R, Macho AP (2020) Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Plants* 9:516. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9040516>
- Yan J, Li P, Wang X, Zhu M, Shi H, Yu G, Chen X, Wang H, Zhou X, Liao L, Zhang L (2022) RasI/R quorum sensing system controls the virulence of *Ralstonia solanacearum* strain EP1. *Appl Environ Microbiol* 88:22. <https://doi.org/10.1128/aem.00325-22>

Material suplementar

Tabela suplementar 1: Biovar

Isolado	Glicose	Maltose	Celobiose	Dulcitol	Trehalose	Sorbitol	Manitol	Biovar
<i>R. solanacearum</i>								
V45	+	+	+	-	+	+	+	3
V41	+	+	+	-	+	+	+	3
V6	+	+	+	-	+	-	-	2T
V43	+	+	+	+	+	+	+	3
V20	+	+	+	-	+	+	+	3
V1	+	+	+	-	+	+	+	3
AMC22	+	+	+	-	+	+	+	3
RSCOI	+	+	+	-	+	+	+	3
RSB1	+	+	+	-	+	+	+	3
B11	+	+	+	+	+	+	+	2T
RS480	+	+	+	-	+	+	+	3
RS467	+	+	+	+	+	+	+	3
RSB1+INOVÍRUS	+	+	+	-	+	+	+	3
IBSBF2576	+	+	+	-	+	+	+	3
LPF750	+	+	+	+	+	+	+	3
LPF751	+	+	+	-	+	-	+	2T
LPF753	+	+	+	-	+	+	+	3
LP754	+	+	+	-	+	+	+	3
LPF755	+	+	+	-	+	-	-	2T
LPF755	+	+	+	-	+	-	-	2T
LPF756	+	+	+	-	+	-	+	2T
UB2014	+	+	+	-	-	-	-	2
LPF710	+	+	+	-	+	-	-	2T
LPF718	+	+	-	-	+	-	-	2
LP807	+	+	-	-	+	-	+	2T
<i>R. pseudosolanacearum</i>								
V4	+	+	+	+	+	+	+	3
RS424	+	+	+	+	+	+	+	3
LPF752	+	+	+	+	+	+	+	3
GMI1000	+	+	+	+	+	+	+	3
GMI1000 + INOVIRUS	+	+	+	+	+	+	+	3
<i>R. syzygii</i>								
Psi07	+	+	+	-	+	-	-	2T

Figura suplementar 1

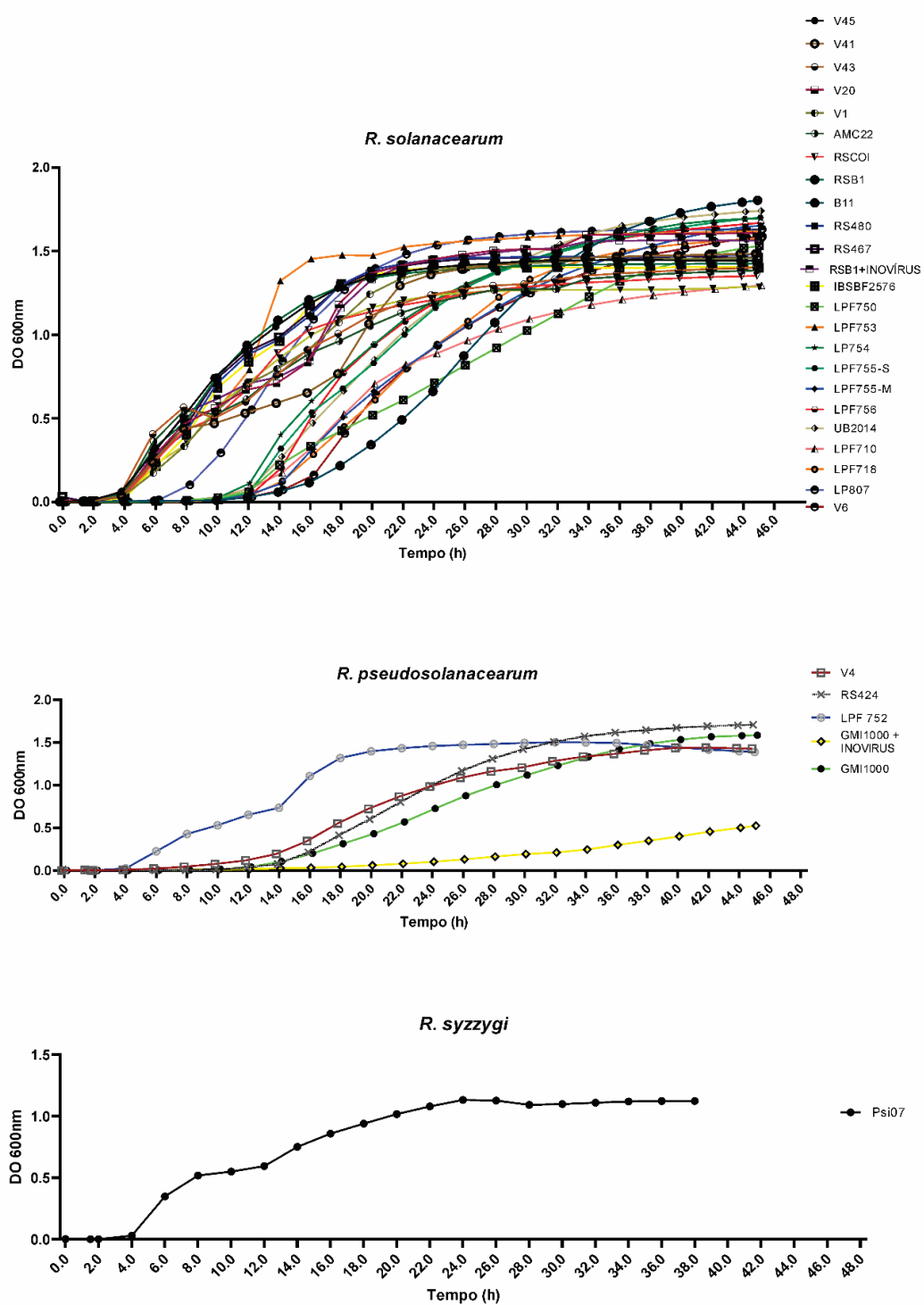


Fig 1S: Curva de crescimento em função da densidade óptica a 600 nm. Média das leituras realizadas a cada duas horas durante 48 h a 28 °C sob agitação constante em leitor de placa MultSkán.

Figura suplementar 2

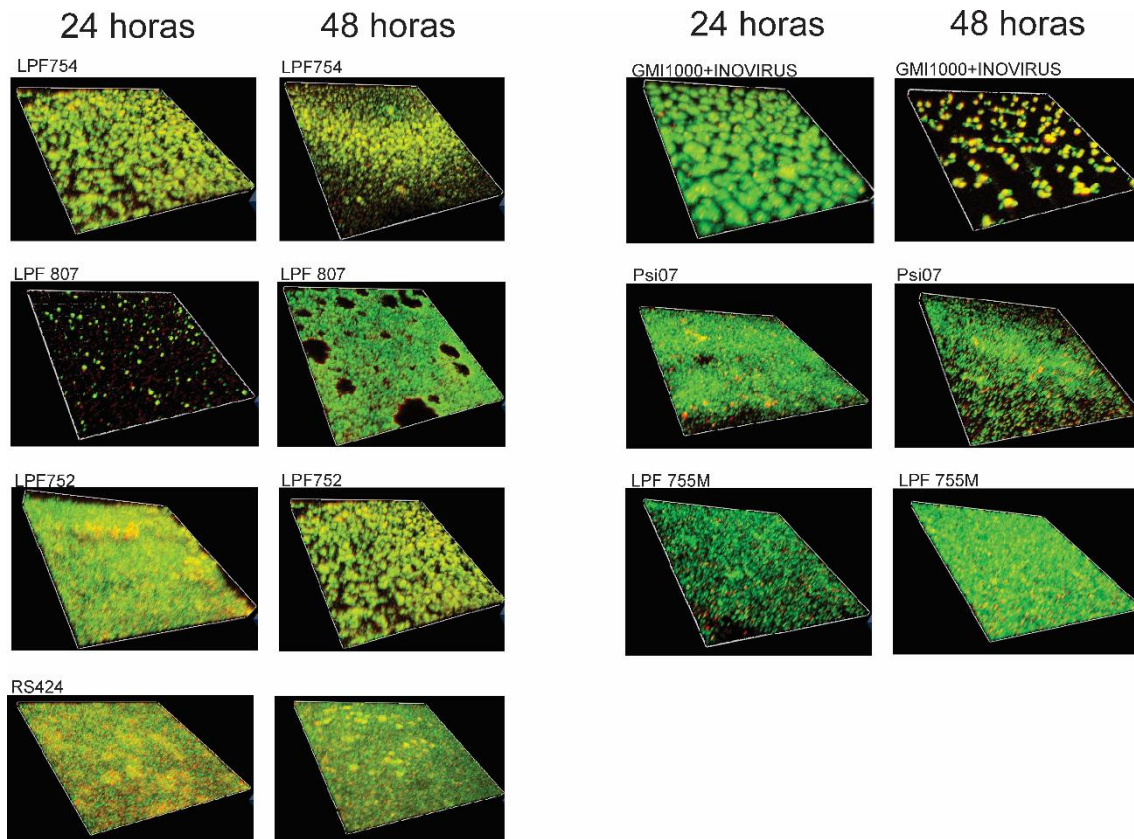


Fig 2S: Imagens do biofilme formado em cupons de poliestireno por microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes classificados com diferentes escalas de formação de biofilme nos tempos de 24 e 48 horas pela escala Stepanivic. Imagens geradas pelo software Zeiss Blue 3.3

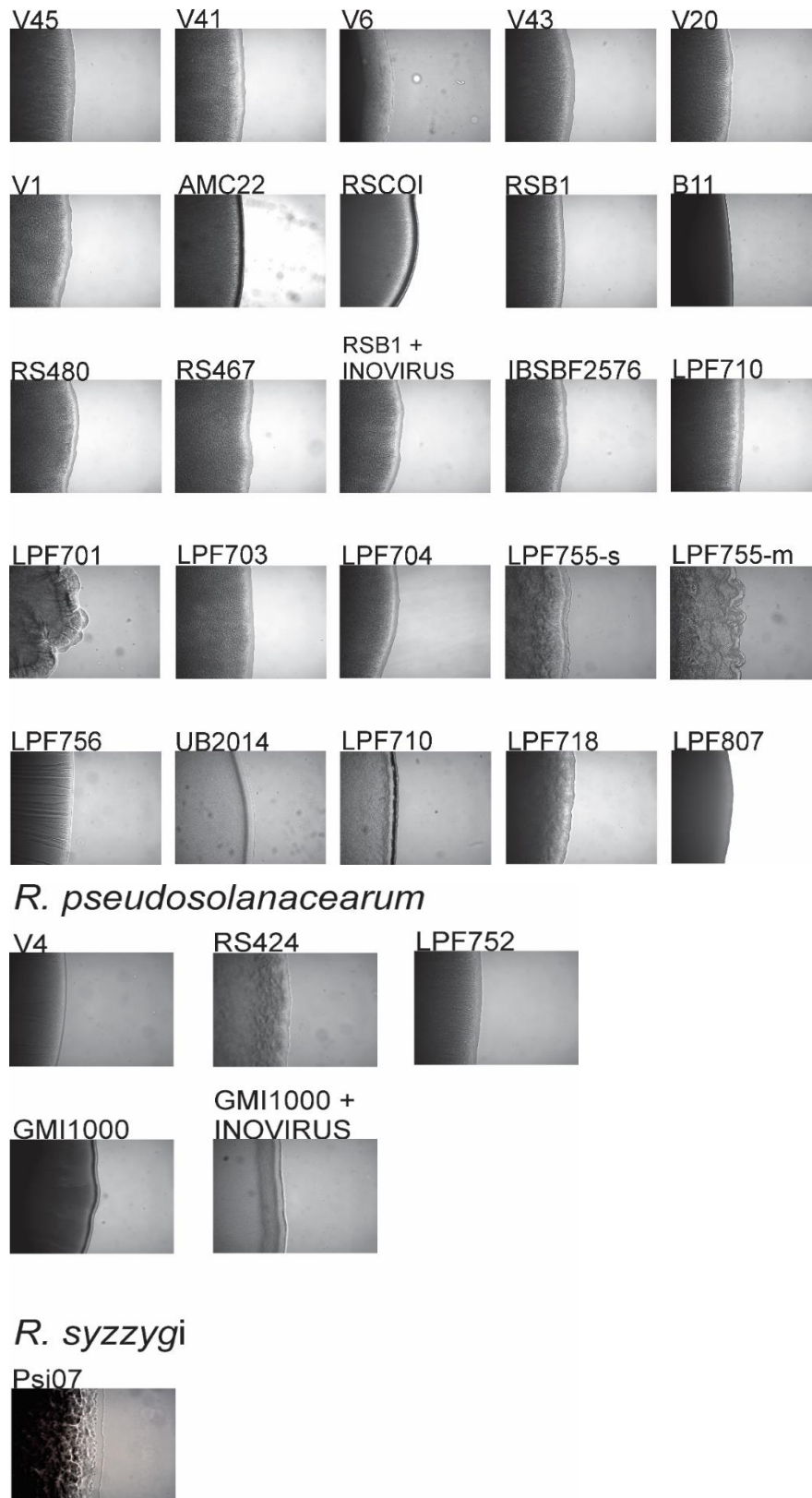
Figura suplementar 3

Fig 3S: Projeção da borda das colônias obtidas após 120 horas de incubação no ensaio de motilidade twitching. Imagens obtidas por microscopia óptica com aumento de 10X.

