



**WILLIAN EDUARDO LINO PEREIRA**

**“USO DE *NICOTIANA TABACUM* E *ARABIDOPSIS THALIANA* COMO  
PLANTAS MODELO PARA ESTUDO FUNCIONAL DE GENES ASSOCIADOS À  
RESISTÊNCIA A CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS”**

CAMPINAS  
2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

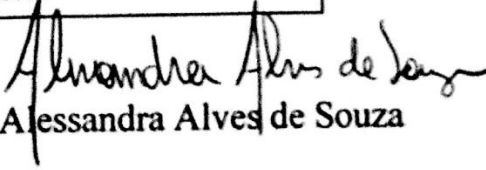
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**WILLIAN EDUARDO LINO PEREIRA**

**“USO DE *NICOTIANA TABACUM* E *ARABIDOPSIS THALIANA*  
COMO PLANTAS MODELO PARA ESTUDO FUNCIONAL DE  
GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A CLOROSE VARIEGADA  
DOS CITROS”**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Este exemplar corresponde à redação final da DISSERTAÇÃO defendida pelo candidato WILLIAN EDUARDO LINO PEREIRA e aprovada pela Comissão Julgadora.

  
Orientadora: Dra. Alessandra Alves de Souza

**CAMPINAS,  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P414u Pereira, Willian Eduardo Lino, 1988-  
Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros / Willian Eduardo Lino Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Alessandra Alves de Souza.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Xylella fastidiosa*. 2. Tabaco. 3. *Arabidopsis*. 4. Clorose variegada dos citros. 5. Relação planta-patógeno. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* as model plants for functional study of genes associated with resistance to citrus variegated chlorosis

**Palavras-chave em inglês:**

*Xylella fastidiosa*

Tobacco

*Arabidopsis*

Citrus variegated chlorosis

Plant-pathogen relationships

**Área de concentração:** Genética Vegetal e Melhoramento

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Alessandra Alves de Souza [Orientador]

Michel Georges Albert Vincentz

Luis Eduardo Aranha Camargo

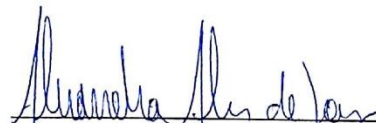
**Data de defesa:** 28-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 28 de março de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Alessandra Alves De Souza (orientadora)



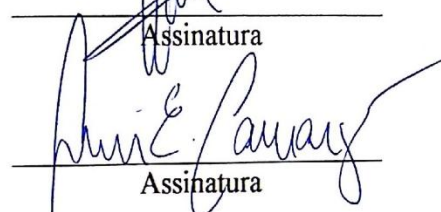
Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo



Assinatura

Dr. Ricardo Harakava

Assinatura

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura



## **“Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros”**

A citricultura brasileira representa um setor comercial muito rico, porém a produtividade brasileira é baixa, sobretudo em razão de pragas e doenças, como a Clorose Variegada do Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que afeta todas as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*). O melhoramento genético de citros é um desafio em virtude da baixíssima variabilidade genética e do grande avanço de pragas e doenças. Uma alternativa para acelerar a obtenção de plantas resistentes a doenças seria a obtenção de plantas transgênicas. A seleção de genes candidatos em citros seria uma excelente estratégia, não fossem dificuldades para transformação genética como escapes, enraizamento, enxertia e longo ciclo da cultura. A solução para acelerar o conhecimento do potencial do gene em conferir resistência ao patógeno seria então o uso de hospedeiros alternativos como *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*, pois possuem grande informação genética, protocolos simples de transformação e ciclo de vida curto. Devido à identificação prévia por transcrito de genes possivelmente associados à resistência de *Citrus reticulata* a *X. fastidiosa*, torna-se necessário o estudo da função desses genes para aplicação por transgenia visando resistência em *C. sinensis*. Assim, o objetivo do trabalho foi utilizar plantas modelo (tabaco e *Arabidopsis*) para estudo funcional desses genes potenciais. Nossos resultados indicaram que *Arabidopsis* é moderadamente resistente à infecção por *X. fastidiosa*, uma vez que a bactéria não consegue colonizá-la eficientemente. Utilizando plantas mutantes de *Arabidopsis* para os genes candidatos *RPS5*, *RAP2.2*, *MOA2.2*, *PseudoNBS*, *ERF73*, *RD22* e *ATJ2* (homólogos aos diferencialmente expressos em *C. reticulata* sob infecção) verificou-se que dois deles, *RPS5* e *RAP2.2*, estão envolvidos na resistência à bactéria, pois na ausência deles a bactéria colonizou mais eficientemente o hospedeiro, e portanto, são bons candidatos para superexpressão em *C. sinensis* visando resistência à CVC. *RPS5* codifica uma proteína do tipo CC-NBS-LRR, comumente responsável pelo reconhecimento de moléculas dos patógenos e desencadeando vias de sinalização, enquanto o gene *RAP2.2* codifica um fator de transcrição relacionado à uma via de sinalização mediada por etileno, de forma a desencadear respostas contra a infecção. Em relação a tabaco foi estudado a colonização da bactéria visando estabelecer um bioensaio quantitativo. Nesse sentido, foi elaborada e validada uma escala diagramática para correta aferição da severidade da doença nas folhas. Também foi estabelecida uma correlação entre níveis de severidade e população bacteriana, permitindo estimar a população bacteriana na folha a partir da análise de severidade. Um bioensaio mais rápido foi estabelecido para avaliação do gene *soyBiPD*, candidato à conferir resistência a *X. fastidiosa*. Entretanto, nossos resultados demonstram que esse gene não confere resistência à esse patógeno na planta modelo, não sendo, portanto, candidato para transformar *C. sinensis* visando resistência a CVC. Num curto período de tempo, oito genes candidatos foram avaliados e dois apresentaram resultados promissores (*RPS5* e *RAP2.2*), sendo selecionados para transformação em *C. sinensis* visando tolerância a CVC. Isso comprova a importância de plantas modelo no estudo e seleção de genes promissores e a consequente redução de custos, trabalho e tempo para obter respostas acerca da potencialidade dos genes.





## **“*Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* as model plants for functional study of genes associated with resistance to citrus variegated chlorosis”**

The Brazilian citrus agribusiness is a very important commodity; nevertheless Brazilian citrus productivity is low, mainly due to pests and diseases that affect the culture. The Citrus Variegated Chlorosis (CVC), caused by the bacterium *Xylella fastidiosa* is one of the most important diseases, since it affects all varieties of sweet oranges. Citrus breeding programs could be used to solve this problem however the breeding is a challenging due to the very low genetic variability and the breakthrough of pests and diseases. An alternative to accelerate the obtaining of resistant plants to diseases could be through of transgenic plants. The selection of candidate genes in citrus would be an excellent strategy, if there were not difficulties in genetic transformation. The solution to accelerate the knowledge of gene to confer pathogen resistance is the use of alternative hosts such as the *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. Both hosts have great genetic information, simple protocol of transformation and short life cycle. Due to the prior identification by transcriptome of genes possibly associated with resistance of *C. reticulata* to *X. fastidiosa* become necessary to study the function of these genes. Thus, the goal of this study was to use model plants (*Arabidopsis* and tobacco) for functional study of potential genes to confer *X. fastidiosa* resistance and use them in *C. sinensis* in a transgenic approach. Our results indicated that *Arabidopsis* is moderately resistant to infection by *X. fastidiosa*, since bacteria cannot colonize it efficiently. Using mutant plants to the candidate genes *RPS5*, *RAP2.2*, *MOA2.2*, *PseudoNBS*, *ERF73*, *RD22* and *ATJ2* (homologous to the differentially expressed in *C. reticulata* under infection) it was found that *RPS5* and *RAP2.2* are probably involved in resistance to this bacterium, since the mutants were more susceptible to *X. fastidiosa*, therefore they are good candidates for overexpression in *C. sinensis* aiming CVC resistance. The *RPS5* gene encodes a protein of the CC-NBS-LRR type commonly responsible for the recognition of molecules of pathogens and triggering signaling pathways, while *RAP2.2* gene encodes a transcription factor related to the signaling pathway mediated by ethylene, triggering responses against infection. Regarding tobacco we study the colonization of bacteria to establish a quantitative bioassay. In this sense, was developed and validated a diagrammatic scale for accurate measurement of disease severity in the leaves. A correlation between levels of severity and bacterial population, allowing estimation of the bacterial population in plant from the analysis of severity, was also established. A faster bioassay was established for evaluation of soy *BiPD* gene, candidate to confer resistance to *X. fastidiosa*. However, our results demonstrate that this gene does not confer resistance in the plant model, and therefore would not be used to transform *C. sinensis*. In a short time, eight candidate genes were evaluated and two of them showed promising results (*RPS5* and *RAP2.2*). These results demonstrate the importance of model plants in accelerate the knowledge of candidate genes and consequent the reduction of costs, labor and time to obtain responses about the potentiality of genes to confer pathogen resistance.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1. A citricultura e a Clorose Variegada dos Citros (CVC) .....	19
2.2. Mecanismos de defesa das plantas .....	20
2.3. Genoma expresso de citros e modelo de resistência à <i>X. fastidiosa</i> .....	22
2.4. Dificuldades na transformação de citros e o uso de plantas modelo.....	25
2.5. Caracterização da infecção de <i>X. fastidiosa</i> em <i>A. thaliana</i> .....	26
2.6. Genes selecionados para avaliação em <i>A. thaliana</i> .....	27
2.7. Caracterização da infecção de <i>X. fastidiosa</i> em <i>N. tabacum</i> .....	30
2.8. Possível papel do gene <i>soyBiPD</i> na tolerância a <i>X. fastidiosa</i> – estudo funcional em <i>N. tabacum</i> .....	31
<b>3. HIPÓTESE DO TRABALHO.....</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. <b>Objetivos gerais.....</b>	<b>33</b>
4.2. <b>Objetivos específicos .....</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo I. <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo para estudo da interação com <i>X. fastidiosa</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
5.1. Seleção do método de inoculação .....	34
5.2. Avaliação de possíveis sintomas .....	35
5.3. Delineamento experimental.....	35
5.4. Cultivo das plantas, preparo do inóculo e inoculação.....	35
5.5. Coleta das amostras e extração de DNA.....	37
5.6. Monitoramento da população bacteriana nas plantas por qPCR .....	37
5.7. Obtenção dos mutantes de <i>A. thaliana</i> .....	38
5.8. Testes para confirmação dos mutantes de <i>A. thaliana</i> .....	38
5.9. Microscopia para observação da fluorescência de <i>X. fastidiosa</i> contendo GFP no interior da planta.....	40
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
6.1. <b>Caracterização da colonização de <i>X. fastidiosa</i> em <i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>41</b>
6.1.1. Seleção do método de inoculação .....	41
6.1.2. Avaliação de possíveis sintomas.....	42
6.1.3. Seleção do ecótipo selvagem mais suscetível .....	43
6.1.4. Caracterização da infecção ao longo do tempo .....	44
6.2. <b>Avaliação dos mutantes de <i>A. thaliana</i> selecionados.....</b>	<b>45</b>
6.2.1. Quantificação da população bacteriana por qPCR .....	45
6.2.2. Análise da colonização por microscopia de fluorescência .....	47
6.2.3. Possível papel funcional dos genes <i>RPS5</i> e <i>RAP2.2</i> no mecanismo de defesa à <i>X. fastidiosa</i> .....	50

<b>Capítulo II. <i>Nicotiana tabacum</i> como planta modelo para estudo da interação com <i>X. fastidiosa</i></b> .....	<b>51</b>
<b>7. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>7.1. Caracterização quantitativa da colonização e sintomatologia de <i>X. fastidiosa</i> em <i>N. tabacum</i></b> .....	<b>51</b>
7.1.1. Cultivo das plantas e preparo do inóculo .....	51
7.1.2. Inoculação das plantas e avaliação da eficiência de inoculação .....	52
7.1.3. Extração de DNA, curva padrão e quantificação de <i>X. fastidiosa</i> por qPCR.....	52
7.1.4. Colonização de <i>X. fastidiosa</i> e correlação com sintomas .....	53
7.1.5. Desenvolvimento e validação da escala diagramática.....	54
7.1.6. Correlação entre severidade e colonização bacteriana .....	55
<b>7.2. Avaliação do potencial de soyBIPD em conferir tolerância a <i>X. fastidiosa</i> usando tabaco como planta modelo</b> .....	<b>55</b>
7.2.1. Cultivo das plantas e preparo do inóculo .....	55
7.2.2. Inoculação e expressão de sintomas .....	55
7.2.3. Análise da incidência e severidade dos sintomas .....	56
7.2.4. Análise da população bacteriana por qPCR.....	56
7.2.5. Isolamento de <i>X. fastidiosa</i> e PCR das colônias.....	56
7.2.6. Confirmação da expressão do transgene por RT-PCR semi-quantitativo .....	57
<b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>8.1. Caracterização quantitativa da colonização e sintomatologia de <i>X. fastidiosa</i> em <i>N. tabacum</i></b> .....	<b>58</b>
8.1.1. Sintomatologia e eficiência de inoculação.....	58
8.1.2. Padrão de colonização da bactéria e evolução dos sintomas .....	59
8.1.3. Escala diagramática e validação .....	61
8.1.4. Correlação entre severidade foliar e população bacteriana.....	64
8.1.5. Quantificação bacteriana durante período de infecção .....	65
8.1.6. Utilização de tabaco como planta modelo para estudos da interação com <i>X. fastidiosa</i> .....	67
<b>8.2. Avaliação do potencial de soyBIPD em conferir tolerância a <i>X. fastidiosa</i> usando tabaco como planta modelo</b> .....	<b>68</b>
8.2.1. Expressão dos sintomas.....	68
8.2.2. Análise da incidência e severidade dos sintomas.....	68
8.2.3. Análise da população bacteriana por qPCR.....	70
8.2.4. Confirmação da bactéria nas plantas sintomáticas.....	71
8.2.5. Confirmação da expressão do transgene por RT-PCR.....	73
8.2.6. Papel do gene <i>BiPD</i> em resposta à <i>X. fastidiosa</i> .....	74
<b>9. CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>83</b>
A. Alinhamento entre as proteínas RPS5 e RAP2.2 de <i>A. thaliana</i> e seus respectivos homólogos em <i>C. reticulata</i> .....	83
B. Alinhamento entre a proteína BiPD de soja e seu homólogo em <i>C. reticulata</i> .....	86
C. Distribuição da severidade nas folhas amostradas .....	87
D. Aprovação da CIBio responsável .....	88

## DEDICATÓRIA

Em especial à minha avó Aparecida (in memoriam) por todo o carinho, amor e dedicação. Por mais que não soubesse nada de Biotecnologia, foi mestre em demonstrar amor, e de maneira muito espontânea.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por tudo, pois mesmo os fracassos são provações que nos tornam mais fortes. Não que eu esteja precisando.

