

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

RÚBIA PADILHA PURCINO

**METABOLISMO DE COMPOSTOS NITROGENADOS E CARBOIDRATOS, E
ALTERAÇÕES NAS PAREDES CELULARES DE PLANTAS DE CITROS
INFECTADAS POR *Xylella fastidiosa*.**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do título de Doutor em
Biologia Vegetal**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Purcino, Rúbia Padilha

P971m Metabolismo de compostos nitrogenados e carboidratos, e alterações nas paredes celulares de plantas de citros infectadas por *Xylella fastidiosa* / Rúbia Padilha Purcino. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Paulo Mazzafera.

**Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.**

1. *Xylella fastidiosa*.
2. Nitrogênio.
3. Carboidratos.
4. Parede celular vegetal.
5. Citros.

Título em inglês: Metabolism of nitrogen compounds and carbohydrates, and modification of cell wall of citrus infected by *Xylella fastidiosa*.

Palavras-chave em inglês: *Xylella fastidiosa*; Nitrogen; Carbohydrates; Plant cell walls; Citrus.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Paulo Mazzafera, Marlene Aparecida Schiavinato, Eduardo Caruso Machado, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Marcos Buckeridge.

Data da defesa: 31/02/2006.

Data da defesa: 31/02/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador) _____

Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato _____

Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado _____

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira _____

Prof. Dr. Marcos Buckeridge _____

Prof. Dr. Ladaslav Sodek _____

Prof. Dr. José Camilo Novello _____

Pro. Dra. Sandra Maria Carmello guerreiro _____

À Minha avó Sebastiana

À minha mãe Maria Aparecida

Ao Rodrigo

Pelo amor, paciência e apoio incondicional!

dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre conduzir meus passos.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação.

Ao Dr. Camilo Lázaro Medina, pela colaboração durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado do centro APTA “Silvio Moreira” pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Helvécio Coleta Filho do centro APTA “Silvio Moreira” pela colaboração na execução das reações para confirmação da infecção das plantas de citros com Xf.

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado da seção de Fisiologia vegetal do Instituto Agrônomo de Campinas, pelas sugestões importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Camilo Novello e seus orientados Flavia e Daniel, pela colaboração na identificação das proteínas da seiva do xilema de plantas de citros.

A Profª. Dra. Sandra Carmello Guerreiro, pela colaboração na confecção das lâminas utilizadas na microscopia confocal.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho e sua orientada Eliane, pela colaboração nas análises de microscopia confocal.

Ao Prof. Dr. Marcos Buckeridge e seu orientado Clóvis Oliveira Silva pela colaboração na extração e análises dos polissacarídeos da parede celular de plantas de citros.

Ao Dr. Paul Knox que gentilmente cedeu os anticorpos de parede celular, utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Miltom Massao pelo auxílio nas coletas e análises bioquímicas.

Ao amigo Geraldo Melo pelo auxílio gentilmente oferecido durante a execução deste trabalho.

Ao Técnico Neurival Paiola, pelo auxílio durante a coleta das amostras de seiva do xilema.

Às amigas, Clara, Flávia, Andréa, Aline e Leandra pela amizade, incentivo e bons momentos compartilhados. .

À minha família pelo carinho, amor incondicional e incentivo ao longo de toda minha história.

À Inês e Antônio Carlos Grimaldi pelo incentivo e enorme carinho.

Ao Rodrigo pelo amor, carinho e incentivo sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

À universidade de Campinas (Unicamp) pela oportunidade da realização deste trabalho.

ÍNDICE

Banca Examinadora.....	3
Agradecimentos.....	5
Resumo.....	10
Summary.....	12
Introdução Geral.....	14
2. Objetivos.....	22
3. Capítulo 1. - Metabolismo do nitrogênio em plantas de citros infectadas com Xylella fastidiosa: Caracterização dos principais compostos nitrogenados na seiva do xilema e atividade das enzimas Redutase do Nitrato e Glutamina Sintetase.....	23
3.1. Resumo.....	24
3.2. Introdução.....	25
3.3. Objetivos.....	27
3.4. Materiais e Métodos.....	28
3.4.1. Material Vegetal.....	28
3.4.2. Obtenção da seiva do xilema.....	28
3.4.3. Confirmação da infecção por Xylella fastidiosa (Xf).....	29
3.4.4. Atividade da Glutamina Sintetase (GS).....	30
3.4.5. Atividade in vivo da Redutase do Nitrato (RN).....	30
3.4.6 Quantificação de NO ₃ , NH ₄ ⁺ , aminoácidos, proteínas solúveis totais e poliaminas.....	30
3.4.7. Determinação da atividade de proteases.....	31
3.4.8. Sequenciamento das proteínas presentes na seiva do xilema.....	31

3.5. Resultados e Discussão.....	35
3.5.1. Confirmação da infecção com Xf.....	35
3.5.2. Concentração de compostos nitrogenados na seiva do xilema.....	35
3.5.3. Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase.....	38
3.5.4. Concentração de aminoácidos e proteínas solúveis e atividade de proteases.....	41
3.5.5. Quantificação de poliaminas.....	49
3.6. Conclusões.....	54
4. Capítulo 2 - Nutrição de Xylella fastidiosa e o metabolismo de açúcares, ácidos orgânicos e alterações na PAREDE das Células do xilema DE plantas de citros com CVC.....	55
4.1. Resumo.....	56
4.2. Introdução.....	58
4.3. Objetivos.....	61
4.4. Material e Métodos.....	62
4.4.1 Material vegetal.....	62
4.4.2. Experimento para fornecimento de ¹⁴ C-manose.....	62
4.4.3. Análise de açúcares solúveis na fração etanólica por HPLC e radioatividade específica componentes da parede celular em material alimentado com ¹⁴ C-manose.....	63
4.4.4. Dosagem de açúcares solúveis na seiva de PS e PD.....	64
4.4.5. Dosagens das atividades de Invertase Ácida e Sacarose Sintase.....	64
4.4.6. Análise de macro e micronutrientes nas folhas e pecíolos.....	65
4.4.7. Determinação de ácidos orgânicos na seiva do xilema por HPLC.....	65
4.4.8. Crescimento de Xf em meios sólidos com diferentes fontes de carbono.....	66
4.4.9 Imunolocalização de pectinas utilizando microscopia confocal.....	66

4.5. Resultados e Discussão.....	67
4.6.Conclusões.....	97
5. Referências Bibliográficas.....	98

RESUMO

Xylella fastidiosa (Xf) é uma bactéria fitopatogênica que se desenvolve exclusivamente no xilema de uma grande variedade de plantas cultivadas. Na cultura do citros essa bactéria é conhecida como o agente causal da clorose variegada do citros (CVC), doença responsável por prejuízos econômicos consideráveis, desde a década de 80. Embora muitos trabalhos tenham sido realizados com essa bactéria, pouco se conhece sobre o mecanismo de infecção, a composição do meio em que ela se desenvolve, o xilema e o desenvolvimento dos sintomas. Grande parte dos estudos sobre a nutrição da bactéria são realizados *in vitro*, o que pode não caracterizar a interação entre a bactéria e xilema. Este trabalho é resultado de um subprojeto do genoma funcional, cujo principal objetivo é a caracterização da constituição da seiva do xilema, na tentativa de melhor compreender a nutrição da bactéria e o desenvolvimento da doença. Ao longo da realização dos experimentos e análises dos resultados foram surgindo questões que levaram a necessidade do melhor entendimento do metabolismo do nitrogênio em plantas com CVC. Por isso os resultados gerados foram agrupados em dois capítulos, onde no primeiro são encontrados resultados da caracterização qualitativa e quantitativa das principais substâncias nitrogenadas presentes na seiva do xilema de plantas de citros com CVC, bem como atividade das principais enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio. A atividade da Redutase do nitrato (RN) nas folhas não sofreu alteração em plantas doentes (PD), porém a atividade da Glutamina Sintetase (GS) foi significativamente maior nos extratos das folhas dessas plantas. Embora a concentração de aminoácidos tenha sido suavemente maior na seiva do xilema de PD, caiu drasticamente no extrato de folhas dessas plantas. O teor de proteínas solúveis também foi menor na seiva do xilema e no extrato de folhas de PD. PD e Planta Sadia (PS) apresentaram o mesmo perfil de aminoácidos em HPLC, contudo em proporções bem

diferentes, principalmente dos aminoácidos ASN, GLN e ARG. A poliamina putrescina foi identificada em grande concentração somente em PD. Estes resultados demonstram que PD apresentam alterações no metabolismo de compostos nitrogenados provavelmente em resposta a mudanças na interação dos processos de absorção, assimilação e redistribuição do nitrogênio.

No segundo capítulo são agrupados os dados das análises do metabolismo de açúcares, ácidos orgânicos e investigação das alterações no metabolismo da parede celular. A seiva de PD apresenta menor concentração de glicose, acompanhada de frutose e glicose. Grande quantidade de ácido cítrico também foi determinada nessas plantas. Baseados nesses resultados cultivamos a bactéria em meios com diferentes fontes de carbono e verificamos que o meios que permitiram maior crescimento foram aqueles que a fonte de carbono utilizada foi glicose (1 g/L), sacarose combinada com citrato nas concentrações de 3g/L de cada fonte de carbono, e citrato na concentração de 3 g/L, o que demonstra que a composição química da seiva do xilema é importante tanto para o processo de agregação como para a formação do biofilme. A infecção com *Xf* também promoveu modificações nas paredes celulares dos pecíolos. Verificamos por imunocitoquímica em microscópio confocal utilizando os anticorpos JIM 5 e JIM 7, diferenças entre PD e PS nos padrões de esterificação da fração pectina, assim como encontramos no fracionamento da parede celular alterações na composição dos principais carboidratos que constituem a fração hemicelulose.

SUMMARY

Xylella fastidiosa (*Xf*) is a fastidious bacterium which grows exclusively in the xylem of several plants. In citrus the disease caused by *Xf* is known as “clorose variegada do citros” (CVC), being responsible for marked loss of productivity since the 80s. Although a meaningful number of reports have been published in the literature about *Xf*, little is known about the mechanisms controlling infection, the biochemical composition of the xylem fluid where the bacteria develops and how the disease symptoms develop. Most of the studies on the nutritional requirements by the bacteria were carried out with artificial media *in vitro*, what may not be the exact situation in the xylem. The aim of this thesis was to characterize the xylem sap composition of citrus plants in order to better understand nutritional aspects of the bacteria and this can influence the disease development. During the experiments new questions arose and focus was given to the nitrogen metabolism of citrus plants infected with CVC. Therefore, the thesis has two chapters. The first chapter contains results on the qualitative and quantitative characterization of the xylem sap of health and diseased plants as well as the activity of enzymes of the nitrogen metabolism in plants. The activity of Nitrate reductase (NR) in leaves did not change in diseased plant (PD), however, the activity of Glutamine synthetase (GS) was significantly higher in these leaves. Although amino acids concentration was slightly higher in the sap of diseased plants the level dropped drastically in the leaves. The protein contents were lower in the sap and in leaves of diseased plants. Diseased and health plants showed the same amino acid profile in HPLC, but different proportions were observed among amino acids, mainly for the amino acids ASN, GLN and ARG. The polyamine putrescine was found in high concentrations only in diseased plants. These results showed that significant changes take place in the

nitrogen metabolism of diseased plants, probably as a response to the alterations in the absorption, assimilation and distribution of nitrogen in the plant.

In the second chapter the data on carbohydrates, organic acids and cell wall are presented. The xylem sap of diseased plants showed lower concentration of glucose than health plants. High amounts of citric acid were also found in diseased plants. This information was used to design artificial media to grow the bacteria and study its nutritional need. Best growth was observed with media containing glucose (1 g/L), sucrose plus citrate both at 3g/L, and citrate alone at 3 g/L, indicating that the composition of the sap might play a role both in the bacterial aggregation as well as in the biofilm formation. Infection with *Xf* also promoted changes in the cell wall of leaf peduncle of infected plants. Immunocytochemical analysis with confocal microscopy, using the antibodies JIM 5 and JIM 7, showed marked differences between diseased and health plants regarding the pectin esterification. Additionally the hemicellulose fraction was also affected.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Xylella* é composto por uma única espécie, *Xylella fastidiosa* (Xf), bactéria limitada ao xilema e que por apresentar bastante variabilidade dentro da espécie necessita uma classificação em subespécie ou patovar.

Xf é uma bactéria com célula do tipo bastonete, medindo de 0,25 a 0,35 μm , Gram-negativa, imóvel, aflagelada, oxidase negativa, catalase positiva, aeróbica estrita, não fermentativa, nutricionalmente fastidiosa, com temperatura e pH ótimos para crescimento em torno de 27°C e pH 6,8, respectivamente (Wells *et al.*, 1987). Sua parede celular é multilaminar, enrugada, com acentuadas reentrâncias (Davis *et al.*, 1981; Wells *et al.*, 1987; Chang & Walker, 1988; Mizubuti *et al.*, 1994; Leite Júnior, 1996), podendo este fato estar relacionado com o reconhecimento patógeno-hospedeiro (Fry & Milholland, 1990).

Xf é encontrada no xilema de um grande número de plantas cultivadas, árvores e plantas ornamentais, sendo em alguma dessas considerada agente causal de doenças, por estarem associadas aos sintomas ou danos causados. A primeira associação de uma doença com essa bactéria ocorreu em 1892 em videiras, e foi denominada de mal de Pierce, inicialmente confundida com doença virótica, devido às suas características em relação à colonização sistêmica e transmissão por enxertia, entre outras. Outras doenças em plantas com importância econômica, como nanismo da alfafa, escaldadura das folhas da ameixeira, escaldadura do pessegueiro (“phony peach”) (Lee *et al.*, 1991; Wells *et al.*, 1987), também são causadas por Xf. Esta bactéria também tem sido relacionada com a ocorrência de anomalias no cafeeiro (Paradela *et al.*, 1995).

No Brasil, das espécies econômicas afetadas por Xf o principal prejuízo é encontrado na cultura do citros, sendo a bactéria identificada como agente causal da doença

denominado de Clorose Variegada dos Citros (CVC), ou amarelinho, após a satisfação do postulado de Koch (Lee *et al.*, 1993).

A CVC foi observada inicialmente em meados da década de 80 em pomares do triângulo mineiro, regiões norte e nordeste do estado de São Paulo, e evoluiu com rapidez para toda região citrícola brasileira (Rosseti & De Negri, 1990). Ocorre em todas as variedades de laranja doce sobre diferente porta-enxertos (Carvalho *et al.*, 1995) e cerca de 30% dos 60 milhões de plantas no estado de São Paulo apresentam a bactéria, com prejuízo estimado em mais de um milhão de dólares (Monteiro *et al.*, 2001)

A disseminação da CVC é feita a curtas distâncias por cigarrinhas da família Cicadellidae e Cercopidae, que utilizam a seiva do xilema das plantas como alimento (Purcell & Hopkins, 1996). Outra forma de transmissão é a enxertia feita com material contaminado, sendo a comercialização de mudas contaminadas a principal responsável pela dispersão da CVC a longas distâncias (Carvalho, 1996).

Xf freqüentemente forma agregados no interior dos vasos do xilema, os quais são constituídos por uma matriz extracelular produzida pela bactéria. A matriz é semelhante ao glicocálice presente em outras bactérias, sendo constituída em grande parte por polissacarídeos extracelulares (EPS), os quais também têm sido denominados de goma fastidiana (Leite *et al.*, 2001). A presença da matriz permite a adesão das células umas às outras, e destas ao hospedeiro. As fibras desse composto apresentam cargas negativas que atuam como uma resina trocadora de íons, concentrando nutrientes. Este fato pode contribuir para a otimização da atividade de algumas enzimas que podem ajudar a bactéria na sua ação contra o hospedeiro, o que parece ser muito importante para a sobrevivência e patogenicidade da bactéria, pois as concentrações de diversos produtos, orgânicos e inorgânicos, essenciais à sobrevivência e ao processo de infecção são muito baixas na seiva

do xilema. Também é atribuído ao glicocálice importante papel na proteção da bactéria contra os mecanismo de defesa do hospedeiro (Hopkins,1989; Purcell & Hopkins, 1996), pois este pode imobilizar substâncias de defesa produzidas pela planta (O'Toole *et al.*, 2000).

Outro aspecto importante na patogenecidade de Xf é a sua capacidade de colonização dos diferentes tecidos distantes do ponto de infecção (Hopkins,1989; Purcell & Hopkins, 1996), o que parece ser possível pela atividade de enzimas do metabolismo de parede celular, tais como pectinases, celulasas e proteases (Dow & Daniels, 2000; Lambais *et al.*, 2000).

O mecanismo de patogenecidade de Xf ainda não é totalmente conhecido e diferentes estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares têm sido realizados neste sentido. Existem hoje três diferentes hipóteses para o mecanismo de patogenecidade de Xf, que são: síntese de fitotoxinas, desequilíbrio hormonal ou a disfunção do xilema (Hayward & Mariano, 1997).

Para Hopkins (1989), o mecanismo primário de patogenecidade é a indução de deficiência hídrica, devido à obstrução parcial ou total dos vasos do xilema promovido pela deposição de goma fastidiana (Beckman & Halmos, 1962; Beckman *et al.*, 1974; Gardner *et al.*, 1983; Hopkins 1985) e formação de cristais de cálcio. Para Hopkins (1989) este mecanismo explica de forma satisfatória a maioria dos sintomas apresentados por plantas com CVC.

Em videiras infectadas por Xf a resistência ao fluxo de água em vasos é cerca de 60 a 200 vezes maior que a apresentada por plantas saudas. Em condições de campo, laranjeiras com CVC apresentaram fluxo de seiva 70% menor em relação às laranjeiras saudas (Oliveira, 2000).

A obstrução dos vasos é resultante da formação do biofilme, que de acordo com o modelo de adesão proposto por Leite *et al.*, (2002), é formado após a adesão inicial das bactérias, mediada por radicais tióis presentes na bactéria e cargas hidrofóbicas da superfície do tecido. Na sequência de eventos, é iniciada a produção da goma fastidiana, que resulta na formação do biofilme no interior dos vasos do xilema. O biofilme pode se tornar mais rígido com a ligação de íons cálcio, o que leva à obstrução dos vasos e conseqüente redução no fluxo de água.

Entretanto, alguns autores não acreditam que a simples obstrução dos vasos do xilema é suficiente para explicar os sintomas característicos da infecção por Xf, defendendo a existência de outros mecanismos como a produção de fitotoxinas (Lee *et al.*, 1982) e o desbalanço hormonal (French & Stassi, 1978).

As fitotoxinas são substâncias produzidas pelo metabolismo do patógeno, que em concentrações muito baixas causam injúrias às plantas. A grande maioria são moléculas pequenas, de diferentes formas e estruturas, com grande facilidade de difundir-se no sítio de infecção e de mobilização para outras partes da planta, via apoplasto. Algumas das possíveis ações das toxinas em plantas é o comprometimento da integridade das membranas plasmáticas e alterações nas suas funções, desencadeando a perda irreversível de turgor.

O papel das fitotoxinas em plantas com CVC ainda é controverso, necessitando de maiores investigações para se conhecer sua real ação, de forma a esclarecer se a toxicidade é resultado de alterações no potencial da água ao redor das células e/ou dado por alterações nas funções das membranas celulares.

Em se tratando da hipótese de um desbalanço hormonal, no processo de infecção por Xf os principais hormônios relatados são o ácido abscísico (ABA) (Goodwin, 1988) e giberelinas (French e Stassi). O ABA está relacionado a processos de abertura e fechamento

dos estômatos, ao atuar como mensageiro químico em condições de baixo potencial hídrico. Sendo assim, a menor condutividade estomática, um dos sintomas apresentados por laranjeiras com CVC, pode ser promovido pelo aumento na concentração desse hormônio nas folhas. No entanto, Gomes (2001) verificou que laranjeiras com CVC apresentavam a mesma concentração de ABA que laranjeiras sadias, mesmo tendo as plantas doentes apresentado redução no potencial da água e acentuada redução na abertura dos estômatos.

Aplicações de giberelina, hormônio que participa em processos de crescimento, estimularam a retomada do crescimento em gemas apicais de pessegueiros com “Phony peach disease” (PPD) (French & Stassi, 1978). Esses dados, em adição ao efeito na redução do crescimento, florescimento abundante e aumento na concentração de clorofila, sintomas da PPD, pela aplicação de um inibidor da biossíntese de giberelina, contribuem com a teoria do desbalanço hormonal.

Um dos principais problemas em relação aos estudos sobre a nutrição da Xf é que são realizados *in vitro* e, por isso, não demonstram a real interação existente entre a bactéria e o meio o qual esta coloniza e se multiplica, o xilema. A seiva do xilema é constituída de diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas. A grande maioria encontra-se na forma livre, não complexada em polímeros, portanto, prontamente disponíveis para o metabolismo celular da bactéria. Desta forma, acredita-se que o xilema provém um excelente ambiente nutricional para o crescimento da bactéria. Porém, a concentração dos nutrientes encontrados na seiva do xilema é bastante baixa, o que sugere a especialização por parte da bactéria para melhor aproveitamento dessas substâncias, induzindo o aparecimento de sintomas de desbalanço nutricional em plantas doentes, como por exemplo, os sintomas de deficiência de zinco.

Existem poucos trabalhos sobre a composição da seiva do xilema em citros. Dos existentes, a maioria são resultados da investigação de aminoácidos, mostrando que os principais aminoácidos presentes na seiva do xilema de citros são arginina, asparagina e glutamina. Os dois primeiros são encontrados principalmente em órgãos em desenvolvimento, sendo apontados, juntos com o íon nitrato, como as principais formas de compostos nitrogenados transportados no xilema de citrus, o que pode explicar a grande exigência de altas concentrações de glutamina nos meios de cultura para o cultivo de Xf (Davis *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1993). A concentração de aminoácidos livres na seiva do xilema se mostra bastante variável ao longo das diferentes épocas do ano (Culianez *et al.*, 1981; Ramamurthy & Ludders, 1982 ; Tadeo *et al.*, 1984). Outro fator que altera essa composição é a ocorrência de estresses bióticos e abióticos.