CAPÍTULO 3

Identificação de *N*-acil Homoserina Lactona e avaliação de fenótipos regulados pelos mecanismos de *quorum sensing* em *Ralstonia solanacearum*

MAGRO-PEREIRA, B. M., CUNHA, V. P., RAMOS, H. J. O., VANETTI, M. C. D., ALFENAS-ZERBINI, P. Identificação de *N*-acil Homoserina Lactona e avaliação de fenótipos regulados pelos mecanismos de *quorum sensing* em *Ralstonia solanacearum*.

Resumo

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) é formado por fitopatógenos de grande importância agrônômica. Seu impacto em diversas culturas, como batata, banana e eucalipto, mostra a relevância de conhecer profundamente os mecanismos que regulam a virulência dessas bactérias. O *quorum sensing* é um importante sistema de comunicação dependente de densidade populacional que está ligado à regulação de fenótipos de virulência como produção de exopolissacarídeos (EPS), motilidade, formação de biofilme, entre outros. Neste estudo realizamos a análise de produção de *N*-acil homoserina lactona em 27 isolados do CERS e identificamos a produção da molécula C4-AHL sendo produzida por dois desses isolados. Uma lactonase expressa nesses isolados para determinar quais fenótipos seriam alterados com a ausência das moléculas de AHLs por eles produzidas. Foi observado que os fenótipos de formação do biofilme, motilidade e resposta ao estresse oxidativo foram significativamente alterados, porém não houve alterações quanto a agressividade em plantas de tomate. Esses resultados demonstram a importância dos sistemas de comunicação mediados por moléculas de AHLs e lançam luz a potenciais alvos para controle biológico de *R. solanacearum*.

Palavras-chave: *Quorum sensing*, *Ralstonia solanacearum*, Biofilme, AHLs

1. Introdução

O Complexo de Espécies *Ralstonia solanacearum* (CERS) é composto pelas três espécies *Ralstonia solanacearum* (filotipo IIA e IIB), *Ralstonia pseudosolanacearum* (Filotipo I e III) e *Ralstonia syzygi* (Filotipo IV) (Prior et al. 2016). Sua classificação em filotipos reflete sua diversidade genética e se correlaciona com a distribuição geográfica dos isolados. Esse grupo de patógenos infecta mais de 250 espécies de plantas em mais de 54 famílias botânicas, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas. São patógenos de difícil manejo, dada sua diversidade genética e viabilidade no solo por longos períodos (Prior and Fegan 2005; Prior et al. 2016).

Sua agressividade está relacionada com a formação de biofilme no xilema vascular das plantas hospedeiras, que obstrui o fluxo do xilema levando à murcha bacteriana (Genin and Denny 2012). Outros fatores de virulência também são importantes para o desenvolvimento da doença. O isolado virulento GMI1000 é capaz de produzir um composto chamado putrecina, que aumenta a sua agressividade em plantas de tomate (Lowe-Power et al. 2018a). A formação de biofilme dessas bactérias depende de uma regulação gênica complexa, envolvendo sistemas de comunicação de quorum, tendo como regulador transcricional global, o gene *phcA*, responsável pela ativação de sistemas relacionados à virulência (Genin and Denny 2012; Lowe-Power et al. 2018b; Yoshihara et al. 2020).

No CERS, o sistema de comunicação mais bem descrito é o *phcBRSQ*, que produz moléculas 3-OH-PAME ou 3-OH-MAME. Esse sistema é o responsável pela regulação positiva do gene *phcA*, um homólogo de Lys-R de *R. solanacearum*, dependente de *quorum*. A presença das moléculas 3-OH-PAME ou 3-OH-MAME induz a expressão da proteína PhcA que regula a expressão de genes relacionados com mecanismos de virulência, sendo fundamentais para o desenvolvimento da murcha bacteriana, enquanto suprime a expressão de genes relacionados com a sobrevivência e de fatores de invasão ao tecido (Brumbley et al. 1993; Genin and Denny 2012; Yoshihara et al. 2020; Takemura et al. 2021).

O sistema de comunicação *Quorum Sensing* (QS) é fundamental para a regulação da virulência dos fitopatógenos (Vesuna and Nerurkar 2018; Baltenneck et al. 2021). Conhecer os tipos de QS de cada espécie e os sistemas regulados por essas moléculas ajuda a compreender os mecanismos de virulência e criar ferramentas de biocontrole eficazes. Diversos mecanismos de comunicação estão sendo descritos em fitopatógenos, desde sistemas de comunicação interespecíes até inter-reinos. A regulação mediada por esses sistemas de comunicação está

diretamente relacionada com mecanismos de virulência, aptidão a estresses ambientais, motilidade e colonização do hospedeiro (Kalia 2018; Balteneck et al. 2021; Li et al. 2022a).

O *QS* mediado por autoindutores AI-1 (*QS* AI-1), mediado por moléculas AHLs (*N*-acil Homoserina Lactona), ainda é pouco explorado em *Ralstonia solanacearum*. O primeiro relato de detecção de uma molécula de AHL foi realizado por Cha et al. (1998) onde, por FPLC (Fast protein liquid chromatography) detectaram uma molécula C8-AHL. A molécula descrita seria expressa pelo sistema *soli/R* que, mais tarde, Genin e Denny (2012) e Lowe-Power, Khokhani e Allen (2018) discutem que não parece ter relação com a virulência de bactérias do CERS. Mais recentemente, Yan et al. (2022) identificaram um novo sistema de *QS* AI-1 em *Ralstonia solanacearum* EP1, regulado pelos genes *RasI/R*, neste sistema é produzida uma molécula C12-AHL e ele controla a virulência nesse isolado ao atuar sobre a motilidade, a formação do biofilme e a atividade de celulase. O objetivo do presente estudo foi identificar moléculas de AHLs produzidas por isolados do CERS e compreender os fenótipos regulados pelo sistema *QS* nestes fitopatógenos, como biofilme, motilidade e tolerância ao estresse oxidativo.

2. Materiais e métodos

2.1. Culturas e condições de crescimento

Os isolados de *Ralstonia* foram crescidos em caldo CPG (Caseína 1%, peptona bacteriológica 10% e glicose 5%) por 48 horas a 28 °C. A biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026 foi crescida em caldo LB (Luria Bertani) adicionado de 20 µg/mL de canamicina. A biosensora *E. coli* pSB403 foi crescida em caldo LB adicionado de 2 µg/mL de tetraciclina. A bactéria *Hafnia alvei* ATCC 11604 foi crescida em meio LB sem adição de antibióticos. Todas essas bactérias foram incubadas a 30 °C por 24 horas. A biosensora *Agrobacterium tumefaciens* WCF047 (pCF218) (pCF372) foi crescida por 48 horas em meio AT (Glicose 0,5%, fosfato de potássio monobásico 0,079 M, sulfato de amônio 0,015 M, sulfato de magnésio 7H₂O 0,6 M, cloreto de cálcio 0,06 mM, sulfato de ferro 0,027 mM e sulfato de manganês 0,0071 mM) contendo 20 µg/mL de canamicina e 2 µg/mL de tetraciclina. Isolados transconjugantes foram mantidos em CPG suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 20 µg/mL de cloranfenicol. *E. coli* XLI Blue pMLBAD-*aiiA*-Gm^r e *E. coli* HB101 pRK600 Cm^r foram mantidas em meio LB suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 20 µg/mL de cloranfenicol, respectivamente, a 37 °C por 24 horas.

2.2. Detecção de AHLs utilizando diferentes biosensoras

Para a análise de produção de AHL pelos isolados de *Ralstonia*, as culturas foram crescidas por 48 horas em caldo CPG e o sobrenadante das culturas foi coletado após centrifugação a 10.000 g por 20 minutos. As biosensoras foram ativadas de acordo com suas respectivas condições de crescimento. Para o ensaio de detecção com a CV026 e *A. tumefaciens* WCR047, em placas de 96 poços, foram aplicados 200 µL de cultura bacteriana de biosensoras e 100 µL de sobrenadante de *Ralstonia*. No teste utilizando *A. tumefaciens*, foram adicionados 40 µg/mL de X-gal em cada poço. As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C até o aparecimento de pigmento indicativo de presença de AHL. O ensaio de detecção utilizando *E. coli* pSB403 foi realizado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, nas mesmas proporções utilizadas para as demais biosensoras. Após 48 horas, os tubos foram levados para sala escura para observação de emissão de fluorescência. Os controles consistiram em sobrenadante de *H. alvei* como controle positivo, sobrenadante de *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo e meio CPG como controle negativo.

2.3. Extração de AHLs

O sobrenadante de 300 mL de cultura ativada por 48 horas foi coletado após centrifugação a 13000 g por 10 min. Mesmo volume de acetato de etila, acidificado com 0,5% de ácido fórmico, foi adicionado ao sobrenadante e agitado vigorosamente por 1 minuto. A mistura foi mantida em repouso para separação de fases e a fase superior foi coletada. A extração foi repetida mais duas vezes, obtendo 900 mL de extrato. O extrato resultante foi evaporado a 80 °C em manta aquecedora e o precipitado final foi solubilizado em 100% de acetonitrila grau HPLC e armazenado a -80 °C até ser analisado.

2.4. Detecção e identificação de AHLs

Os extratos foram analisados por LS-MS usando o sistema nanoUPLC (nanoACQUITY-Waters) sendo carregados em uma coluna C18 BEH130 1,7 µM – 100 x 100 nm, operando com fluxo de 0,5 µL/min. A análise de massa foi realizada em espectrômetro de massas ION TRAP (Amazon-Bruker). O LS-MS foi ajustado para realizar uma varredura completa MS1 sem fragmentação $[M+H]^+$ na faixa de 100 – 510 m/z e a fragmentação de íons com faixas de 40 m/z. A análise da presença de AHL consistiu na triagem de íons precursores com fragmentação m/z 102 e comparação de perfil de fragmentação de padrões AHLs sintéticas (4C-AHL; 6C-AHL; 6-OH-C-AHL; 8C-AHL, 10C-AHL e 12C-AHL) (Sigma-Merck).

2.5. Determinação das alterações fenotípicas dos isolados IBSBF2576 e LPF750 na ausência de moléculas AHLs

2.5.1. Obtenção dos transconjugantes IBSBF2576-T e LPF750-T expressando *aiiA* lactonase

Para obtenção dos isolados expressando uma lactonase foi realizada uma conjugação triparental (Martins, 2007). Para isso o clone de *E. coli* HB101 contendo o plasmídeo conjugativo pRK600 foi utilizado como auxiliadora e *E. coli* XLI Blue pMLBAD-*aiiA*-Gm^r (7.635 pb) utilizada como doadora. A primeira etapa consistiu na indução da conjugação, incubando 100 µL de cada clone de *E. coli* crescidas *overnight* por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL do isolado aceptor (IBSBF2576 e LPF750) foi adicionado à mistura e incubados por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Foi realizada a diluição seriada da mistura de bactérias e plaqueadas por sobrecamada em meio CGP, suplementado com 20 µg/mL de gentamicina e 20 µg/mL de cloranfenicol, *overnight* ou até o aparecimento de colônias.