Aos meus pais pelo amor e suor dedicados à minha formação acadêmica, por mais que não pudessem ter tido essa oportunidade. Sobretudo agradeço pela minha formação como pessoa e os valores que me foram passados;

À minha namorada Lidiane pelo amor e pela compreensão nas minhas ausências;

À minha irmã Eliane pela ajuda quando IC, pelos conselhos e por ter me dado um sobrinho, João Miguel, fonte radiante de vida e alegria;

Ao meu avô pelos ensinamentos, amor e pela sede de conhecimento exemplar;

Aos meus tios por todo carinho, incentivos e favores dedicados;

A todos os familiares e amigos que de forma ou outra contribuíram para minha formação e caráter;

Ao São Paulo F.C. pela fonte de inspiração, descontração e profunda alegria.

A todos do Centro de Citricultura, equipe de apoio, pessoal das salas de pós, pesquisadores, e em especial aos colegas de bancada por toda ajuda, convivência e amizade;

Ao amigo e pesquisador Dr. Juarez Pires Tomaz por todo auxílio e aprendizado, essenciais para a realização deste trabalho e para minha formação científica;

À doutoranda Raquel Caserta, pelo aprendizado desde os tempos de IC, por todo auxílio e amizade (pelos docinhos também).

À minha orientadora, Dra. Alessandra Alves de Souza pela sua dedicação na arte de orientar, pela paixão à pesquisa exemplar e por incentivar e acreditar no meu potencial desde a iniciação científica;

Aos membros da qualificação, pré-banca e banca examinadora por terem aceitado os convites, dando valiosas sugestões e opiniões;

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pelo local e condições de trabalho proporcionadas;

Aos pesquisadores Dr. Helvécio Della Coletta Filho e Dr. Marco Aurélio Takita pelas discussões científicas e auxílio com dados experimentais

À FAPESP pelo auxílio financeiro, projeto n. 2011/14629-2





## 1. INTRODUÇÃO

Com um setor altamente organizado e competitivo, a citricultura no Brasil é uma das mais importantes agroindústrias, respondendo por um faturamento anual da ordem de 1,5 bilhões de dólares, com exportação de suco concentrado e subprodutos da laranja (pectina, óleo, ração), com destaque para os estados de São Paulo, Sergipe, Bahia e Paraná. O Estado de São Paulo é a região produtora mais expressiva, possuindo 212 milhões de árvores de laranja doce que produzem 13,4 milhões de toneladas para a indústria de suco, representando 63% da produção mundial de suco de laranja (Neves *et al.*, 2010). Estes números fazem do Brasil o maior exportador mundial de sucos concentrado congelado (COJ) e suco não concentrado (NFC). Mesmo representando um setor comercial tão rico, a produtividade citrícola brasileira é baixa (média de 2 caixas de 40,8 kg/planta/ano). Um dos atributos a esta produtividade é a expansão simultânea de pragas e doenças, com significativo reflexo nos custos de produção, sendo que outros fatores como o plantio em áreas não irrigadas e a estreita base genética da citricultura também têm seus efeitos negativos na produtividade. Dentre as doenças que afetam os pomares brasileiros, a Clorose Variegada do Citros (CVC) é uma das principais e mais sérias para citricultura brasileira, sendo responsável por prejuízos na ordem de aproximadamente 100 milhões de dólares devido à perda de produção e aos custos no manejo da doença (Bové & Ayres, 2007).

A CVC foi constatada em 1987 em pomares da região Noroeste do Estado de São Paulo. Ela apresenta como principal característica uma redução na produção e no tamanho dos frutos das principais variedades de laranja doce, independentemente do porta-enxerto utilizado (Laranjeira *et al.*, 2005). A doença é causada por uma bactéria gram-negativa (*Xylella fastidiosa*) que coloniza o xilema das plantas e multiplica-se, interrompendo o fluxo regular de água e nutrientes. A disseminação da bactéria ocorre por cigarrinhas (família Cicadellinae), as quais alimentam-se da seiva contida no xilema e transmitem a bactéria.

Devido ao impacto das doenças na citricultura brasileira e principalmente no Estado de São Paulo, o Centro APTA Citros Sylvio Moreira iniciou um intensivo programa de melhoramento de citros visando principalmente resistência à patógenos e estresse hídrico. Dentre os cruzamentos visando resistência a CVC foi obtida uma população de híbridos de laranja “Pêra” com tangor “Murcott” (Oliveira *et al.*, 2002). Esta população foi multiplicada clonalmente e uma análise preliminar revelou a existência de diferentes graus

de resistência e suscetibilidade à *X. fastidiosa* (Oliveira, 2003; Coletta-Filho, 2007, De Souza et al., 2007). Essas informações abriram perspectivas para o entendimento da interação molecular planta-*Xylella fastidiosa* em uma resposta de suscetibilidade e de resistência, visando a identificação de genes que poderiam estar associados à resposta de resistência em citros. A identificação desses genes, assim como a comprovação do seu papel funcional, possibilitaria a transferência destes para laranja doce através da transgenia ou da seleção de híbridos contendo o (s) gene (s) de interesse associados à resistência a CVC.

Sabe-se que a obtenção de plantas de citros transgênicas é um processo que requer muito tempo e ainda não possui uma alta eficiência de transformação, o que muitas vezes pode atrasar o estudo da funcionalidade dos genes de interesse (Domingues et al., 2000). Por essa razão, este trabalho buscou estabelecer o uso de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* como plantas modelo para o estudo da função de genes candidatos à conferir resistência a *X. fastidiosa*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A citricultura e a Clorose variegada dos citros (CVC)

As espécies de citros estão entre as principais frutíferas difundidas no mundo e ocupam papel de grande importância sócio econômica, principalmente em países como o Brasil onde o agronegócio como um todo representa mais de 22 % do PIB nacional, o que corresponde a mais de R\$ 940 bilhões ao ano (Cepea, 2012). Segundo o Ibge (2011), o Brasil é referência na produção da fruta cítrica de maior interesse comercial, a laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), sendo que das quase 20 milhões de toneladas de citros produzidos no país anualmente, cerca de 18 milhões são de laranjas. Os integrantes desta cadeia produtiva, em conjunto com as empresas e indústrias de processamento de suco, contribuem para que o Brasil produza mais da metade do suco de laranja do mundo e alcance um faturamento anual entre 1,5 e 2,5 bilhões de dólares com as exportações do produto (Neves et al., 2011).

Apesar da grande organização e da competitividade do setor citrícola nacional, a produtividade dos pomares é constantemente afetada por pragas e doenças agrícolas que causam enormes prejuízos aos produtores (Marques et al., 2007). Atualmente existem inúmeras pragas e doenças que acometem a citricultura paulista e causam prejuízos estimados em US\$150 milhões por ano com queda de produção ou perdas de plantas, além de outros US\$140 milhões que são gastos com defensivos agrícolas no setor (Neves & Lopes 2005).

Dentre as principais doenças que atacam os pomares, a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, tem impactado negativamente a produção citrícola em São Paulo desde seu surgimento nos anos 80. Segundo levantamentos recentes cerca de 47% das árvores de laranja doce (aproximadamente 140 milhões de plantas) no Estado de São Paulo são afetadas pela CVC, onde estes números eram 52% em 2011 ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)). Este decréscimo na incidência da CVC é o resultado de esforços de um manejo cada vez mais intenso da doença, principalmente ao controle químico dos vetores (cigarrinhas) através do uso intenso de inseticidas, com amplo espectro, que atualmente também é usado no controle do psilídeo transmissor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *americanus* causadora do HLB, além do plantio de mudas saudáveis. Entretanto, apesar destes números favoráveis, o elevado custo de produção como consequência deste manejo intenso, atrelado ao baixo

preço da caixa de laranja, tem levado muitos produtores, principalmente de pequeno e médio porte a desistirem da citricultura no Estado de São Paulo.

O elevado uso de defensivos agrícolas na citricultura tem um impacto direto e negativo no ambiente, ou seja, afeta a sustentabilidade ambiental, onde pragas antes tidas como secundárias ganham o status de primária. Num período onde a sustentabilidade ambiental é a bandeira para abertura de mercados no mundo globalizado, a procura por alternativas mais sustentáveis no manejo de doenças como a CVC se faz necessário para manter o Brasil na produção desta “commodity” agrícola. A CVC afeta todas as variedades de *Citrus sinensis* (laranja doce) que é principal espécie do agronegócio citrícola. Porém nem todas as espécies de citros são afetadas pela *X. fastidiosa*, algumas cultivares de tangerinas (*Citrus reticulata*) e alguns de seus híbridos com laranjas doce apresentam resistência ou tolerância a *X. fastidiosa*, e por isso são objetos de estudo visando a busca por fontes de resistência genética para transferência em laranja doce (Coletta-Filho *et al.* 2007; De Souza *et al.*, 2007, De Souza *et al.*, 2009; Gmitter *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013).

## **2.2. Mecanismos de defesa das plantas**

As plantas naturalmente são submetidas a inúmeras injúrias ambientais e, além destas, o ataque por pragas e patógenos. Embora os micro-organismos apresentem distintas estratégias e mecanismos de patogenicidade para invadir as células das plantas hospedeiras, o sucesso da infecção não é tão frequente devido a uma variedade de mecanismos adaptativos e de defesa desenvolvidos pelas plantas ao longo do processo evolutivo (Lucas, 1998; Solomon & Sessa, 2012). Mesmo que consigam superar as barreiras físicas dos tecidos vegetais, o que inclui a presença de ceras, cutículas e uma espessa camada de parede celular, os patógenos ficam ainda sujeitos ao reconhecimento molecular que propicia, a partir das vias de sinalização sistêmica, o desencadeamento de distintas respostas de defesa por parte da planta (Jones & Dangl, 2006). O sistema de imunidade inata corresponde à primeira linha de defesa das plantas hospedeiras contra a invasão de patógenos e de fato é muito eficiente, normalmente conferindo resistência à maioria dos micróbios invasores. Parte do sucesso se deve, principalmente, à rápida detecção destes invasores em potencial, além do largo espectro de especificidades de reconhecimento por parte de proteínas receptoras que estão presentes nas células das plantas hospedeiras (Zipfel, 2008).

As plantas inicialmente percebem a presença de microrganismos invasores a partir dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs, de *pattern recognition receptors*). Os PRRs são proteínas presentes na superfície das membranas das células e que reconhecem perfis moleculares associados ao patógeno (PAMPs, de *pathogen-associated molecular patterns*). Os PAMPs foram inicialmente definidos como moléculas altamente conservadas de uma classe de micróbios (Nurnberger & Brunner, 2002). PRRs também podem reconhecer perfis moleculares associados a danos (DAMPs), os quais são produtos geralmente oriundos da degradação da parede celular vegetal por um patógeno (Wirthmueller et al., 2013). Com a detecção dos PAMPs/DAMPs, os PRRs desencadeiam na planta a resposta de imunidade inata conhecida como resposta PTI (de *PAMP-Triggered Immunity*). A classe de receptores PRRs mais conhecida por perceberem PAMPs são *Receptor-like kinases* ricas em leucinas (RLK- LRR) que constituem de uma proteína transmembrana, um domínio extracelular amino-terminal (N-terminal) variável e um domínio intracelular típico de quinase na região C-terminal. A presença de domínios variáveis na região extracelular N-terminal contribui para que estas proteínas atuem como sinalizadores em um grande número de vias metabólicas e regulem processos distintos. Alguns RLK-LRR desempenham papéis importantes na defesa contra diversos tipos de estresses, incluindo resposta ao ataque de pragas e patógenos. Xa21 e Xa26 são exemplos de RLK-LRR que atuam como PRRs e reconhecem proteínas sulfatadas tipo-1, conferindo resistência a *Xanthomonas* em cultivares de arroz (*Oryza sativa*). FLS2 e EFR, por sua vez, representam receptores RLK-LRR capazes de reconhecer as estruturas bacterianas flagelinas e EF-Tu, respectivamente, e desencadear respostas de defesa do tipo PTI (Song et al., 1995; Sun et al. 2004; Gomez-Gomez & Boller, 2000; Zipfel et al., 2006). De forma geral, as respostas PTI normalmente observadas incluem um rápido fluxo iônico através da membrana, fortificação das paredes celulares, ativação de MAP quinases, produção de espécies reativas de oxigênio e síntese de proteínas e compostos antimicrobianos ativados pela sinalização mediada por hormônios.