Gould *et al.* (1991) investigaram a composição de aminoácidos em *Prunus persica* infectadas com Xf, não encontrando correlação entre a presença da bactéria e as alterações na composição destas substâncias. Laranjeiras em estádios iniciais da infecção por CVC e submetidas a déficit hídrico tiveram a composição de aminoácidos alteradas em resposta à redução do conteúdo de água, não devido à presença da bactéria (Medina, 2002). O aminoácido arginina apresentou maior concentração nessas condições e, de acordo com Lovatt (1996), a explicação para esse aumento é a redução de glicose nas folhas de citros, e conseqüente acúmulo de amônia, o que leva ao aumento na síntese arginina como um mecanismo de detoxificação. Entretanto, apesar de Medina (2002) verificar a presença de pequenas quantidades de amônia em folhas de laranjeira, não encontrou diferenças na concentração desse íon em plantas doentes e sadias.

No ano de 2002, a estirpe 9a5c de Xf teve o seu genoma completamente sequenciado. O genoma de Xf é composto por um cromossomo circular com 2.679.305pb,

e dois plasmídeos de 51.158 e 1.285pb, respectivamente denominados pXF51 e pXF1.3 (Simpson *et al.*, 2000). Apesar de muito similar ao genoma de *Xanthomonas* spp., o genoma da Xf não apresentou genes do sistema de secreção do tipo III, o qual é responsável pela injeção de determinantes de patogenicidade e/ou virulência, diretamente nas células dos hospedeiros (He, 1998; Dow & Daniels, 2000; Romantschuk et al., 2001). No entanto, apresentou todas as vias metabólicas conhecidas para a secreção de fatores de virulência extracelulares presente em bactérias Gram-negativas.

Também foi identificado um agrupamento de genes que são responsáveis pela secreção de várias enzimas extracelulares incluindo endoglicanases, pectinases e proteases, importantes fatores de patogenicidade, altamente similar ao sistema de secreção do tipo II (Dow *et al.*, 1987, 1989) em *Xanthomonas*, denominado de xps (“*Xanthomonas* protein secretion”) (Dums *et al.*, 1991).

Em Xf foram identificados vários sideróforos e genes envolvidos no transporte através da membrana, sugerindo que o ferro pode ser de grande importância para a sobrevivência da bactéria no xilema.

A homeostase de ferro é um processo importante na regulação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade de bactérias (Vasil & Ochsner, 1999). Em bactérias gram-negativas a regulação é feita diretamente pela concentração intracelular de ferro na forma Fe (II), via proteína fur (“ferric uptake regulation”). Quando ferro está disponível dentro da bactéria, este forma um complexo com a proteína, o qual se liga a várias seqüências operadoras específicas (“Fur boxes”), bloqueando a síntese de genes funcionais (Ratlegde & Dover, 2000). Dessa forma além da redução na condutividade de água outros fatores podem contribuir para as alterações fisiológicas apresentadas em plantas com CVC.

Depois da publicação do sequenciamento do genoma da Xf (Simpson et al., 2000), muito esforço tem sido realizado na tentativa de melhor se compreender o mecanismo de patogenicidade da bactéria. Nesse contexto é importante o esclarecimento de algumas questões como, por exemplo, a melhor caracterização da constituição da seiva do xilema, para se conhecer melhor o ambiente em que essa bactéria se desenvolve e também tentar entender como se dá a nutrição desse microorganismo. Respostas para essas questões podem vir a colaborar para o desenvolvimento de tecnologia para o controle da CVC, minimizando os prejuízos na citricultura causados por essa doença.

2. OBJETIVOS

Esta tese está dividida em dois capítulos, os quais tiveram como principais objetivos:

- a) Caracterizar quantitativamente e qualitativamente, a composição de substâncias orgânicas e inorgânicas relacionadas com o metabolismo de nitrogênio e presentes na seiva do xilema de laranjeiras com CVC;
- b) Identificar proteínas da seiva do xilema que apresentam expressão diferenciada quando comparadas plantas sadias e plantas com CVC;
- c) Análise do metabolismo de açúcares, ácidos orgânicos e investigação das alterações no metabolismo da parede celular e sua relação com a nutrição da Xf;
- d) Investigar a dinâmica do íon ferro em plantas com CVC;

**3. CAPÍTULO 1- METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS DE CITROS
INFECTADAS COM *Xylella fastidiosa*: CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS
COMPOSTOS NITROGENADOS NA SEIVA DO XILEMA E ATIVIDADE DAS
ENZIMAS REDUTASE DO NITRATO E GLUTAMINA SINTETASE**

3.1. RESUMO

A Clorose Variegada do Citros (CVC) é uma das mais graves doenças da citricultura mundial, cujo agente causal é a bactéria *Xylella fastidiosa* (Xf) que pertence ao grupo denominado de “Xylem –limited bactéria” (XLB), por colonizar e se desenvolver nas células do xilema. Com o objetivo de se conhecer possíveis alterações no metabolismo do nitrogênio em plantas de citros com CVC, foram comparadas as concentrações de compostos nitrogenados, tais como NO_3^- , NH_4^+ , aminoácidos, proteínas solúveis, e poliaminas entre plantas saudáveis (PS) e plantas doentes (PD), assim como foram analisadas as atividades da redutase do nitrato (NR) e glutamina sintetase (GS). PD apresentaram acúmulo de NO_3^- tanto na seiva do xilema como nos extratos de folhas. A atividade da NR nas folhas não sofreu alteração em PD, porém a atividade da GS foi significativamente maior nos extratos das folhas dessas plantas. Embora a concentração de aminoácidos tenha sido um pouco maior na seiva do xilema de PD, caiu drasticamente no extrato de folhas dessas plantas. O teor de proteínas solúveis também foi menor na seiva do xilema e no extrato de folhas de PD. PD e PS apresentaram o mesmo perfil de aminoácidos em HPLC, contudo em proporções bem diferentes, principalmente dos aminoácidos asparagina (ASN), glutamina (GLN) e arginina (ARG). A atividade de proteases no extrato de folhas foi maior em PD enquanto na seiva do xilema só foi detectada atividade em PD. A poliamina putrescina foi identificada em grande concentração somente em PD. Estes resultados demonstram que PD apresentam alterações no metabolismo de compostos nitrogenados, provavelmente em resposta a mudanças na interação dos processos de absorção, assimilação e redistribuição do nitrogênio.

3.2. INTRODUÇÃO

A Clorose variegada do citros (CVC) é uma das mais importantes doenças da citricultura mundial, responsável por causar prejuízos consideráveis à produção de frutos em variedades comerciais de laranja doce. O agente causal da CVC foi identificado como sendo *Xylella fastidiosa* (Xf), bactéria pertencente ao grupo denominado de “Xylem-limited bacteria”, as quais colonizam e se desenvolvem nas células do xilema. Bactérias com essa característica nutrem-se provavelmente de compostos inorgânicos e orgânicos presentes na seiva do xilema.

Após a infecção do xilema a bactéria produz exopolissacarídeos formando agregados, denominados de biofilme, o que resulta na obstrução dos vasos do xilema, fato que está relacionado com a maioria dos sintomas apresentados por plantas com CVC.

O mecanismo de patogenecidade de Xf ainda não é totalmente conhecido, estimulando diferentes estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares.

A grande maioria dos estudos sobre a nutrição da Xf é realizada *in vitro* e por isso não demonstram a real interação existente entre a bactéria e o meio o qual esta coloniza e se multiplica, o xilema.

Existem poucos trabalhos sobre a composição da seiva do xilema em citros. Dos poucos existentes, a maioria mostra que os principais aminoácidos presentes na seiva do xilema de citros são arginina, asparagina e glutamina (Culianez *et al.*, 1981), sendo os dois primeiros encontrados principalmente na seiva de órgãos em desenvolvimento. Esses aminoácidos, junto com o íon NO_3^- , são apontados como as principais formas de compostos nitrogenados transportados pelas planta. A concentração de aminoácidos livres na seiva do xilema se mostra bastante variável ao longo das diferentes épocas do ano (Ramamurthy &

Ludders, 1982 a; Tadeo *et al.*, 1984). Outro fator que altera a composição de aminoácidos é a ocorrência de estresses bióticos e abióticos.

A mudança na composição de aminoácidos bem como na concentração de NO_3^- na seiva do xilema e nas folhas, pode ser o reflexo de alterações nas atividades das enzimas do metabolismo do nitrogênio.

Não foram realizados até o presente momento trabalhos de avaliação da atividade da RN em plantas com CVC. Essa enzima é responsável pela redução do NO_3^- a NO_2^- , primeira fase do processo de redução deste íon até NH_4^+ , a qual é a única forma de nitrogênio assimilada por plantas, mas como é altamente tóxica, é rapidamente incorporada em nitrogênio orgânico, pela via GS/GOGAT.

A enzima Glutamina Sintetase (GS) cataliza a formação de glutamina por meio da aminação do glutamato, tendo como substratos α -cetoglutarato e NH_4^+ , as glutaminas sintetizadas são inicialmente distribuídas por reações de transaminação, originando outros aminoácidos. Estudos bioquímicos e moleculares revelaram a existência de múltiplas isoformas para a enzima GS, sendo cada isoenzima regulada de forma diferentes.

Da mesma forma que muito pouco se sabe sobre aminoácidos em citrus, infectadas ou não por CVC, muito pouco se sabe sobre as proteínas do xilema dessas plantas ou mesmo sobre o nível de proteínas nas folhas.

3.3. OBJETIVOS

Os principais objetivos desse capítulo foram:

- a) Estudar a dinâmica de compostos nitrogenados, conhecidos por apresentarem alterações em respostas a diferentes tipos de stress biótico e abiótico, bem como a atividade das principais enzimas do metabolismo do nitrogênio;
- b) Identificação das proteínas presente na seiva do xilema de plantas com CVC;

3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1. Material Vegetal

Para a extração da seiva do xilema e coleta das amostras de folhas e pecíolos, foram utilizadas plantas de laranjeira pêra com aproximadamente 5 anos de idade, as quais aos 16 meses foram enxertadas sobre limoeiro cravo. A formação de plantas doentes foi por inoculação por encostia em plantas doentes (Medina, 2002). A encostia foi realizada no tronco, logo abaixo dos ramos principais da copa e as plantas mantidas em casa de vegetação, com telado a prova de infestação de cigarrinhas, no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros ‘Sílvia Moreira’, Instituto Agronômico, Cordeirópolis, SP. Foram feitas adubações e irrigações de acordo com as recomendações para citros. As plantas usadas neste estudo foram às mesmas utilizadas por Medina (2002).

3.4.2. Obtenção da seiva do xilema

A seiva foi coletada da parte apical de ramos de plantas sadias (PS) e plantas doentes (PD). Devido à grande obstrução dos vasos do xilema nas PD, optou-se pelo uso de uma câmara de pressão (bomba de Scholander), conforme utilizado por Gould *et al.*, (1991) para “phony peach disease” (Figura). Sendo o rendimento de seiva muito pequeno nas PD, ramos apicais contendo 3 a 5 folhas totalmente expandidas foram coletados de várias plantas e as seivas misturadas aleatoriamente e na sequência separadas em 5 repetições. As coletas foram feitas na parte da manhã (8-10h), quando a tensão nos vasos do xilema não é tão alta e ainda existe certa transpiração nas PD (Medina, 2002). Os ramos foram cortados com auxílio de bisturi e imediatamente montados na câmara de pressão. Em seguida, o local de corte foi lavado abundantemente com água destilada, rapidamente seco com papel de filtro,

e a pressão então liberada na câmara. Nas PS a saída da seiva era abundante mesmo em baixas pressões (3 a 5) bars, enquanto nas PD a retirada só era possível em pressões entre 15 e 20 bars. As amostras de seivas foram mantidas em gelo durante a coleta e depois centrifugadas a 3000g ou não para eliminação das bactérias presentes. O sobrenadante coletado foi armazenado em freezer -80°C.

3.4.3. Confirmação da infecção por *Xylella fastidiosa* (Xf)

A confirmação da infecção foi feita por meio de reações PCR (Pooler & Hartung 1995). Inicialmente tentou-se usar a seiva diluída diretamente nas reações de PCR, mas sem sucesso, provavelmente devido à presença de inibidores de Taq polimerase. Assim, a seiva foi purificada usando a matrix InstaGene Matrix da BioRad (cat no.732-6030), (H.D. Coleta Filho, do Centro de Citricultura do IAC, comunicação pessoal)

- 1 – Adicionar a matrix (1:1, v/v) na seiva e incubar por volta de 20 min a 56°C
2. Vortex em alta velocidade por 10 segundos e incubar 100°C durante 8 min
3. Vortex em alta velocidade por 10 segundos e centrifugar a 12000 rpm por 3 min
4. Usar 20 µl da fase superior para a reação de PCR.

Abaixo são indicados os componentes da reação e as condições do PCR para detecção da presença de Xf, utilizando-se o par de primers CVC1 e 272-2 (Pooler and Hartung, 1995) e o par RST₃₁ e 272 WT (desenhados pelo Centro de Citricultura do IAC):

H2O (q.s.p.)	25,0 µl
Tampão 10X	2,5 µl
Mg ++	2,5 mM
DNTP	0.25 mM de cada
Primers (12,5 - 18,0 ng)	0,5 µl de cada primer
Taq polimerase	1 unidade
Seiva purificada	20µl

Ciclagem

- 1- 94°C - 3 min
- 2- 94°C - 1 min

- 3- 60°C - 1 min
- 4- 72°C - 1,5 min (30x etapa 2 até 4)
- 5- 72°C - 5 min

3.4.4. Atividade da glutamina sintetase (GS)

1. Aproximadamente 1 g de folha foi macerado com N₂ líquido, adicionando-se 100 mg de PVPP, com posterior adição de 5 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,5, contendo, 0,5 mM de MgCl₂.6H₂O, 10 mM EDTA, 1mM de DTT, 0,4 mM de PMSF, a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 16000g por 20 min a 4°C, sendo o precipitado descartado. A atividade biossintética da GS foi medida na presença de NH₂OH, como descrito por O'Neil & Joy (1974).

3.4.5. Atividade *in vivo* da Redutase do Nitrato (RN)

A atividade da RN foi determinada pelo método descrito por Carelli *et al.*, (1990). Discos foliares foram coletados e infiltrados a vácuo por 2 min, com 5 ml do meio de reação (100 mM tampão fosfato, pH 7,5, 25mM KNO₃, 1% de isopropanol) Os discos infiltrados foram incubados a 35°C por 30 min em ausência de luz e com agitação ocasional. A atividade da enzima foi medida pela quantidade de NO₂ formada durante o período de incubação e liberada dos discos foliares para o meio após 5 min de fervura. Aliquotas de 2ml foram misturadas em 1:1 com 1% sulfanilamida em HCl 2,4M:0,02% N-1-naphtyl-etilenoamina, sendo a absorbância medida em 540 nm.

3.4.6 Quantificação de NO₃⁻, NH₄⁺, aminoácidos, proteínas solúveis totais e poliaminas

Nos mesmos extratos utilizados para a quantificação da atividade enzimática da GS foram determinadas às concentrações de proteínas solúveis totais, NO₃⁻, NH₄⁺ e

aminoácidos de acordo com os métodos de Bradford (1976), Cataldo *et al.*, (1975), Sodek & Lea (1993), Cocking & Yemm (1954), respectivamente. A dosagem dessas substâncias na seiva foi feita diretamente com o material coletado, após centrifugação para eliminação de bactérias. A determinação individual de cada aminoácido, tanto nas amostras de seiva como nos extratos de folhas, foi feita pela derivação com *o*-phtalaldehyde e análise em HPLC com detecção fluorimétrica (Jarret *et al.*, 1986). Para quantificação de prolina na seiva do xilema foi feita a derivação utilizando-se o AccQ-Fluor Reagent Kit (Waters) e posterior análise em HPLC. Nas folhas a concentração desse aminoácido foi determinada pela reação com ninhidrina em meio ácido (Ringel *et al.*, 2003). A identificação das poliaminas foi realizada por HPLC de acordo com o método descrito por Hanfrey *et al.*, (2002).

3.4.7. Determinação da atividade de proteases

O método utilizado para determinar a atividade de proteases foi uma variação de Jones *et al.*, (1998), utilizando-se azocaseína ao invés de azogelatina. Nas folhas foi feita extração em tampão TRIS-HCl pH 7,5. Em Eppendorf adicionou-se 50 µl do extrato de folhas ou de seiva, 450 µl de 25 mM TRIS-HCl pH 7,5, e após 10 min de pré-incubação a 40°C, 200 µl de azocaseína 1%. A mistura foi incubada por 6 horas, quando recuperou-se 350 µl dos tubos e a este volume adicionou-se 150 µl de TCA 10%. Após 20 min na temperatura ambiente, o precipitado formado foi eliminado por centrifugação e o sobrenadante lido em 440 nm.

3.4.8 Identificação de proteínas diferencialmente expressas na seiva do xilema

Preparação das amostras de seiva do xilema para eletroforese bidimensional: Amostras de seiva de plantas saudáveis e doentes de citrus foram obtidas como descrito no item 3.4.2. Foram adicionados aproximadamente 500 µl de solução precipitante (1% ácido acético,

50% etanol, 50% acetona) gelada à 500 µl de seiva obtido diretamente dos ramos de plantas sadias e doentes. Esta amostra foi mantida em repouso no gelo por 30 min ou “overnight” a –20°C. Após o período de precipitação, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi solubilizado em tampão de lise (1% SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.8 , 2 mM PMSF , 100 mM DTT e 1:50 coquetel inibidor de proteases) suficiente para a obtenção de uma amostra protéica de concentração aproximada de 15 µg/ul.

Eletroforese Bidimensional (2D): A eletroforese bidimensional permite separar as proteínas de uma amostra devido ao ponto isoelétrico e a massa molecular.

Para separação das proteínas pelo ponto isoelétrico (primeira dimensão) as amostras de seiva precipitada foram solubilizadas no tampão SB1D (8 M uréia, 4% CHAPS, 70 mM DTT, 2% anfólitos, 0.001% azul de bromo fenol) completando o volume para 350 µl. As amostras foram então centrifugadas a 10000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi utilizado na eletroforese por ponto isoelétrico (IEF).

Foram feitas IEF de amostras protéicas utilizando-se géis de poliacrilamida desidratados pré-feitos ou “strips” (Amersham Biosciences) com faixas de gradiente fixo de pH 3-10NL utilizando-se o aparato IPGphor (Amersham Bio Science). A concentração de anfólito é variável de acordo com a quantidade de proteína aplicada e da faixa de gradiente de pH compreendida no gel para a primeira dimensão. Os parâmetros elétricos para esta corrida diferenciaram-se de acordo com a faixa de pH analisada, sendo que para o uso dos géis pH 3 a 10 NL foi utilizado o seguinte parâmetro: rehidratação por 12 h, 500 V durante 1 h, 3500 V durante 1 h e 8000V, até acumularem-se 70 kVh totais de corrida. Os géis ficaram sob refrigeração constante de 20°C e amperagem máxima de 50 µA por gel. Após

a IEF as “strips” foram armazenadas a -80°C para uso posterior na separação na segunda dimensão.

Incubação das “strips”: Para a separação das proteínas de acordo com suas respectivas massas moleculares é necessário que as mesmas sejam incubadas em tampões cujo reagente principal é o detergente sódio dodecil sulfato (SDS), que atuará solvatando as moléculas protéicas, atribuindo carga total negativa. Neste passo as “strips” provenientes da IEF foram incubadas no tampão 1 (uréia, SDS, glicerol, H_2O , Tris-HCl pH 8.8, DTT) por 8 min, e no tampão 2 (uréia, SDS, glicerol, H_2O , iodoacetamida, Tris-HCl pH 8.8) por 12 min. Após este período foram adicionados 200 μl de tampão Tris-HCl pH 6.8 em cada “strip”, que permaneceu mais 2 min nesta condição. Subseqüentemente a este passo, as “strips” foram submetidas à segunda dimensão da 2D.

SDS PAGE – 2ª Dimensão: Na segunda dimensão da 2D há a separação das proteínas de acordo com a massa molecular apresentada por cada molécula protéica. Neste passo foram confeccionados géis de poliacrilamida de concentração de 12,5% (30 acrilamida : 0.8 bis), 0,04% PSA, 0,05% TEMED, 0.37M Tris-HCl pH 8.8) de dimensões 15 cm x 16 cm x 1,5 mm, os quais serviram de matriz para a separação das proteínas contidas nas “strips” provenientes da 1ª dimensão (IEF) da 2D. Sobre os géis da 2ª dimensão foram colocados aproximadamente 2 ml de agarose 0.5% aquecida a 70°C e sobre ela a “strip” proveniente da incubação com tampão contendo SDS.

As corridas foram realizadas no aparato para eletroforese modelo SE-600 (Hoefer) sob refrigeração constante de 20°C e com uso de tampão de corrida (72.10 g glicina, 5 g SDS, 15.15 g Tris, H_2O q.s.p. 1 litro).

Detecção das proteínas em gel de poliacrilamida: Para a detecção das proteínas os géis foram lavados com água mili Q por 5 min após o término da 2D e colocados diretamente numa solução corante (40% metanol, 10% ácido acético, 0.2% Comassie Brilliant Blue) por 1 h e, posteriormente, foram descorados com trocas sucessivas de descorante (40% metanol, 10% ácido acético).

Identificação das proteínas: As proteínas separadas nos géis 2D foram recortadas do gel e os peptídeos obtidos seguindo o protocolo de digestão *In-gel* de proteínas (Smolka, 2003). Os peptídeos foram previamente purificados em colunas ZipTip C18 (Millipore) e na sequência analisados em espectrômetro de massa modelo Q-ToF (Applied Biosystems).