2.5.2. Identificação por PCR

Para a confirmação de espécie, o DNA total dos transconjugantes obtidos foi extraído com o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo instruções do produto. Para a confirmação da natureza dos isolados foi realizado o PCR amplificando a região ITS de 199 pb (Rs199R – TATTCGCTTGACCCTATAA; Rs199F – AGTAACTCGGCTGTTCTTT), segundo Freitas et al. (2021), com poucas modificações. Foi utilizado 2 µL de DNA (15 ng/µL), 0,1 µL de enzima Taq Pol (+) MgCl₂ (Cellco Biothec), 0,5 µL de primer (10 µM) e 1µL de dNTPs, para uma reação final de 25 µL. O ciclo de amplificação foi de 94 °C por 2 min de desnaturação inicial, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com extensão final de 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE, o gel foi corado em solução de 1% de brometo de etídio e analisado em fotodocumentador L-PIX (Locus Biotechnology). DNAs dos isolados selvagens foram usados como controle positivo da reação, junto com o DNA do isolado *R. pseudosolanacearum* GMI1000, e os DNAs das cepas de *E. coli* XL1 Blue e HB101 foram usadas como controle negativo.

2.5.3. Confirmação da ausência de moléculas AHLs

Para confirmar a quebra das AHLs foi utilizado a biosensora CV026. No centro de uma placa foi realizada a estria do isolado selvagem em paralelo com CV026 e quatro estrias laterais correspondendo a cada colônia transconjugantes obtida com a estria paralela, voltada para o

centro, de CV026. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas para avaliação da produção de violaceína.

2.5.4. Formação de biofilme

Foi realizado o ensaio de formação do biofilme dos transconjugantes. Os isolados foram crescidos por 48 horas a 28 °C e padronizados para DO600nm 0,1 utilizando tampão PBS, 2% de inóculo foi adicionado a 198 µL de meio CPG líquido em placa de poliestireno de 96 poços. A placa foi incubada por 24 e 48 horas a 28 °C para avaliar a formação de biofilme. Após o tempo de incubação foi realizada a leitura da DO de 600 nm e o meio foi removido dos poços cuidadosamente e lavado com tampão PBS por três vezes. Os poços foram corados com 1% de cristal violeta por 30 min a temperatura ambiente, consecutivamente, lavado gentilmente três vezes com tampão PBS. O corante aderido foi dissolvido com etanol 95% e avaliado em leitor de placa na absorbância de 590 nm. Foi avaliada a formação do biofilme a 590 nm.

2.5.5. Microscopia Confocal

A morfologia do biofilme dos isolados transconjugantes foi analisada por microscopia confocal de varredura a laser utilizando Live/Dead (SYTHO 9 e iodeto de propídio) como corante. Cupons de poliestireno de 10 x 30 mm foram lavados por uma hora em solução de NaOH 1%, posteriormente lavados por 1 hora em solução de etanol 70% e por fim esterilizados por irradiação UV por 15 minutos para cada lado. Em um tubo tipo Falcon de 15 mL, os cupons foram posicionados verticalmente e aproximadamente 1 mL de meio de cultura com 2% de inóculo bacteriano foi adicionado (volume suficiente para a formação de uma interface líquido-ar imediatamente antes da metade do cupom). Os tubos foram incubados a 28 °C por 24 e 48 horas sem agitação. Foi utilizado o Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss, LSM510 META, com aumento final de 20X/0,5 e os lasers Argon/2 (458, 477, 488, 514 nm) e HeNe543 (543 nm).

2.5.6. Ensaio de motilidade

Para avaliar a capacidade de locomoção dos isolados transconjugantes foram realizados os ensaios de motilidade *twitching*, *swarming* e *swimming* (Raza et al. 2016). Para o ensaio de *twitching* foram preparadas placas de 60 mm contendo CPG com 1,7% de ágar e para o ensaio de *swarming* e *swimming* as concentrações de ágar utilizadas foram de 0,7% e 0,3%, respectivamente, em placas de 90 mm. Os isolados foram crescidos em caldo CPG por 48 h a 28 °C e, posteriormente, padronizados para a DO 600 nm de 0,1, 2 µL de suspensão bacteriana padronizada foi aplicada na superfície do ágar e as placas incubadas a 28 °C após completa secagem da gota. O ensaio de *twitching* foi avaliado por 5 dias. Nos ensaios de *swarming* e

swimming o diâmetro das colônias foi medido ao longo de 3 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata, contendo duas réplicas cada.

2.5.7. Ensaio de teste de tolerância ao estresse oxidativo

A sensibilidade dos isolados transconjugantes ao estresse oxidativo foi avaliada usando método descrito por Colburn-Clifford (2010). Inicialmente os isolados foram crescidos conforme descrito anteriormente e padronizados para a DO 600 nm de 0,1. Um volume de 100 μ L do inóculo padronizado foi espalhado uniformemente pela superfície de ágar CPG. Discos de 5 mm de papel filtro estéril foram aplicados na superfície do ágar em posições equidistantes e embebidos com 5 μ L de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Merk). As concentrações de H₂O₂ foram de 32, 16, 8, 4 e 2 μ M. O controle utilizado foi água MilliQ estéril. Após 24 horas os halos de inibição foram medidos usando o software ImageJ.

2.5.8. Agressividade dos isolados em tomate

Para o ensaio de agressividade foram utilizadas plantas de tomate Santa Clara. As sementes foram germinadas por 21 dias em substrato florestal e transplantadas para vasos, contendo uma mistura de uma parte de substrato florestal para duas partes de solo comum, onde permaneceram até a formação da terceira folha verdadeira. A inoculação dos isolados foi realizada pelo método do palito, na região axial da folha entre a primeira e a segunda folha verdadeira. Os sintomas de murcha foram avaliados por 15 dias em câmara de crescimento, com temperatura variando de 25 a 28 °C, umidade regulada em média de 80% e controle fotovoltáico de 12h claro/escuro. Como controle negativo foi utilizado água MilliQ esterilizada (Khokhani et al. 2018). A cada 5 dias, caules de plantas inoculadas foram coletadas e maceradas para a realização do reisolamento e a contagens de UFC (unidades formadoras de colônia).

2.5.9. Análises estatísticas

Os dados foram analisados por comparação par a par comparando os isolados selvagens com seu respectivo transconjugantes. Foi adotado o teste t e p-value de 0,05, 0,01 e 0,001 para todos os ensaios realizados, em software GraphPad Prisma 5.00.

3. Resultados

3.1. Detecção de AHLs por indução de bactérias biosensoras e confirmação por LS-MS

Foram avaliados 27 isolados do CERS quanto a indução de sinal de *QS* nas biosensora *C. violaceum* CV028, *E. coli* pSB403 e *A. tumefaciens* WFC047. Deste grupo, 16 isolados induziram a produção de violaceína em CV026 e bioluminescência em *E. coli* pSB403 e 10 induziram a produção de β -galactosidade em *A. tumefaciens* WCF047 (Tabela 1).

Tabela 1: Indução de *Quorum sensing* em diferentes bactérias biosensoras.

Isolado	Fonte	Hospedeiro	Origem	<i>C. violaceum</i> CV026	<i>E. coli</i> pSB403	<i>A. tumefaciens</i> WCF047
V45	INPA	Pepino	Amazônia	+	+	+
V41	INPA	Berinjela	Amazônia	+	+	-
V6	INPA	Tomate	Amazônia	-	-	-
V43	INPA	Berinjela	Amazônia	+	+	+
V20	INPA	Tomate	Amazônia	+	+	+
V1	INPA	Tomate	Amazônia	+	+	-
V4	INPA	Tomate	Amazônia	-	+	+
AMC22	LPF/UFV	Eucalipto	Amapá	+	+	+
RSCOI	MIND/UFV	Tomate	Minas Gerais	+	+	+
RSB1	MIND/UFV	Eucalipto	Bahia	+	+	+
B11	UFRPE	Banana	Amazônia	-	-	-
RS480	EMBRAPA	Gerânio	São Paulo	+	+	-
RS467	INPA	Tomate	Amazônia	+	+	-
RS424	EMBRAPA	Tomate	Acre	-	-	-
RSB1+ INOVÍRUS	MIND/UFV	Eucalipto	Bahia	+	+	-
IBSBF2576	LPF/UFV	Eucalipto	Santa Catarina	+	+	-
LPF750	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	+	+	+
LPF751	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	-	-	-
LPF752	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	+	+	-
LPF753	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	+	+	+
LPF754	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	+	-	+
LPF 755m	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	-	-	-
LPF 755s	LPV/UFV	Eucalipto	Pará	-	-	-
LPF 756	LPF/UFV	Eucalipto	Pará	-	-	-
GMI 1000	UW	Tomate	Guiana Francesa	-	-	-
UB 2014	EMBRAPA	Berinjela	Ceará	-	-	-
GMI 1000 + INOVÍRUS	UW	Tomate	Guiana Francesa	-	-	-

Destes 27 isolados, dois foram escolhidos para realizar a extração e identificação de moléculas de AHL. Seguindo critérios de fenótipos observados no capítulo anterior foram selecionados o isolado IBSBF2576, classificado como forte produtor de biofilme, com elevadas motilidades *swarming* e *twitching* e não agressivo em tomate, e o isolado LPF750, que foi classificado como não formador de biofilme, com elevadas motilidades *swarming* e *twitching* e não agressivo em tomate.

Padrões de tamanhos de cadeia lateral entre 4 e 12 carbonos foram utilizados como controles para auxiliar na identificação de moléculas AHL. A busca de picos 102 m/z, que corresponde ao anel lactona, orientou a determinação da presença de moléculas AHLs nos extratos obtidos. A análise no equipamento Ion Trap resultou em espectros com perda neutra equivalente a uma molécula de água, isso significou em redução de 70 Da em todos os espectros obtidos.

Na figura 1 estão os espectros de fragmentação iônicas obtidos por LS/MS. Em A é apresentado o espectro de fragmentação do íon 172, padrão da molécula C4-AHL (*N*-butirilhomoserina lactona) sintética, em B e C estão os espectros de fragmentação dos íons 172 dos extratos dos isolados IBSBF2576 e LPF750, respectivamente. A presença dos picos m/z 102 característicos do anel lactona foram obtidos nos tempos de retenção de 6,4 minutos para a molécula pura e de 6,1 minutos para os dois extratos analisados. Os espectros de picos 102, 143 e 153 (setas vermelhas da figura) característicos da molécula C4-AHL, assim como o observado no espectro da molécula padrão, confirmam a presença da C4-AHL nos extratos dos dois isolados testados. Esse é o primeiro relato de detecção de uma molécula C4-AHL produzida por CERS. Esse resultado não descarta a possibilidade da presença de outras moléculas AHLs de diferentes tamanhos e formatos de cadeia lateral.

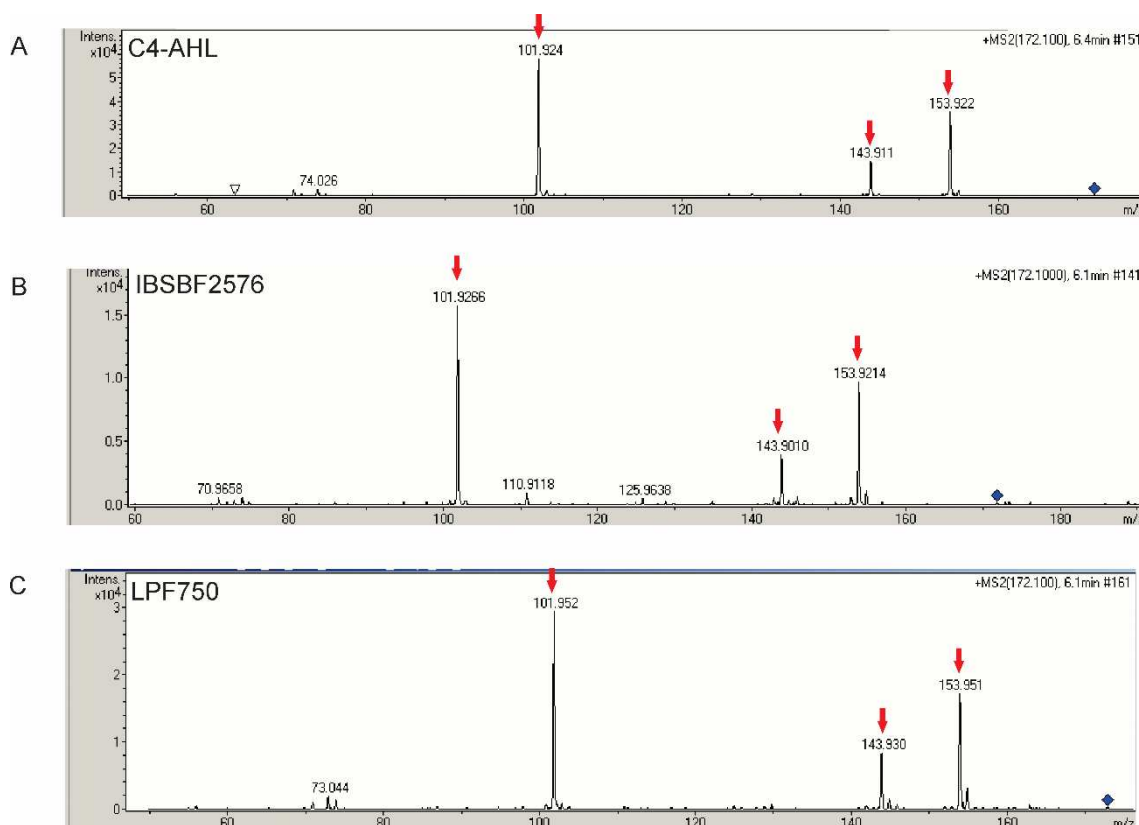


Figura 1: Análise da detecção de *N*-Acil Homoserina Lactona em extratos de isolados do CERS por LS/MS. A- Espectro da fragmentação do íon 172 da molécula sintética C4-AHL, com perda neutra de 70 Da; B- Espectro de fragmentação iônica dos íons 172 obtido no extrato de IBSBF2576; C- Espectro de fragmentação iônica dos íons 172 obtido no extrato de LPF750. Setas vermelhas indicam os picos correspondentes à fragmentação iônica dos íons 172 de C4-AHL.