O sucesso da infecção pelo patógeno vai depender da habilidade deste em suprimir a imunidade inata da planta, o que pode ser alcançado, na maioria das vezes, a partir da secreção de moléculas de virulência conhecidas como efetoras ou indutores (Jones & Dangl, 2006). Algumas bactérias patogênicas são capazes de “injetar” moléculas efetoras diretamente no citoplasma das células das plantas hospedeiras a partir, principalmente, do “maquinário” presente no sistema de secreção Tipo III (Tang et al., 2006).

Evolutivamente, as plantas respondem sintetizando proteínas R de resistência que reconhecem (pela presença ou atividade) estes efetores individualmente. A maioria destas proteínas R são receptores intracelulares citoplasmáticos do tipo NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine-Rich Repeat*) que desencadeiam respostas de defesa do tipo ETI (*Effector-Triggered Immunity*) por parte da planta. As respostas ETI estão associadas à especificidade da molécula efetora secretada pelo patógeno, havendo normalmente o desencadeamento de respostas de hipersensibilidade (HR) e de resistência sistêmica adquirida (SAR) por parte do hospedeiro (Thomma et al., 2011).

### **2.3. Genoma expresso de citros e modelo de resistência à *X. fastidiosa***

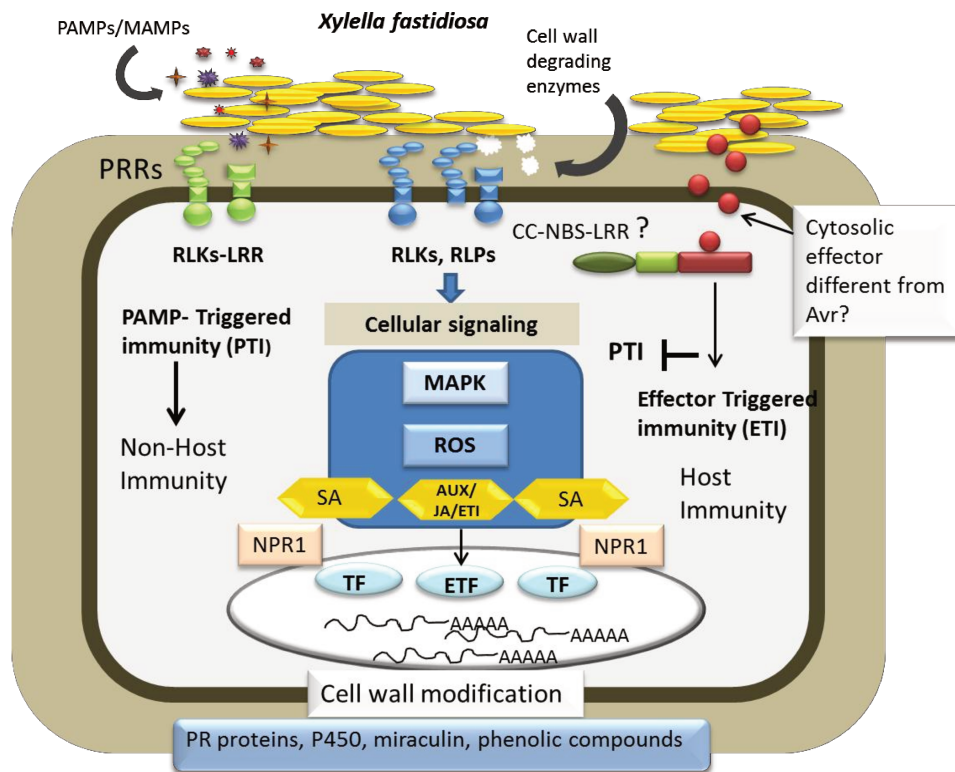
O Brasil é atualmente líder no genoma expresso de citros graças ao projeto Instituto do Milênio, financiado pelo CNPq/MCT, coordenado pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira - IAC e que resultou num grande banco de dados de ESTs – o CitEST (ver fascículo especial da revista GMB 2007). Nesse projeto foram sequenciados genes expressos de várias espécies de citros visando identificar e caracterizar as respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos. Esse grande volume de informação contida no CitEST, 300.000 sequências e 30.000 unigenes, revela a necessidade de estudos funcionais acerca de potenciais genes envolvidos na resistência a estresses bióticos e abióticos. Dessa forma, importantes trabalhos utilizando informações do CitEST foram voltados para o entendimento das interações moleculares planta-patógeno e dentre elas a interação planta resistente/suscetível – *Xylella fastidiosa*.

Em De Souza et al., (2007a) foram comparadas a expressão de genes em plantas de citros suscetíveis (*Citrus sinensis*) e inoculadas com *Xylella fastidiosa*, em relação a plantas não inoculadas, obtendo-se desta forma, informações acerca dos genes que têm sua expressão elevada ou diminuída. Esses resultados contribuíram para o entendimento da resposta da planta em uma interação de suscetibilidade. A superexpressão de alguns genes sugere que a planta ativa a sua maquinaria de defesa, porém não consegue bloquear a doença. Isso poderia estar relacionado a um reconhecimento tardio ou indução baseada em efeitos fisiológicos como estresse hídrico e nutricional.

Em De Souza et al., (2007b) foram analisadas e comparadas as respostas de espécies de citros suscetíveis e resistentes (*Citrus reticulata*) à infecção por *X. fastidiosa*. Em um trabalho posterior foram avaliados a expressão genica global apenas na espécie resistente (*C. reticulata*) aos 0, 30 dias (período em que é detectada a bactéria na planta)

e 60 dias (período em que há diminuição da bactéria e posterior desaparecimento dentro da planta) visando identificar os genes possivelmente responsáveis por eliminar a bactéria do hospedeiro (De Souza et al., 2009). A diferença de expressão de certos genes entre essas espécies revelou possíveis mecanismos genéticos de resistência a esse fitopatógeno (Gmitter et al., 2012). Recentemente, Rodrigues et al (2013) investigou as respostas iniciais de *C. reticulata* após infecção com *X. fastidiosa* (1 dia após inoculação) através de RNAseq usando RNA de xilema infectado e não infectado. Neste trabalho os autores encontraram induzidos: dois genes que codificam PRRs, responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs, o que sugere a ativação da imunidade inata (PTI) e um gene do tipo CC-NBS-LRR, responsável pelo reconhecimento de efetores do tipo avr. Como já se sabe, *X. fastidiosa* não possui tais efetores específicos (Simpson et al., 2000), o que levanta a hipótese de algum efector ainda desconhecido pode estar sendo reconhecido em *C. reticulata*. Além disso, também acredita-se que moléculas sinalizadoras (DAMPs) poderiam estar sendo emitidas pelo patógeno e reconhecidas por *CC-NBS-LRR* no citoplasma. Essas moléculas seriam oriundas da degradação da parede celular pela bactéria. Também foi visto que genes da via de sinalização mediada por auxina eram induzidos em *C. reticulata*, indicando um reconhecimento inicial característico da planta a organismos necrotróficos, porém numa etapa posterior, possivelmente a planta reconheça algum efector e altere o mecanismos de sinalização para uma resposta a biotróficos, uma vez que, genes associados a via de ácido salicílico são ativados mais tardiamente (Rodrigues et al 2013).

Através da obtenção dos resultados de ESTs (De Souza et al 2007a, 2007b, 2009, Gmitter et al., 2012) e RNA seq (Rodrigues et al 2013), De Souza (dados não publicados) elaborou um modelo hipotético para explicar a resposta de defesa de *C. reticulata* a infecção por *X. fastidiosa* (Figura 1).



**Figura 1. Modelo hipotético de resistência de *C. reticulata* a *X. fastidiosa*.** A sinalização celular de resposta de defesa a *X. fastidiosa* em *C. reticulata* parece ocorrer primeiramente pela percepção de sinais moleculares oriundos da degradação de parede celular vegetal pela *X. fastidiosa* antes de formar um biofilme maduro, e assim ativar a via de sinalização mediada por auxina/JÁ/Etileno. Depois, após a *X. fastidiosa* formar um biofilme maduro outras moléculas PAMP são percebidas pelo hospedeiro através de receptores PRR (RLK-LRR, dois deles superexpressos em nosso estudo), sugerindo que PTI possa ser inicialmente ativado. Posteriormente a indução de um gene que codifica CC-NBS-LRR sugere que *X. fastidiosa* poderia ter um efetor citosólico desconhecido que pode ser reconhecido por este gene de resistência. Isto poderia ativar MAPKs que levam à transdução do sinal. Essa ativação mais tardia, seja por PTI ou ETI ativa genes associados a sinalização de ácido salicílico e genes dependentes de NPR. Genes associados com stress oxidativo, proteínas PR, miraculina, P450 e os outros foram expressos 30 dias após de infecção (DAI) e podem estar envolvidos no aumento da resistência ao patógeno. Aos 60 DAI há um aumento de P450, estresse oxidativo, proteínas PR e compostos fenólicos, o que culmina no desaparecimento da bactéria na planta.

Nesse modelo inicialmente *X. fastidiosa* é percebida por receptores do hospedeiro (Receptores de PAMPs – PRR) de forma inespecífica devido a moléculas derivadas do patógeno (PAMPs) (foram detectados dois receptores dessa família no por Rodrigues et al., 2013). Ainda em estágios iniciais *X. fastidiosa* parece ser reconhecida pelo hospedeiro como um organismo necrotrófico, uma vez que, na planta resistente aumenta a expressão dos genes relacionados a sinalização por auxina e jasmonato (Rodrigues et al 2013). Essa hipótese é reforçada pelo fato de *X. fastidiosa* ser inoculada pelo inseto vetor



diretamente nos vasos do xilema, que é composto principalmente de células mortas, e ao fato da bactéria ser capaz de degradar a parede de células vegetais, e dessa forma, as moléculas oriundas dessa degradação poderiam ser um sinal similar ao que ocorre em microrganismos necrotróficos. Em um estágio mais avançado da infecção a indução de auxina/jasmonato diminui significativamente e aumenta os genes associados a ácido salicílico (SA) e os genes responsivos aos mesmos (Rodrigues et al., 2013). No mesmo tempo aumenta a expressão de um gene CC-NBS-LRR que está associado ao reconhecimento de elicitores específicos do patógeno. Esse gene está mais associado ao reconhecimento de proteínas Avr que é secretada pelo sistema de secreção do tipo III (T3SS) nas bactérias. Entretanto, como *X. fastidiosa* não tem T3SS a possibilidade da presença de um efetor específico foi descartada. Porém sugere-se que haja alguma molécula que mais tardiamente é reconhecida de forma específica pela planta, o que culmina na diminuição de auxina/JA, aumenta CC-NBS-LRR, SA e mais tardiamente compostos fenólicos, ROS e conseqüentemente a eliminação da bactéria na planta. Dados de expressão gênica apontam para uma resposta genética mediada pelo reconhecimento da bactéria inicialmente como um organismo necrotrófico, induzindo genes relacionados com a via de sinalização de auxina (modificando a parede celular vegetal) e posteriormente altera a resposta a um patógeno biotrófico (possivelmente pelo reconhecimento de outras moléculas da bactéria quando em biofilme maduro) ativando genes de defesa mediados por SA que culminam na morte da bactéria no hospedeiro resistente (Gmitter et al., 2012; Rodrigues et al., 2013).

O entendimento desse mecanismo visa além do conhecimento científico básico, o conhecimento de genes chaves para serem utilizados nos programas de transgenia em *C. sinensis*, visando resistência a patógenos. Neste sentido o uso de plantas modelo é fundamental para o avanço no conhecimento da funcionalidade destes genes e do seu papel na resposta de resistência a *X. fastidiosa*.

#### **2.4. Dificuldades na transformação de citros e o uso de plantas modelo**

Dificuldades como escapes, enraizamento, enxertia, longo ciclo da cultura e muitas variações de resposta entre variedades desencorajam em muito o processo de transformação de citros (Peña et al., 2001). Em vista disso e do amplo espectro de hospedeiros para *X. fastidiosa*, faz-se necessário a busca de hospedeiros alternativos que possam servir como planta modelo para estudos funcionais. Para isso, é necessário que a

planta possua facilidade para transformação e tenha informações disponíveis acerca do seu genoma, requisitos que inviabilizam o uso da maioria dos hospedeiros alternativos.

Uma planta modelo bastante interessante para o estudo funcional de genes candidatos à resistência a *X. fastidiosa* é *Nicotiana tabacum*, uma vez que o tabaco é conhecidamente hospedeiro susceptível de *X. fastidiosa* e gera sintomas característicos (Lopes et al., 2000). Além disso, o tabaco oferece inúmeras vantagens como planta modelo para estudos funcionais, como o seu curto ciclo de vida, dados do seu genoma completo já disponíveis (Tobacco Genome Initiative of the North Carolina State University - <http://www.pnng.org/tgi/>), facilidades no protocolo de transformação, na obtenção de transformantes e grande quantidade de sementes por cápsula (Brasileiro, 1998).