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Confirmação da infecção com Xf

Uma vez que o rendimento na extração de seiva em plantas doentes é muito menor do que nas plantas saudas, foi necessário fazer amostras compostas de seivas de várias plantas doentes. Foram realizadas reações de PCR para os vários tubos de seiva coletados (5 repetições para cada tipo - PS, PD) para confirmação da infecção. Pela figura 1 pode-se observar que todos os frascos de PS não mostraram bandas, ocorrendo o contrário com PD.

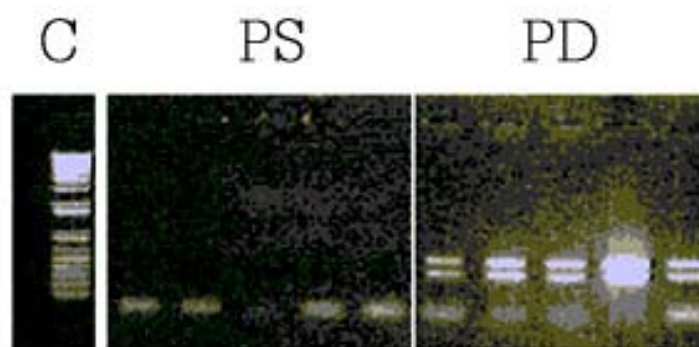


Figura 1. Reações de PCR realizadas com primers específicos para identificação de Xf: C) controle; PS) Planta sadia; PD) Plantas com CVC.

3.5.2. Concentração de compostos nitrogenados na seiva do xilema

O sintoma mais marcante em plantas de citros com CVC é o déficit hídrico. Nessa condição a concentração de íons e compostos orgânicos nitrogenados na seiva do xilema e folhas podem ser alteradas.

As principais formas de absorção do nitrogênio em plantas são NO_3^- e NH_4^+ , sendo a dinâmica do N um dos fatores que mais limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Por isso é muito importante que se conheça alterações no metabolismo dessas

formas de N em plantas submetidas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos. Pelo exposto, a princípio parece plausível fazer um paralelo entre alterações no metabolismo do nitrogênio em plantas com CVC com relatos encontrados na literatura de plantas crescidas em condições de baixos potenciais hídricos.

A quantificação da concentração do NO_3^- em PS e PD mostraram que esse íon tem uma tendência a se acumular tanto na folhas como na seiva do xilema das PD (figuras 2A e 2B). Em contrapartida, nos diferentes métodos empregados não detectamos NH_4^+ em nenhuma das frações analisadas em PS e PD. A maior concentração de NO_3^- encontrada tanto na seiva do xilema como nas folhas de plantas com CVC e, a ausência de NH_4^+ pode ter ocorrido em consequência da redução do metabolismo desse íon na raiz, uma vez que para a completa assimilação é necessária a redução até NH_4^+ , o qual é extremamente tóxico não sendo transportado pela seiva do xilema.

O transporte de NO_3^- das raízes pela seiva para outras partes das plantas depende da concentração do íon no meio e da demanda da parte aérea, processo o qual é altamente regulado por feedback pelos compostos nitrogenados, como aminoácidos principalmente glutamina (Gojon *et al.*, 1998). Dessa forma o aumento na concentração de nitrato em função da infecção por Xf pode ser reflexo de alterações na complexa interação existente entre absorção, transporte e assimilação deste íon em composto orgânico.

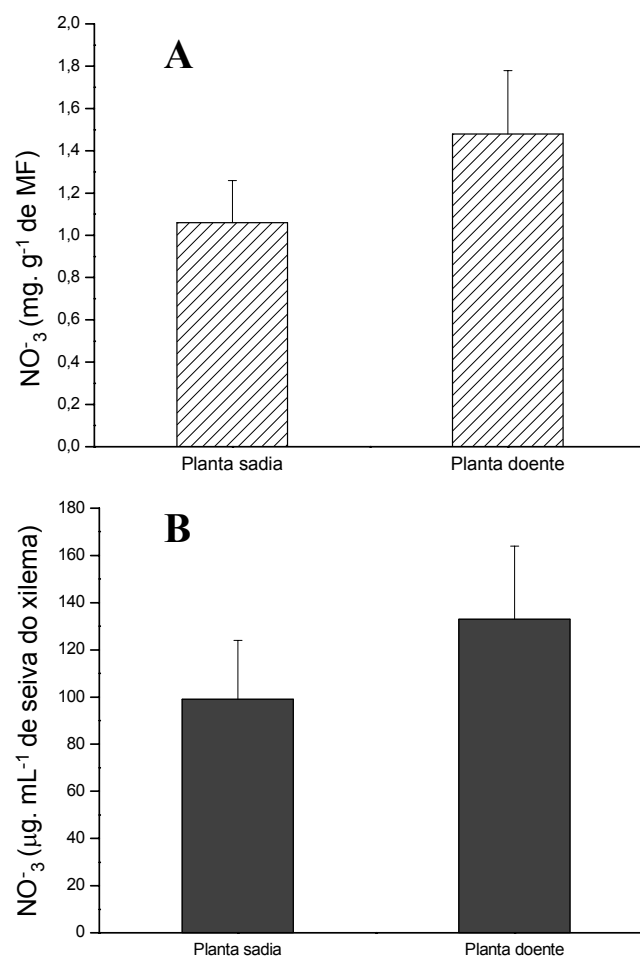


Figura 2. Concentração do ânion nitrato nas folhas (A) e seiva do xilema (B) de plantas de citros saudáveis e com CVC.

3.5.3. Atividade das enzimas Redutase do Nitrato e Glutamina Sintetase

Embora a maior concentração de NO_3^- em plantas com CVC sugerisse maior atividade da Redutase do Nitrato (RN), o resultado da atividade dessa enzima não foi significativamente diferente entre PS e PD (figura 3A).

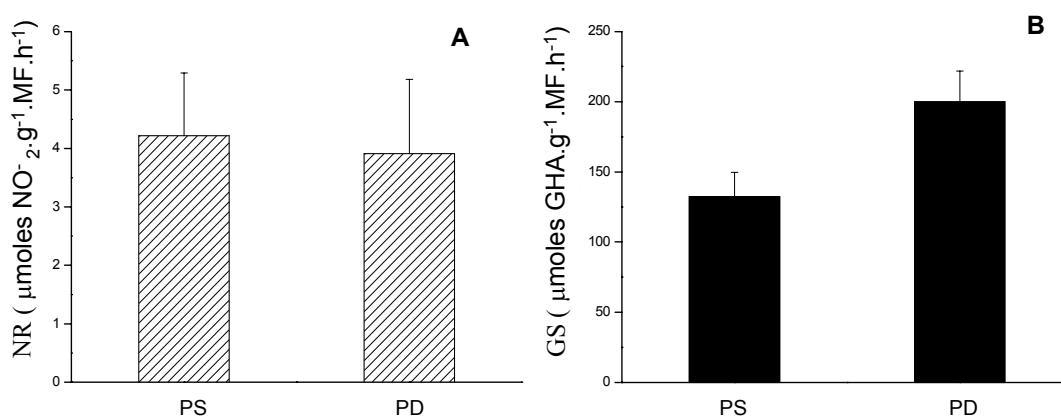


Figura 3. Atividade da redutase do nitrato (A) e glutamina sintetase (B) em discos de folhas saudáveis (PS) e plantas doentes (PD).

Para explicar este dado é necessário o melhor entendimento da regulação dessa enzima, assunto que tem sido intensamente estudado devido a sua importância no metabolismo de plantas. A regulação da RN ocorre inicialmente por efetivo controle da expressão gênica, o que determina os níveis da proteína, e na sequência a atividade enzimática da proteína é rapidamente modificada por mecanismos reversíveis de fosforilação (Kaiser *et al.*, 1999). Essa particularidade parece ser uma forma de aumentar a sensibilidade da RN aos estímulos celulares e do ambiente. Dentre os principais fatores envolvidos na regulação da RN estão a concentração do NO_3 , luz e concentração de CO_2 . Por isso a atividade da enzima apresenta variação ao longo do dia, sendo a maioria dos trabalhos relacionados com essa enzima em função de se conhecer a variação de atividade em um determinado período, o que não foi à intenção do nosso trabalho. Apenas investigamos o comportamento da RN em um determinado ponto para saber a resposta da enzima em decorrência da infecção por Xf. Como a transcrição do gene de RN e ativação da enzima é dependente de luz (Vincentz *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1994) as coletas das amostras de folhas foram realizadas às 9 horas da manhã o que garantiu um período de exposição à luz.

Muito provavelmente a atividade da RN não foi alterada em função de um conjunto de outros fatores que não foram investigados em nosso trabalho, mas sobre os quais podemos fazer algumas inferências. Em geral os sintomas de deficiência hídrica em plantas com CVC têm sido acompanhados de alterações nas trocas gasosas (Medina *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003) e isto ocorre em função do fluxo de CO_2 e de vapor água serem condicionados à densidade de fluxo fotossintético de fótons (PPFD), déficit de pressão de vapor (VPD) e abertura estomática (Germaná & Sardo, 1996), os quais são dependentes da hidratação dos tecidos. Gomes *et al.*, (2003) avaliaram as trocas gasosas em plantas saudáveis e

com CVC após 20 e 26 meses da inoculação da bactéria e demonstraram que a assimilação de CO₂ é reduzida em PD, principalmente nas primeiras horas da manhã e ao meio dia. Uma vez que a concentração de CO₂ atua regulando a atividade da RN, podemos levantar a hipótese que a atividade da enzima não respondeu positivamente à maior concentração de NO₃⁻ em função de uma provável diminuição na assimilação de CO₂, com conseqüente efeito no mecanismo de fosforilação, uma vez que tem sido demonstrado que o controle do CO₂ ocorre no nível pós-transcricional. Pesquisas com plantas transgênicas de *Nicotiana plumbaginifolia*, com alterações nas regiões responsáveis pelo controle transcricional e pós-transcricional da RN, demonstraram que o CO₂ atua no controle da atividade da enzima e não na expressão, uma vez que a RN manteve a atividade catalítica nas plantas com a região pós-transcricional alterada quando mantidas em atmosfera livre de CO₂, enquanto nas plantas que a seqüência foi conservada a redução na atividade foi reduzida a 60% (Lejay *et al.*, 1997).

Outra questão a ser considerar na atividade da RN diz respeito ao fato de plantas sensíveis ao estresse salino acumularem grandes quantidades de Na e Cl nas folhas, o que também tem sido relacionado com reduções significativas na atividade catalítica da enzima (Abd-el Baki *et al.*, 2000). Plantas com CVC apresentaram considerável acúmulo de Na nas folhas e pecíolos (ver Capítulo II), o que pode ter contribuído para evitar o aumento da atividade da RN em resposta ao acúmulo de NO₃⁻.

De outra maneira, a atividade total GS, responsável pela assimilação do nitrogênio inorgânico em aminoácidos, foi significativamente maior nos extratos de PD, quando comparada com a atividade em PS (figura. 2B). Uma vez que a redução do NO₃⁻ não acompanhou o aumento de concentração nestas plantas, podemos considerar que o aumento da atividade da GS ocorreu em função da reassimilação de NH₄⁺ formado em outros

processos, como fotorrespiração ou produto da hidrólise de proteínas, sendo este último considerado um importante mecanismo de reaproveitamento de nitrogênio em plantas.

Estudos bioquímicos e moleculares revelaram a existência de múltiplas isoformas para a enzima GS, sendo cada isoenzima regulada de forma diferente. A isoforma designada GS1 é encontrada no citossol, enquanto GS2 está presente nos cloroplastos e outros plastídeos (MacNally *et al.*, 1983). A proporção relativa das isoformas citossólica e cloroplástica é influenciada por diferentes fatores ambientais. Através do uso de mutantes ficou evidente que GS2 é responsável pela assimilação de NH_4^+ resultante da redução do NO_3^- ou da fotorrespiração (Blackwell *et al.*, 1990), enquanto GS1 responde pela reassimilação de NH_4^+ resultante da degradação de proteínas, o que ocorre durante a senescência dos tecidos (Sakakibara *et al.*, 1992). Uma vez que as folhas com CVC apresentam clorose generalizada, sintoma característico de redistribuição de N, podemos sugerir que o aumento da atividade total da GS possa ser devido ao aumento da atividade da isoforma citossólica.

3.5.4. Concentração de aminoácidos e proteínas solúveis e atividade de proteases

Os resultados da quantificação de aminoácidos totais e proteínas solúveis na seiva do xilema e folhas de PS e PD (figura 4) confirmam que alterações principalmente na redução e assimilação do nitrogênio nas PD refletem no conteúdo de compostos nitrogenados.

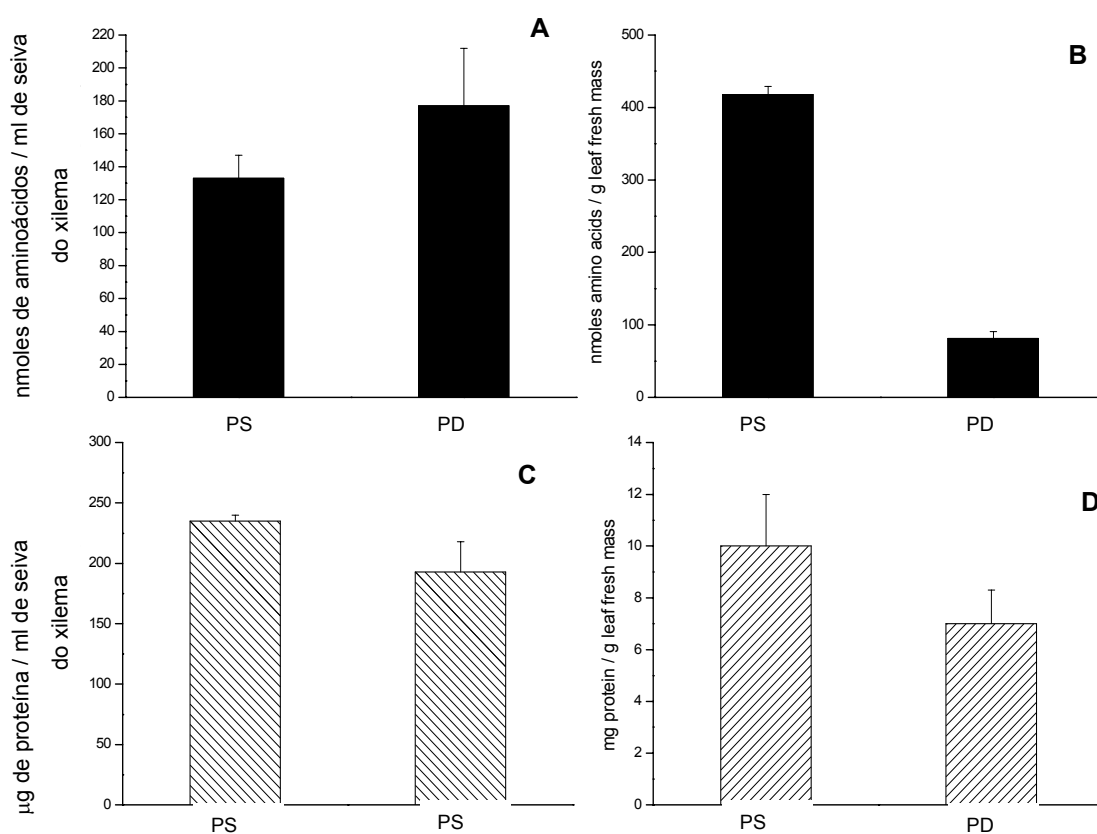


Figura 4. Análise de aminoácidos e proteínas na seiva do xilema e folhas de plantas de citros sadias (PS) e com CVC (PD): A) concentração de aminoácidos na seiva do xilema; B) concentração de aminoácidos no extrato de folhas; C) concentração de proteínas na seiva do xilema; D) concentração de proteínas nas folhas.

A concentração de aminoácidos solúveis totais na seiva do xilema foi maior nas PD (Figura 4A), porém as folhas dessas plantas apresentaram redução na concentração desses compostos em comparação com os valores encontrados em PS (Figura 4B). Já a concentração de proteínas solúveis totais foi menor tanto na seiva do xilema como nas folhas de PD. Os aminoácidos fazem parte das conhecidas substâncias caracterizadas como “solutos compatíveis”, as quais apresentam aumento na concentração em decorrência do ajuste osmótico desenvolvido por plantas quando submetidas a condições de baixos potenciais hídricos ou stress salino (Baker *et al.*, 2000).

A expressiva redução na concentração dos aminoácidos das folhas de plantas com CVC, apresentando aparentes sintomas de deficiência hídrica, indica que ao contrário do que se tem observado em condições naturais de baixos potenciais hídricos, estas não desenvolveram mecanismo de ajuste osmótico pelo aumento da concentração dessas substâncias nas folhas, e provavelmente a maior concentração desses compostos na seiva do xilema ocorreu em função de alterações nas atividades das enzimas envolvidas nos processos de redução e assimilação do nitrogênio na parte aérea.

Outra explicação para o aumento na concentração de aminoácidos na seiva do xilema de plantas doentes é o fato de que plantas infectadas por Xf apresentaram maior atividade de proteases na seiva do xilema e nos extratos de folhas (figura 5).

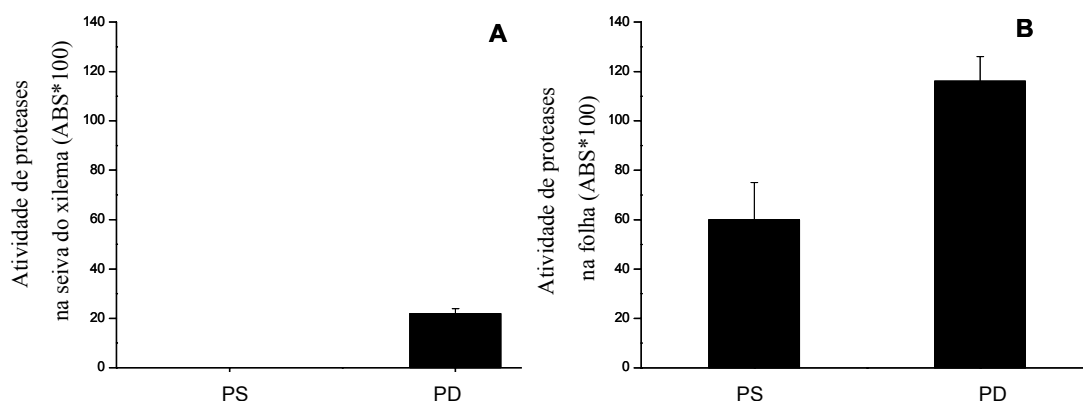


Figura 5. Análise da atividade de proteases em plantas de citros sadias (PS) e com CVC (PD): A) atividade de proteases no extrato de folhas; B) Atividade de proteases na seiva do xilema.

No sequenciamento do genoma de Xf foram encontradas seqüências de genes que codificam para proteases (Simpson *et al.*, 2000), e estudos baseados no proteoma (Smolka *et al.*, 2002) confirmaram a presença de uma Zn-protease e duas serino-proteases em células cultivadas *in vitro*. Sugeriu-se que possivelmente estas enzimas sejam importantes em termos nutricionais (digestão de proteínas da parede celular e aproveitamento dos resíduos pela bactéria), assim como para degradação dos poros dos traqueídeos, facilitando a contaminação de outros tecidos das plantas. Os dados de atividade aqui apresentados mostram que as proteases são expressas no xilema *in vivo*, e que provavelmente contribuíram para a maior concentração de aminoácidos na seiva de plantas sadias. As duas explicações para a maior concentração dessas substâncias não se anulam e podem estar ocorrendo simultaneamente.

Na figura 6 são mostrados os géis de eletroforese bidimensional das proteínas presentes na seiva do xilema de PS e PD, respectivamente. As figuras 6 A e 6B mostram géis corados com prata e as figuras 6C e 6D géis corados com comassie blue que foram usados para obter as proteínas usadas no sequenciamento. Nenhuma das proteínas sequenciadas mostraram similaridades com proteínas de Xf. A proteína identificada como spot D1 não pode ser sequenciada, enquanto D2 e D3 apresentaram grande homologia com quitinases (dados não mostrados), enzimas responsáveis pela degradação da parede celular de fungos. Uma vez que quitinases podem ser induzidas por vários tipos de estresses, a presença destas proteínas na seiva de PD pode não estar associada a presença da bactéria, uma vez que essa não apresenta quitina.