3.2. Determinação das alterações fenotípicas dos isolados IBSBF2576 e LPF750 na ausência de moléculas AHLs

Para entender os fenótipos regulados pelo *QS* AI-1, foram utilizados os dois isolados em que foram detectados a molécula C4-AHL. Para isso foi utilizado o sistema de expressão de uma lactonase para que moléculas do tipo AHL fossem degradadas e, assim, correlacionar o fenótipo observado com a repressão do *QS* AI-1. A sequência codificadora da lactonase, presente no plasmídeo de expressão pMLBAD-aiiA-Gm^r, em *E. coli* XLI Blue, foi transferido para os isolados IBSBF2576 e LPF750 utilizando a técnica de conjugação triparental, que foi auxiliada pela célula conjugativa *E. coli* pRK600. O sucesso da transconjugação foi determinado pelo isolamento de colônias em meio CPG contendo os marcadores de seleção dos plasmídeos e o antibiótico ampicilina, que bactérias do CERS é intrinsecamente resistente. Na figura 2 está apresentado o gel do PCR com primers específicos para bactérias do CERS, onde

confirmar-se que os transconjugantes obtidos eram os isolados IBSBF2576 e LPF750. Para fins de nomenclatura os transconjugantes serão nomeados como IBSBF2576-T e LPF750-T.

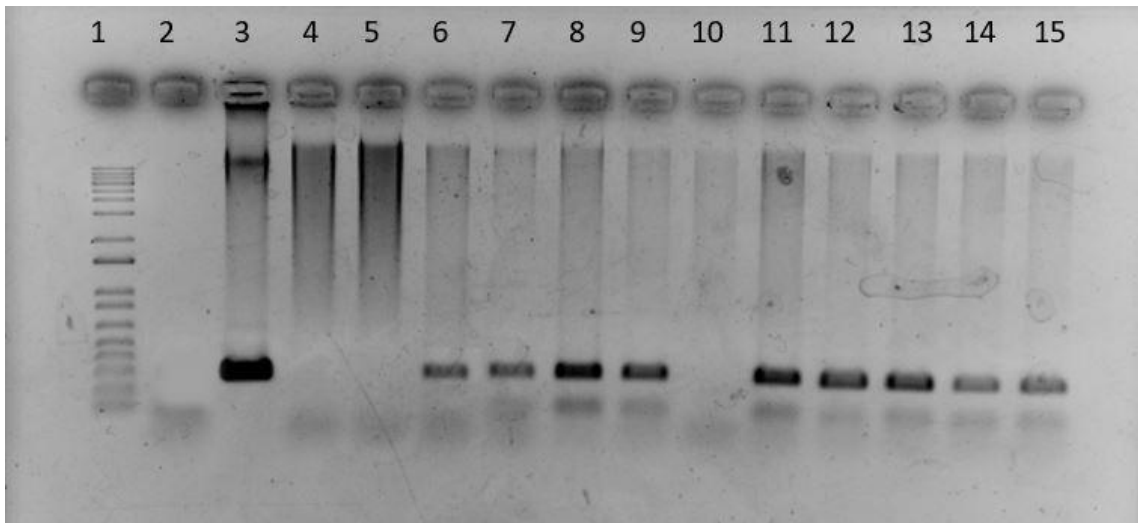


Figura 2: Resultado do gel do PCR para determinação de espécie de *Ralstonia solanacearum*. 1-marcador; 2- Branco; 3- GMI 1000; 4- *E. coli* HB101; 5- *E. coli* XLI Blue; 6- IBSBF2576 selvagem; 7- IBSBF2576-1T; 8- IBSBF2576-2T; 9- IBSBF2576-5T; 10- IBSBF2576-8T; 11- LPF750 selvagem; 12- LPF750-1T; 13- LPF750-2T; 14- LPF750-3T; 15- LPF750-4T.

A confirmação da eficiência da transconjugação foi avaliada pela degradação da molécula de AHL produzida por cada isolado. A degradação foi determinada pela ausência de indução de *QS* em CV026 e consequente ausência da produção de violaceína (Figura 3). Neste ensaio foi constatada a indução *QS* pela produção de violaceína apenas nas estrias de CV026 paralelas com os isolados selvagens, confirmando a degradação de AHL dos transconjugantes obtidos.

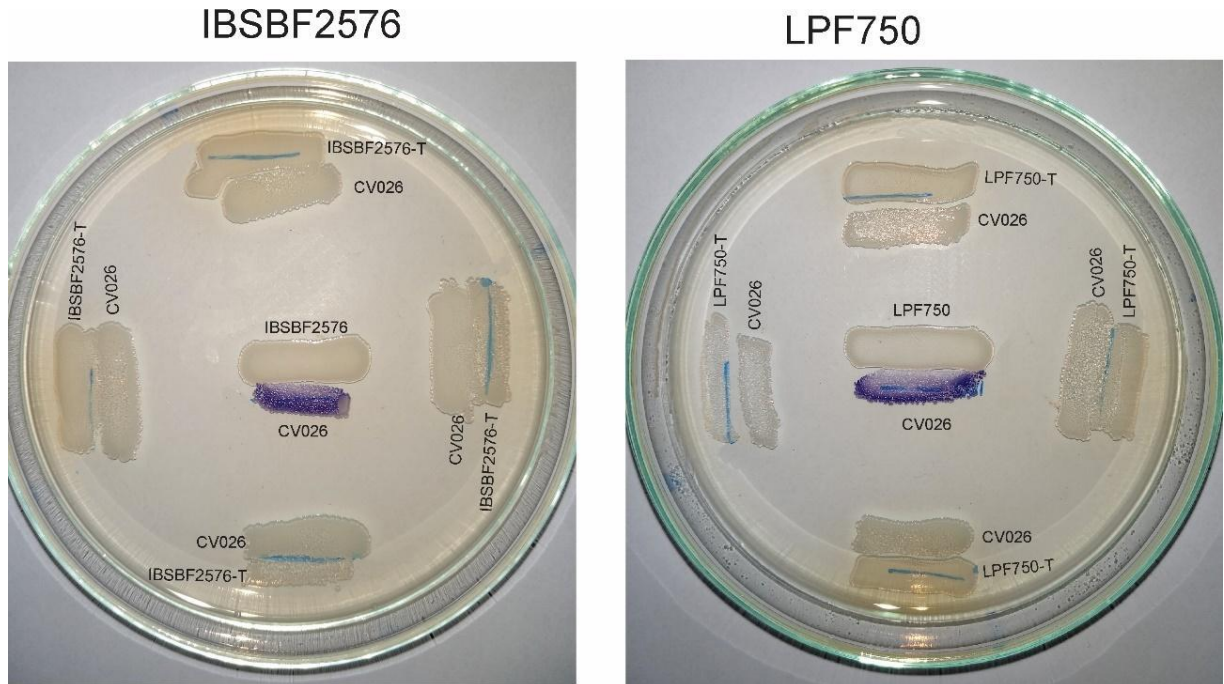


Figura 3: Determinação da degradação de moléculas AHLs dos isolados IBSBF2576 e LPF750. A: Isolado IBSBF2576, ao centro estria do tipo selvagem e nas laterais quatro transconjugantes obtidos. B: Isolado LPF750, ao centro estria do tipo selvagem e nas laterais quatro transconjugantes obtidos.

Características fenotípicas relacionadas com a virulência foram avaliadas para determinar a relação do sistema de *QS* AI-1 com tais fenótipos. A formação de biofilme em superfície de poliestireno foi determinada e comparada com o isolado selvagem. Os resultados obtidos (Figura 4) mostraram a formação do biofilme de ambos os isolados foi alterada. O isolado IBSBF2576 (Figura 4A) é um forte produtor de biofilme tanto em 24 quanto em 48 horas, porém IBSBF2576-T apresentou significativa redução de formação de biofilme na superfície de poliestireno nos dois tempos avaliados. O isolado LPF 750 não é capaz formar biofilme em superfícies de poliestireno nos dois tempos avaliados, e esse mesmo fenótipo foi observado em LPF750-T para o tempo de 24 horas, já no tempo de 48 horas houve um aumento significativo formação do biofilme de LPF750-T em relação ao selvagem (Figura 4B).

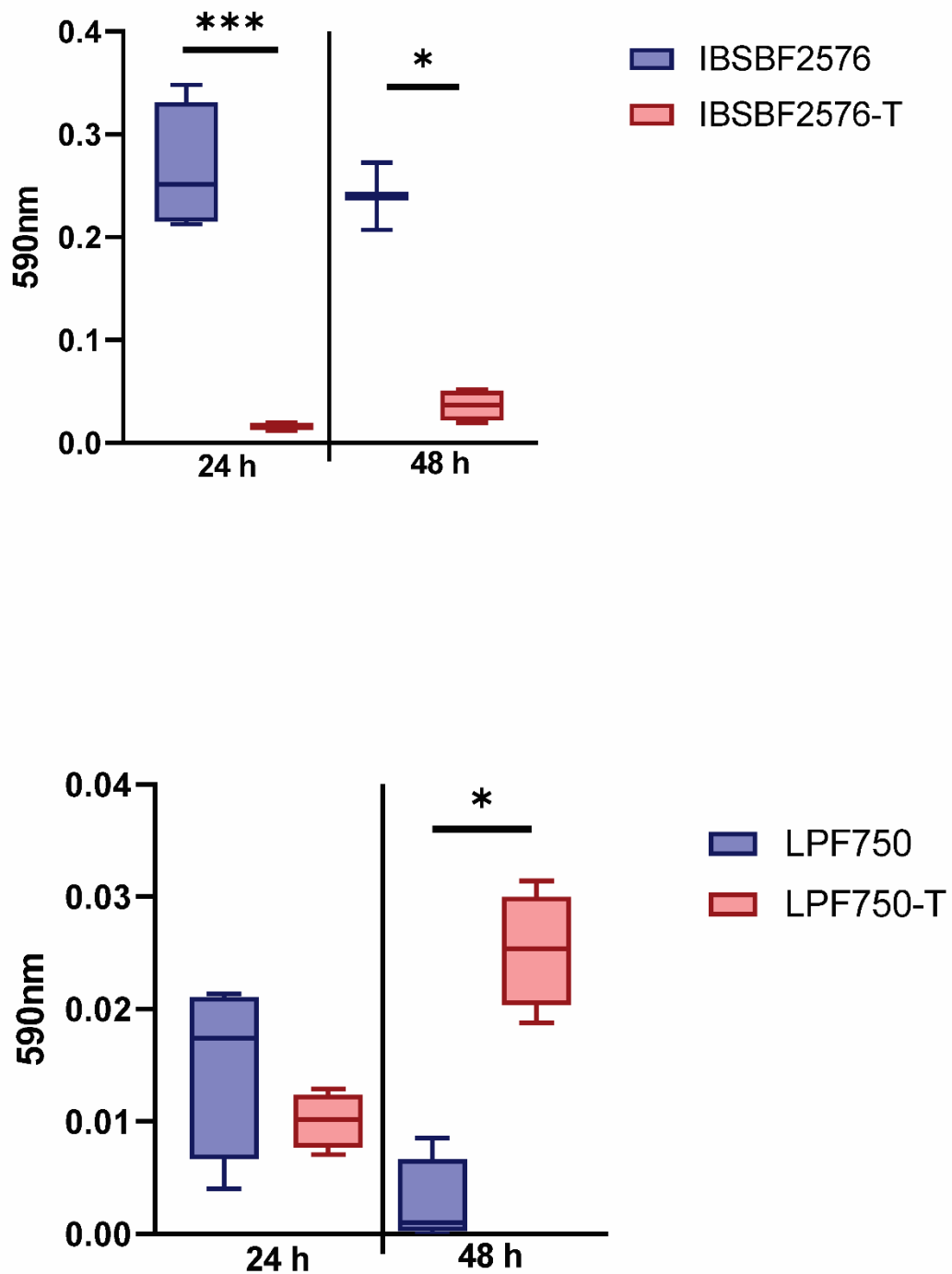


Figura 4: Adesão do biofilme à superfície de poliestireno. A- Formação do biofilme após 24 e 48 horas dos isolados IBSBF2576 e IBSBF2576-T. B- Formação do biofilme após 24 e 48 horas dos isolados LPF750 e LPF750-T. Diferença estatística foi analisada por t teste, um asterisco indica p valor <0,05, dois asteriscos indicam p valor <0,01 e três asteriscos indicam p valor <0,001.