Outra planta modelo muito interessante para estudos funcionais é *Arabidopsis thaliana*, planta que possui genoma pequeno e totalmente sequenciado (The Arabidopsis Information Resource - TAIR – <http://www.arabidopsis.org>), ciclo de vida curto, pequeno porte, protocolo de transformação simples e grande produção de sementes. Além disso, em razão da sua facilidade de transformação existem bancos de mutantes de T-DNA, ou seja, coleções de plantas que apresentam algum gene específico silenciado. Já foi relatado por Rogers, (2012) que é possível a infecção de *A. thaliana* por *X. fastidiosa* que causa doença de Pierce em videiras.

Como dito anteriormente, a transformação de citros possui muitas dificuldades e isso acaba por torná-la inviável quando não se tem o conhecimento acerca da função do gene em estudo. Por outro lado, plantas modelo como *A. thaliana* e *N. tabacum* permitem o estudo da função dos genes com maior facilidade e rapidez. Sendo assim, o ideal é que se tenha um estudo dos genes em plantas modelo e depois sejam avaliados em citros apenas aqueles genes que apresentaram resultados promissores para a resistência a patógenos. Por mais que possam existir diferenças evolutivas e funcionais entre as respostas genéticas de citros e das plantas modelo, essa seleção de genes contribui fortemente para um avanço rápido das pesquisas, eliminando gastos desnecessários de tempo e recursos financeiros na avaliação de genes não promissores em citros.

## **2.5. Caracterização da infecção de *X. fastidiosa* em *A. thaliana***

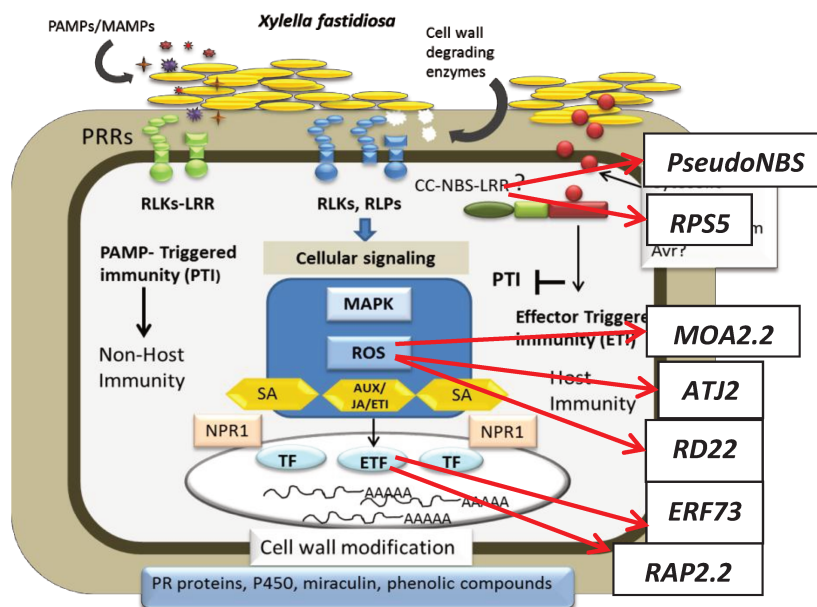
A utilização de *Arabidopsis thaliana* como planta hospedeira de *X. fastidiosa* já foi recentemente abordada no trabalho de Rogers, (2012). A estirpe utilizada neste trabalho é responsável por colonizar e causar a doença de Pierce em videiras. Apesar de

pertencerem à mesma espécie, existem diversos pontos de divergência entre as estirpes que causam doença em uva e citros. Por exemplo, há padrões distintos de sintomatologia e diferentes tempos de incubação da doença quando são inoculadas em tabaco (Francis et al., 2008; Lopes et al., 2000). Além disso, a estirpe que causa doença em citros é capaz de infectar uva, enquanto o contrário não foi constatado (Li et al., 2002). O fato é que *A. thaliana* apresentou-se como hospedeiro à estirpe que infecta uva, não apresentando sintomas, mas colonizando preferencialmente os ecótipos Tsu-1 e Van-0 em relação à Col-0 (Rogers, 2012). Essa abordagem permitiu realizar bioensaios em período extremamente curto considerando o longo ciclo de culturas perenes como uva e laranja. Dessa forma, o estabelecimento e caracterização da infecção de *X. fastidiosa* que infecta citros em *A. thaliana* é um passo primordial para o rápido avanço dos estudos no patossistema citros-*X. fastidiosa*.

## **2.6. Genes selecionados para avaliação em *A. thaliana***

Com base no modelo de resistência proposto (figura 1), houve a necessidade de estudar a função de determinados genes para comprovar seu papel no mecanismo de resistência a *X. fastidiosa*. Neste sentido, como mencionado acima, o uso de plantas modelo é fundamental para o rápido avanço no conhecimento da funcionalidade destes genes e do seu papel na resposta de resistência a *X. fastidiosa*. Para o presente trabalho foram escolhidos genes de *A. thaliana* homólogos aos de *C. reticulata* que são candidatos à resistência a *X. fastidiosa*.

A localização desses genes no modelo hipotético de resistência em *C. reticulata*, está destacada na figura 2.



**Figura 2.** Dentre os genes homólogos utilizados neste trabalho, dois pertencem à família NBS-LRR (*RPS5* e *NBS*) e podem estar atuando no reconhecimento do patógeno, três podem estar relacionados à uma resposta de estresse oxidativo (*ATJ2*, *MOA2.2* e *RD22*) e dois podem estar relacionados a uma via de sinalização mediada por etileno (*ERF73* e *RAP2.2*).

O gene *RPS5* confere resistência a *Pseudomonas syringae* que expressa o gene de avirulência *avrPphB*. Está envolvido na resposta de defesa a bactérias, interações incompatíveis e resposta de hipersensibilidade em plantas. Trata-se de um gene R do tipo NBS-LRR, ou seja, possui uma região de ligação ao nucleotídeo (NBS – *nucleotide-binding site*) e uma região rica em leucinas (LRR – *leucine-rich repeat*) (Warren et al., 1998). A proteína codificada por *RPS5* interage diretamente com a proteína de avirulência (Avr) do patógeno, porém sabe-se que em *X. fastidiosa* não foram identificados genes de avirulência (Simpson et al., 2000). Apesar disso, há trabalhos como o de Boller & Felix, (2009) que relatam a possível ação de genes NBS-LRR no reconhecimento de PAMPs. Além disso, Qi et al., (2011) relataram a associação física de um receptor de PAMP (FLS2) com proteínas do tipo CC-NBS-LRR, entre eles a codificada por *RPS5*, em *A. thaliana*. Isso sugere que um complexo protéico seja capaz da ativação indireta de *RPS5* em resposta à DAMPS decorrentes de degradação da parede celular vegetal pela bactéria. Este tipo de reconhecimento possivelmente levaria à ativação da resistência na interação *planta-X. fastidiosa*.

O gene pseudoNBS é um pseudogene que também pertence à classe de genes CC-NBS-LRR e é o mais próximo filogeneticamente de *RPS5* (Tan et al., 2007). Apesar de ser descrito como pseudogene, sabe-se atualmente que eles podem atuar através da

produção de RNAs reguladores (Sasidharan & Gerstein, 2008). Tan et al., 2007 relataram alta indução deste gene em *A. thaliana* após 4 horas de um tratamento com ácido salicílico, hormônio envolvido na resposta de defesa a patógenos.

O gene *MOA2.2* codifica a enzima glicolato oxidase que está envolvida em processos metabólicos e de oxido-redução. Atua oxidando o glicolato em glioxilato e peróxido de hidrogênio nos peroxissomos (Apel & Hirt, 2004). Em Balazadeh et al., (2012) foi descrito que a superexpressão deste gene em *A. thaliana* promove a indução de genes envolvidos na via de sinalização por jasmonato e que codificam compostos secundários.

O gene *RD22* está envolvido na resposta a dissecação, resposta a estresse salino e resposta a estímulos por ABA. Requer a biossíntese de proteínas para a expressão induzida por ABA, por isso possui alguns motivos conservados para ligação de proteínas ligantes. Por sua vez estas proteínas funcionam como fatores de transcrição para a expressão dependente de ABA do gene *RD22* (Abe et al., 1997). A proteína *RD22* age na detoxificação de espécies reativas de oxigênio produzidas durante estresse hídrico (Abe et al., 1997; Gillet et al., 1998). Sabe-se que *X. fastidiosa* induz alterações fisiológicas no hospedeiro mesmo antes do surgimento dos sintomas (Ribeiro et al., 2003). O fato de alguns genes associados a estresse hídrico serem induzidos na espécie resistente a *X. fastidiosa* sugere uma resposta eficiente e precoce do hospedeiro à presença do patógeno.

Os genes *ERF73* e *RAP2.2* codificam fatores de transcrição da via de etileno (ETFs). Estão envolvidos com a via de sinalização mediada por etileno, resposta celular a hipóxia, resposta a anóxia nuclear e regulação da expressão gênica. A grande família de fatores de transcrição ERF (ethylene response factor) está envolvida na regulação de diferentes mecanismos como o desenvolvimento floral ou a resposta a diferentes tipos de estresse abiótico, incluindo estresse hídrico (Singh et al., 2002). A superexpressão de fatores de transcrição dessa família em *N. tabacum* conferiu tolerância a estresse hídrico e osmótico, além de tolerância ao patógeno *P. syringae* pv *tabaci* (Park et al., 2001). A atuação do gene *RAP2.2* em *A. thaliana* foi descrita recentemente como responsável por conferir resistência ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, inclusive utilizando mutantes para *RAP2.2* foi constatado maior suscetibilidade ao fungo. Neste mesmo trabalho, foi visto que esse gene é regulado por etileno, indicando que durante a infecção *RAP2.2* atua como regulador transcricional na via de sinalização mediada por etileno (Zhao et al., 2012).

O gene *ATJ2* codifica uma chaperona que atua no dobramento de proteínas ou na marcação de proteínas incorretamente dobradas (Bohnert *et al.*, 1995). *DNAJ* codifica uma co-chaperonina citoplasmática pertencente à família Hsp40s que atua conjuntamente estimulando a atividade da ATPase da chaperonina DNAK (família *Hsp70s*) (Laufen *et al.*, 1999). A superexpressão de *DNAJ* em *A. thaliana* conferiu tolerância a estresse salino segundo o trabalho de Zhichang *et al.*, (2010). Também foi relatada a atuação deste gene em resposta a oídio, em que plantas de *A. thaliana* mutantes para *ATJ2* apresentaram maior suscetibilidade que o controle (Berkey, 2013).

## **2.7. Caracterização da infecção de *X. fastidiosa* em *N. tabacum***

*Xylella fastidiosa* possui colonização sistêmica e, como já mencionado anteriormente, a utilização de plantas perenes como citros, uva, ameixa e café em estudos de colonização, patogenicidade, estudos funcionais visando transgenia, entre outros são dificultados devido ao longo período de incubação da doença e longo ciclo da cultura. Por essa razão *Nicotiana tabacum* vem sendo amplamente usada como planta modelo nos estudos de interação com *Xylella fastidiosa* por apresentar sintomas em um período mais curto e ser suscetível a diferentes estirpes (Andreote *et al.*, 2006; Chatelet *et al.*, 2011; Dandekar *et al.*, 2012; De La Fuente *et al.*, 2013; Francis *et al.*, 2008)

Outros hospedeiros alternativos e de ciclo anual também já foram reportados para *X. fastidiosa*, tais como *Parthenocissus quinquefolia*, *Catharantus roseus*, *Helianthus annuus*, *Ipomoea purpurea*, *Vinca major*, *Datura meteloides*, *Artemisia douglasiana* e *Chenopodium quinoa* (Chatelet *et al.*, 2011; McElrone *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2001), porém obstáculos como baixa informação genética a respeito da cultura e dificuldades para transformação genética inviabilizam o uso como plantas modelo. Entretanto, apesar dessa planta já ter sido demonstrada como hospedeira para *X. fastidiosa* (Alves *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2000), ainda há grande falta de informação a respeito do comportamento da bactéria na planta, além de não haver nenhuma avaliação quantitativa da sintomatologia, estabelecida nos trabalhos que utilizaram essa planta como hospedeira alternativa.

A avaliação quantitativa de doenças em plantas é algo bastante utilizado em programas de melhoramento para seleção de genótipos resistentes ou tolerantes, também conhecida como fitopatometria (Campbell & Madden, 1990; Main, 1977; Zadoks & Schein, 1979). Além disso, em estudos de genoma funcional também se faz necessária

a utilização de tais técnicas para avaliar o potencial do transgene frente ao patógeno. Uma das ferramentas mais utilizadas é o uso de escalas diagramáticas, as quais nos permitem avaliar a severidade da doença na planta. Isso é imprescindível quando tratamos de genes que não conferem resistência absoluta à doença, mas certo grau de tolerância, haja vista que apenas análises da incidência da doença não nos permitem acessar tais informações sobre o nível de tolerância conferido por um determinado gene.