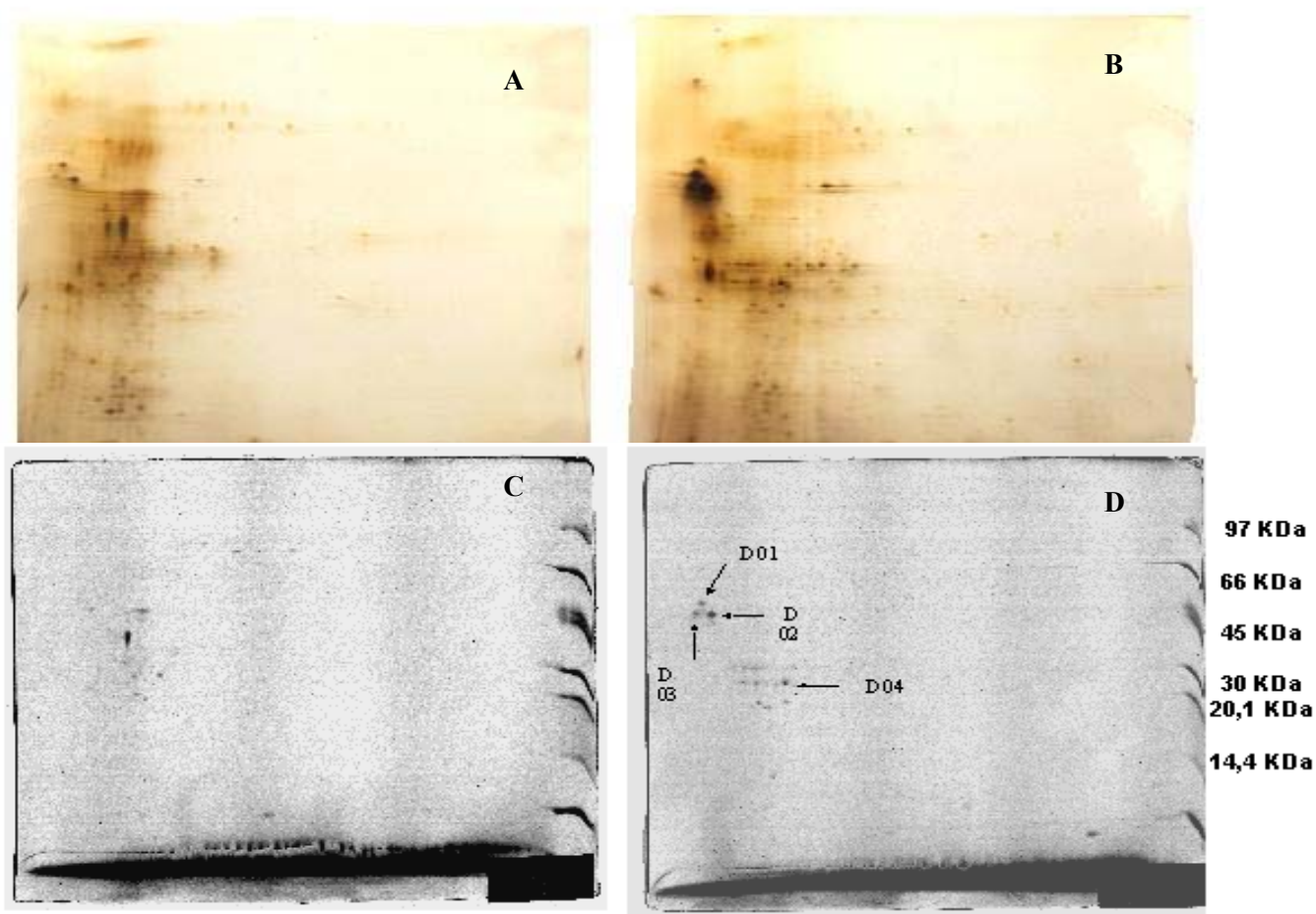


Figura 6. Gel de eletroforese bidimensional das proteínas encontradas na seiva do xilema de plantas sadias (PS) e infectadas com *Xylella fastidiosa* (PD): A) Gel de proteínas presentes na seiva do xilema de PS, corado com prata; B) Gel de proteínas presente na seiva do xilema de PD, corado com prata; C) Gel de proteínas presentes na seiva do xilema de PS, corado com comassie blue; d) Gel de proteínas presente na seiva do xilema de PD, corado com comassie blue. As setas estão indicando os spots escolhidos para o sequenciamento.

Os fragmentos gerados a partir do spot D4 apresentaram similaridade com thaumatinas (Dados não mostrados), proteínas que pertencem à família PR5 (Pathogenesis Related Proteins) e que apresentam como característica a alta glicosilação. Além de estarem associadas com patogenicidade, thaumatinas também tem sido associada a senescência (Sassa *et al.*, 2002). Alguns trabalhos têm obtido evidências de que proteínas de plantas com similaridade para thaumatina têm capacidade de se ligarem α -1,3-glucanos, o que lhes conferiria atividade anti-fúngica (Trudel *et al.*, 1998; Eulgem *et al.*, 2004).

Portanto, as diferenças qualitativas observadas entre as proteínas da seiva de PD e PS refletem o estresse geral causado pela infecção com Xf, não colaborando no esclarecimento da participação de proteases nesse processo. Entretanto, podemos observar na fotografia do gel das proteínas presente na seiva de PD a presença de um grande número de proteínas de baixa massa molecular, o que de certa forma é concordante com os resultados de maior atividade de proteases e maior conteúdo de aminoácidos observados em PD.

Análises em HPLC da seiva do xilema (figura 7) não revelaram diferenças de aminoácidos entre PS e PD, sendo identificados, principalmente, ácido aspártico (ASP), ácido glutâmico (GLU), asparagina (ASN), serina (SER), glutamina (GLN), arginina (ARG), porém houve diferenças nas concentrações principalmente de ASN e ARG.

A concentração de ASN caiu de 40,3 % na seiva de PS para 25,7% na seiva de PD. Da mesma forma, GLN apresentou pequena redução na seiva de PD, de 18,5% contra 23,25% na seiva de PS. Mas a principal diferença foi em relação à concentração de ARG, que ao contrário dos outros dois aminoácidos foi encontrada na concentração de 12,64% na seiva de PD, enquanto apenas traços (1%) foram detectados na seiva de PS. Em folhas, a maior diferença encontrada foi na concentração dos aminoácidos GLN e ARG. Enquanto

ARG teve sua concentração maior em PD como o verificado na seiva do xilema, a concentração de GLN foi fortemente reduzida nessas plantas.

Grande quantidade de prolina foi quantificada nos extratos de folhas (figura 7C) e, apesar da concentração ter sido um pouco maior nas plantas com CVC, a infecção por Xf não alterou de forma significativa a concentração deste aminoácido.

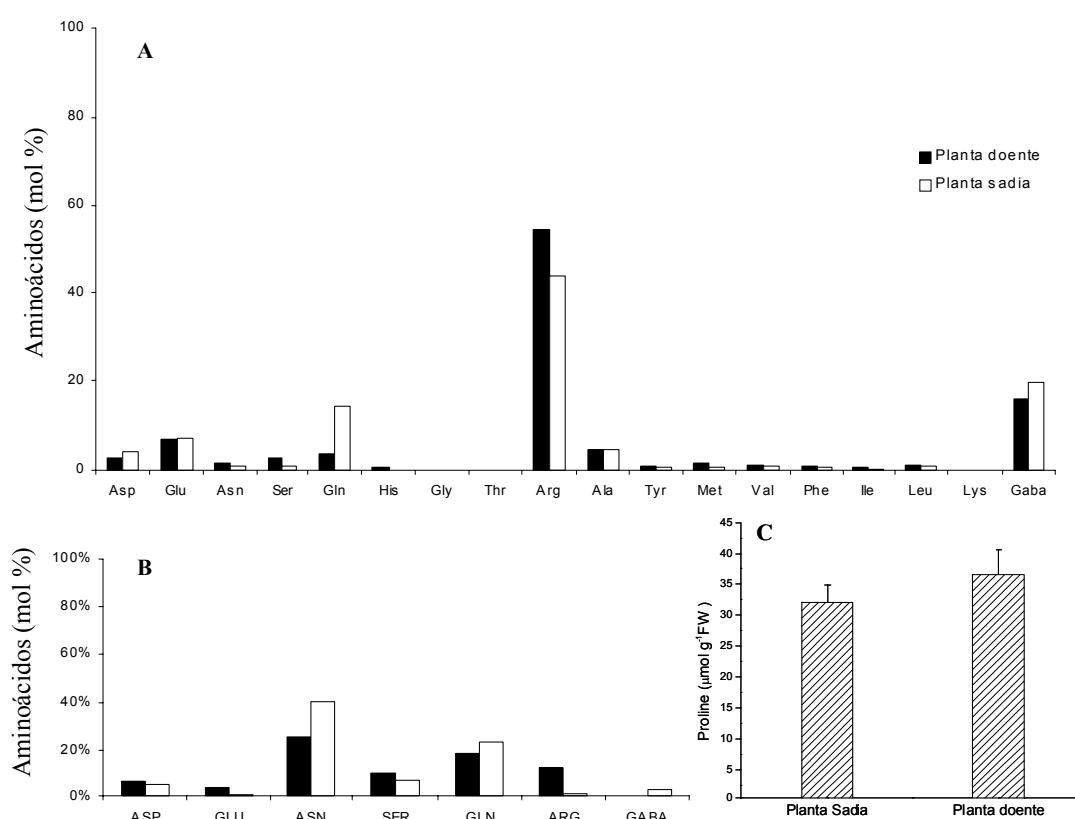


Figura 7. Análise dos aminoácidos presentes na seiva do xilema e folhas de plantas de citros com CVC: A) Separação, identificação e quantificação dos amonoácidos encontrados no extrato de folhas. B) Principais aminoácidos separados e quantificados na seiva do xilema; C) Concentração do aminoácido prolina em folhas.

Os poucos trabalhos sobre a composição de aminoácidos da seiva do xilema em citros mostram que os principais aminoácidos presentes são ARG, ASN e GLN, tal qual os resultados encontrados em nossas análises. Estes trabalhos também relatam que a composição de aminoácidos livres na seiva é influenciada pela ocorrência de diferentes fatores, como, por exemplo, estresses bióticos, época do ano e hora do dia em que são feitas as coletas (Culianez *et al.*, 1981; Ramamurthy & Ludders, 1982 a; Tadeo *et al.*, 1984). Em investigação para se conhecer a composição de aminoácidos em *Punus persica* infectadas com Xf, Gould *et al.*, (1991) não conseguiram estabelecer uma correlação entre a presença da bactéria e as alterações na composição destas substâncias. Como o objetivo do trabalho foi tentar relacionar a infecção pela bactéria e o desenvolvimento dos sintomas de deficiência hídrica das plantas com CVC com as alterações na composição de aminoácidos, é interessante ressaltar a maior concentração de ARG encontrada na seiva do xilema e no extrato de folhas com CVC, uma vez que a concentração desse aminoácido foi alta também no extrato de folhas de laranjeiras com CVC em estádios iniciais submetidas a déficit hídrico (Medina, 2000). Este autor atribuiu o aumento na concentração dos ARG à redução do conteúdo de água e não à presença da bactéria. ARG e PRO são oriundos a partir do GLU por intermediários acetilados, os quais são comuns as vias de biossíntese desses dois aminoácidos, o que parece ser um mecanismo de regulação para evitar a competição entre a biossíntese desses dois aminoácidos (Thompson, 1980)

3.5.5. Quantificação de poliaminas

O aumento de prolina nas plantas com CVC não foi tão expressivo como os observados em outras plantas sob diferentes tipos de estresse. Pode-se especular que provavelmente isto possa ter acontecido em função do fato da infecção por Xf de alguma

forma alterar a biossíntese de aminoácidos, favorecendo a formação de ARG. ARG pode ser convertida em poliaminas que são, pequenas moléculas carregadas positivamente e que por esta razão podem ser encontradas nas forma livre ou conjugadas com outras moléculas (Martin-Tanguy, 1997). As principais poliaminas sintetizadas em plantas são putrescina, espermina, espermidina, sendo a primeira sintetizada diretamente a partir da ARG, por ação da enzima arginina descarboxilase. ARG é precursora de espermina e espermidina. Diversos trabalhos têm mostrado que o metabolismo dessas substâncias é alterado em resposta a diferentes tipos de estresse (Walters, 2003). Análises em HPLC revelaram que plantas com CVC contêm alta concentração da poliamina putrescina no extrato de pecíolos e folhas, como pode ser verificado na figura 8.

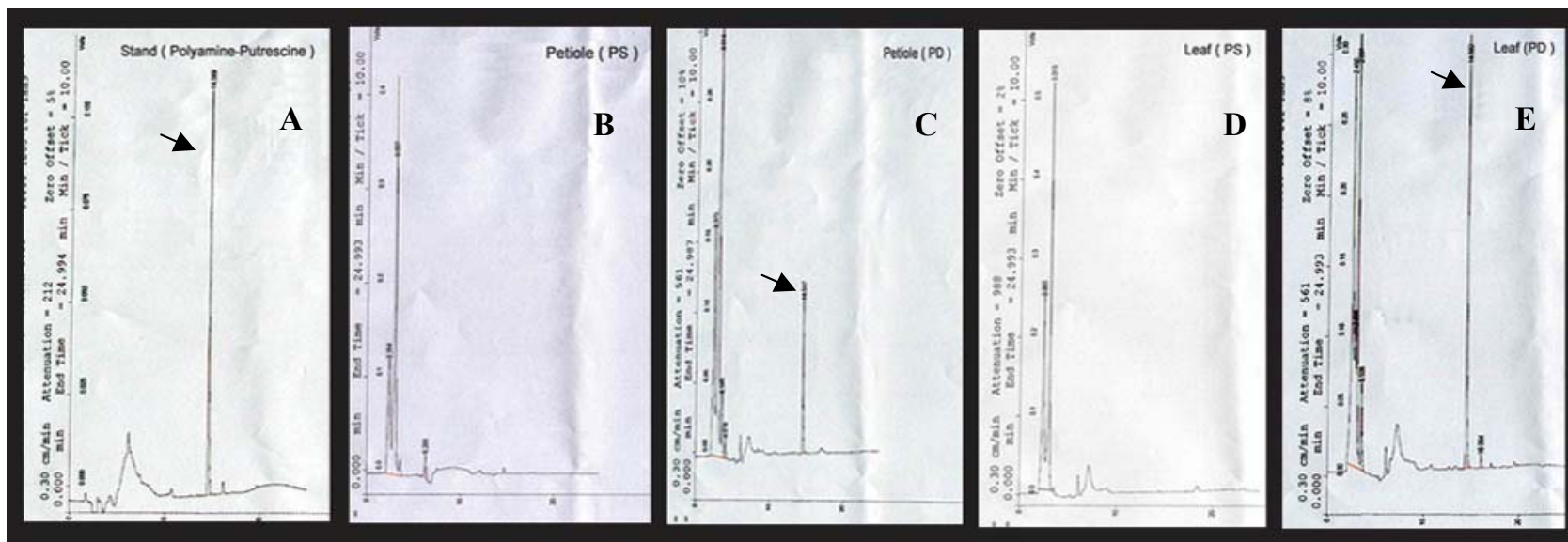


Figura 8. Perfil cromatográfico da poliamina putrescina em plantas sadias (PS) e plantas doentes (PD): A) Padrão de putrescina; B) Pecíolo sadio; C) Pecíolo doente; D) Folha sadia; E) Folha doente.

O pico correspondente ao padrão de putrescina foi detectado de forma bastante expressiva nos pecíolos de folhas de PD, estando ausente nos extratos de PS. Uma pergunta é se o aumento na concentração de putrescina é uma resposta direta a infecção pela bactéria ou ocorre em função do estresse hídrico decorrente do bloqueio dos vasos do xilema, pois existem relatos mostrando que o aumento na síntese dessas substâncias pode ser promovido tanto por estresses abióticos como em resposta a infecção por patógenos. Nas duas condições, apesar da mudança nos níveis de poliaminas serem evidenciadas, as razões fisiológicas não são bem compreendidas. Liu *et al.*, (2000) sugeriram uma hipótese que explica apenas o aumento dessas substâncias em estresses, uma vez que estes autores mostraram que putrescina, espermina e espermidina controlam a abertura e o fechamento dos estômatos de *Vicia faba*, atuando diretamente nos canais de K^+ das células guarda. Em relação à função das poliaminas na complexa interação entre plantas e patógenos, existem explicações distintas para interações compatíveis e incompatíveis (Walters, 2003). No caso de interações compatíveis, caracterizadas pela suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno, a participação das poliaminas é ainda menos clara, sendo a maioria das pesquisas focadas no aumento dos níveis dessas substâncias nas infecções de cereais por fungos (Walters, 1989). Existem relatos diferentes no que diz respeito às alterações nas concentrações dessas substâncias em infecções promovidas por fungos e vírus. Plantas de nabo infectadas pelo vírus TYMV acumularam grandes quantidades de poliaminas (Torget *et al.*, 1979). De outra maneira, experimentos com plantas de tabaco infectadas por fungo, mostraram reduções no conteúdo das poliaminas, principalmente de putrescina (Edreva, 1997), o que foi considerada uma resposta não específica à infecção. Sendo assim, fica difícil explicar se o acúmulo de putrescina nos pecíolos e folhas de plantas com CVC ocorre em resposta direta à infecção por Xf ou em consequência dos sintomas de estresse hídrico ou até mesmo

em função do acúmulo de Na^+ , uma vez que foi determinado grande aumento na concentração desse elemento nos pecíolos e folhas de plantas doentes (ver Capítulo II). Entretanto podemos especular que este tipo de resposta possa ser em função da interação de todos esses fatores, uma vez que estudos sobre mecanismo de regulação da arginina descarboxilase têm demonstrado que essa enzima pode ser codificada por múltiplos genes em algumas espécies, como por exemplo, membros da família Brassicaceae (Galloway *et al.*, 1998), e que apresentam expressão diferencial em respostas à diferentes tipos de estresses (Mo & Pua, 2002).

3.6. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que a infecção por Xf promove alterações marcantes nas atividades das enzimas de redução e assimilação do nitrogênio, com conseqüências também marcantes nas concentrações e no perfil de compostos nitrogenados, como NO_3^- , aminoácidos, poliaminas e proteínas.

**4. CAPÍTULO 2 - NUTRIÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* E O METABOLISMO
DE AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E ALTERAÇÕES NA PAREDE DAS
CÉLULAS DO XILEMA DE PLANTAS DE CITROS COM CVC**

4.1. RESUMO

Xylella fastidiosa (Xf) faz parte do grupo de bactéria denominado de “Xylem-limited bactéria”, as quais colonizam e se desenvolvem nas células do xilema. Até o momento não se conhece qual a fonte de carbono preferencialmente utilizada pela bactéria para a manutenção do crescimento, multiplicação celular, formação do biofilme, e qual a relação desses fatores com o processo de infecção e patogenecidade desenvolvido por esta bactéria.

Como grande parte dos estudos em relação à nutrição da Xf são realizados *in vitro*, estes podem não demonstrar a real interação existente entre a bactéria e o meio o qual esta coloniza e se multiplica, o xilema. Outra questão de grande importância é o fato de Xf se encontrar aderida à parede celular dos elementos de vasos do xilema. Com o objetivo de encontrar respostas para estas questões, comparamos a caracterização dos componentes da seiva do xilema de plantas sadias (PS) e plantas doentes (PD) em HPLC e investigamos, por meio de microscopia confocal, possíveis alterações na parede celular das células que compõem esse tecido. A seiva de PS além de apresentar maior concentração de açúcares solúveis totais, quase duas vezes mais que a concentração encontrada na seiva de plantas doentes, tem como principal açúcar a glicose, seguida por sacarose, sendo encontrado apenas traços de frutose. A seiva de PD apresenta menor concentração de glicose, acompanhada de frutose e glicose. Grande quantidade de ácido cítrico também foi observada nessas plantas. Baseados nesses resultados cultivamos a bactéria em meios com diferentes fontes de carbono e verificamos que aqueles que permitiram maior crescimento foram aqueles continham glicose (1 g/L) como fonte de carbono, sacarose combinada com citrato nas concentrações de 3g/L de cada fonte de carbono, e citrato na concentração de 3 g/L, o que demonstra que a composição química da seiva do xilema é importante tanto

para o processo de agregação como para a formação do biofilme. A infecção com Xf também promoveu modificações nas paredes celulares dos pecíolos. Verificamos por imunocitoquímica em microscópio confocal utilizando os anticorpos JIM 5 e JIM 7, diferenças entre PD e PS nos padrões de esterificação da fração pectina, assim como encontramos no fracionamento da parede celular, alterações na composição dos principais carboidratos que constituem a fração hemicelulose.

4.2. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a CVC reduz o estado energético das plantas por reduzir a taxa de assimilação de CO₂ e conseqüente redução na concentração de fotoassimilados (Gomes, 2001), porém ainda não está claro como se é a relação entre o mecanismo de infecção e de sobrevivência da bactéria nesse processo.

Xyllela fastidiosa (Xf) faz parte do grupo de bactéria denominado de “xylem-limited bacteria” (XLB), as quais colonizam e se desenvolvem nas células do xilema. É classificada como aflagelada, fastidiosa e evolutivamente relacionada à *Xanthomonas spp.* As XLB têm tendência a se acumular em células ou tecidos específicos como é o caso de XF, que apresenta maior concentração nos pecíolos e nervuras foliares (Purcell & Hopkins, 1996). Bactérias com essas características nutrem-se, provavelmente, dos solutos orgânicos e inorgânicos presentes na seiva, tais como, aminoácidos, ácidos orgânicos e íons inorgânicos.

Até o momento não se conhece qual a fonte de carbono preferencialmente utilizada pela bactéria para a manutenção do crescimento, multiplicação celular, formação do biofilme, e qual a relação desses fatores com o processo de infecção e patogenicidade desenvolvido por esta bactéria. Porém, *in vitro* as células dessa bactéria apresentam crescimento lento e são exigentes em nutrientes. Todos os isolados de Xf exigem meios semidefinidos complexos e especializados para o seu crescimento.

Em trabalho realizado por Lemos *et al.*, (2003) foram definidos 5 meios de cultura para se estudar o crescimento de Xf. Dois meios foram definidos como os melhores, XDM2 e XDM3. O primeiro possui serina (SER) e metionina (MET), para os quais a rota biossintética é inexistente em Xf, e asparagina (ASN) e glutamina (GLN), que são abundantes em seiva do xilema de plantas. O meio XDM3 é semelhante ao XDM2, sendo

que apenas substituiu-se ASN por ácido aspártico (ASP). Xf possui em seu genoma a via completa de degradação de ASP. O crescimento de Xf nos meios de cultura líquidos foi medido pela densidade óptica em 600nm e pela produção de proteína por volume de meio. Notou-se que para todos os meios testados não havia crescimento sem a inclusão de glicose. Os autores destacaram a importância da inclusão de uma fonte de carbono, neste caso, glicose, para o crescimento de Xf.

Por outro lado, Leite *et al.*, (2004) basearam-se na composição de aminoácidos presentes na seiva do xilema de videira para a preparação de dois meios de cultura para o cultivo de Xf. Esses meios foram comparados com meios definidos baseados no genoma de Xf. No que diz respeito à glicose como fonte de carbono, este trabalho conclui que essa fonte de carbono não parece ser essencial. Isto porque o meio CHARD2 não continha este açúcar e mesmo assim houve crescimento, ainda que menos intenso que o meio 3G10-R, que continha glicose. Outra observação foi que o meio CHARD2 levou à maior formação de biofilme.