A morfologia do biofilme foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser nos mesmos tempos realizados no ensaio de adesão. Na figura 5, observa-se a morfologia do

biofilme de IBSBF2576 e IBSBF2576-T. Em A e B pode ser observado o biofilme do isolado selvagem como sendo compacto, aumentando em espessura e densidade no tempo de 48 horas. Já em C e D é mostrado o biofilme do transconjugantes IBSBF2576, nessas imagens é possível perceber a significativa redução do biofilme no cupom nos dois tempos, onde tem-se um biofilme puntiforme, em 24 horas, e um tapete com muitos espaços, em 48 horas. Essas imagens confirmam que IBSBF2576-T tem menor produção de biofilme e que esse biofilme é menos denso e com redução da formação de aglomerados bacterianos.

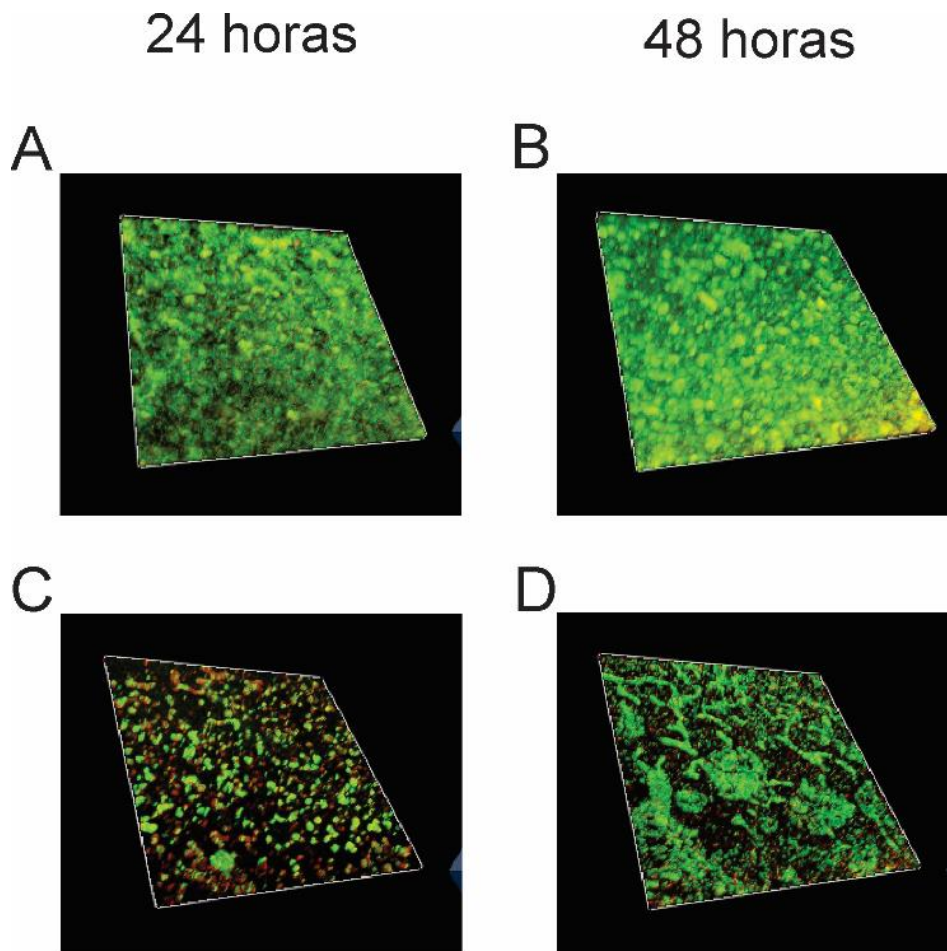


Figura 5: Biofilme do isolado IBSBF2576 e seu respectivo transconjugantes IBSBF2576-T. A e B- biofilme do isolado selvagem IBSBF2576 nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. C e D- Biofilme do transconjugante IBSBF2576-T nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. Imagens pelo software Zeiss Blue 3.3 e obtidas por microscopia confocal de varredura a laser com o uso do corante de viabilidade Live/Dead.

A figura 6 mostra o biofilme do isolado selvagem de LPF750 (Figura 6 A e B) e seu transconjugantes LPF750-T (Figura 6 C e D). O isolado selvagem, apesar de apresentar baixa formação de biofilme, forma estruturas aglomeradas em formato de cogumelo na superfície de poliestireno, que é reduzido no tempo de 48 horas. O LPF750-T revelou alteração na morfologia

do biofilme nos dois tempos avaliados, apresentando ausência das estruturas em formato de cogumelo. Ao contrário do seu selvagem, o biofilme de LPF750-T apresentou estruturas em “rede” ou “teia” no tempo de 24 horas e a formação de um fino tapete de células em 48 horas, indicando que, apesar de não ser um biofilme tão espesso, a alteração fenotípica conferida pelo LPF750-T está na morfologia desse biofilme

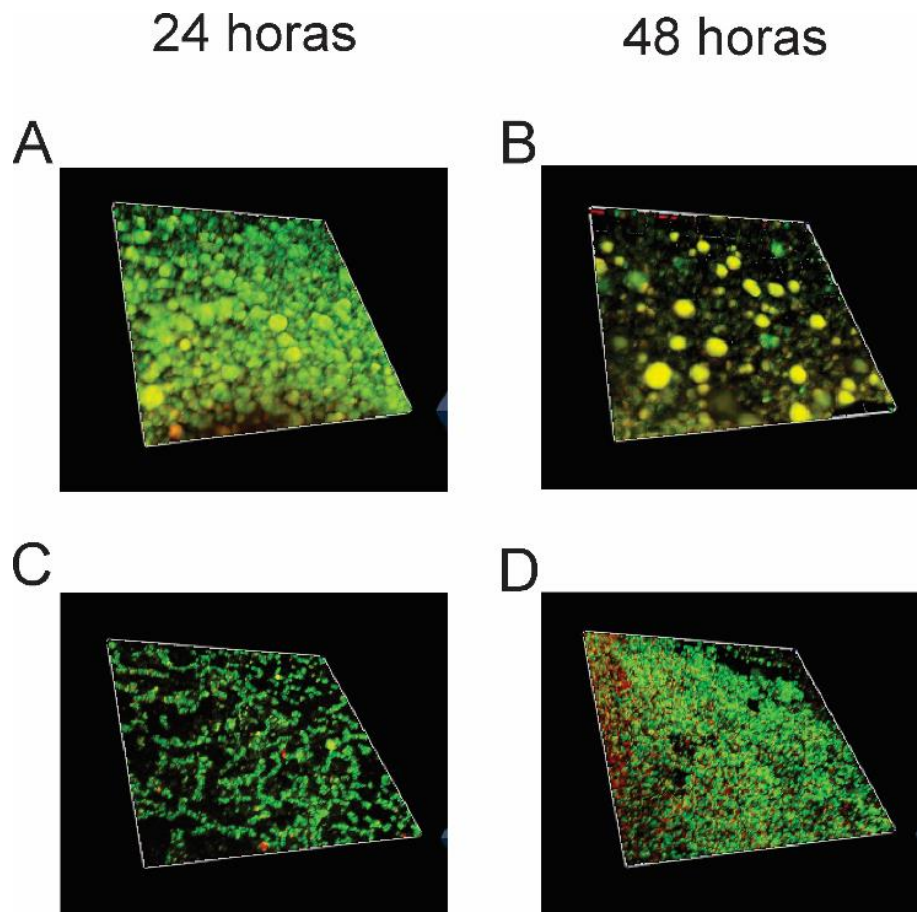


Figura 6: Biofilme do isolado LPF750 e seu respectivo transconjugantes LPF750T. A e B- biofilme do isolado selvagem LPF750 nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. C e D- Biofilme do transconjugantes LPF750-T nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. Imagens pelo software Zeiss Blue 3.3 e obtidas por microscopia confocal de varredura a laser com o uso do corante de viabilidade Live/Dead.

Na figura 7 é apresentado o resultado dos três tipos de motilidade do isolado IBSBF2576 e IBSBF2576-T. Em 7A a motilidade *swimming* mostrou-se significativamente reduzida em IBSBF2576-T, quando comparado ao selvagem. IBSBF2576 mostrou elevada motilidade *swimming* e a redução significativa (p valor >0,001) do transconjugantes confirma a alteração desse fenótipo regulada pelo QS AI-1. O mesmo fenótipo é observado em 7B. Na motilidade *twitching*, na figura 7C, observa-se o aumento progressivo das colônias com a manutenção, ao longo do tempo, da diferença estatística entre selvagem e transconjugantes.

Nos ensaios de motilidade, LPF750 e LPF750-T (Figura 8) apresentaram mesmo fenótipo observado em IBSBF2576. Em 8A e 8B, são apresentadas as motilidades *swimming* e *swarming*, respectivamente, e na figura 8C a motilidade *twitching*. Ambos os isolados selvagens possuem elevada motilidade *in vitro* e a degradação de moléculas de AHLs, e consequente bloqueio de regulação gênica regulada pelo QS AI-1, resultou na drástica redução de motilidade desses isolados.