## **2.8. Possível papel do gene soy*BiPD* na tolerância a *X. fastidiosa* – estudo funcional em *N. tabacum*.**

O gene *BiPD* é um gene de soja e foi selecionado para avaliação em *N. tabacum* pois codifica uma chaperona envolvida no mecanismo de resistência de plantas a estresses abióticos e bióticos (Anderson *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1999; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999; Alvim *et al.*, 2001). Fietto *et al.*, (2007) realizaram uma abordagem *in silico* através da comparação de ESTs de *C. sinensis* e *C. reticulata* infectados com *X. fastidiosa*, visando a identificação de genes *Hsp70* em citros homólogos aos de *A. thaliana* e a verificação do padrão de expressão destes. Neste trabalho foi observado a indução da expressão de um gene *BiP* (*BiP-1*), mais comumente expresso em flores, em plantas de citros por *X. fastidiosa*, o que sugeria a ativação de uma via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR). Os autores confirmaram essa hipótese em razão da superexpressão de um ortólogo da calreticulina, um gene que é ativado pela via UPR. Essa via de transdução de sinal é ativada quando ocorre acúmulo de proteínas mal dobradas no RE e é caracterizada por uma cascata de sinalização que permite a comunicação entre o RE e o núcleo, promovendo um aumento coordenado da transcrição de genes *BiP* e outros que são envolvidos no dobramento de proteínas recém-sintetizadas no RE (Lee, 1992).

A chaperona molecular *BiP* é uma proteína de 78KDa que pertence à família Hsp70 e representa uma das chaperonas do RE mais bem caracterizada. A expressão de genes *BiP* tem mostrado responder a uma variedade de estresses abióticos e bióticos, incluindo estresse hídrico, ataque de patógenos, estresse nutricional, aclimação ao frio e elicitores da resposta planta-patógeno (Anderson *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1999; Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999; Alvim *et al.*, 2001). Segundo Jelitto-Van Dooren *et al.*, (1999) os genes *BiP* respondem a estímulos causados por enzimas que degradam parede celular, simulando um ataque de patógenos.

Alvim et al., (2001) mostraram que a superexpressão constitutiva de um gene *BiP* de soja (*soyBiPD*) conferia tolerância à seca durante o crescimento e tolerância à tunicamicina durante germinação (indutor de estresse no RE, impede glicosilação de proteínas e induz a via UPR) em *Nicotiana tabacum*. Em soja existem quatro genes *BiP*: *soyBiPA*, *soyBiPB*, *soyBiPC* e *soyBiPD* e os autores escolheram estudar o *soyBiPD* em razão deste ser expresso em todas as partes da planta. Segundo Valente *et al.*, (2008) a superexpressão deste gene *BiPD* em soja e tabaco resultou em aumento da tolerância à seca e retardamento da senescência foliar. As plantas superexpressando o gene *BiPD* não apresentaram respostas típicas de combate à seca como aumento da presença de osmoprotetores (prolina e açúcares solúveis), aumento da parte radicular, diminuição da fotossíntese, transpiração e atividade estomática, o que indica um mecanismo diferenciado de resposta. Também foi visto que o gene *BiPD* inibiu a indução de diferentes classes de genes responsivos (Valente et al., 2009). Sugere-se que as mudanças no processo de dobramento de proteínas no RE tenham servido como um mecanismo de detecção precoce do estresse hídrico. Tanto a desidratação por PEG simulando estresse osmótico utilizada no trabalho de Irsigler et al., (2007) como o estresse hídrico, promoveram uma repressão de alvos específicos da via UPR como *BiPs* e *calreticulina/calnexina*. Isso indica que os estresses regulam inversamente a via UPR prejudicando o dobramento de proteínas no RE.

O gene *BiPD* também mostrou regular vias pró-apoptóticas que emanam do RE quando este não consegue regular sua homeostase. Os autores ainda sugerem que o controle homeostático de íons  $Ca^{2+}$  no RE poderia promover efeitos fisiológicos pleiotrópicos como a tolerância à seca (Valente *et al.*, 2009).

Apesar de ainda não se saber ao certo todos os mecanismos que ativam os genes *BiP*, sabe-se que são responsáveis pelo aumento da resistência ao estresse hídrico em plantas e talvez por uma via de sinalização que envolva PAMPs (Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999). Na citricultura brasileira é comum a ocorrência de déficits hídricos em certas regiões e períodos, sobretudo devido à prática de irrigação ser raramente empregada (Ortolani *et al.*, 1991), o que está relacionado a menores taxas de fotossíntese (Brakke and Allen, 1995). Por sua vez, *X. fastidiosa* também induz estresse hídrico em plantas infectadas e conforme mencionado em Fietto et al., (2007) a infecção de citros por *X. fastidiosa* promove a indução de um gene *BiP* de citros e ativação de uma via de resposta (UPR) em *C. reticulata*. Dessa forma, o estudo do gene *BiPD* para estresses bióticos como *X. fastidiosa* é uma forma de avaliar o seu potencial em induzir resistência contra



esse fitopatógeno, seja em plantas modelo ou propriamente em citros. Assim, plantas de tabaco supexpressando o gene soy*BiPD* e desafiadas com *X. fastidiosa* poderiam acelerar o conhecimento a cerca desse gene quanto a potencialidade em conferir resistência a esse patógeno, dando assim, subsídios experimentais, se este seria ou não um bom candidato para transformação em *C. sinensis*.

### 3. HIPÓTESE DO TRABALHO

*Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* são hospedeiros de *Xylella fastidiosa* e poderiam ser usadas como plantas modelo para estudos funcionais de genes visando tolerância a esse fitopatógeno.

A resistência de *C. reticulata* à CVC deve-se à existência de alguns genes específicos ou pela ativação da expressão de genes de defesa em comparação à *C. sinensis*. Dessa forma, alguns genes de *C. reticulata* podem conferir resistência a *X. fastidiosa* e isso pode ser testado usando plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*.

O gene *BiPD* de soja é relatado como associado à resposta a resistência a estresses bióticos e abióticos, por sua vez a superexpressão deste gene poderia evitar ou diminuir a colonização de *X. fastidiosa* e o aparecimento de sintomas.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivos Gerais

1. Estabelecer e caracterizar o uso das plantas modelo *N. tabacum* e *A. thaliana* para o estudo funcional de genes de citros.
2. Avaliar o possível papel biológico de genes de *A. thaliana* homólogos a *C. reticulata* na resposta a *X. fastidiosa*.
3. Verificar o possível papel biológico do gene *BiPD* na resistência a *X. fastidiosa* usando a planta modelo *N. tabacum*.
4. Selecionar genes potencialmente envolvidos na resposta de defesa à *X. fastidiosa* para transformação genética em *Citrus sinensis*.

## 4.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer e caracterizar a infecção de *X. fastidiosa* em ecótipos de *A. thaliana*;
- Avaliar a resposta da infecção por *X. fastidiosa* em mutantes de *A. thaliana* para os genes *RD22*, *PseudoNBS*, *RPS5*, *ERF73*, *RAP2.2*, *MOA2.2*, e *ATJ2*;
- Otimizar e caracterizar respostas quantitativas da infecção de *X. fastidiosa* em *N. tabacum*;
- Avaliar a resposta da infecção por *X. fastidiosa* em tabaco superexpressando o gene *soyBiPD*;

## ***CAPÍTULO I. Arabidopsis thaliana como planta modelo para estudo da interação com X. fastidiosa***

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Seleção do método de inoculação

Em um experimento piloto foram testadas três diferentes metodologias de inoculação a fim de selecionar a que seria mais adequada em termos de praticidade, rapidez e maior taxa de infecção. Em todas as metodologias a concentração inicial de bactéria foi de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL.

A primeira metodologia (inoculação por injeção) baseou-se na injeção de solução bacteriana por uma seringa no pecíolo das plantas. Primeiramente realizou-se o corte do limbo foliar, deixando os vasos condutores do pecíolo expostos para introdução da solução bacteriana através da seringa.

Outra metodologia utilizada baseou-se na absorção da bactéria pelo contato com as raízes das plantas (inoculação via raiz). Plântulas crescidas em meio de cultura MS/2 (Mourashige & Skoog, 1962) tiveram as extremidades das raízes cortadas para facilitar absorção e expostas durante uma hora à solução bacteriana, sendo posteriormente cultivadas em vasos com substrato.

Por fim, a outra metodologia baseou-se na introdução da solução bacteriana com o auxílio de uma agulha (inoculação por perfuração de agulha) (Almeida et al., 2001). A

solução bacteriana era depositada sobre o pecíolo próximo à junção com o caule da planta e introduzida através de perfurações com o auxílio de uma agulha entomológica.

## **5.2. Avaliação de sintomas**

Foram avaliados os possíveis sintomas decorrentes da inoculação das estirpes 11399-GFP e 9a5c de *X. fastidiosa* em *A. thaliana* por meio do acompanhamento diário das plantas inoculadas e observações de alguma diferença fenotípica entre os tratamentos e o controle inoculado com tampão PBS (8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,78g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,27g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH 7,4).

## **5.3. Delineamento experimental**

Após seleção do método de inoculação, foi realizado um experimento com os ecótipos Van-0, Tsu-1 e Col-0 para seleção do ecótipo mais suscetível a ser utilizado como background genético para os mutantes. Dessa forma, os mutantes de *A. thaliana* selecionados poderiam ser comparados fielmente ao seu respectivo ecótipo selvagem. Neste experimento utilizou-se a estirpe 11399-GFP com a finalidade de conhecer seu padrão de colonização nas plantas selvagens e possibilidade de observações da colonização por microscopia de fluorescência.

Outro experimento foi realizado utilizando apenas o ecótipo selvagem mais suscetível encontrado e a estirpe 9a5c, estirpe mais virulenta que 11399, com a finalidade de quantificar a população bacteriana em diferentes períodos após a infecção (duas, três, quatro e cinco semanas após inoculação). Foram utilizadas dez plantas em cada período e as análises estatísticas para comparação de médias foram realizadas utilizando teste de Tukey (P<0,05).

## **5.4. Cultivo das plantas, preparo do inóculo e inoculação.**

Para o início do cultivo das plantas, sementes de *A. thaliana* foram desinfestadas com etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio 40% por 20 minutos e quatro lavagens em água MilliQ estéril. A germinação e o desenvolvimento inicial foram realizados *in vitro* em meio de cultura MS/2 sólido acrescido de 4,4 ml/l de tampão MES 3mM pH 5,7 e ajustado a 0,3% de glicose e 0,55% de ágar. Para a quebra de dormência as sementes foram mantidas durante 72 horas no escuro a 4°C. Para as sementes de *A. thaliana*

mutantes para o gene de interesse, foi adicionado 100mg/l de canamicina ao meio para seleção das sementes, uma vez que o gene da canamicina havia sido inserido previamente em um cassete junto ao T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* para nocaute das plantas.

As plântulas originadas em meio de cultura foram transplantadas para vasos contendo substrato para cultivo de hortaliças (Plantmax HT) e vermiculita na proporção 2:1, respectivamente. As plantas foram cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura constante de 22°C em câmara de crescimento Conviron Adaptis 1000.

A estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* foi isolada de plantas de laranja doce com sintomas de CVC e cultivada em meio PW (Davis, 1981) por 7 dias a 28°C. A partir disso, foi efetuada a raspagem das placas e a bactéria foi ressuspensa em tampão PBS para inoculações. Já a estirpe 11399-GFP foi obtida através da marcação com GFP da estirpe 11399 pelo nosso grupo (Niza, 2011). A estirpe 11399 havia sido cedida pelo IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná) e utilizada para estudos de diversidade genética por Coletta-Filho et al., (2001). Após ser mantida a - 80°C, a estirpe 11399-GFP foi cultivada em meio PW e ressuspensa em PBS para inoculações.

O processo de inoculação foi feito em plantas de 4 a 5 semanas pelo método de perfuração por agulha (figura 3), com a aplicação de 5µl de uma suspensão bacteriana (OD= 0,2 a 600nm) sobre a parte basal de um pecíolo da folha da planta e utilizando perfurações com agulha entomológica para introdução da solução (Almeida *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Inoculação de plantas de *A. thaliana* pelo método de perfuração por agulha. **A.** Aplicação da solução. **B.** Introdução da solução através de perfurações.

## 5.5. Coleta das amostras e extração de DNA

Para detecção e quantificação de *X. fastidiosa*, foram separados com auxílio de uma tesoura a raiz na parte basal da planta e os limbos foliares juntamente com hastes florais na parte superior, de forma a deixar apenas os pecíolos compreendidos em torno de 1 cm da base da planta. Esse material foi então macerado em nitrogênio líquido, pesado e utilizado para extração de DNA segundo Doyle & Doyle (1987) com modificações. O material foi incubado por 1 hora com 0,8ml de tampão de extração (Tris-HCl 0,1M pH 8,0; 2% de CTAB, Sigma; EDTA 0,02M; NaCl 1,4M, Merck, e 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol) pré aquecido a 65°C. Após esse período duas extrações com 1 volume de fenol:clorofórmio (24:1 v/v) foram realizadas. O DNA foi precipitado por 4 horas com 1 volume de isopropanol (Merck) gelado. Após a lavagem com etanol 70%, o precipitado foi lavado com etanol absoluto, seco à temperatura ambiente, dissolvido em 30 $\mu$ l de TE+RNase A (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH8,0, Ultra Pure EDTA; 100 $\mu$ g/ml de RNase A, Sigma) e incubado por 30 minutos a 37°C. A integridade do DNA foi observada em gel 1% de agarose e quantificado no Nanodrop™ 8000 (Thermo Scientific).