Trabalhando apenas com meio sólido, Almeida *et al.*, (2004) compararam o meio XfD2 com outros meios, entre os quais fizeram parte os meios tradicionais PWG e PD3. Esses autores observaram que o citrato, fonte de carbono fornecida no meio XfD2, sustentou o crescimento bacteriano. Nesse trabalho o íon ferro foi fornecido na forma de cloreto de hemina, e quando ausente não foi verificado o crescimento de Xf.

Como grande parte dos estudos em relação à nutrição da Xf são realizados *in vitro*, estes podem não demonstrar a real interação existente entre a bactéria e o meio o qual esta coloniza e se multiplica, o xilema. Portanto, é fundamental se conhecer possíveis alterações no metabolismo de carbono em plantas com CVC bem como a fonte de carbono utilizada pela bactéria para manutenção do seu crescimento e formação do biofilme.

A seiva do xilema é constituída de diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas, as quais se encontram em grande parte na forma livre, não complexada em polímeros, portanto, prontamente disponíveis para o metabolismo celular da bactéria. Desta forma, acredita-se que o xilema provém um excelente ambiente nutricional para o crescimento da bactéria. Mas a concentração desses nutrientes encontrados na seiva do xilema é baixa, o que sugere a especialização por parte da bactéria para melhor aproveitamento dessas substâncias, induzindo o aparecimento de sintomas de desbalanço nutricional em plantas doentes.

Outra questão de grande importância é o fato de Xf encontrar-se aderida a parede celular dos elementos de vasos do xilema. A parede celular é formada por polissacarídeos estruturalmente diferentes, que se arranjam de forma complexa. Entre as atividades atribuídas à parede estão o armazenamento de carboidratos e a liberação de moléculas sinalizadoras.

Portanto, a caracterização dos componentes da seiva do xilema e a investigação de possíveis alterações na parede celular das células que compõem esse tecido, podem ajudar a entender como ocorre a nutrição da bactéria e o processo de colonização no desenvolvimento na doença.

4.3. OBJETIVOS

- a) Comparar o metabolismo de carboidratos entre PS e PD, a partir da caracterização quantitativa e qualitativa dos açúcares solúveis presentes na seiva, pecíolos e caule;
- b) Estudar a dinâmica do íon ferro nessas plantas;
- c) Investigar alterações na parede celular, por meio de microscopia confocal.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

Para a extração da seiva do xilema e coleta das amostras de folhas e pecíolos, foram utilizadas plantas de laranjeira pêra com aproximadamente 5 anos de idade, as quais aos 16 meses foram enxertadas sobre limoeiro cravo. A formação de plantas doentes foi por inoculação por encostia em plantas doentes (Medina, 2002). A encostia foi realizada no tronco, logo abaixo dos ramos principais da copa e as plantas mantidas em casa de vegetação, com telado a prova de infestação de cigarrinhas, no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros ‘Sílvia Moreira’, Instituto Agronômico, Cordeirópolis, SP. Foram feitas adubações e irrigações de acordo com as recomendações para citros. As plantas usadas neste estudo foram as mesmas utilizadas por Medina (2002).

4.4.2. Experimento para fornecimento de ^{14}C -manose

Este experimento foi realizado com ramos de plantas sadias (PS), ramos com sintomas de plantas doentes (DCS) e ramos sem sintomas de plantas doentes (DSS). Para se verificar a incorporação da radioatividade de ^{14}C -manose em açúcares de parede, ápices de ramos contendo duas a três folhas novas foram cortados com bisturi e imediatamente imersos em água. Sob água foram cortados novamente. Rapidamente, cada ápice cortado foi colocado em Eppendorfs contendo tampão fosfato 25 mM, pH 7, e 0,01 M de ácido aminooxy-acético (AOA) e 0,1 M de 2-deoxi-D-glucose (2DG), que inibem, respectivamente, a biossíntese de celulose e lignina. Após verificar que o volume do tampão diminuía, ou seja, que o ramo transpirava, retirou-se com pipeta o máximo possível de tampão e adicionou-se o 25 μl de ^{14}C -manose (5 μCi , radioatividade específica de 314 mCi/mmol, Amersham Pharmacia) diluídos

em 200 µl do tampão fosfato com inibidores. Após quase total absorção dessa mistura, voltou-se a fornecer somente tampão, sem inibidores. Os ramos foram então mantidos por 24 h em câmara com luz constante ($300 \mu\text{mols f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$). O material foi separado em folhas, pecíolos e caule, e então extraídos para vários açúcares. Após maceração em mortar, fez-se primeiramente quatro extrações com etanol 80%. Na última fração já não se detectava a presença de açúcares solúveis. As quatro frações foram combinadas e denominadas de fração etanólica. O material recuperado foi então extraído duas vezes com 90% dimetilsulfóxido (DMSO) por 24 h para remoção de amido. O resíduo foi extraído com ácido oxálico 1 M por duas vezes por 24 h para remoção de pectinas. O resíduo foi extraído por duas vezes com 6 M NaOH, contendo 0,1% de borohidreto de Na, para remoção de hemicelulose.

4.4.3. Análise dos açúcares solúveis e radioatividade específica na fração etanólica, por HPLC, em material alimentado com ^{14}C -manose

Para a quantificação de açúcares solúveis da fração etanólica, os extratos foram secos em speed vac (Savant) e na seqüência solubilizado em água. Aliquotas foram aplicadas em HPLC acoplado a um detector de radioatividade (RM). Usou-se coluna NH_2 para a separação e água como eluente, no fluxo de 1 ml/min. As mesmas amostras foram aplicadas (mesma quantidade que aquelas aplicadas em HPLC-RM) em HPLC acoplada com detector eletroquímico (PAD). Neste caso usou-se uma coluna de fase reversa C_{18} RCX-10 (Eppendorf) e 30 mM NaOH como eluente, com fluxo de 0,8 ml/min. Assim, pode-se estimar a quantidade de açúcares e a radioatividade contida neles (expressa por cpm/µmol de açúcar), ou seja a radioatividade específica.

4.4.4. Dosagem de açúcares solúveis na seiva de PS e PD

Seivas de PS e PD foram centrifugadas e aplicadas diretamente em HPLC acoplada com detector eletroquímico (PAD), usando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ RCX-10 (Eppendorf) e 30 mM NaOH como eluente, com fluxo de 1 ml/min.

4.4.5. Dosagens das atividades de invertase ácida e sacarose sintase

Para atividade das invertases ácidas (InvA), as proteínas foram extraídas de pecíolos de PD e PS previamente macerados em nitrogênio líquido, utilizando-se tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, contendo 2 mM MgCl₂, 5 mM EDTA e 10 mM β-mercaptoetanol. Para a extração de Sacarose sintase (Susy), utilizou-se TRIS 200 mM, pH 8, contendo 2 mM MgCl₂, 5 mM EDTA e 10 mM β-mercaptoetanol. Para cada 1 g de material adicionou-se 5 a 7 ml de tampão de tampão, 4°C. Os extratos foram deixados em gelo por 30 min, com agitação ocasional, e depois centrifugados a 15.000 rpm a 4°C, por 15 min. Os sobrenadantes foram recuperados e filtrados em colunas PD10-Sephadex G25 (Amershan). A eluição das proteínas foi feita com tampão fosfato 25 mM, pH 7, 0, para InvA, e TRIS 100 mM, pH 8, para Susy. Nos extratos protéicos filtrados foram determinadas as concentrações de proteínas (Bradford, 1976). O meio de reação padrão para a dosagem de InvA foi 100 µg de proteína, 100 µl de sacarose 1 M, diluída em tampão 50 mM citrato-fosfato, pH 4,5, e o volume ajustado para 1 ml com tampão 50 mM citrato-fosfato, pH 4,5. Após incubação por 60 min a 37°C, quantificou-se os açúcares redutores (AR) formados (Somogy, 1952). A dosagem de atividade de Susy foi na direção de síntese de sacarose. A composição do meio de reação padrão foi 75 µg de proteína, 20 µl de UDPG 100 mM, 20 µl de frutose 100mM e o volume ajustado para 1 ml com tampão Tris 200 mM, pH 6,0. A

incubação foi de 60 min a 30°C e determinou-se a sacarose formada na reação (Van Handel, 1968).

4.4.6. Análise de macro e micronutrientes nas folhas e pecíolos

Folhas e pecíolos de plantas saudáveis e plantas doentes foram coletadas e analisadas para macro e micro nutrientes no Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo S/C Ltda.

4.4.7. Determinação de ácidos orgânicos na seiva do xilema por HPLC

Utilizou-se o método de Seden *et al.*, (1992), no qual 30 µl de seiva de cada tratamento foram injetados em HPLC-Shimadzu, sendo separados com coluna C18 Microsorb-MT (12,5 mm x 4 mm, 5 µm) e a detecção feita em detector de diodo Shimadzu (SPD-M 10A). A eluição foi isocrática utilizando-se tampão 0,05 M de KH₂PO₄/H₃PO₄, pH 2,3, com fluxo de 0,5 ml/min e detecção no comprimento de onda de 214 nm. A identificação foi feita por comparação com padrões puros de ácido cítrico, málico e succínico.

4.4.8. Crescimento de Xf em meios sólidos com diferentes fontes de carbono

Para o cultivo de Xf em meio sólido com diferentes fontes de carbono, foram testadas 11 combinações diferentes de fontes de carbono. O meio utilizado como padrão foi o XfD-2 (Almeida *et al.*, 2004). Nos tratamentos os ácidos succínico e cítrico, fontes de carbono no meio XfD-2 (Controle), foram substituídos por: **1)** glicose 1 g/L; **2)** glicose 4 g/L; **3)** citrato 3 g/L + glicose 2 g/L; **4)** citrato 2 g/L e glicose 3 g/L; **5)** sacarose 1 g/L; **6)** parede celular de café 1 g/L; **7)** citrato 3 g/L; **8)** citrato 6 g/L; **9)** sacarose 3 g/L; **10)**

succinato 3 g/L + citrato 3 g/L; **11)** citrato 3 g/L + sacarose 1,5 g/L. Também foi testado um tratamento com o fornecimento de **12)** parece celular extraída de folhas de café (Mazzafera, dados não publicados). Células da bactéria foram obtidas junto ao Centro de Citricultura do IAC, junto com o Dr. Marcos Machado. As placas foram inoculadas e mantidas em estufa a 30°C e avaliadas semanalmente por período de 45 dias. Foram feitas 5 repetições por tratamento.

4.4.9 Imunolocalização de pectinas utilizando microscopia confocal

Para observações da estrutura da parede celular de PS e PD, pecíolos foram fixados em FAA, transferido para álcool butílico 70%, desidratado pela série butílica (Johansen, 1940) e incluído em parafina. Com o uso de micrótomo rotativo, cortes seriados longitudinais e transversais foram obtidos com espessura de 12 a 16 µm. Para imunolocalização de pectinas as reações foram realizadas com os anticorpos Jim 5 e Jim 7 (gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Knox, PlantProbes) e observadas em microscópio confocal. A fixação e corte do material foi feita no Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, sob a orientação da Profa Dra Sandra Maria Carmelo Guerreiro, enquanto as reações com anticorpos e observação no microscópio confocal foram orientadas pelo Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp. As reações com os anticorpos foram reveladas utilizando-se anticorpo secundário Igh anti-rato conjugado com fluoresceína.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Xylella fastidiosa (Xf) é uma bactéria de hábito de crescimento lento formando agregados no interior dos vasos do xilema, os quais são constituídos de uma matriz extracelular rica em polissacarídeos produzida pela bactéria, denominada de goma fastidiana (Leite *et al.*, 2001).

Uma hipótese para explicar qual a fonte de carbono utilizada pela bactéria para a manutenção do seu metabolismo energético e formação do biofilme é a obtenção de carbono de compostos que circulam pela seiva do xilema, por exemplo, ácidos orgânicos, açúcares solúveis, ou mesmo compostos liberados da parede celular das células do xilema que estão em contato com as fibras carregadas negativamente do biofilme.

Para verificar a presença de açúcares na seiva do xilema de plantas de citros infectadas por Xf e saber se de alguma forma a bactéria utiliza esses açúcares, se comportando como um dreno, foram realizadas análises da seiva de plantas saudáveis e plantas doentes em HPLC (figura 1 e 2).

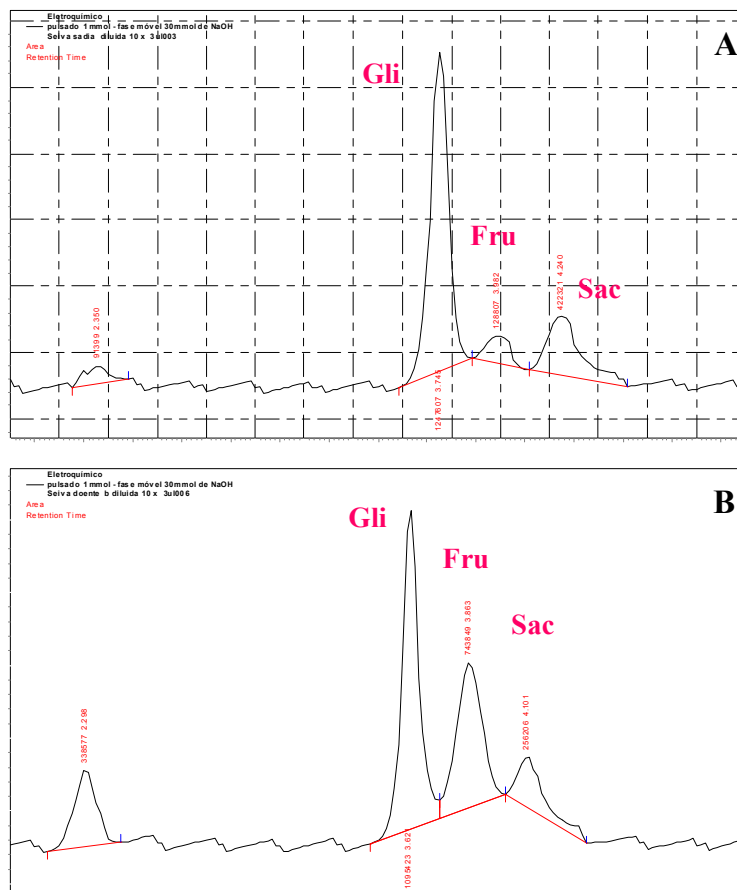


Figura 1. Perfil de eluição de açúcares solúveis presentes na seiva, utilizando coluna de fase reversa C18 RCX 10 e 30mM de NaOH como eluente. A detecção foi feita em detector eletroquímico. A) Planta sadia; B) Planta doente.

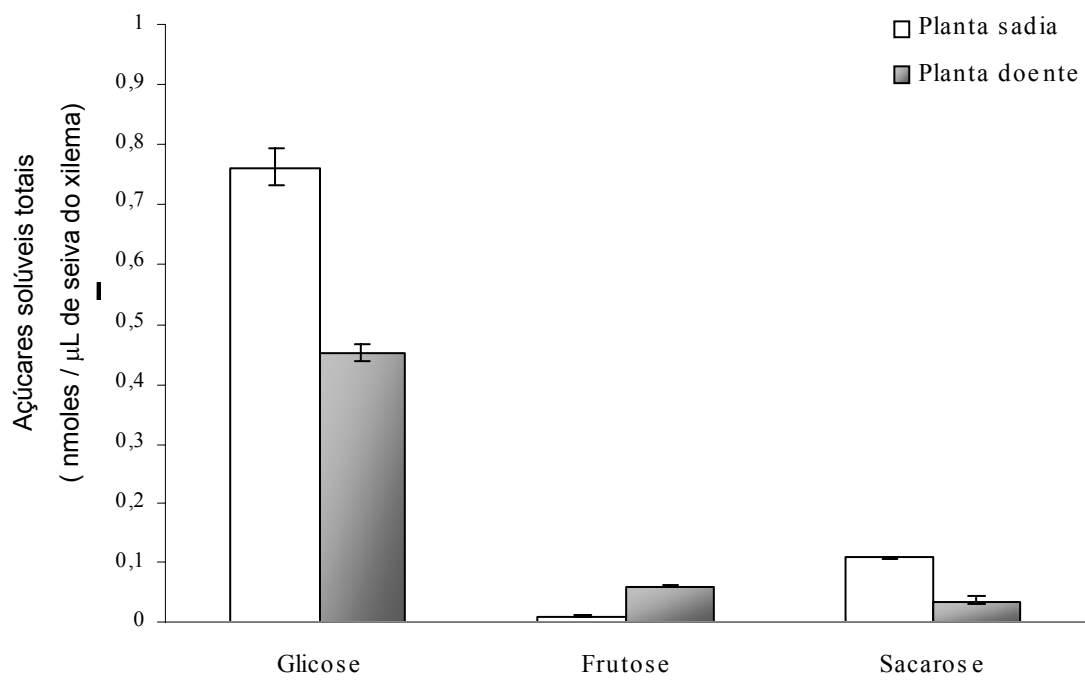


Figura 2. Concentração de açúcares solúveis totais nas seivas dos xilemas de plantas saudáveis e plantas doentes.

Analisando a figura 2 podemos verificar que a seiva de plantas sadias além de apresentar maior concentração de açúcares solúveis totais, quase duas vezes a mais que a concentração encontrada na seiva de plantas doentes, a maior parte desses é glicose, seguida por sacarose, sendo encontrado bem menos frutose. A seiva de PD apresenta menor concentração de glicose, acompanhada de frutose e glicose.

Análises quantitativa e qualitativa de açúcares nos pecíolos e caules de PS e PD também apresentaram diferenças como pode ser visualizado na figura 3. Nestas amostras, além da quantificação dos açúcares, foram medidas as radioatividades específicas, pois foram extraídas de ramos tratados com ^{14}C -manose.

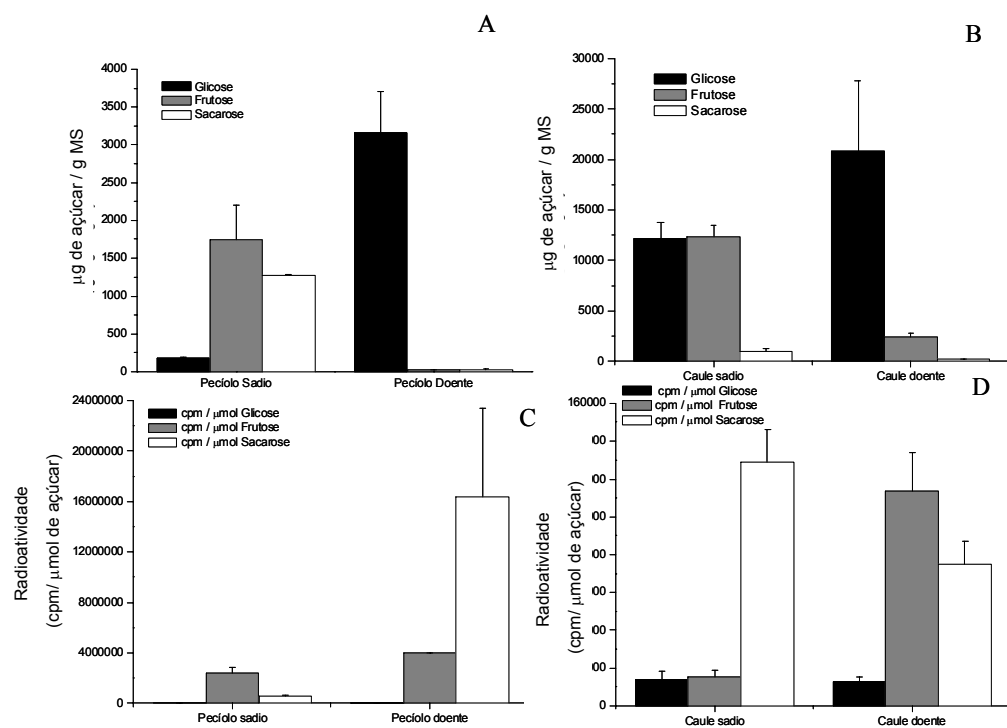


Figura 3. Quantificação de açúcares e radioatividade específica em pecíolos e caule de plantas de citros tratadas com manose marcada: A) Açúcares do pecíolos; B) Açúcares do caule; C) Radioatividade específica de açúcares do pecíolo; d) Radioatividade específica de açúcares do caule.

Ao contrário do verificado para seiva, nas amostras de pecíolos e caules não encontramos grandes diferenças no total de açúcares solúveis, mas em compensação o perfil qualitativo mostrou-se completamente diferente. Glicose foi o principal açúcar encontrado tanto em pecíolos como nos caules de plantas doentes, sendo frutose e sacarose encontradas em quantidades muito pequenas. Por outro lado, amostras de pecíolos sadios apresentaram conteúdo de frutose e sacarose semelhantes, e traços de glicose. No caule dessas plantas a distribuição de glicose foi semelhante a frutose e detectado traços de sacarose. Verificamos que a radioatividade específica encontrada em glicose nas amostras de PD é quase nula, sendo interessante destacar os maiores valores de radioatividade específica encontrados em frutose e, principalmente, sacarose nas amostras de pecíolos e caules de plantas doentes, lembrando que estes açúcares não fazem parte da goma fatidiana. A maior radioatividade encontrada nesses açúcares pode ser em decorrência da conversão de ^{14}C -manose em frutose, a qual pode ser destinada à síntese de sacarose. Por outro lado, a pequena radioatividade específica em glicose demonstra uma ciclagem grande pelo pool desse açúcar redutor, ou melhor, existe uma grande demanda por ele. Isto poderia ser indicativo de que estaria sendo consumido pela bactéria.

Com base nesses resultados, podemos pressupor que Xf provoca alterações no metabolismo de açúcares de plantas de citros. Outro fato é que glicose mesmo não sendo a principal forma, é sim, utilizada como fonte de carbono pela bactéria.