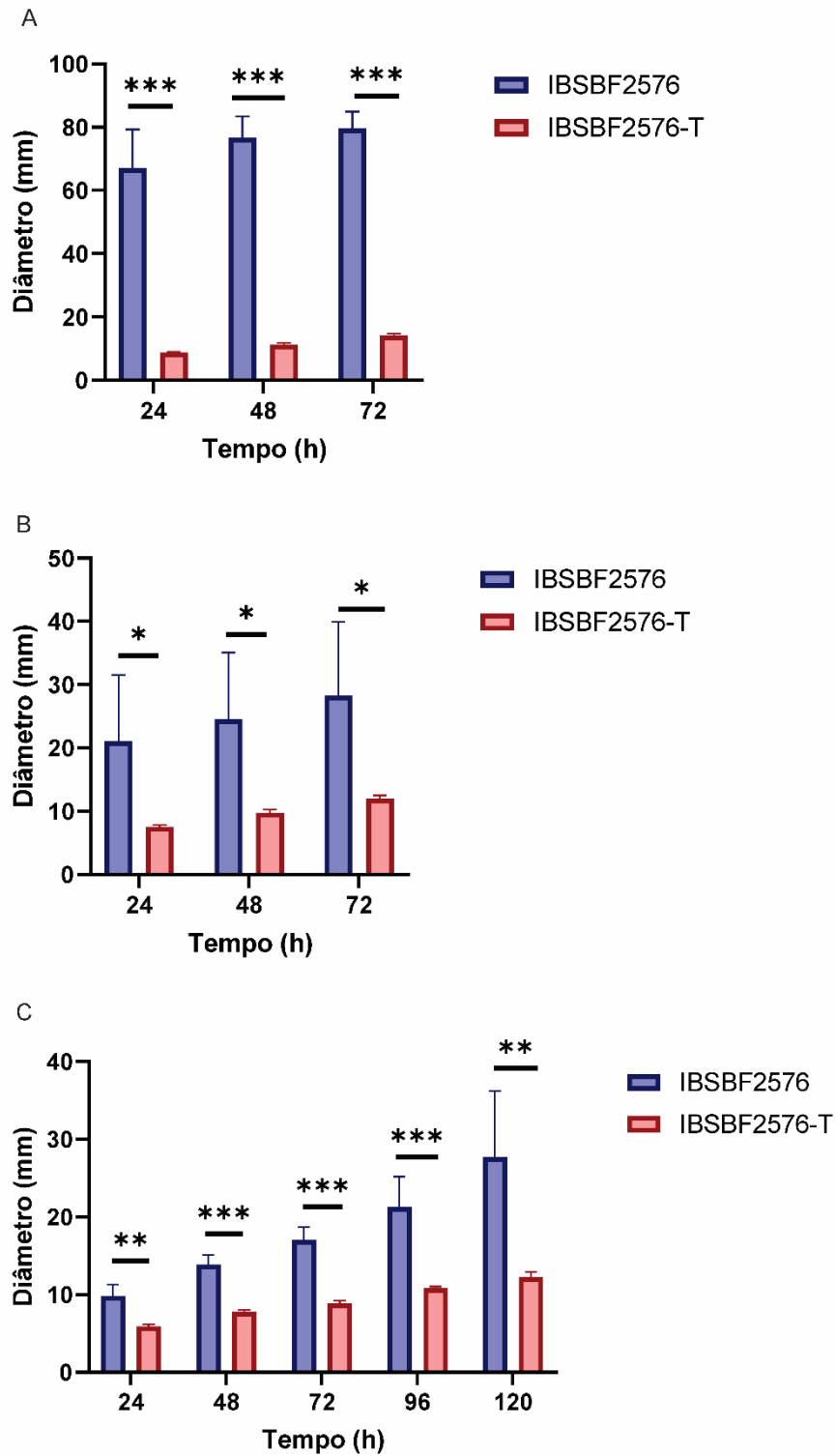


Figura 7: Motilidade do isolado IBSBF2576. A- Motilidade *swimming* de IBSBF2576 e IBSBF2576-T em 0,3% de ágar. B- Motilidade *swarming* de isolados IBSBF2576 e IBSBF2576-T em 0,7% de ágar. C- Motilidade *twitching* de IBSBF2576 e IBSBF2576-T em 1,7% de ágar. Diferença estatística foi analisada por t teste, um asterisco indica p valor <0,05, dois asteriscos indicam p valor <0,01 e três asteriscos indicam p valor <0,001.

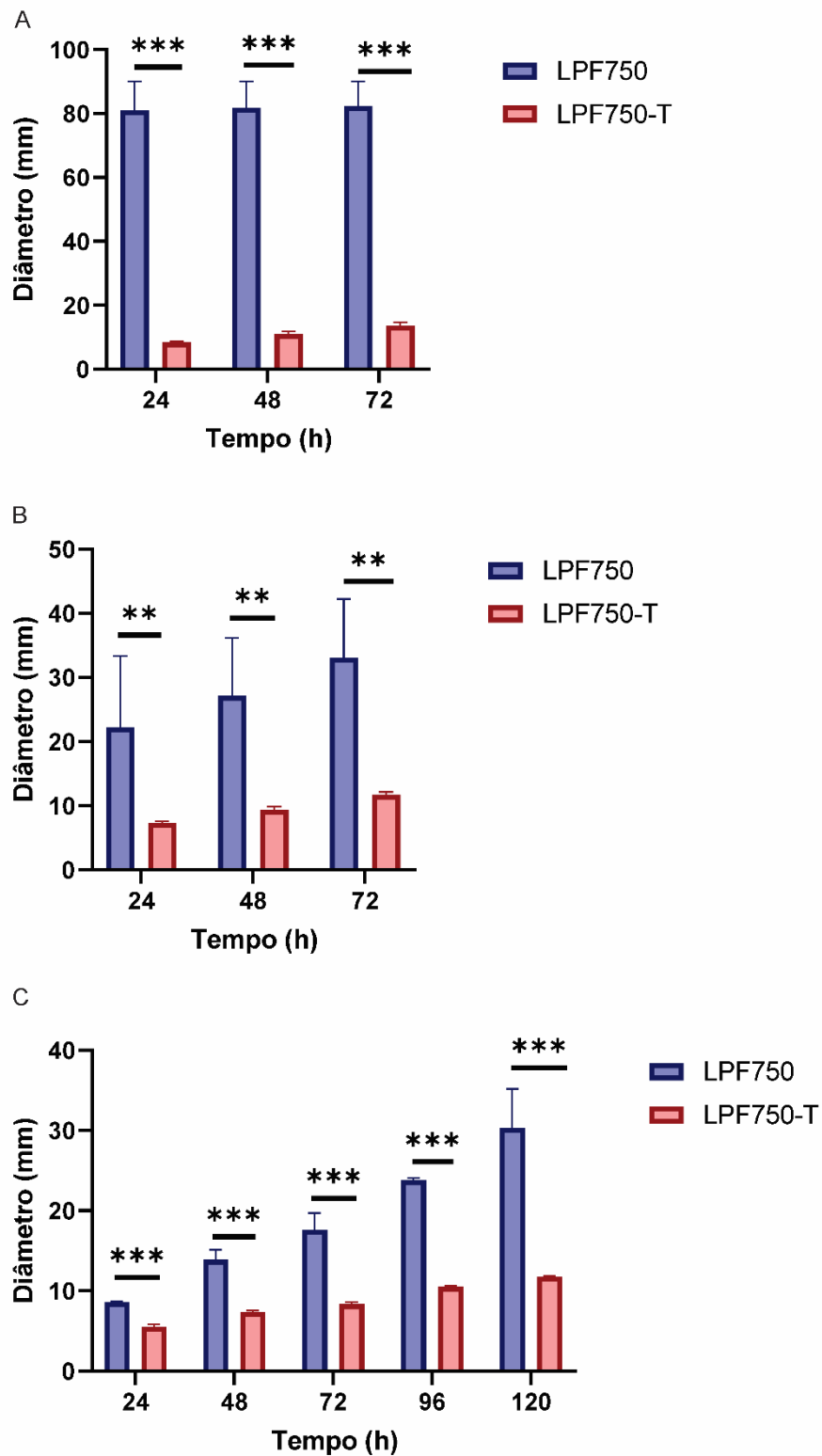


Figura 8: Motilidade do isolado LPF750. A- Motilidade *swimming* de LPF750 e LPF750-T em 0,3% de ágar. B- Motilidade *swarming* de isolados LPF750 e LPF750-T em 0,7% de ágar. C- Motilidade *twitching* de LPF750 e LPF750-T em 1,7% de ágar. Diferença estatística foi analisada por t teste, um asterisco indica p valor <0,05, dois asteriscos indicam p valor <0,01 e três asteriscos indicam p valor <0,001.

Na figura 9 é apresentado o efeito crescimento dos isolados na presença de H₂O₂. As concentrações de 32, 16 e 8 μM os isolados selvagens se apresentaram susceptíveis com aumento progressivo do tamanho do halo em função do aumento da concentração de H₂O₂. Os transconjugantes IBSBF2576-T e LPF750-T se mostraram resistentes a quaisquer concentrações de H₂O₂ utilizadas neste experimento, ao apresentar tamanho de halo correspondente ao tamanho do disco difusão adotado.

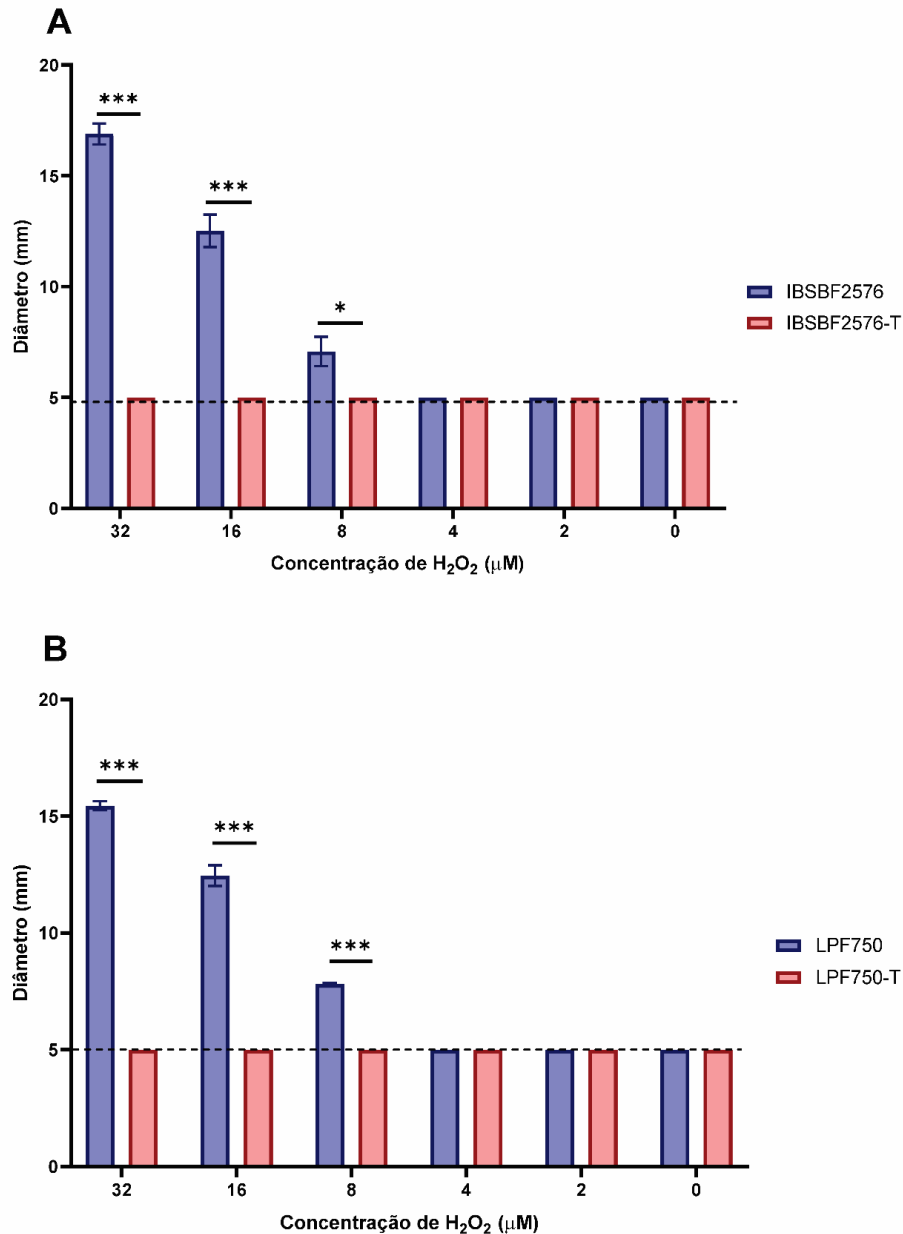


Figura 9: Crescimento os isolados IBSBF2576 e LPF750 e seus transconjugantes na presença de peróxido de hidrogênio. A- Tamanho dos halos obtidos para o isolado IBSBF2576 e IBSBF2576-T; B- Tamanho dos halos obtidos para os isolados LPF750 e LPF750-T. A linha pontilhada em ambos os gráficos indica o tamanho do disco difusão utilizado. Diferença estatística foi analisada por t teste, um asterisco indica p valor >0,05, dois asteriscos indicam p valor >0,01 e três asteriscos indicam p valor >0,001.

Os isolados selvagem e transconjugantes foram inoculados em plantas de tomate susceptíveis para determinar o efeito de sua agressividade (Figura 10). No trabalho anterior foi determinado que ambos os isolados selecionados foram não agressivos em tomate. A cada 5 dias foi realizado a contagem de colônias do macerado do caule para determinar a colonização da planta e a população. Foi observado que nos tempos de 5 e 10 dias após inoculação as populações de IBSBF2576 e IBSBF2576-T se mantiveram estatisticamente iguais. Houve diferença estatística em 15 dias após inoculação. As populações de LPF750 e LPF750-T foram significativamente diferentes nos dias 5 e 15 após inoculação.