## 5.6. Monitoramento da população bacteriana nas plantas por qPCR

O monitoramento da população bacteriana nos pecíolos de *A. thaliana* foi realizado por PCR Quantitativo em tempo real (qPCR) no período de maior população bacteriana nas plantas (selecionado por experimento prévio, item 5.3), com um mínimo de seis repetições biológicas para cada tratamento. A reação de amplificação foi realizada num volume de 25  $\mu$ l contendo 12,5  $\mu$ l TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500nM da sonda TAQCVC (5'-(6FAM)AAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TC(TAMRA)-3'), 525 nM dos *primers* CVC-1 (AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA) e CCSM-1 (GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT) descritos por Oliveira et al., (2002), e 2 $\mu$ g do DNA da amostra. Em cada corrida experimental foram sempre utilizados os controles negativo (planta inoculada com PBS) e positivo (DNA genômico da bactéria). Todas as amostras foram testadas em triplicatas dentro de cada corrida experimental. A amplificação e a captura do sinal foram realizadas no ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). O número de células de *X. fastidiosa* foi estimado através da comparação com uma curva padrão, construída correlacionando-se a concentração de DNA (número de cópias) com a fluorescência medida ( $C_t$  – ciclo *threshold*). Quantidades

conhecidas de DNA genômico de *X. fastidiosa* foram diluídas em DNA da planta em concentrações entre  $10^2$  e  $10^8$  para construção da curva padrão. A equação da curva gerada para *A. thaliana* ( $y = -4,8169x + 50,647$ ) apresentou coeficiente  $R^2$  igual a 0,9944. A análise estatística dos resultados foi realizada através da comparação de médias, utilizando análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 5.7. Obtenção dos mutantes de *A. thaliana*

A partir da busca e seleção de genes de *A. thaliana* homólogos aos genes promissores de *C. reticulata* à conferir resistência a *X. fastidiosa*, buscou-se no banco de mutantes do instituto SALK (<http://signal.salk.edu/>) os respectivos mutantes de *A. thaliana* para tais genes (tabela 1).

**Tabela 1** – Mutantes Salk de *A. thaliana* para os genes homólogos de *C. reticulata* candidatos à resistência a *X. fastidiosa*.

Mutante ID	Gene ID	Gene	T-DNA
SALK_146066C	At5g25610	<i>RD22</i>	90pb
SALK_127201C	At1g12220	<i>RPS5</i>	73pb
SALK_039484C	At1g72360	<i>ERF73</i>	84pb
SALK_010265C	At3g14230	<i>RAP2.2</i>	84pb
SALK_071563C	At5g22060	<i>ATJ2</i>	88pb
SALK_051930C	At3g14420	<i>MOA2.2</i>	84pb
SALK_080562C	At4g14610	<i>PseudoNBS</i>	94pb

Fonte: The Arabidopsis Information Resource (TAIR, 2013).

As sementes dos mutantes de *A. thaliana* selecionados foram então adquiridas e cultivadas, passando primeiramente por uma confirmação quanto a presença e homozigose do T-DNA nas sementes antes dos experimentos.

### 5.8. Testes para confirmação dos mutantes de *A. thaliana*

Para comprovar que as sementes adquiridas eram realmente mutantes para os genes de interesse foram desenhados e sintetizados *primers* (tabela 2) com o objetivo de constatar a ausência ou presença do T-DNA inserido no gene. O silenciamento ocorre pela introdução do T-DNA dentro do gene de interesse, deixando o locus interrompido. No caso, a planta mutante tem um T-DNA inserido por *Agrobacterium spp.* no momento da

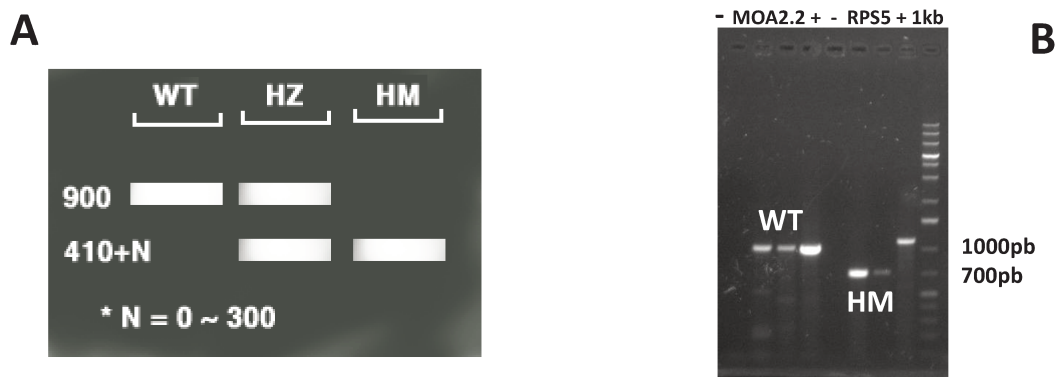
transformação e esse T-DNA pode ter sido inserido no local do gene causando o seu silenciamento ou não.

A detecção dos mutantes é realizada através de PCR utilizando-se 3 *primers*, um deve estar localizado à esquerda da inserção do T-DNA (*primer* LP), outro deve estar localizado à direita (*primer* RP) e o terceiro deve estar localizado dentro do T-DNA inserido. Dessa forma, quando o amplicon apresentar um tamanho menor que a distância entre os *primers* LP e RP é sinal de que o *primer* LbB1.3 se ligou ao T-DNA e portanto o T-DNA está inserido no gene causando o silenciamento (figura 4A).

**Tabela 2.** Sequências dos *primers* utilizados na detecção dos mutantes de T-DNA.

Gene ID	Primer LP	Primer RP
At5g2560	5' – ACCGGACATTCATTTCTTTCC – 3'	5' – AGCATTTAAGGAGCAGAAGGC–3'
At1g12220	5' – TTTGTGGTTTCTGCTCCAAAG – 3'	5' – CATCATGCATTTTCACGTTTG – 3'
At1g72360	5' – AATTATTCGCGATATACCG – 3'	5' – ATTGAGCTTAGCTTTGGCTCC – 3'
At3g14230	5' – GAGCTAAGGACGGTAAGCTGG – 3'	5' – CAACGGACGATTGTATTGGAC – 3'
At5g22060	5' – GGATTCTGATTGATAAAAGAAAACC – 3'	5' – TATGACTTCCGAATGGGTGTC – 3'
At3g14420	5' – GACACCCCAAGGCTAGGCCG – 3'	5' – TTCAAAGTTCTTCAATGTCA – 3'
At4g14610	5' – CAACTTACAACCTCCTCCT – 3'	5' – CATGATAAATCCAATACGAC – 3'
<b>Primer LbB1.3</b>	5'– ATTTTGCCGATTTCCGGAAC – 3'	

Após a aquisição dos *primers* foram realizadas amplificações e constatou-se que a grande maioria das plantas eram homozigotas para os genes silenciados, ou seja, possuíam a inserção de T-DNA nos dois genomas de *A. thaliana* (diplóide) sendo então selecionadas para a realização do experimento. Apesar disso, também foram constatadas plantas selvagens contidas no pool de sementes mutantes para o gene *MOA2.2*, ressaltando a importância dessa verificação prévia (figura 4B). Essa confirmação também evita o uso de mutantes heterozigotos, ou seja, que apresentam mutação em apenas uma cópia do gene, o que interferiria nos resultados.



**Figura 4.** PCR para detecção de mutantes em tabaco. **A.** Representação de como deve ser o tamanho dos amplicons no gel. WT indica os genótipos selvagens, HM indica homozigotos mutantes e HZ indica heterozigotos. **B.** Gel para supostos mutantes dos genes *MOA2.2* e *RPS5*.

Como pode ser observado, o suposto mutante para o gene *MOA2.2* é na verdade selvagem, enquanto o suposto mutante para o gene *RPS5* é realmente mutante e em homozigose.

Apenas plantas de *A. thaliana* selecionadas para o genótipo homozigoto mutante foram utilizadas nos experimentos de inoculação, conforme descrito anteriormente.

Foram utilizados os sete mutantes selecionados mais o ecótipo selvagem para inoculação com a estirpe 11399-GFP, visando a quantificação da população bacteriana no período de maior infecção (selecionado no experimento descrito anteriormente, item 5.3) e visualização da bactéria por microscopia de fluorescência. Os mutantes que apresentaram maior população bacteriana em relação ao ecótipo selvagem foram então selecionados para um segundo experimento biológico e análise da colonização da bactéria por microscopia de fluorescência.

Cerca de 10 plantas de cada mutante foram utilizadas em cada experimento, totalizando 110 plantas, das quais 80 foram utilizadas em um primeiro experimento biológico e mais 30 plantas em um segundo experimento para confirmação. A análise estatística foi realizada por comparação das médias através de teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

### **5.9. Microscopia para observação da fluorescência de *X. fastidiosa* contendo GFP no interior da planta**

O experimento foi avaliado no período de maior população bacteriana nas plantas. As avaliações foram feitas de modo destrutivo, em que pelo menos 5 plantas de cada tratamento foram utilizadas por época de avaliação. Foram coletadas amostras de caule juntamente com os pecíolos em pontos próximos ao da inoculação visando comparar a população bacteriana presente nos tratamentos. Para tal, amostras de pecíolos foram seccionadas e preparadas para os estudos de microscopia como descrito por Newman et al. (2004). Cortes individuais de hastes e pecíolos foram realizados com bisturi, montados em lâminas e imersos em glicerol 50%. As observações foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX6, com filtro para GFP, nos aumentos de 4X, 10X e 40X.

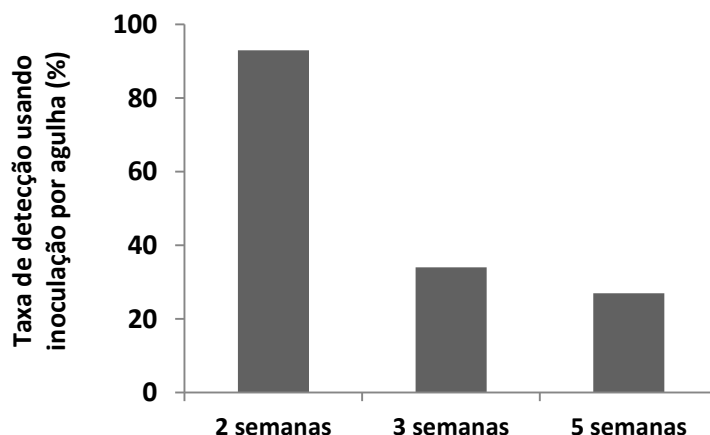


## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização da colonização de *X. fastidiosa* em *A. thaliana*

#### 6.1.1. Seleção do método de inoculação em *A. thaliana*

O método de inoculação utilizado foi selecionado a partir de experimentos anteriores em que comparamos três metodologias de inoculação (inoculação por injeção, inoculação via raiz e inoculação por perfuração de agulha), como descrito no material e métodos. Para esse experimento prévio foram utilizadas plantas do ecótipo Col-0 inoculadas com a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*. Não houve diferença significativa na taxa de infecção entre as técnicas de injeção e inoculação via raiz (dados não mostrados). Ambas mostraram apenas algumas plantas positivas para a presença da bactéria, demonstrando que a técnica de inoculação não foi eficiente. A técnica que apresentou melhor resultado foi a de inoculação por perfuração de agulha que permitiu uma detecção eficaz por qPCR, na maioria das plantas inoculadas (figura 5). Esse método também foi utilizado com sucesso por Rogers (2012) em trabalho de inoculação de *X. fastidiosa* causadora da doença de Pierce em *A. thaliana*.



**Figura 5.** Taxa de detecção de *X. fastidiosa* estirpe 9a5c em plantas de *A. thaliana* ecótipo Col-0 inoculadas pelo método de perfuração por agulha. Porcentagens correspondem ao número de plantas positivas em relação ao total de plantas inoculadas. Mínimo de 30 plantas avaliadas por período.

As taxas de detecção da bactéria obtidas em diferentes períodos de infecção comprovam que o método de inoculação por agulha foi eficaz em introduzir a bactéria nas

plantas, haja vista que 93% destas foram detectadas após duas semanas da inoculação (figura 5). Entretanto há certa dificuldade na detecção da bactéria após esse período, indicando um possível declínio na população bacteriana nesse hospedeiro. Em *A. thaliana* inoculada com *X. fastidiosa* causadora da doença de Pierce em videira, os autores verificaram a presença da bactéria 1 semana após inoculação e constataram aumento da população bacteriana duas semanas após inoculação. Entretanto não realizaram a avaliação em um *time course* mais avançado para caracterizar o comportamento da bactéria após duas semanas em *A. thaliana*.