Um dos principais meio de cultura desenvolvido para o cultivo da Xf é o meio “Periwinkle Wilte” (PW), o qual tem a composição baseada em um meio original desenvolvido por Davis *et al.* (1978). O meio PW, assim como outros meios dos quais este é a base, são ricos em fonte de carbono, mas tem como inconveniente a presença de componentes não definidos como, por exemplo, a pepitona, o que dificulta a investigação da

participação de outros componentes do meio nas vias metabólicas. Atualmente já existem meios de composição definida, como o Xf-26 desenvolvido por Chang & Donaldson, (1993), constituído de dois ácidos tricarboxílicos além de sais inorgânicos, dezessete aminoácidos e amido. O desenvolvimento de meios de composição definida com base na sequência do genoma de Xf também tem permitido o estudo de substâncias requeridas para a manutenção da nutrição da bactéria (Lemos *et al.*, 2003).

Almeida *et al.*, (2004) testaram diferentes meios de cultivo de composição definida, produzidos a partir de alterações na composição do meio XfD2. Estes autores descrevem que a principal fonte de carbono utilizada pela bactéria é o citrato. Ácidos orgânicos também têm sido considerados como uma importante fonte de carbono para Xf (Davis *et al.*, 1981), mas esta bactéria possui sequências de genes que codificam todas as vias metabólicas importantes para utilização de substratos simples como os carboidratos, principalmente glicose. Esse açúcar é apontado por Lemos *et al.*, (2003) como importante fator para o crescimento da bactéria, enquanto Almeida *et al.*, (2004) sugerem que o metabolismo de carbono é mais direcionado para o uso de ácidos orgânicos, pelo fato da concentração de glicose ser baixa na seiva do xilema.

Os resultados das análises de ácidos orgânicos apresentaram diferenças bastante contrastantes quando comparadas PS com PD que apresentavam sintomas (DCS-Doente com sintoma) e com PD com Xf, mas que não apresentavam sintomas (DSS-doente sem sintoma) (figura 4).

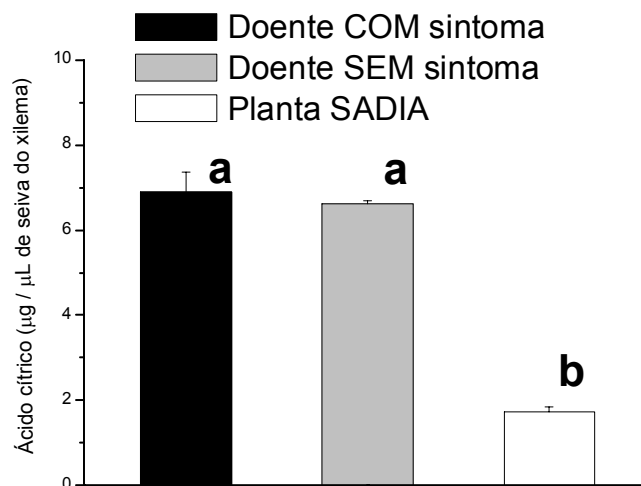


Figura 4. Teor de Ácido cítrico na seiva de xilema de plantas saudáveis (PS) , Plantas doentes com sintoma (DCS), Plantas doentes sem sintomas (DSS)

Independente da ocorrência de sintomas, plantas doentes apresentaram maior concentração de ácido cítrico, o que pode ser uma vantagem estratégica para *Xf*, aumentando a capacidade de aquisição de energia.

Outro fator que pode estar relacionado com a maior concentração de citrato na seiva de plantas infectadas são alterações na dinâmica do íon ferro, pois estudos sobre nutrição mineral relatam que plantas que apresentam deficiência em relação a esse micronutriente têm elevado teor de citrato no xilema, pois esse íon é complexado com o ácido para ser transportado (Alam *et al.*, 2001; Abadia *et al.*, 2002). Alterações nas concentrações desse micronutriente foram confirmadas como podemos constatar na figura 5.

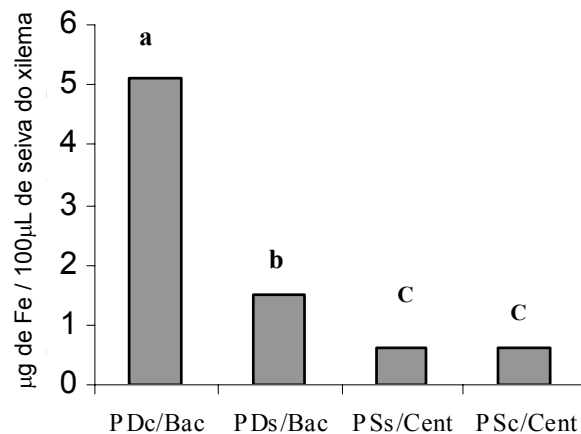


Figura 5. Concentração do íon Fe^{+2} , na seiva do xilema de plantas doentes sem centrifugação para remoção da bactéria (PD c /Bac), após centrifugação para remoção da bactéria (PD s/ Bac), Plantas sadias sem centrifugação (PS s / cent), Planta sadias após centrifugação (PS c / cent).

A concentração desse íon foi maior tanto na seiva de PD não centrifugadas para eliminação da bactéria como após a centrifugação, o que nos leva a concluir que existe algum mecanismo de retenção desse elemento pela bactéria. A participação desse íon também foi evidenciada por Almeida *et al.*, (2004). Estes autores relataram que na ausência de cloreto de hemina não ocorre o crescimento de células de Xf.

Os resultados de análise foliar de micronutrientes (figura 6) reforçam a hipótese da importância e da existência de algum mecanismo de retenção do ferro para o crescimento da bactéria, pois verificamos que a concentração desse íon é significativamente menor em plantas com CVC, assim como acontece para os elementos, Mn e Cu.

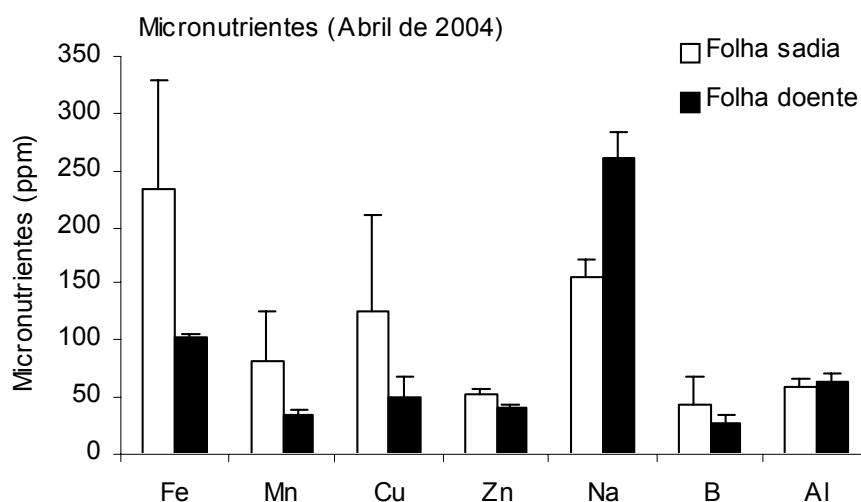


Figura 6. Concentração de micronutrientes em folhas de plantas saudáveis e folhas de plantas doentes.

Pesquisando a fixação de Xf em vidro Souza *et al.*, (2001) verificaram a expressão diferencial de vários genes, entre eles, alguns relacionados com a absorção de ferro. Também estudos do proteoma de Xf cultivada *in vitro* mostraram a existência de várias proteínas envolvidas na absorção e armazenamento de Fe^{+2} . Uma indicação da importância do Fe^{+2} para o crescimento e estabelecimento da bactéria foi demonstrada por um ensaio com plantas de tabaco infectadas com Xf, onde apenas o suprimento de FeSO_4 foi suficiente para reduzir os sintomas de infecção (Torres *et al.*, 2002).

Na tentativa de esclarecer melhor a questão a respeito de qual a principal fonte de carbono utilizada pela bactéria, resolvemos realizar um experimento que combinasse os dados disponíveis na literatura sobre o cultivo de Xf com os dados obtidos da quantificação

de açúcares solúveis e ácido orgânicos na seiva. Utilizamos como padrão o meio XFD-2 (Almeida *et al.*, 2004).

Nas figuras 7 e 8 são mostrados o crescimento de células de Xf em meio sólido com diferentes concentrações e combinações das seguintes fontes de carbono: concentrações de glicose, sacarose, parede celular extraídas de células de café, e citrato.

O maior crescimento foi evidenciado nas placas onde a única fonte de carbono foi, glicose na concentração de 1 g/L (figura 7B), mostrado não só pelo número de colônias (pontuações brancas), como também pela tamanho delas. Também podemos observar bom crescimento nos meios com sacarose combinada com citrato nas concentrações de 3g/L de cada fonte de carbono (figura 7D) e citrato na concentração de 3 g/L (figura 8H). Ainda assim, o crescimento foi melhor com glicose 1 g/L. Glicose e citrato sozinhos nas concentrações de 4 g/L e 6 g/L, respectivamente, promoveram menor crescimento ou até mesmo a inibição (figura 7E e figura 8K). Isto ocorreu provavelmente devido ao efeito destas concentrações na diminuição do potencial do potencial osmótico dos meios.

No meio onde a fonte de carbono utilizada foi parede celular de café houve algum crescimento, mas de difícil visualização pela foto, pois parte do material de parede não solubilizou, interferindo na imagem.

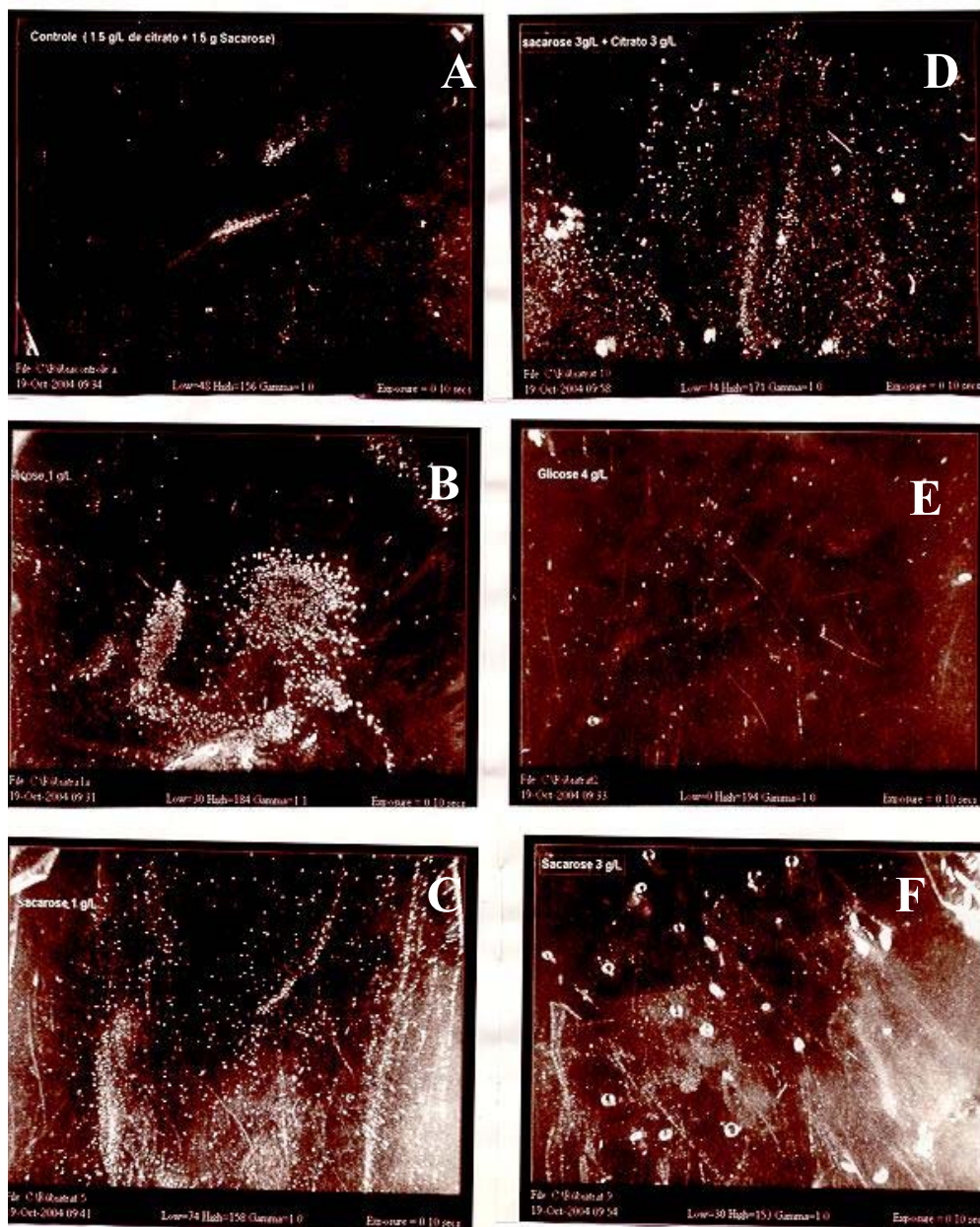


Figura 7. Fotos das placas de cultivo de *Xylella fastidiosa* mostrando o crescimento da bactéria em meios constituídos com diferentes fontes de C. A) Controle, XDf-2 (1,5 g/L de citrato + 1,5 g/L de sacarose); B) Glicose 1,0 g/L; C) Sacarose 1,0 g/L; D) Sacarose 3 g/L + citrato 3 g/L; E) Glicose 4 g/L; F) Sacarose, 3 g/L.

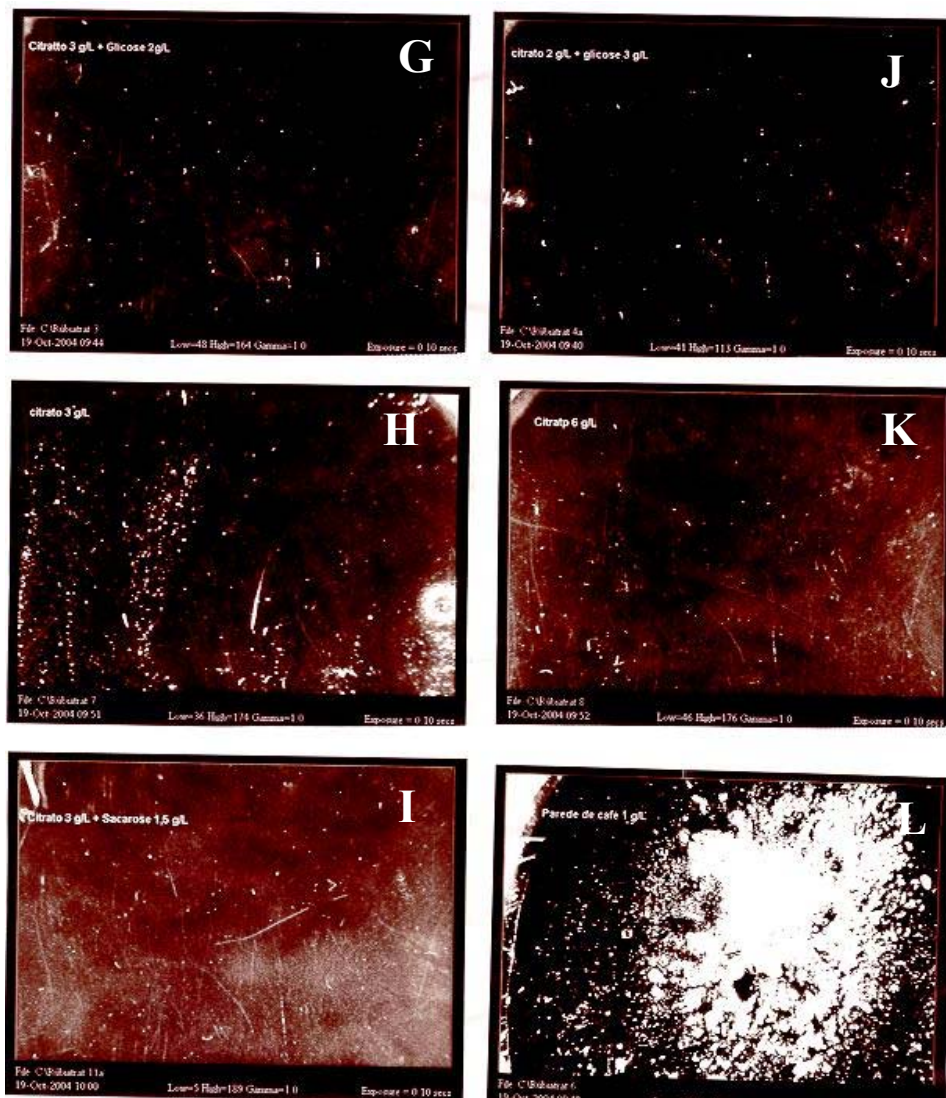


Figura 8. Fotos das placas de cultivo de *Xylella fastidiosa* mostrando o crescimento da bactéria em meios constituídos com diferentes fontes de C. H) Citrato 3 g/L + glicose 2 g/L; I) Citrato 3 g/L; J) Citrato 3 g/L + Sacarose 1,5 g/L ; K) citrato 6 g/L; L) Parede de café (1 g/L).

Portanto, os dados desse experimento vêm em suporte às informações obtidas nas análises bioquímicas da seiva do xilema e de tecidos de PS e PD, de que glicose pode ser, sim, fonte de carbono para o crescimento da bactéria, se não a principal.

Sendo assim, é possível que a composição química da seiva do xilema seja determinante para a agregação e formação do biofilme na planta. Com isto, podemos então inferir que *Xf* pode utilizar ácidos orgânicos e glicose como fontes de carbono e que essas substâncias são destinadas para utilização distintas. Ácidos orgânicos favorecem a formação do biofilme e agregação bacteriana enquanto glicose estimula o crescimento da bactéria.

Achamos importante complementar nosso trabalho com a determinação da atividade das enzimas Susy e InVa, que são enzimas envolvidas no metabolismo de sacarose. As invertases catalisam a degradação da sacarose por meio de uma reação irreversível. Existem como diferentes isoformas, sendo classificadas de acordo com o pH no qual apresentam maior atividade e pela localização celular. Dentre as isoformas, são conhecidas as invertases ácidas, que se encontram ligadas à parede celular e que são armazenadas no vacúolo. Alguns trabalhos demonstram que Susy está associada ao desdobramento de sacarose para a síntese de celulose na parede celular (Tanase & Shohei, 2000), estando intimamente associada à membrana plasmática e microtúbulos, próximos aos locais de deposição de celulose durante a formação da parede celular secundária nos traqueídeos (Salnikov *et al.*, 2001; Konishi *et al.*, 2004).

O sistema vascular de citros não apresenta separação definida entre os xilemas primário e secundário (comunicação pessoal da Pesquisadora Raquel Queiroz, do Instituto Agrônomo de Campinas). Estes fatos nos levaram a questionar se existiria a possibilidade

da sacarose sintetizada nas células do pecíolo ser liberada no apoplasto e consequentemente utilizada pela bactéria.

Podemos verificar na figura 9 que as InVa apresentaram maior atividade que Susy, mas a atividades das enzimas não apresentaram diferenças significativas entre pecíolos de PS e pecíolos de PD. Foi detectada uma variação muito grande entre as repetições da Susy.

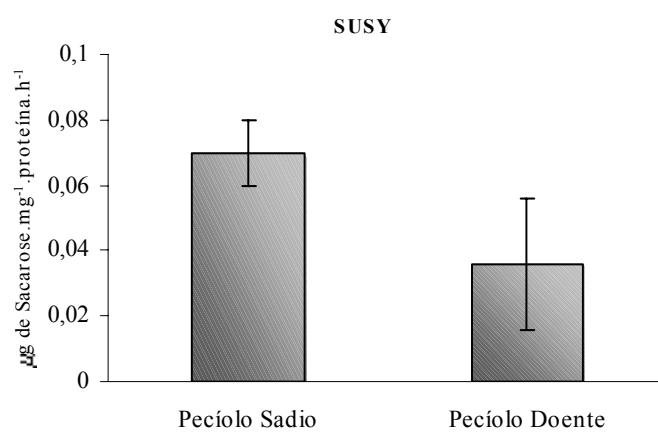
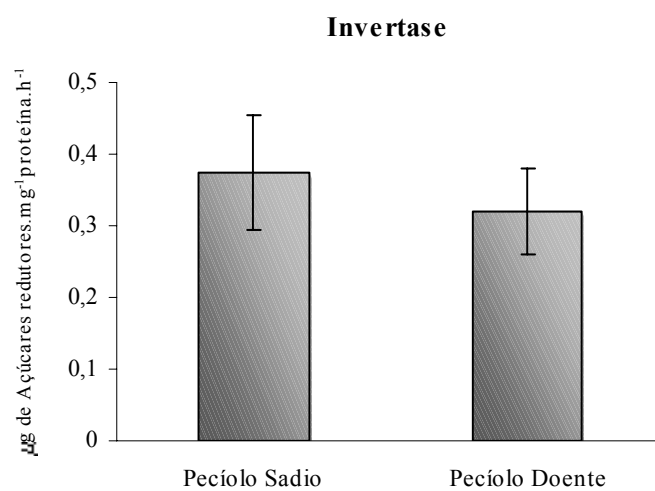


Figura 9. Atividades das enzimas do metabolismo da sacarose: A) Invertase Ácida (InVa); B) Sacarose sintetase (susy)

Esses resultados esclareceram que ao contrário do proposto quando resolvemos investigar a atividade dessas enzimas, que a infecção pela bactéria não interfere no metabolismo de sacarose das células do pecíolo. Sendo assim mais uma vez podemos argumentar que as fontes de carbono utilizadas pela bactéria são principalmente os ácidos orgânicos e glicose transportada na seiva do xilema.

Xf encontra-se aderida às paredes celulares dos vasos do xilema. Portanto, a caracterização de alterações na parede celular das células que compõem esse tecido podem contribuir para o entendimento da nutrição da bactéria e o processo de colonização no desenvolvimento na doença.