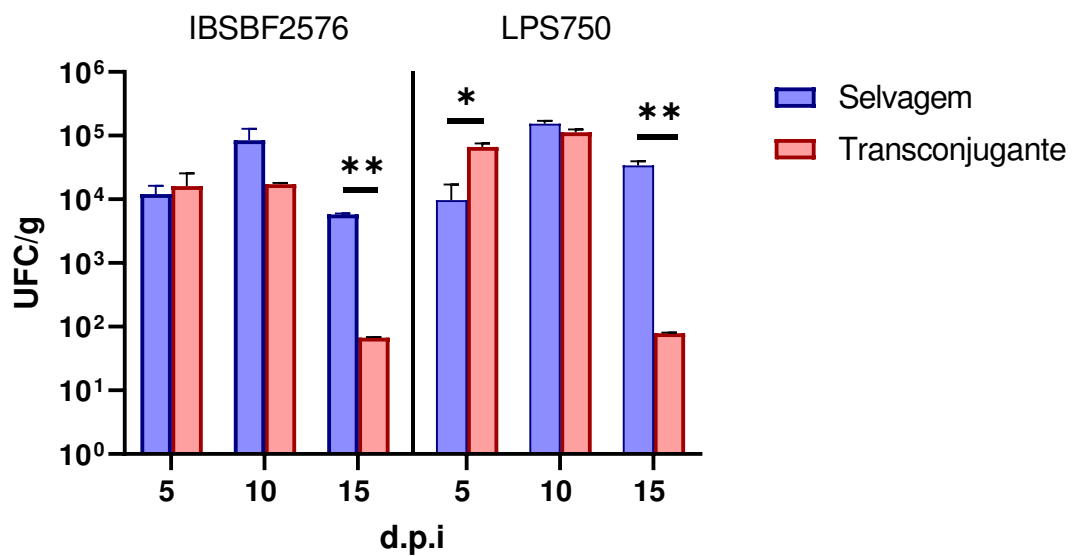


Figura 10: UFC obtida do reisolamento dos isolados na região do ponto de inoculação nas plantas de tomate. Contagem realizada em função da quantidade de tecido vegetal macerado. Diferença estatística foi analisada por t teste, um asterisco indica p valor >0,05, dois asteriscos indicam p valor >0,01 e três asteriscos indicam p valor >0,001.

O ensaio de inoculação em plantas de tomate mostra que tanto os selvagens como os transconjugantes, apesar de colonizarem o tecido, não foram agressivos em tomates (Figura 11). Imagens confirmam que, mesmo após 15 dias as plantas não apresentaram quaisquer sintomas de doença. Esses dados corroboram que a quebra de moléculas de AHLs nesses isolados não alteraram seu fenótipo não agressivo.

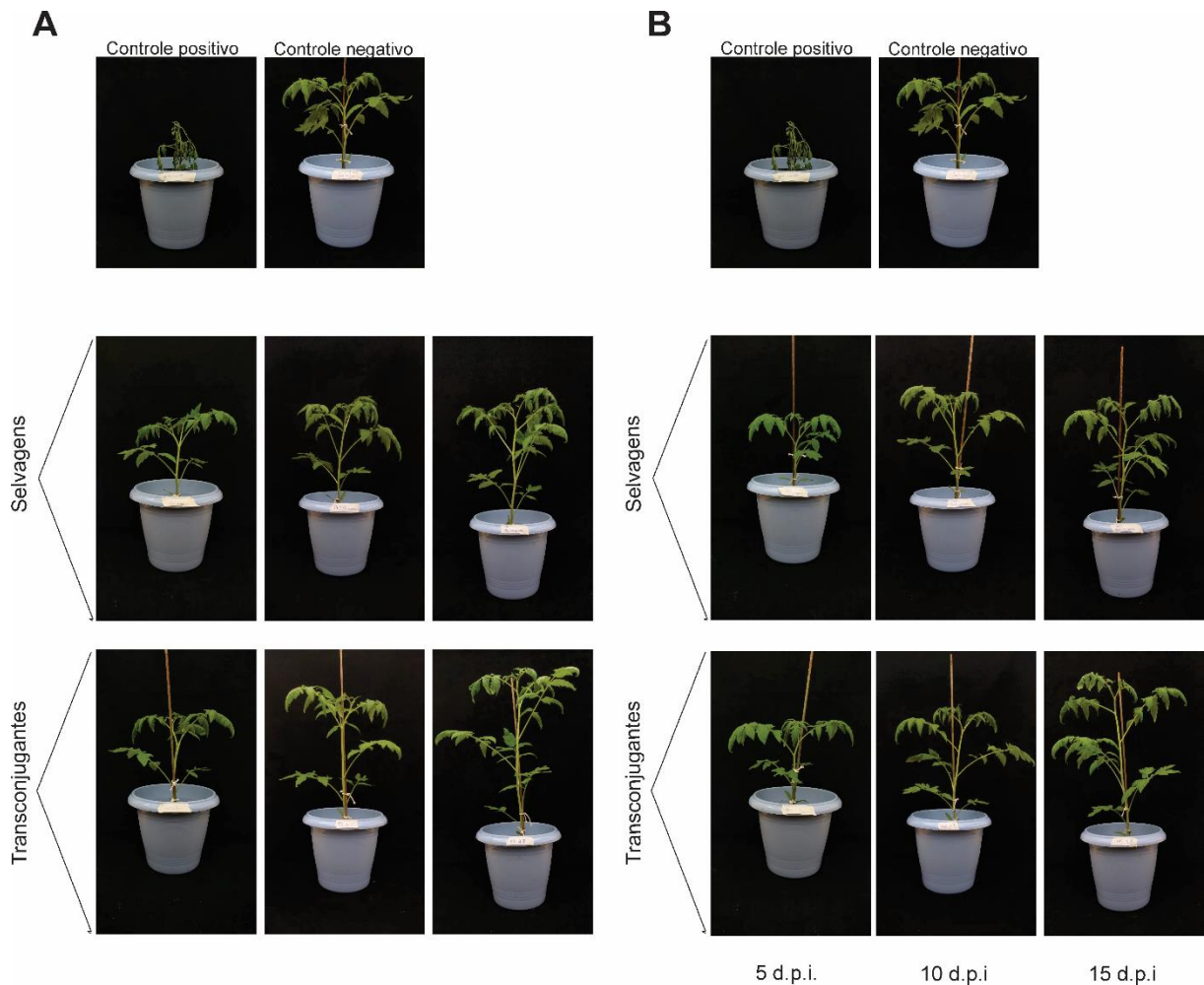


Figura 11: Ensaio de patogenicidade dos isolados em tomates susceptíveis. A- Plantas inoculadas com o isolado IBSBF2576 e IBSBF2576-T. B- Plantas inoculadas com o isolado LPF750 e LPF750-T. Foram avaliadas durante 15 dias e avaliadas a cada 5 dias após inoculação (d.p.i.). O isolado agressivo GMI1000 foi utilizado como controle positivo de susceptibilidade dos tomates. Plantas foram inoculadas com água como controle negativo. Ensaio realizado em duplicata com 5 plantas para cada isolado.

4. Discussão

O CERS é geneticamente diverso e isso tem mostrado influenciar na diversidade de mecanismos de comunicação célula-a-célula. Até o momento, pouco foi descrito sobre o mecanismo do QS AI-1 em bactérias do CERS, evidenciando a importância em se estudar esse mecanismo, regulador de diferentes fenótipos de virulência em fitopatógenos (Kalia 2018; Vesuna and Nerurkar 2018; Mohan et al. 2019; Baltenneck et al. 2021). A produção de moléculas de AHLs por bactérias do CERS já foi descrito, porém, devido a escassez de trabalhos, é possível que exista maior diversidade de AHLs produzidas por esses microorganismos, apresentando uma maior variedade dessas moléculas em relação à estrutura e composição. Por exemplo, o isolado EP1 de *R. solanacearum* produz C12-AHL (*N*-3-

hidroxidodecanoil-AHL), já os isolados K60 e AW1 são produtores de C8-AHL (N-octanoil-AHL) (Cha et al. 1998; Yan et al. 2022).

Nosso estudo analisou 27 isolados de bactérias do CERS e buscou identificar a indução de sinal de *QS* utilizando diferentes bactérias biosensoras. A biosensora CV026 tem a capacidade de detecção de moléculas de AHLs de tamanhos entre 4 e 8 carbonos, sem variações oxo. *E. coli* pSB403 reconhece moléculas entre 4 e 8 carbonos e as variações oxo das mesmas. Já *A. tumefaciens* WCF047 é sensível a moléculas entre 4 e 12 carbonos, com maior sensibilidade a moléculas de 8 a 12 carbonos (Pinto et al. 2007; de Freitas et al. 2022).

Foi observado neste estudo que o sobrenadante de alguns isolados induz a produção de violaceína e bioluminescência nos biosensores CV026 e *E. coli* pBS403, respectivamente, no entanto estes mesmos isolados não induziram a produção de β -galactosidade em *A. tumefaciens* WCF47. A identificação dos dois extratos (IBSBF2576 e LPF750) contendo AHL revelou que ambos os isolados são produtores de uma C4-AHL. Os dois isolados foram obtidos de regiões geográficas diferentes e do mesmo tipo de hospedeiro, eucalipto. Essas informações podem ajudar a correlacionar a produção de uma molécula de mesmo tamanho e a possível relevância da mesma para o sistema planta-patógeno. Vale destacar que a detecção dessa molécula de AHL corrobora a importância da diversidade genética do CERS nos mecanismos de comunicação e virulência desses patógenos.

Para conhecer os fenótipos regulados pelas moléculas de AHLs nos isolados IBSBF2576 e LPF750, utilizamos o método de degradação enzimática de AHL. O mecanismo de degradação enzimática envolve o uso de enzimas especializadas na degradação das AHL, sendo elas lactonases, acilases ou oxido-redutases (Vesuna and Nerurkar 2018). Neste trabalho, optou-se por uma lactonase, visto que a mesma atua diretamente no anel lactona e é independente do tamanho da cadeia carbônica. A ausência de moléculas de AHLs influenciou na morfologia do biofilme dos dois isolados estudados, alterando capacidade de formação e morfologia do biofilme. A regulação do biofilme de bactérias do CERS envolve uma série de genes e tem como regulador global a proteína *phcA* (Genin e Denny 2012). Muitos trabalhos têm mostrado a importância desse regulador global em alterações de diversos fenótipos em isolados de *R. solanacearum*, incluindo o biofilme (Addy et al. 2012; Kai et al. 2014; Khokhani et al. 2017; Li et al. 2022a). Os sistemas de comunicação *QS* mediado por 3-OH-PAME e 3-OH-MAME foi descrito como essencial para a ativação de *phcA* e, conseqüentemente, ocorrer a expressão de genes relacionados ao biofilme, motilidade e virulência (Genin and Denny 2012; Lowe-Power et al. 2018b). Mais recentemente, a descrição do novo sistema de comunicação *QS* regulado por *RalI/R* mostrou que a mutação desses genes leva a um aumento da formação

do biofilme do isolado EP1 e atenuação de sua virulência (Yan et al. 2022). Essas evidências em conjunto com os resultados apresentados neste estudo corroboram a importância dos sistemas de comunicação *QS* para a modulação do biofilme, seja no aumento ou na redução, e, conseqüentemente, na agressividade de *R. solanacearum*.

Assim como o biofilme, a motilidade é um importante fenótipo para as bactérias do CERS. Neste trabalho determinou-se que os isolados que não apresentam AHLs foram significativamente menos móveis que seus respectivos selvagens. Esse achado mostra que a motilidade desses isolados está sendo regulada por genes que dependem do sistema *QS* mediado por AHLs. Corral et al. (2020) mostrou que a motilidade do isolado GMI1000 é controlada por sinais quimiostáticos, regulados por genes *chpA* e *pilI*, além dos genes de codificação de flagelo e pili. Juntos, mutações direcionadas nos genes *chpA*, *pilI*, *pilA* e *fliC*, resultaram em redução da motilidade *twitching*, alteração na formação do biofilme, redução da eficiência de transformação e da capacidade de adesão à raiz.

A capacidade de *R. solanacearum* resistir à variações ambientais permite a espécie a se manter viável no solo por longos períodos sem colonizar plantas hospedeiras. O sistema *solI/R* é relatado como o regulador de resposta a estresse ambiental em *R. solanacearum* (Genin e Denny 2012; Lowe-Power et al. 2018b). Neste trabalho foi observado que a quebra de AHLs no meio resultou em maior resistência ao estresse oxidativo mediado por H₂O₂. No trabalho realizado por Colburn-Clifford, Scherf e Allen (2010) foi determinado que Dps, uma proteína de ligação ao DNA não-específica, é responsável pela tolerância de *R. solanacearum* ao estresse oxidativo. Pode-se inferir que a ausência de AHLs no meio extracelular leve a uma super-expressão no gene codificante de Dps, ou funcione como um regulador positivo, aumentando a tolerância dos isolados transconjugantes ao estresse oxidativo. Tal hipótese deve ser testada para se chegar a uma conclusão do papel das AHL na regulação dos genes de resposta a estresses ambientais.