### **6.1.2. Avaliação de possíveis sintomas**

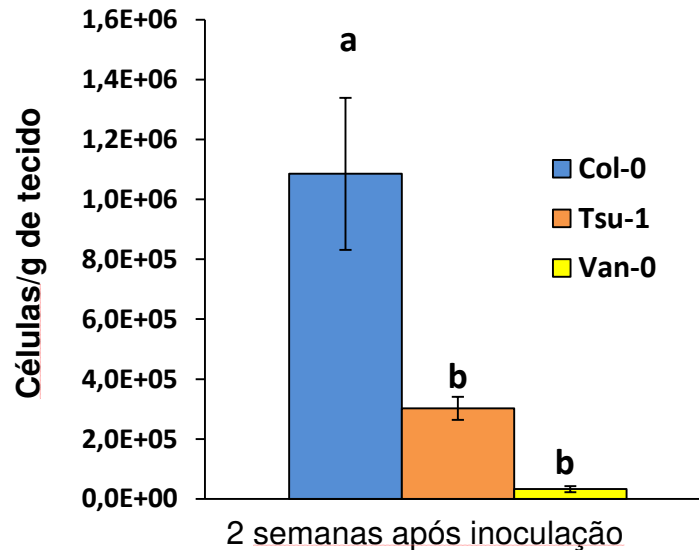
Nenhuma alteração fenotípica evidente foi observada entre as plantas inoculadas (9a5c ou 11399-GFP) e não inoculadas que pudessem ser atribuída a um possível sintoma causado pela bactéria (figura 6A e 6B). Resultado similar foi observado por Roger (2012) que também não observou nenhum sintoma resultante da infecção de *X. fastidiosa* que coloniza uva em plantas de *A. thaliana*. Entretanto, em nossos estudos sintomas como arroxamento e amarelecimento apareceram mais rápido, em torno de 3 semanas após inoculação, em plantas inoculadas com *X. fastidiosa* do que nas plantas controle (figura 6C e 6D) que apresentaram esse sintoma mais tardiamente, cerca de 4 a 5 semanas após inoculação. Esse tipo de sintoma é comum em *A. thaliana* quando estão em condições de estresse nutricional (Vellanoweth, 1997). O fato das plantas inoculadas apresentarem esses sintomas mais rápido sugere que *X. fastidiosa* possa estar causando estresse na planta e, como consequência, induzir os sintomas de estresse nutricional mais rapidamente.



**Figura 6.** Plantas de *A. thaliana* inoculadas com *X. fastidiosa*. **A.** Planta inoculada com PBS. **B.** Planta inoculada com *X. fastidiosa*. **C.** Folhas acima apresentando arroxamento comparadas a folhas de planta inoculada com PBS abaixo. **D.** Planta apresentando amarelecimento das folhas à direita comparado ao controle inoculado com PBS à esquerda. **A e B.** Plantas avaliadas duas semanas após inoculação. **C e D.** Plantas avaliadas três semanas após inoculação.

### 6.1.3. Seleção do ecótipo selvagem mais suscetível

Visando determinar qual o melhor ecótipo de *Arabidopsis* para o estudo da interação com *X. fastidiosa*, foi realizada a inoculação e quantificação da população bacteriana nos ecótipos Col-0, Tsu-1 e Van-0 e avaliada duas semanas após inoculação (figura 7).



**Figura 7.** Quantificação da estirpe 11399-GFP de *X. fastidiosa* em ecótipos selvagens de *A. thaliana*. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística pelo teste de tukey ( $p < 0.05$ ).

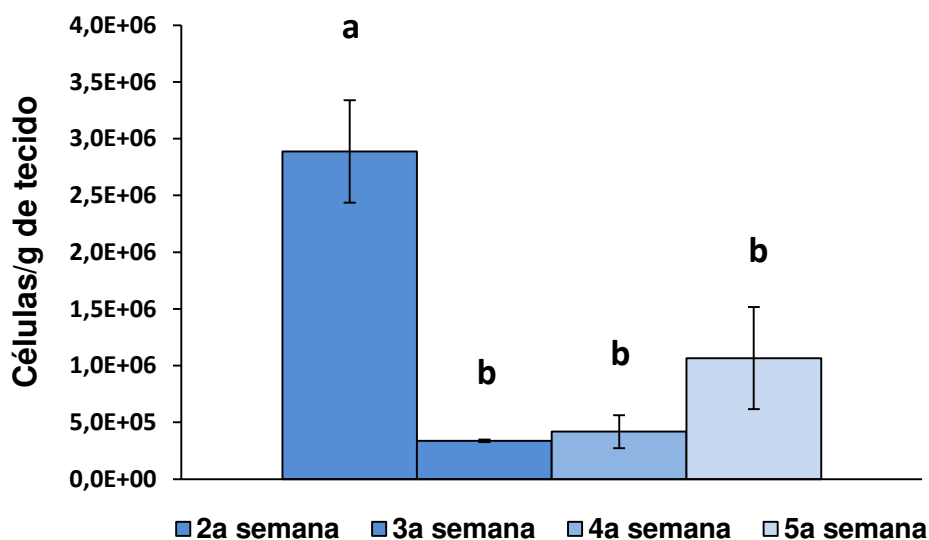
O ecótipo Col-0 apresentou população bacteriana significativamente maior que os demais e por isso os mutantes de *A. thaliana* foram selecionados com este background genético. Curiosamente, em *X. fastidiosa* que infecta uva (Rogers, 2012), os ecótipos Van-0 e Tsu-1 foram os menos suscetíveis à colonização, sugerindo que possa haver um certo grau de especificidade ou preferência hospedeira entre os ecótipos e as diferentes estirpes de *X. fastidiosa*.

Após duas semanas da inoculação a população bacteriana presente em nossas plantas Col-0 foi inferior ao encontrado em Rogers, (2012), cerca de 1 célula/ $\mu$ g de DNA total em relação à 9,76 células/ $\mu$ g de DNA total. Essa diferença provavelmente se deve às diferenças entre as estirpes que colonizam citros e uva, respectivamente.

#### 6.1.4. Caracterização da infecção ao longo do tempo

Após a seleção de Col-0 como ecótipo selvagem mais suscetível, este mesmo ecótipo foi novamente inoculado, desta vez com a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* (mais virulenta que 11399), para avaliar o comportamento da população bacteriana durante a infecção. Como observado na figura 8, embora *X. fastidiosa* seja capaz de colonizar *A. thaliana*, essa colonização não é eficiente, ou seja, não ocorre um aumento significativo da população bacteriana durante o *time course* da infecção, uma vez que após duas

semanas houve um declínio significativo na população bacteriana na planta. Esses resultados estão de acordo com os observados na figura 5, entretanto, assim como observado por trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Niza, B. - dados não publicados) que indicam a estirpe 11399 como menos virulenta que 9a5c, a população quantificada para a estirpe 9a5c (figura 8) foi superior à 11399-GFP (figura 7). De forma geral, podemos dizer que *A. thaliana* apresentou um comportamento de tolerância à bactéria, similar à espécie *C. reticulata* (De Souza et al., 2009) onde foi demonstrado que *X. fastidiosa* coloniza o hospedeiro por um breve período (até 30 dias), ocorrendo um declínio 60 dias após inoculação.



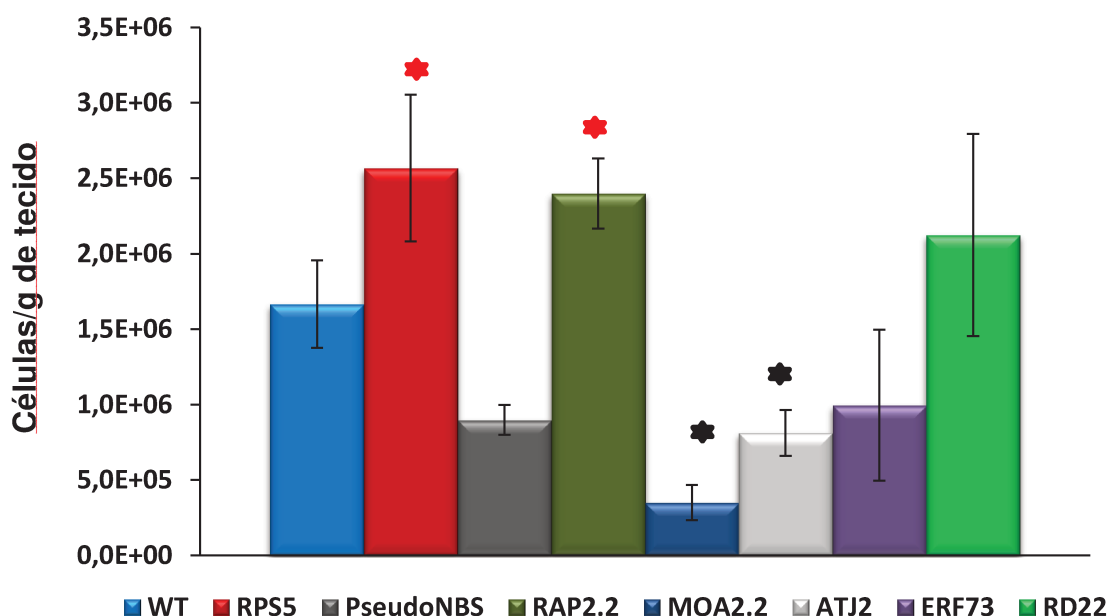
**Figura 8.** Quantificação da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* no ecótipo selvagem Col-0 durante o período da infecção. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 6.2. Avaliação dos mutantes de *A. thaliana* selecionados

### 6.2.1. Quantificação da população bacteriana por qPCR

Uma vez que *A. thaliana* se mostrou uma boa planta modelo com perfil de tolerância à *X. fastidiosa*, a utilização de mutantes de genes ortólogos de *C. reticulata*, potencialmente associados à resistência a *X. fastidiosa*, seria uma boa estratégia para testar a funcionalidade destes genes, assim como, uma possível função conservada entre as espécies na resposta a esse patógeno. Desta forma, espera-se que mutantes para genes associados a defesa apresentem maior colonização por *X. fastidiosa*, uma vez que,

sua função está comprometida. Para a quantificação bacteriana nos sete mutantes selecionados foi utilizada a estirpe 11399-GFP, uma vez que, além do estudo da população por qPCR também seria possível visualizar a fluorescência da bactéria na planta por microscopia de fluorescência. Como controle, o ecótipo selvagem Col-0 também foi inoculado e todas as plantas foram analisadas no período de duas semanas após inoculação. Na figura 9 observa-se que os mutantes para os genes *RPS5* e *RAP2.2* apresentaram população bacteriana significativamente maior que o tipo selvagem. Apesar do aumento da população nesses mutantes ser aparentemente pequeno, esse aumento foi de aproximadamente o dobro da população da bactéria observada no tipo selvagem, e tratando-se de *A. thaliana* que é de pequeno porte, tem curto ciclo de vida e apresenta característica de tolerância ao patógeno, consideramos esses resultados promissores, indicando um possível papel do gene no processo de resistência da planta à colonização pela bactéria, e devido a ausência da função deles, houve maior colonização do patógeno.

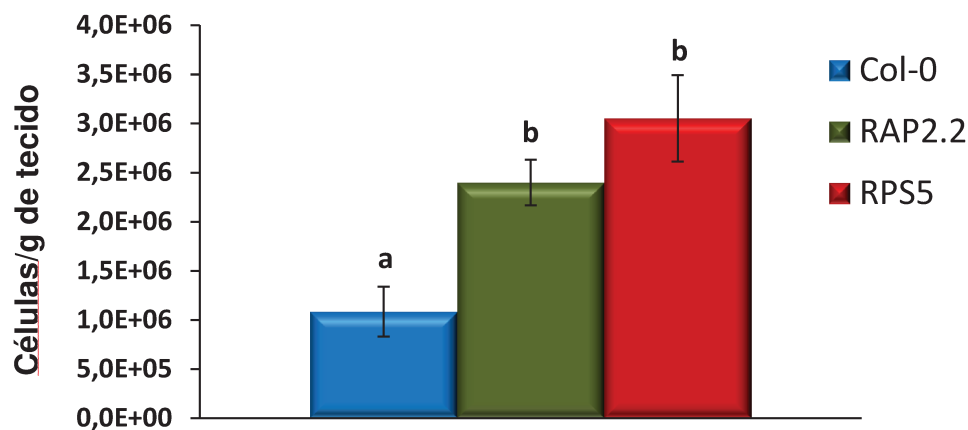


**Figura 9.** Quantificação de *X. fastidiosa* presente nos mutantes em relação ao tipo selvagem duas semanas após a inoculação. Asteriscos acima das barras indicam diferença estatística em relação ao controle selvagem ( $p > 0.05$ ).

Dentre os mutantes analisados também podemos observar que dois deles (*MOA2.2* e *ATJ2*) tiveram uma colonização significativamente menor em relação ao tipo selvagem, sugerindo uma possível participação na suscetibilidade da planta à colonização

bacteriana. Genes associados a suscetibilidade tem sido atualmente objeto de estudo na interação planta-patógeno (Eckardt, 2002; Lapin & Van der Ackerveken, 2013). Dessa forma, esses genes são promissores para o estudo futuro visando esse tipo de abordagem na interação com *X. fastidiosa*.