A parede celular é formada por polissacarídeos estruturalmente diferentes que se arranjam de forma complexa. Entre as atividades atribuídas a parede está o armazenamento de carboidratos e a liberação de moléculas sinalizadoras.

Investigamos alterações nos componentes da parede celular tentando entender a relação destas com a infecção causada por Xf. As fotografias com os resultados de imunomarcação são vistas nas figuras 10 e 11.

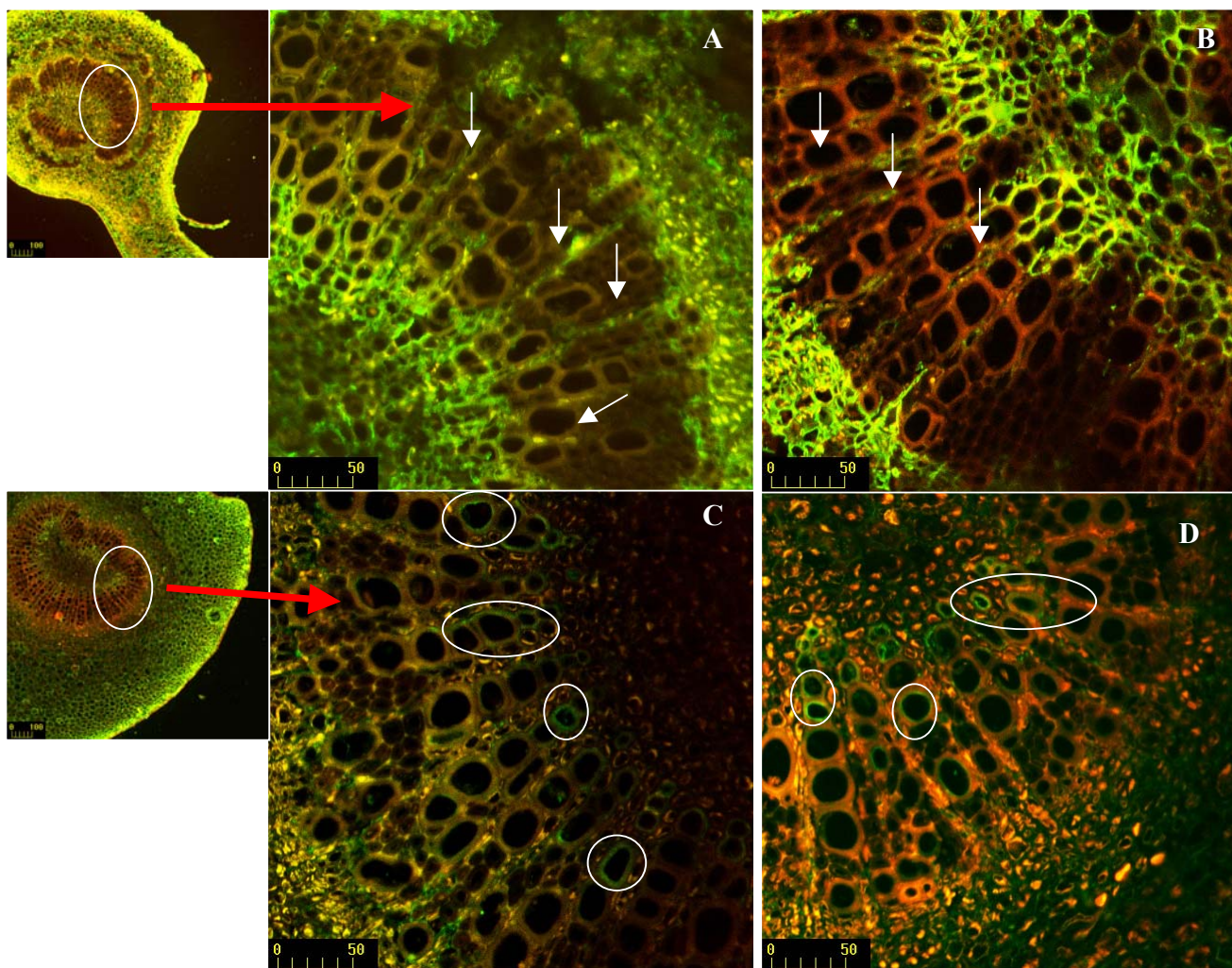


Figura 10. Fotomicrografias em microscópio confocal de cortes transversais de pecíolos após reação com anticorpo monoclonal JIM 5, o qual reconhece epítomos não esterificados ou de baixa esterificação de homogalacturonanas: A) e B) Pecíolos de plantas doentes (PD); C) e D) Pecíolos de plantas sadias

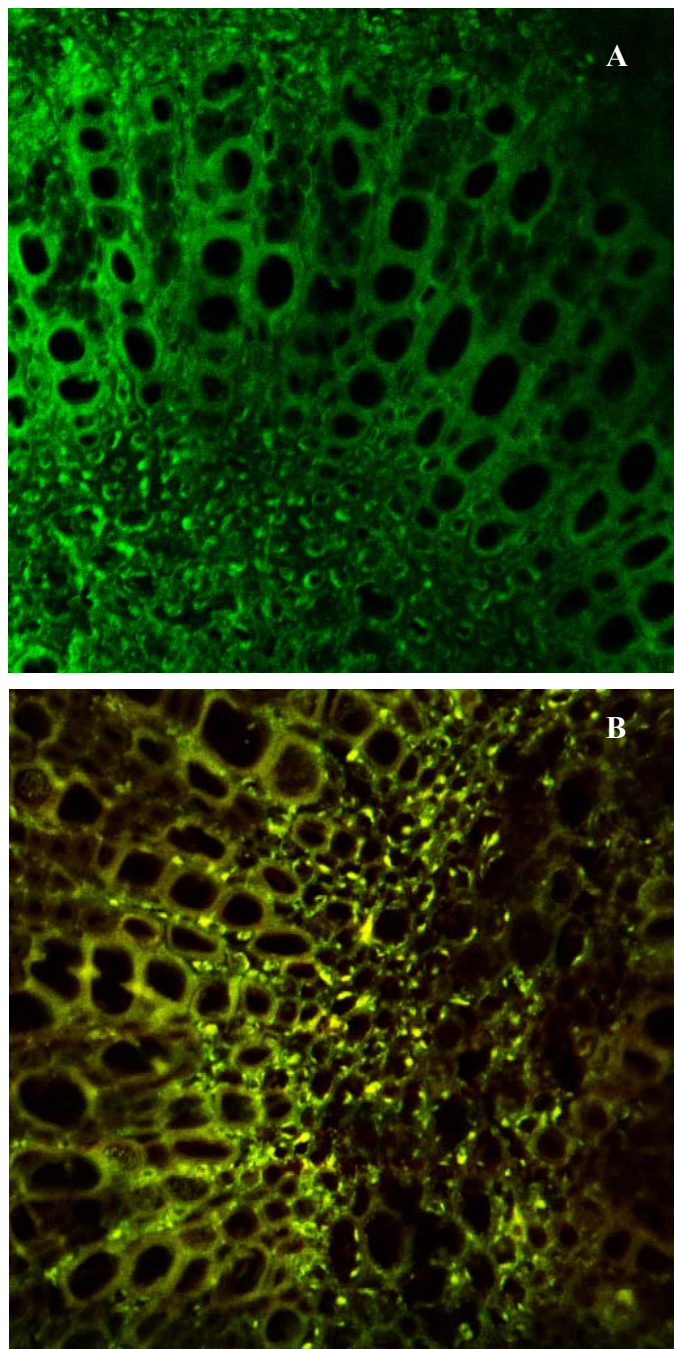


Figura 11. Fotomicrografias em microscópio confocal de cortes transversais de pecíolos após reação com anticorpo monoclonal JIM 7, o qual reconhece epítomos esterificados de homogalacturonanas: A) Planta sadia; B) Planta doente.

Utilizamos dois anticorpos que reconhecem homocagalacturonanas (HG), um dos principais constituintes da fração pectina da parede celular. Esses anticorpos reconhecem epítomos com diferenças no grau de metilesterificação. O anticorpo Jim 5 é capaz de reconhecer polissacarídeos HG não esterificados ou com baixo grau de esterificação, enquanto JIM 7 reconhece HG com alto grau de metilesterificação. As reações com os anticorpos foram reveladas utilizando anticorpo secundário Igh anti-rato conjugado com fluoresceína. Assim, nos locais onde aconteceram reações com os anticorpos verificamos a coloração verde, enquanto a região vermelha é devida a fluorescência natural do material.

Nos cortes transversais de pecíolos após imunolocalização com o anticorpo JIM 5 (figura 10) podemos visualizar maior marcação nas regiões da epiderme e do córtex, estando estas menos presentes na região dos elementos de vasos. Esse padrão não sofre alterações marcantes quando comparamos PS com PD, mas em contrapartida podemos notar que quando presente a marcação nos elementos de vaso do xilema de PS, ocorre de forma contínua em toda parede celular (círculos brancos nas figuras 10C e 10D) e tem intensidade uniforme entre os elementos de vasos mais internos e aqueles localizados na parte externa do corte. Nas PD essa marcação ocorre na forma de pontos (setas brancas nas figuras 10A e 10B) e de forma mais intensa nos vasos localizados no interior.

De outra maneira, podemos verificar nas fotografias onde a imunolocalização foi realizada com anticorpo JIM 7 forte marcação em todos os tecidos, inclusive nos elementos de vasos (figura 11). Fica claro, também, que existe diferença na marcação encontrada em PS e PD. Nas PS a marcação é contínua, enquanto nas PD a marcação ocorreu na forma de pontos, com intervalos na parede, assim como a descrita para JIM 5. Esse perfil de marcação encontrado nos elementos de vasos de PD revela provável

degradação de pectinas nessas células o que parece refletir na formação ou estruturação dos elementos de vasos, pois enquanto esses são uniformes nas PS, encontram-se bastante desorganizados nas plantas doentes.

Resultados semelhantes de degradação da parede celular de elementos de vasos de pecíolo de laranjeiras com CVC foram relatados por Alves (2003), que por microscopia de transmissão com imunocitoquímica demonstrou em cortes transversais a presença de bactérias próximas a região das pontuações e verificou nesse local a ausência da lamela média e parede primária. Estudos de imunolocalização com JIM 5 tem mostrado uma maior marcação com esse anticorpo na região da lamela média e entre os espaços intercelulares (Knox, 1990). Assim, é provável que o padrão de pontuações encontrado na marcação com os anticorpos JIM 5 e JIM 7 nos elementos de vasos de PD ocorra em função da degradação das pectinas, o que pode levar a ausência das diferentes camadas da parede celular e conseqüente desorganização dos elementos de vasos. Nas imagens podemos constatar maior desorganização dos vasos na parte mais externa do xilema e, de acordo com Alves (2003), os elementos de vasos dessa região são os que apresentam maior número de bactérias, e boa parte desse são pontuados. Uma explicação para esta localização preferencial da bactéria consiste no fato das paredes dessas células apresentarem maior concentração de lignina e características de condutividade hidráulica diferenciada (Leperem *et al.*, 2000).

Analizamos também o rendimento da diferentes frações obtidas no processo de fracionamento da parede celular de pecíolos e caules de PS e PD, (oxalato de amônio, NaOH 0,1 M, NaOH, 1M; NaOH, 4,0 M). Antes de começarmos o fracionamento da parede raspamos as camadas mais externas na intenção de deixarmos somente a região onde está localizado o xilema. Talvez esta seja a razão de termos obtido baixo rendimento

na fração oxalato de amônio, a qual extrai grande parte das pectinas solúveis, com médias de 1,39% e 0,75 % nos pecíolos e caules de PS respectivamente e 1,88% e 1,69% nas PD. Nas frações NaOH (0,1M), NaOH (1M) e (4M) o rendimento aumentou consideravelmente. Temos que esclarecer que na fração NaOH (0,1 M) são extraídas pectinas metilesterificadas, e o aumento no rendimento está de acordo com os resultados encontrados na distribuição dos anticorpos JIM 5 e JIM 7, confirmando que os elementos de vasos apresentam maior proporção de pectinas metilesterificadas. Nessa fração, quando comparamos PS e PD o rendimento foi pouco menor nos pecíolos de PD, o que confirma alterações na fração pectina da parede celular de PD. Na fração NaOH 1,0 M é extraída uma mistura de hemiceluloses e pectinas que se encontram fortemente ligadas a hemicelulose. Na fração NaOH (4,0M) são extraídas somente hemiceluloses.

Na tabelas encontradas a seguir estão distribuídos os principais monossacarídeos que constituem as frações pectina e hemicelulose da parede celular de amostras de pecíolos e caules de PS e PD.

Tabela 1. Proporção de monossacarídeos na fração oxalato (pectinas solúveis) de pecíolos de plantas sadias e plantas com CVC. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

Monossacarídeos (% do total)	Pecíolos sadios	Pecíolos doentes
Fucose	-	-
Ramnose	3,51	3,84
Arabinose	3,51	19,05
Galactose	73,80	9,50
Glucose	21,40	59,77
Xilose	-	7,81
Manose	-	-

Tabela 2. Proporção de monossacarídeos na fração Oxalato (pectinas solúveis) de caules de plantas sadias e plantas com CVC. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

Monossacarídeos (% do total)	Caule sadio	Caule Doente
Fucose	-	-
Ramnose	3,59	3,64
Arabinose	6,19	8,92
Galactose	71,5	60,9
Glucose	17,42	21,40
Xilose	1,22	2,75
Manose	-	2,97

Tabela 3. Proporção de monossacarídeos na fração NaOH (0,1M) (pectinas metil - esterificadas) de pecíolos de plantas sadias e plantas com CVC. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

Monossacarídeos (% do total)	Pecíolos sadios	Pecíolos doentes
Fucose	-	-
Ramnose	3,23	1,96
Arabinose	17,0	6,13
Galactose	47,92	54,51
Glucose	30,70	37,04
Xilose	0,80	-
Manose	-	-

Tabela 4. Proporção de monossacarídeos na fração NaOH (0,1M) (pectinas metilesterificadas) de caules de plantas saudas e plantas com CVC. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

Monossacarídeos (% do total)	Caules saudas	Caules doentes
Fucose	-	-
Ramnose	2,02	2,70
Arabinose	4,50	7,35
Galactose	41,88	30,47
Glucose	51,41	58,9
Xilose	0,89	-
Manose	-	-

Tabela 5. Proporção de monossacarídeos na fração NaOH (4,0 M) (Hemiceluloses) de pecíolos de plantas saudas e plantas com CVC. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

Monossacarídeos (% do total)	Pecíolos saudas	Pecíolos doentes
Fucose	-	-
Ramnose	4,00	3,97
Arabinose	23,66	23,80
Galactose	8,24	30,54
Glucose	25,62	40,25
Xilose	38,46	1,42
Manose	-	-

Tabela 6. Proporção de monossacarídeos na fração NaOH (4,0 M) (Hemiceluloses) de caules de plantas saudas e plantas com CVC. Os dados foram obtidos por cromatografia de alta performance (HPLC-Dionex) com detecção por pulso amperométrico. Os dados são expressos em porcentagem do total de monossacarídeos detectados.

Monossacarídeos (% do total)	Caules saudas	Caules doentes
Fucose	-	-
Ramnose	3,99	4,84
Arabinose	3,99	4,84
Galactose	51,93	45,4
Glucose	43,74	47,79
Xilose	0,89	0,96
Manose	-	-

Constatamos que na fração oxalato (pectinas solúveis, Tabelas 1 e 2), os monossacarídeos encontrados em maior quantidades nos pecíolos de PS foram galactose e glicose, nas proporções de 73,8% e 21,4%, respectivamente. Curiosamente, nos pecíolos de PD enquanto a quantidade de galactose caiu drasticamente para cerca de 9,5%, a quantidade de glicose aumentou consideravelmente para cerca de 59%, e ao mesmo tempo arabinose apareceu em quantidade relevante, cerca de 19% (Tabela 1). No caule os monossacarídeos encontrados em maior quantidade nessa fração foram também galactose seguido de glicose (Tabela 2), mas contrário do verificado nos pecíolos essas proporções não se diferenciaram de forma marcante quando comparamos PS e PD, embora a tendência tenha sido redução de galactose e pequeno aumento de arabinose e glicose nas PD, assim como aconteceu no pecíolo.

Na fração NaOH 0,1M (Tabelas 3 e 4), galactose e glicose também foram os monossacarídeos encontrados em maior proporção nos pecíolos de PD, embora a proporção desses dois monossacarídeos tenha sido levemente mais elevada a diferença não foi tão evidenciada.

Não mostramos aqui a tabela referentes ao fracionamento com NaOH (1M), uma vez que nessa concentração, como citado anteriormente, se extrai uma mistura de pectinas e hemicelulose.

Em NaOH 4,0 M (Tabelas 5 e 6) altas proporções de glicose (25,62%) e xilose (38,46%) nas PS indicam a presença principalmente de xiloglucanos como principal constituinte da fração hemiceluloses das paredes celulares do elementos de vasos de citrus. A alteração que mais chama atenção na composição dessa fração em PD é a fortíssima redução na concentração de xilose para 1,42 %. A redução desse monossacarídeo em PD

foi acompanhada por aumentos nas quantidades de glucose (40,25%) e galactose (30,54%). É importante destacar que essa redução na concentração de xilose pode ser decorrente da degradação dos xiloglucanos, o que resulta em aumento na concentração de glucose e galactose.

Os xiloglucanos de parede celular de órgãos vegetativos são muito semelhantes aos xiloglucanos de sementes (Hayashi, 1989). Nessa estrutura os xiloglucanos apresentam função de reserva (Buckeridge *et al.*, 1992; Tiné *et al.*, 2000) e sua mobilização é acompanhada por aumento seguido de queda na atividade das enzimas β -galactosidase, β -glucosidase, endo- β -(1-4) glucanase (XET) e α -xilosidase. Como verificamos degradação dos xiloglucanos em PD esperávamos encontrar maior atividade de hidrolases, mas os resultados das atividades de duas dessas enzimas, as exo-O-glicosil hidrolases, β -D-galactosidase e β -D-glucosidase não foram superiores nas PD (figura 12). Essas enzimas atuam sobre poli ou oligossacarídeos a partir da extremidade não redutora, liberando monossacarídeos ou dissacarídeos.

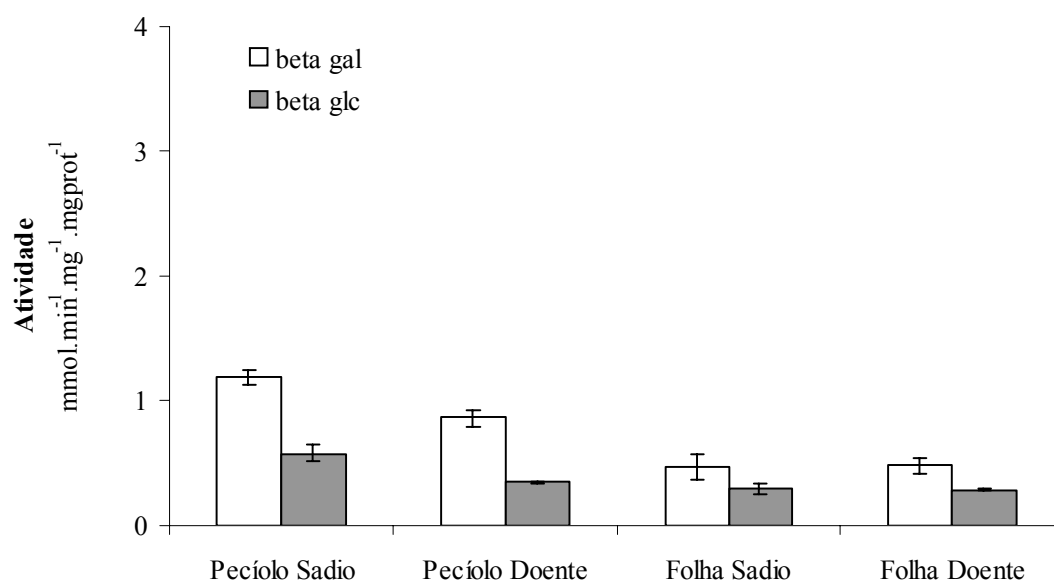


Figura 12. Atividade das hidrolases β -galactosidase (beta gal) e β -glucosidase (beta glc) no extrato bruto de pecíolos e folhas de plantas de citro sadias e com CVC. Os resultados representam a média mais o erro padrão de três determinações

Quando comparamos as duas enzimas, verificamos maior atividade da β -galactosidade, sendo esta maior nos pecíolos e folhas de PS. Como a degradação dos xiloglucanos envolve outras enzimas, os resultados dessas enzimas não são conclusivos, precisávamos ter investigado também a atividade da XET. Trabalhos resultantes do modo de ação da XET (Edwards *et al.*, 1986; Combrie *et al.*, 1998) descrevem um modelo aproximado para degradação de xiloglucanos, onde as quatro enzimas atuam sobre o polímero produzindo galactose, glucose e xilose. A atividade hidrolítica da XET é maior quando os oligossacarídeos de xiloglucanos se encontram em menores concentrações (Fanutti *et al.*, 1993) e na sequência os oligossacarídeos formados são prontamente utilizados pelas exo-glicosídeses. Outro fator que controla a atividade das enzimas envolvidas na degradação do xiloglucano são alterações do pH da parede (Alcantara *et al.*, 1999). Com base nesses conhecimentos podemos sugerir que a constatação da degradação dos xiloglucanos baseada apenas na atividade dessas duas enzimas não foi possível, pois os eventos envolvidos neste são mais complexos e requerem melhor investigação de todas as enzimas envolvidas.

As alterações nas frações, pectinas (homogalacturonanas) e hemiceluloses (xiloglucanos) em plantas doentes apresentadas aqui confirmam que Xf é hábil em degradar a parede celular dos elementos de vasos, resultando na descontinuidade do apoplasto, o que pode levar à maior ocorrência de embolia e cavitação, fatores responsáveis pelo aumento da resistência ao fluxo de água. Esta resistência é um dos principais sintomas apresentados por plantas com CVC.