Os isolados deste estudo não são agressivos em tomates susceptíveis e seus transconjugantes mantiveram o fenótipo. Esses dados podem sugerir que as AHLs produzidas por esses isolados não têm relação com a regulação de agressividade. A diferença observada na população isolada, principalmente em 15 dias para os transconjugantes, pode sugerir que as células bacterianas perderam o plasmídeo contendo a lactonase em função da perda de pressão positiva para o plasmídeo em ambiente *in vivo*. É importante destacar que o fenótipo de agressividade é controlado pelo regulador transcricional dependente de *quorum*. Mutantes espontâneos de *phcA* se mostram não agressivos, fenótipo observado nesse trabalho (Genin and Denny 2012; Khokhani et al. 2017; Perrier et al. 2018). A hipótese proposta sugere que os dois

isolados deste trabalho produzem uma C4-AHL que regula fenótipos de motilidade, formação de biofilme e tolerância ao estresse oxidativo. Pode-se sugerir, além disso, que as alterações fenotípicas *in vitro* não representem o que ocorre *in vivo*.

Em bactérias fitopatogênicas, o QS AI-1 regula a virulência dos principais agentes patogênicos de plantas, como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium* spp., *Agrobacterium* spp., *Dickeya* spp. e *R. solanacearum* (Kalia 2018; Baltenneck et al. 2021). Em *P. syringae*, o QS regula a motilidade e é dependente da regulação de aptidão epifítica, característica do mecanismo de patogenicidade dessa espécie. Em *Agrobacterium* spp. foi descrito a importante relação da regulação do sistema QS AI-1 com a transferência conjugativa e replicação do plasmídeo Ti. A molécula OC8-AHL ativa o sistema Tra/Trb, responsável pela replicação e segregação do plasmídeo Ti, aumentando, assim, a taxa de conjugação e replicação (Baltenneck et al. 2021). Em *R. solanacearum*, o primeiro sistema QS AI-1 descrito é o regulado pelos genes *solI/R* e está relacionado com a aptidão a variações de temperatura (Cha et al. 1998). Mais recentemente foi identificado um novo sistema, *RasI/R*, que produz AHLs de 12 carbonos e parece ter relação com a virulência do isolado EP1 (Yan et al. 2022). Em *E. amylovora* e *Dickeya* spp. como observado em *R. solanacearum*, a regulação de virulência e a produção de AHL não parece ter relação com a agressividade e se mostra ser dependente de cepa (Baltenneck et al. 2021).

O papel das moléculas sinalizadores de QS AHLs em *R. solanacearum* é complexo e necessita de uma detalhada exploração para entender a importância desse sistema de comunicação nesses micro-organismos e seu papel em sua virulência. Muitos estudos já demonstram eficiente efeito do biocontrole de fitopatógenos utilizando sistemas *quorum quenching*, como o uso de compostos produzidos por plantas (Deryabin et al. 2019; Rodríguez et al. 2020), uso de enzimas degradadoras de AHLs (Vesuna and Nerurkar 2018), mediação da competição na rizosfera com uso de bactérias produtoras de compostos *quorum quenching* (Kumar Jayanna and Umesha 2017; Caicedo and Villamizar 2022), entre outros. Este estudo trouxe importantes observações de alteração de fenótipos com a ausência de AHL, atuando na formação e estrutura do biofilme, na motilidade e na tolerância ao estresse oxidativo.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Neste estudo foi descrita uma molécula de AHL produzida por *R. solanacearum*, uma C4-AHL. Foi determinado o efeito fenotípico da ausência de moléculas de AHLs no meio para os fenótipos de biofilme, motilidade e resposta ao estresse oxidativo. Os achados desse estudo ajudam a conhecer um pouco mais sobre a diversidade de mecanismos de comunicação QS

existentes no CERS e a importância de entender sua função regulatória para os fenótipos de virulência. Com esses resultados espera-se abrir caminho para explorar o *QS* de *R. solanacearum*. Para isso análises mais profundas precisam ser feitas, na busca de conhecer os genes-alvo dessas moléculas e quais fatores possam ser de interesse biotecnológico como potencial meio de biocontrole.

6. Referências

- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T (2012) Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by Φ RSM filamentous phages. *Phytopathology* 102:469–477. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-11-0319-R>
- Baltenneck J, Reverchon S, Hommais F (2021) Quorum sensing regulation in phytopathogenic Bacteria. *Microorganisms* 9:239. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020239>
- Brumbley SM, Carney BF, Denny TP (1993) Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 175:5477. <https://doi.org/10.1128/JB.175.17.5477-5487.1993>
- Caicedo JC, Villamizar S (2022) Quorum quenching bacteria: an approach for phytopathogens control in citrus cultivars. In: *Advances in Citrus Production and Research*. IntechOpen, p 14
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:1119–1129. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.11.1119>
- Colburn-Clifford JM, Scherf JM, Allen C (2010) *Ralstonia solanacearum* Dps contributes to oxidative stress tolerance and to colonization of and virulence on tomato plants. *Appl Environ Microbiol* 76:7392–7399. <https://doi.org/10.1128/AEM.01742-10/ASSET/2C64401E-7DFD-4688-BD55-AE8F8A1208EC/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991015220004.JPEG>
- Corral J, Sebastià P, Coll NS, Barbé J, Aranda J, Valls M (2020) Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity. *mSphere* 5:1–16. <https://doi.org/10.1128/msphere.00740-19>
- de Freitas LL, Carneiro DG, Oliveira GS, Vanetti MCD (2022) *N*-acyl-homoserine lactone

- produced by *Rahnella inusitata* isolated from the gut of *Galleria mellonella* influences *Salmonella* phenotypes. *Brazilian J Microbiol* 53:819–829. <https://doi.org/10.1007/S42770-022-00681-W/FIGURES/6>
- Deryabin D, Galadzhieva A, Kosyan D, Duskaev G (2019) Plant-derived inhibitors of AHL-mediated quorum sensing in bacteria: Modes of Action. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 5588 20:5588. <https://doi.org/10.3390/IJMS20225588>
- Genin S, Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Phytopathol* 50:67–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>
- Kai K, Ohnishi H, Mori Y, Kiba A, Ohnishi K, Hikichi Y (2014) Involvement of ralfuranone production in the virulence of *Ralstonia solanacearum* OE1-1. *ChemBioChem* 15:2590–2597. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201402404>
- Kalia VC (2018) *Biotechnological applications of quorum sensing inhibitors*, 1st edn. 2018, Delhi, India
- Khokhani D, Lowe-Power TM, Tran TM, Allen C (2017) A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MBio* 8:20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00895-17>
- Khokhani D, Tran TM, Lowe-Power TM, Allen C (2018) Plant assays for quantifying *Ralstonia solanacearum* virulence. *Bio-protocol* 8:19. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.3028>
- Kumar Jayanna S, Umesha S (2017) Quorum quenching activity of rhizosphere bacteria against *Ralstonia solanacearum*. *Rhizosphere* 4:22–24. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.007>
- Li P, Cao X, Zhang L, Lv M, Zhang L-H (2022) PhcA and PhcR regulate ralsolamycin biosynthesis oppositely in *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci* 13:903310. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.903310>
- Lowe-Power TM, Hendrich CG, von Roepenack-Lahaye E, Li B, Wu D, Mitra R, Dalsing BL, Ricca P, Naidoo J, Cook D, Jancewicz A, Masson P, Thomma B, Lahaye T, Michael AJ, Allen C (2018a) Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environ Microbiol* 20:1330–1349. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14020>
- Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C (2018b) How *Ralstonia solanacearum* exploits and

- thrives in the flowing plant xylem environment. *Trends Microbiol* 26:929–942. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.06.002>
- Mohan R, Benton M, Dangelmaier E, Fu Z, Sekhar AC (2019) Quorum sensing and biofilm formation in pathogenic and mutualistic plant-bacterial interactions. *Implic Quor Sens Syst Biofilm Form Virulence* 133–160. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2429-1_9/FIGURES/1
- Perrier A, Barlet X, Peyraud R, Rengel D, Guidot A, Genin S (2018) Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microb Pathog* 116:273–278. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.028>
- Pinto UM, de Souza Viana E, Martins ML, Vanetti MCD (2007) Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control* 18:1322–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.09.005>
- Prior P (Philippe), Fegan M (2005) How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia Solanacearum Species Complex*. pp 449–461
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B, Allen C (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2413-z>
- Raza W, Ling N, Yang L, Huang Q, Shen Q (2016) Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Sci Rep* 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep24856>
- Rodríguez M, Torres M, Blanco L, Béjar V, Sampedro I, Llamas I (2020) Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Sci Reports* 2020 101 10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61084-1>
- Takemura C, Senuma W, Hayashi K, Minami A, Terazawa Y, Kaneoka C, Sakata M, Chen M, Zhang Y, Nobori T, Sato M, Kiba A, Ohnishi K, Tsuda K, Kai K, Hikichi Y (2021) PhcQ mainly contributes to the regulation of quorum sensing-dependent genes, in which PhcR is partially involved, in *Ralstonia pseudosolanacearum* strain OE1-1. *Mol Plant Pathol*

22:1538–1552. <https://doi.org/10.1111/MPP.13124>

- Vesuna A, Nerurkar AS (2018) Enzymatic quorum quenching for virulence attenuation of phytopathogenic bacteria. *Biotechnol Appl Quor Sens Inhib* 447–473. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_21/TABLES/2
- Yan J, Li P, Wang X, Zhu M, Shi H, Yu G, Chen X, Wang H, Zhou X, Liao L, Zhang L (2022) RasI/R quorum sensing system controls the virulence of *Ralstonia solanacearum* strain EP1. *Appl Environ Microbiol* 88:22. <https://doi.org/10.1128/aem.00325-22>
- Yoshihara A, Shimatani M, Sakata M, Takemura C, Senuma W, Hikichi Y, Kai K (2020) Quorum sensing inhibition attenuates the virulence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem Biol* 15:3050–3059. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00752>

CONCLUSÕES FINAIS GERAIS

As bactérias do CERS possuem uma heterogenicidade genética que a classifica como uma espécie de difícil manejo e com uma gama de hospedeiro muito diversa. Conhecer os fenótipos de um grupo de isolados ajudam a visualizar a influência dessa diversidade genética e entender as características de cada indivíduo. Neste trabalho buscou-se caracterizar fenótipos relacionados à agressividade de um grupo de isolados bacterianos do CERS e entender que relações esses fenótipos possuem com a agressividade em plantas de tomate. Uma variedade de fenótipos foi observada entre os isolados, além de grande variedade de morfologias de biofilmes *in vitro* e diferentes capacidades de formação de biofilme. Essa dinâmica de formação do biofilme pode ajudar a entender a agressividade das bactérias no CERS e a gama de hospedeiro, buscando entender os fatores que estão associados à formação do biofilme que levam ao desenvolvimento da doença.

O sistema de comunicação *Quorum sensing* é um importante regulador de diferentes sistemas gênicos de *Ralstonia solanacearum*. A identificação da molécula de C4-AHL neste estudo relata a existência de um novo sistema de QS AI-1 nessa espécie. A avaliação dos efeitos fenotípicos decorrentes da quebra de anéis lactonas de AHLs realizadas neste trabalho mostrou que o sistema de QS AI-1 está diretamente relacionado à regulação de importantes fenótipos de agressividade, como a formação do biofilme, motilidade e resistência ao estresse oxidativo. Esses achados apresentam a importância de se explorar mais sobre outras moléculas AI-1 que possam estar influenciando diretamente na agressividade das bactérias do CERS, podendo resultar em estratégias de controle de sua agressividade.

Esse trabalho trouxe novas informações sobre as características fenotípicas de bactérias do CERS, contribuindo para o maior conhecimento sobre esses isolados. Aqui foi realizada a identificação de um novo tipo de sistema de comunicação QS mediado por AHLs. Essas informações são relevantes para auxiliar nos estudos sobre esse patógeno e abrem portas para explorar novos sistemas gênicos e seu impacto na agressividade do CERS.