Outro fator a se considerar além da questão estrutural envolvendo a degradação de paredes dos elementos de vasos de plantas com CVC, que pode estar relacionada com a

nutrição da bactéria, é o fato dos oligossacarídeos (OGAs) originados poderem apresentar atividade biológica (Côté & Hahn, 1994; Côté *et al.*, 1998).

Em casos de infecção por patógenos a primeira alteração na parede celular é a degradação das HG como resultado da atividade de poligalacturonases e endopectatolases secretadas pelos patógenos. Os oligossacarídeos formados podem tanto ser utilizados como fonte de carbono para nutrição do patógeno, como também podem iniciar um via de tradução de sinais que levam ao desenvolvimento de respostas de defesa. Exemplos deste tipo de resposta são o fechamento dos estômatos, e a síntese de proteínas relacionadas a patogênese que podem levar à reação de resistências.

Plantas de citros com CVC apresentam alterações fisiológicas como, por exemplo, maior resistência estomática (Machado *et al.*, 1994). Além desta característica, encontramos grande quantidade da poliamina putrescina em PD (Capítulo 1). Devido a sua natureza policatiônica, poliaminas podem se encontrar ligadas à moléculas carregadas negativamente como os polissacarídeos pécticos (D'Orazi & Bagni, 1987). Trabalhos que relacionam poliaminas com OGAs (Messiaen *et al.*, 1997; Messiaen & Van Cutsem, 1999) têm mostrando que a ligação dessas moléculas nos polissacarídeos pécticos modulam o sinal que os OGAs desenvolvem nas plantas. Nesse caso putrescina tem sido descrita por estabilizar a conformação de pectinas, promovendo o desenvolvimento do sinal, enquanto espermidina e espermina removem Ca, desestruturando essa conformação e impedindo a sinalização desencadeada pelos OGAS.

Pelo exposto, podemos sugerir que essas alterações possam ocorrer em função da sinalização dos OGAs, uma vez que verificamos que plantas com CVC apresentam degradação das HG (observadas com os anticorpos JIM 5 E JIM 7). Assim, em PD os sintomas não se correlacionam com a proporção de vasos colonizados provavelmente pelo

fato do desenvolvimento do quadro sintomatológico envolver outros mecanismos além das disfunções no sistema condutor de água.

4.6. CONCLUSÕES

A infecção por Xf altera a composição de açúcares solúveis e ácidos orgânicos na seiva e órgãos de plantas de citros, bem como promove modificações na estruturação das paredes celulares e na composição dos oligossacarídeos das frações pectina e hemicelulose das células do xilema. Os resultados demonstram que a bactéria utiliza diferentes fontes de carbono e que provavelmente os ácidos orgânicos favorecem a formação do biofilme e agregação bacteriana, enquanto glicose estimula o crescimento da bactéria.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIA, J., LOPEZ-MILLAN, A.F., ROMBOLA, A., ABADIA, A., 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil*, v.241, p.75-86.
- ABD-EL BAKI, G.K., SIEFRITZ, F., MAN, H.M., *et al.*, 2000. Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell and Environment*, v.23, p.515-52.
- ALAM, S., KAMEI, S., KAWAI, S., 2001. Effect of iron deficiency on the chemical composition of the xylem sap of barley. *Soil Science Plant Nutrition*, v.47, n.3, p.643-649.
- ALCÂNTARA, P.H.N., DIETRICH, S.M.C, BUCKERIDGE, M.S., 1999. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) específico β -galactosidase from cotyledons of *Copaifera Langsdorffii*. *Plant. Physiol. and Biochemistry*. v.37, p. 653-663.
- ALMEIDA R.P.P., MANN R., PURCELL A.H., 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined médium. *Current Microbiology*, v.48, p.368-372.
- ALVES, E., 2003. *Xylella* - Adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinha vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. Tese de doutoramento. USP, Piracicaba, SP.122 p.
- BECKMAN, C.H., HALMOS. S., 1962. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of roo-invading fungi. *Phitopatology*, v.52, p.893-897.
- BECKMAN, C.H., MUELLER, W.C., MACE, M.E., 1974. The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopatology*, v.64, p.1214-1220.

- BLACKWELL R.D., MURRAY A.J.S., LEA P.J., 1990. Enzymes OF THE Photorespiratory carbon pathway. *Methods Enzymology*, v.3, p.129-144.
- BRADFORD M.N., 1996. A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248-254.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A.S., 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant. Physiol. and Biochemistry*, v.38, p.141-156.
- CARELLI M.L.C., FAHL J.I., MAGALHÃES A.C., 1990. Redução de nitrato em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de luz e de nitrogênio. *Bragantia*, v.49, p.1-9.
- CARVALHO, M.L.V., ROSSETI, V., POMPEU JUNIOR, J., 1995. Evolução da sintomatologia de clorose variegada dos citros em laranja doce (*C. sinensis*) *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.351, suplemento.
- CARVALHO, M.L.V., 1996. Situação atual da clorose variegada dos citros e estratégias de controle. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p 328 , suplemento.
- CATALDO D.A., HAROON M., SCHRADER L.E., YOUNGS V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.6, p. 71-80.
- CHANG, C. J., WALKER, J.T. 1988. Bacterial leaf scorch of northern red oak – isolation, cultivation, and pathogenicity of a xylem- limited bacteria. *Plant Disease*, v.72, n. 8, p. 730-733.
- CHANG, C.J., GARNIER, M., ZREIK, L., ROSSETTI, V., BOVÉ, J.M., 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated

- chlorosis and its identification as strain of *Xylella fastidiosa*. Current Microbiology, v.27, p.137-142.
- CHANG, C. J., DONALDSON R. C., 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. Phytopathology, v.83, p.192-94.
- COCKING E.C., YEMM E.W., 1954. Estimation of amino acids by ninhidrin. Biochemistry Journal, v.58, p.xii-xiii.
- CÔTE, F., HAHN, M.G., 1994. Oligosaccharins: estruture and signal transduction. Plant Molecular Biology, v.12, p.1374-1441.
- CÔTE, F., HAHN, K.S., HAHN, M.G., BERGMAN, C.W., 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions: Generation, perception, and signal transduction. In, Biswas, B.B. DAS, H. (Eds.), Subcellular biochemistry, Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 29, p.385-431.
- CROMBIE, H.J., REID, J. S. G., 1998. Pectin methyltransferase: activities in particulate and solubilised preparations from mung bean (*Vigna radiata*) Hypocotyls and tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp. In: Cell Wall'98: 8th International Cell Wall Meeting: John Innes Centre, Norwich, UK: 1-5 September.
- CULIAÑEZ F., MARTIN B., GUERRI J., TADEO J.L., PRIMO-MILLO E., 1981. Proteins and amino acids changes in citrus organs during the fruiting period. Proc. Int. Soc. Citriculture v.2, p.566-571.
- DAVIS, M. J., FRENCH, W. J., SCHAAD, N. W., 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. Current Microbiology, v.6, n.4, p.309-314.
- D'ORAZI, D., BAGNI, N., 1987. In vitro interactions between polyamines and pectins substances. Biochemistry Biophysics Research Communications, v.148, p. 1159-116.

- DOW, J.M., SCOFIELD, G., TRAFFORD, K. *et al.*, 1987. A gene-cluster in *Xanthomonas campestris pv.campestris* required for pathogenicity controls the excretion of poligalacturonate lyase and outas enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v.31, n. 2, p.261-271.
- DOW, J.M., DANIELS, M.J. DUMS, F. *et al.*, 1989. Genetic and Biochemical analysis of protein export from *Xanthomonas campestris*. *Journal of Cell Science*, v.11, p.59-72, Suplemento.
- DOW, J.M., DANIELS, M.J., 2000. *Xyllela* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast*, v.17, n. 4, p.263-271.
- DUMS, F., DOW, J. M., DANILES, M.J., 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion system of other gram-negative bacteria. *Molecular General Genetics*, v.229, n. 3, p.357-364.
- EDREVA, A., 1997. Tobacco polyamines as affected by stresses induced by different pathogens. *Biologia Plantarum*, v.40, p.317–320.
- EDWARDS, M., DEA, I.C.M., BULPIN, P.V., REID, J.S.G., 1986. Purification and properties of a novel xyloglucan-specific endo (1→ 4) β -D- glucanase from germinated nasturtium seed (*Tropaeolum majus* L.). *Journal of Biological Chemistry*, v.261, p.9489-9494.
- EULGEM T., WEIGMAN V.J., CHANG H.S., *et al.*, 2004. Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. *Plant. Physiol.*, v.135, p.1129-1144.

- FANUTTI, C., GIDLEY, M.J., REID, J.S.G., 1993. Action of pure xyloglucan endotransglycosylase (formely called xyloglucan –especific endo 1→ 4) β -D-glucanase from cotyledons of germinated nasturtium seed. *Plant Journal*, v.3, p.691-700.
- FRENCH , W. K., STASSI , D.L., 1978. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. *Plant Disease*, v.62, p. 1035-1038.
- FRY, S.M., MILHOLLAND, R.D., 1990. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce’s disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, v.80, n.1, p. 66-69.
- GALLOWAY, G.L., MALMBERG, R.L., PRICE, R.A., 1998. Phylogenetic utility of nuclear gene arginine decarboxylase: na example from Brassicaceae *Molecular Biology Evolution*, v.15, p.1312-1320.
- GARDNER , J. M., FELDMAN, A.W. , STAMPER, D. H., 1983. Role and fate of bacteria in vascular occlusions of citrus. *Plant Pathology*, v23, p.295-309.
- GOJON, A, DAPOIGNY, I., LEJAY, L.*et al.*, 1998. Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on $^{15}\text{NO}_3$ uptake and reduction in Nicotiana plants. *Plant Cell and Environment*, v.21, p.43-53.
- GOMES, M. M. A., 2001. Trocas gasosas, relações hídricas e hormonais de laranjeira ‘Pêra’ infectada com *Xylella fastidiosa* e submetidas à deficiência hídrica. Universidade de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- GOODWIN, T.R., GIDTTI, F.B., SANTOS, J.M., CARVALHO, A.C. 1998. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce’s disease of the grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

- GOULD A.B., FRENCH W.J., ALDRICH J.H., BRODBECK B.V., MIZELL-III R.F., ANDERSEN P.C., 1991. Rootstock influence on occurrence of *Homalodisca coagulata*, peach xylem fluid amino acids and, concentration of *Xylella fastidiosa*. Plant Disease, v.75, n. 767-770.
- HAYASHY, T., 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. Annual Review of Plant. Physiol. and Plant Molecular Biology, v.40, p.139-168.
- HAYWARD, A.C., MARIANO, R.L.R., 1997. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.5, p. 199-234.
- HOPKINS, D.L., 1985. Effects of plant growth regulators on development of Pierce's disease symptoms in grapevine. Plant Disease, v.69, n. 944-946.
- HOPKINS, D.L., 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annual Review of Phytopathology, v.27, p.271-290.
- HUBER, J.L., REDINBAUGH, M.G., HUBER, S.C. CAMPBELL, W.H., 1994. Regulation of maize leaf nitrate reductase activity involves both gene expression and protein phosphorylation. Plant. Physiol., v.106, p.1667-1674.
- JARRET H.W., COOSKY K.D., ELLIS B., ANDERSON J.M., 1986. The separation of *o* - phtalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. Analytical Biochemistry, v.153, p.189-198.
- JONES B.L., FONTANINI D., JARVINEN M., PEKKARINEN A., 1998. Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin. Analytical Biochemistry, v.263, p.214-220.
- JOHANSEN, D.A., 1940. Plant Mycrotechnique. New York, McGraw-Hill Book.

- KAISER, W.M., WEINER, H., HUBER, S.C., 1999. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli in to control of catalytic activity. *Physiologia Plantarum*, v.105, p.385-390.
- KNOX, P.J., LINSTED, P.J., KING, J., COOPER, C., ROBERTS, K., 1990. Pectin esterification is spatially regulated both cell wall and between developing tissues of root apices. *Planta*, v.181, p.512-521.
- KONISHI T., OHMIYA Y., HAYASHI T., 2004. Evidence that sucrose loaded into phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various B-glucan synthases in the stem. *Plant. Physiol.*, v.134, p.1146-1152.
- LAMBAIS, M.R., GOLDMAN, M.H.S., CAMARGO, L.E.A. *et al.*, 2000. A genomic approach to the understanding of *Xyllela fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, n.5, p.459-462.
- LEE, R. F. RAJU, B. C., NYLAND, G. GOHENN, A. C., 1982. Phytotoxin(s) produced in culture by Pierce's disease bacterium. *Phytopathology*, v.72, p.886-888.
- LEE, R.F., BERETTA, M.J.G., DERRICK, K., 1991. Clorose variegada dos citros: uma nova e destrutiva doença dos citros no Brasil. *Laranja*, v. 12, n.2, p. 345-356.
- LEE, R.F., BERETTA, M.J.G., HARTUNG, J.H. *et al.*, 1993. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xyllela fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopatologica*, v.19, n.2, p.123-125.
- LEJAY, L., QUILLERE, I., ROUX, Y. *et al.*, 1997. Abolition of posttranscriptional regulation of nitrate reductase partially prevents the decrease in the leaf NO₃ reduction when photosynthesis is inhibited by CO₂ deprivation but not in darkness. *Plant. Physiol.*, v.115, p.623-631.

- LEMOS E.G.M., ALVES L.M.C., CAMPANHARO J.C., 2003. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. FEMS Microbiology v.219, p.39-45.
- LEPEREN, W., 2000. Fluid composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. Journal Experimental Botany, v.51, n.345, p.769-776.
- LEITE JUNIOR, R.P., 1996. Escaldadura da folha em ameixeira : a doença e seu agente causal *Xyllela fastidiosa*. Fitopatologia Brasileira, v.21, p.327, suplemento.
- LEITE, B., PASCHOLATI, S.F., KITAJIMA, E.W. *et al.*, 2001. Mecanismos de adesão de bactéria e fungos às plantas hospedeiras. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.9, p.1-41.
- LEITE, B., ISHIDA, M. I., ALVES, E., *et al.*, 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca^{+2} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.35, n. 6, p.645-650.
- LEITE, B., ANDERSEN, P.C., ISHIDA M.L., 2004 Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa*. FEMS Microbiology Letters, v 230, p.283-290.
- LEMOS, E.G.M., ALVES, L.M.C., CAMPANHARO, J.C., 2003. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. FEMS Microbiology, v.219, p.39-45.
- LIU, K., FU, H., BEI, Q., LUAN, S., 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. Plant. Physiol., v.124, p.1315–1326.

- MACHADO, E. C., QUAGGIO, J.A., LAGÔA, A. M.M.A., *et al.*, 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira com clorose variegada dos citros. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.66, n.1, p.53-57.
- MESSIAN, J., CAMBIER, P., CUTSEM, P.V., 1997. Polyamines and pectins I. Ion exchange and selectivity. *Plant. Physiol.*, v.113, p.387-395.
- MESSIAN, J., CUTSEM, P.V. Polyamines and pectins., 1999. II. Modulation of pectin-signal transduction. *Planta*, v.208, p.247-256.
- LOVATT, C.J., 1986. Salinity stress results in ammonia intoxication. *Plant. Physiol.*, v.80, p10.
- Mc NALLY, S.F., HIREL, B., GADAL, P., MANN, A.F., STEWART, G.R., 1983. Glutamine synthetase of higher plants. *Plant. Physiol.*, v.72, p.22-25.
- MEDINA , C.L., 2002. Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira Pêra com CVC e submetida à deficiência hídrica. Tese de doutoramento, Unicamp, Campinas, SP.
- MIZUBURI, E.S.G, MATSUOKA, K., ARIZZI, P., 1994. Associação de bactérias do tipo *Xyllela* em laranjeiras com sintoma de clorose variegada na região de Mata de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, n.2, p.241-242.
- MO, H., PUA, E.C., 2002. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. *Physiologia Plantarum*, v.114, p.439-449.
- MONTEIRO, P.B., TEIXEIRA, D.C., PALMA, R.R., *et al.*, 2001. Stable transformation of the citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2263-2269.

- OLIVEIRA, R.F., MACHADO, E.C., MARIN, F.R., MEDINA, C.L., 2002. Sap flow rates and stomatal conductance of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osb) infected by *Xylella fastidiosa*. IN: IX International Society of Citriculture Congress, Florida, USA, abstracts. p.161.
- RAMAMURTHY S., LÜDDERS P., 1982. Influence of nitrate and ammonium on the contents of certain amino acids and their amides in leaf and roots extracts of *Citrus madurensis* Lour. Angew. Botanik, v.56, p.383-392.
- O'NEIL, O., JOY, K.W., 1974. Glutamine synthase of pea leaves. Purification, Stabilization, and pH optima. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.159, p.113-122.
- O'TOOLE G., KAPLAN H.B., & KOLTER R., 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Review Microbiology, v.54, p.49-79.
- POOLER M.R., HARTUNG J.S., 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Current Microbiology, v.31, p.134-137.
- PARADELA FILHO, O., SUMIGORI, M. H., RIBEIRO, I. J. A., *et al.*, 1997. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. Summa Phytopathologica, v.23, n.1, p.46-49.
- PURCELL, A.H., HOPKINS, D. L., 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, v.34, p.131-51.
- RATLEDGE, C., DOVER, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annual Review of Microbiology, v.54, p. 881-941.
- ROSSETTI, V., DE NEGRI, J.D., 1990. Clorose variegada dos citros – Revisão. Laranja, v.11, n.1, p.1-14.

- ROMANTSCHUK, M., ROINE, E., TAIRA, S., 2001. Hrp pilus- reaching though the plant wall. European journal of Plant Pathology, v.107, n.2, p.153-160.
- SAKAKIBARA, H., KAWABATA, S., TAKAHASHI, H., HASE, T., SUGIYAMA, T., 1992. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Plant Cell Physiology, v.33, p.49-58.
- SALNIKOV, V.V., GRIMSON, M.J., DELMER, D.P., HAIGLER, C.H., 2001. Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. Phytochemistry, v. 57, p.823-833.
- SASSA, H., USHIJIMA, K., HIRANO, H., 2002. A pistil-specific thaumatin/PR5-like protein gene of Japanese pear (*Pyrus serotina*): sequence and promoter activity of the 5' region in transgenic tabaco. Plant Molecular Biology, v.50, p.371-377.
- SIMPSON, A.J.G. *et al.*, 2002. The genome of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* Nature, v, 406, p.151-157.
- SEDEN M.N.M.N., VAN DER MEER A.J.G.M., LIMBORGH J., WOLTERBEEK H.T.H., 1992. Analysis of major tomato xylem organic acids and PITS- derivatives of amino acids by RP-HPLC and UV detection. Plant and Soil, v.142, p.81-89.
- SMOLKA M.B., MARTINS D., WINCK F.V., *et al.*, 2003. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. Proteomics, v.3, p.224-237.
- SODEK L., LEA P.J., 1993. Asparaginase from developing testas of lupin and pea seeds. Phytochemistry, v.34, p. 51-56.
- SOMOGY N., 1952. Notes on sugar determination. Journal Biology Chemistry, v.195, p.19-23.

- SOUZA, A.A., TAKITA M.A., KURAMAE-IZIOKA E.E., *et al.*, 2001. Avaliação de genes diferencialmente expressos em *Xylella fastidiosa* através da análise de microarray. Fitopatologia Brasileira, v.26, p.296-297.
- STEWART, G. A., 1961. Nitrogen transformation in citrus trees. Soil and Crop Science Soc. of Floride, v.21, p.272-282.
- TADEO, J.L., CALO, M.C., GUERRI, J., *et al.*, 1984. Amino acid changes in organs of Valencia late (*C. sinensis* [L.] Osbeck) young trees during the growth cycle. Proc. Int. Soc. Citriculture, v.1, p 241.
- TANASE , K., SHOHEI, Y., 2000. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from japanese pear fruit. Plant Cell Physiology, v.41, n.4, p.408-414.
- THOMPSON, J. P., 1980. Arginine synthesis, proline synthesis and related process. In the Biochemistry of plants, v.5, p.375-402, Ed. B.J. Mifflin, Academia Press, New York.
- TINÉ, M.A.S., CORTELAZZO, A .L., BUCKERIDGE, M.S., 2000. Xyloglucan mobilisation in cotiledons of developing plantlets of *Hymenaeae courbaril* L.(Leguminosae-Caesalpinoideae). Plant Scienc, v.154, p.117-126.
- TORGET, R., LAPI, L., COHEN, S.S., 1979. Synthesis and accumulation of polyamines and S-adenosylmethionine in Chinese cabbage infected by turnip yellow mosaic virus. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.87, p.1132–1139.
- TORRES, S.C.Z., SOUZA, V., CAMPERONI G., *et al.* 2002. Adubação mineral em tabaco inoculado com *Xylella fastidiosa* resulta em menor incidência de doença. Fitopatologia Brasileira, v.27, suplemento.
- TRUDEL, J., GRENIER, J., POTVIN, C., ASSELIN, A., 1998. Several thaumatin-like proteins bind to α -1,3- glucans. Plant. Physiol., v.118, p.1431-1438.

- VAN HANDEL E., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.*, v.22, p.280-283.
- VASIL, M.L., OCHSNER, U.A., 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular Microbiology*, v.34, n.3, p.399-413.
- VINCENTZ, M., MOUREAUX, T., LEYDECKER, M.T. , *et al.*, 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant Journal*, v.3, p.1135-1143.
- WALTERS, D.R., 1989. Polyamines and plant disease. *Plants Today* January–February, 22–26.
- WALTERS, D., 2003. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*, v.159, n.1, p.109-115.
- WELLS JM., RAJU BC., HUNG H-Y, WEIS- BERG W.G., MANDELCO-PAUL, *et al.*, 1987. *Xylella fastidiosa* new-genus new-species Gram-negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.37, p.136-43.
- YELENOSKY, G., 1979. Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regimes. *Plant. Physiol.*, v.64, p.425-427.