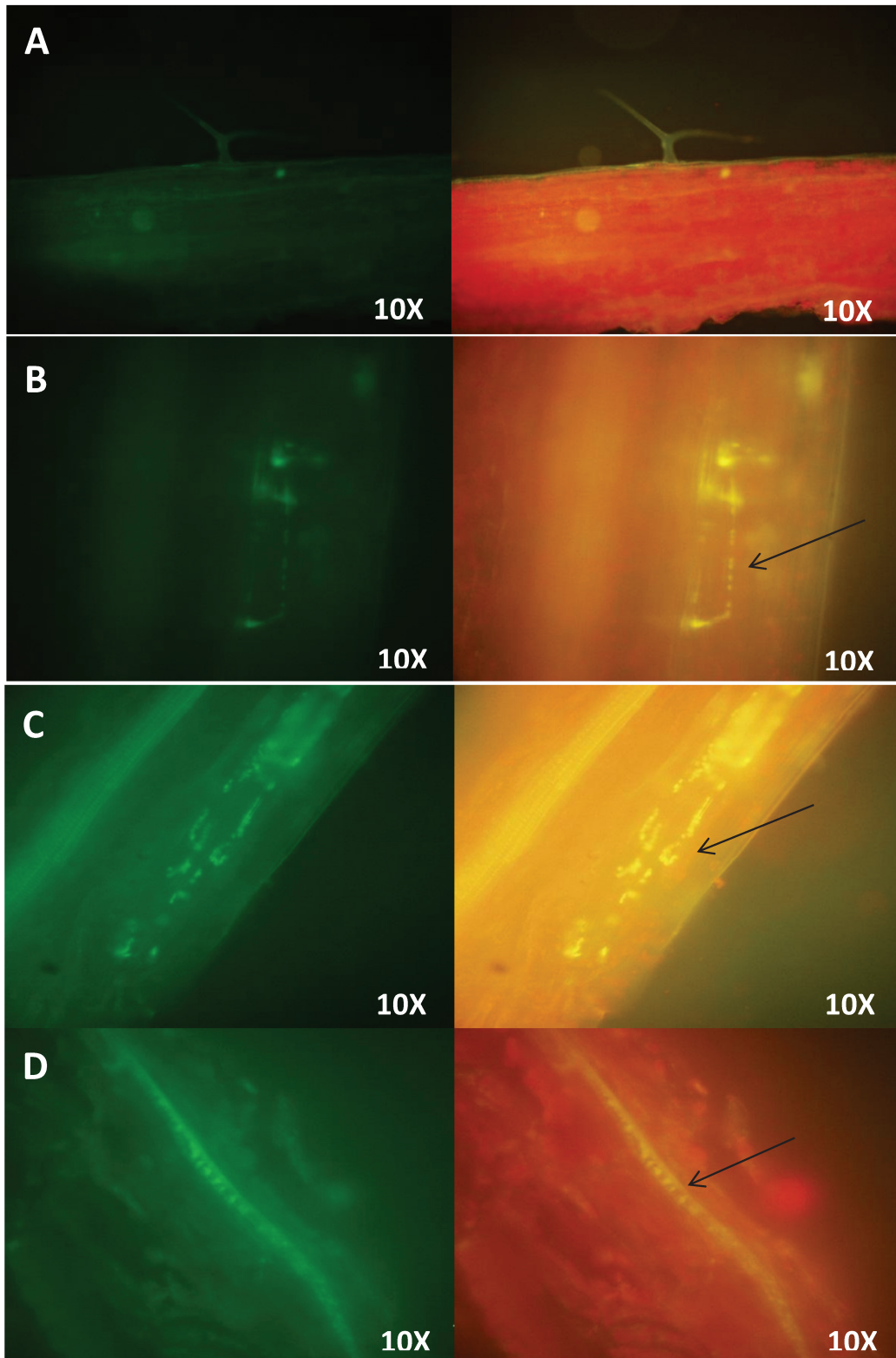
Uma vez que, o objetivo do presente estudo é a seleção de genes que possam estar associados à resposta de defesa contra *X. fastidiosa*, foi realizado um novo experimento biológico, apenas com os mutantes para os genes *RAP2.2* e *RPS5* para confirmar seu potencial em conferir resistência à *X. fastidiosa*. Como observado na figura 10, maior colonização da bactéria foi observada nos mutantes para os genes *RAP2.2* e *RPS5*, confirmando seu papel em conferir tolerância a colonização de *X. fastidiosa* em *A. thaliana*.



**Figura 10.** Quantificação de *X. fastidiosa* para os mutantes mais promissores. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.2. Análise da colonização por microscopia de fluorescência

Com o objetivo de comparar a colonização bacteriana através da fluorescência emitida pela bactéria no interior de plantas mutantes com relação ao tipo selvagem, foram preparados cortes longitudinais a partir de pecíolos de plantas inoculadas. Utilizou-se como controle uma planta inoculada com PBS, a fim de verificar a possível autofluorescência emitida pelo material vegetal (figura 11A), e a planta tipo selvagem inoculada com a bactéria para comparação com as plantas mutantes para os genes de interesse. Comparando-se a colonização bacteriana nos mutantes com relação ao tipo selvagem pode-se observar que houve uma maior colonização bacteriana nos mutantes *RAP2.2* (figura 11C) e *RPS5* (figura 10D) do que no tipo selvagem (figura 11B).

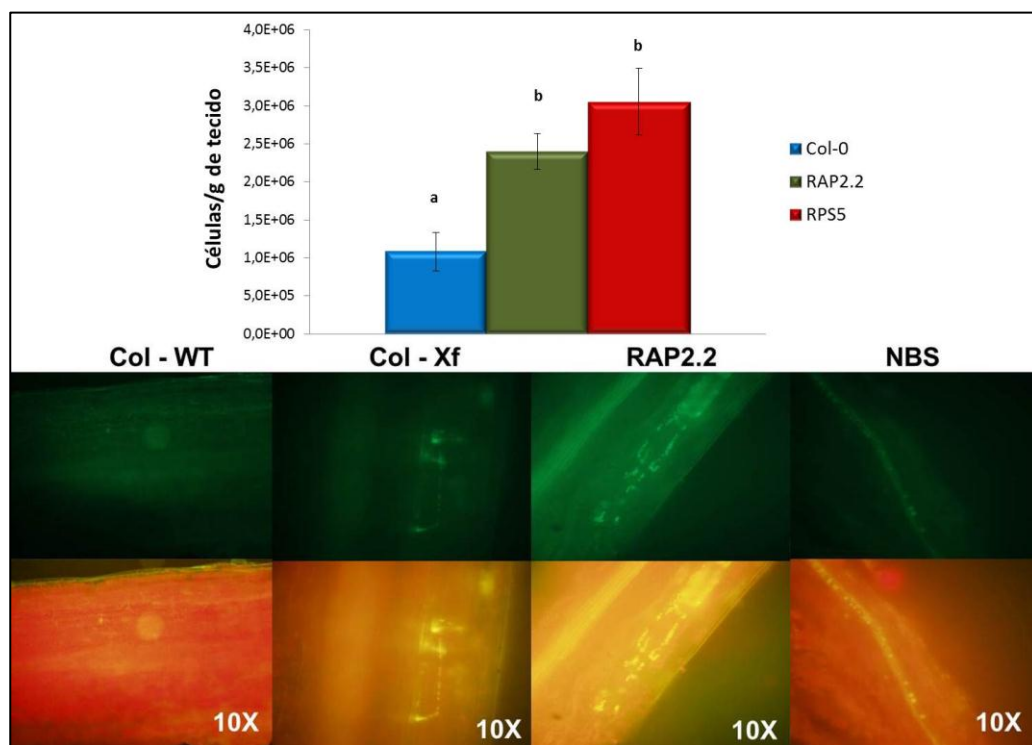


**Figura 11.** Fluorescência emitida por GFP em linhagem transformada de *X. fastidiosa* no interior de plantas de *A. thaliana*. Imagens obtidas por filtro verde à esquerda, comparadas com filtro vermelho à direita. **A.** Ecótipo selvagem Col-0 inoculado com PBS.



**B.** Col-0 inoculado com 11399-GFP. **C.** Mutante para *RAP2.2* inoculado com 11399-GFP. **D.** Mutante para *RPS5* inoculado com 11399-GFP.

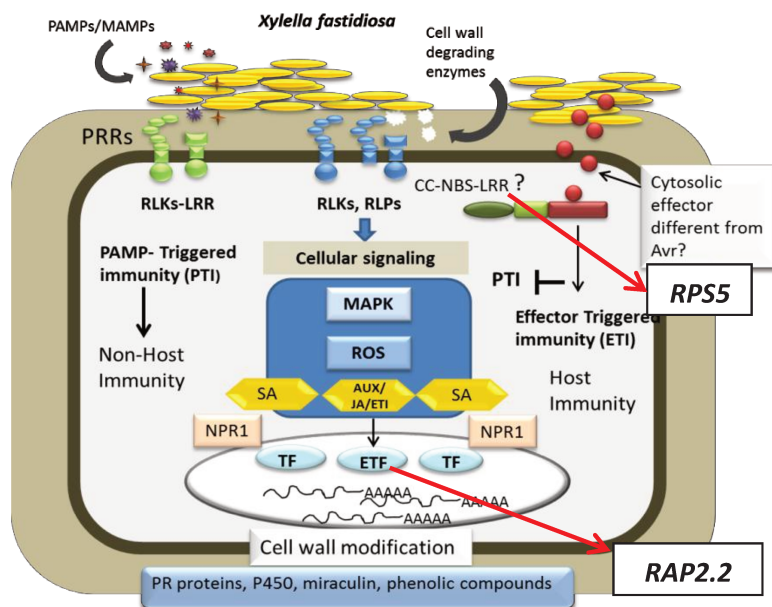
A correspondência entre os resultados de quantificação bacteriana e microscopia (figura 12) reforça a idéia de que esses dois genes (*RAP2.2* e *RPS5*) estão envolvidos na resposta de resistência da planta à *X. fastidiosa*, sendo potenciais candidatos para superexpressão em hospedeiros suscetíveis visando resistência ao patógeno. Analisando a similaridade dessas proteínas codificadas em *A. thaliana* e seus respectivos homólogos em *C. reticulata* observamos que não há grande identidade entre elas (42% para *RPS5* e 46% para *RAP2.2*), porém os domínios funcionais que caracterizam a função destas proteínas está presente e conservado em ambas (ANEXO A). Isso leva a crer que tais proteínas de *A. thaliana* possuam ortólogos funcionais em citros que atuariam de maneira semelhante. De mesmo modo foi relatado recentemente um ortólogo funcional em citros (*CsNDR1*) que complementou a suscetibilidade do mutante *ndr1-1* a *Pseudomonas seryngae* e conferiu resistência a *Hyaloperonospora arabidopsidis* em *A. thaliana* (Lu et al., 2013). Dessa forma, estes genes foram considerados bons candidatos para transformação genética em *C. sinensis* visando conferir resistência a *X. fastidiosa*.



**Figura 12.** Correspondência entre a colonização da bactéria detectada por qPCR e visualizada por microscopia de fluorescência, respectivamente. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa por teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **6.2.3. Possível papel funcional dos genes *RPS5* e *RAP2.2* no mecanismo de defesa à *X. fastidiosa***

Curiosamente o gene *RAP2.2* está associado à resistência a necrotrófico em *A. thaliana* (Zhao et al., 2012) e *RPS5* é um gene de resistência associado ao reconhecimento de *Pseudomonas syringae* (Simonich & Innes, 1995). Segundo Rodrigues et al (2003) *X. fastidiosa* parece ser reconhecida por DAMPs, ou seja, moléculas oriundas da degradação da parede celular promovida pela bactéria, e por isso, desencadeia um reconhecimento típico de necrotróficos pela planta. Os dados encontrados nesse trabalho reforçam a hipótese que possivelmente a planta resistente possa inicialmente reconhecer *X. fastidiosa* como um necrotrófico ativando as vias de defesa mediada por etileno, e por isso o gene *RAP2.2* que é um fator transcricional induzido por etileno foi importante para tolerância a *X. fastidiosa*, assim como foi observado ser importante para tolerância ao fungo *Botrytis cinerea* em *A. thaliana* (Zhao et al., 2012). Assim como foi dito anteriormente o gene *RPS5* atua no reconhecimento de moléculas efetoras de patógenos como *Pseudomonas syringae* (Simonich & Innes, 1995). Mas recentemente, foi visto no trabalho de Qi et al. (2011) que há a possibilidade de formação de um complexo protéico desta proteína com proteínas que reconhecem PAMPs. Essa informação nos leva a hipótese que, apesar de *X. fastidiosa* não apresentar efetores típicos do tipo *avr*, DAMPs da bactéria poderiam ser reconhecidos por meio desse complexo protéico formado ou outro efector ainda desconhecido poderia ser reconhecido por *RPS5*. Esses DAMPs seriam sinais moleculares obtidos da degradação da parede celular pela bactéria, o que também contribuiria para o reconhecimento do patógeno inicialmente como necrotrófico, podendo desencadear vias de resposta características como as mediadas por auxina, jasmonato ou etileno, assim como sugerido por Rodrigues et al (2013) em trabalhos de expressão genica global. Após esse reconhecimento, sugerimos que uma sinalização mediada por etileno na qual o fator de transcrição codificado por *RAP2.2* atuaria promovendo a indução da expressão de genes de defesa. Assim, ambos os genes são importantes para defesa do hospedeiro e poderiam atuar conjuntamente numa mesma via de resposta. A localização desses genes no modelo hipotético da tolerância observada em *C. reticulata* no qual esses dois genes selecionados estariam atuando conjuntamente estão destacados na figura 13.



**Figura 13.** Modelo hipotético de atuação dos genes *RPS5* e *RAP2.2* em resposta à infecção por *X. fastidiosa*. O gene *RPS5* poderia ser ativado indiretamente por moléculas DAMP derivadas, por exemplo, da degradação da parede vegetal da planta. Esse reconhecimento ocorreria através de um complexo protéico formado com proteínas PRR (proteínas que reconhecem DAMPs). A planta ao reconhecer esses DAMPs desencadearia respostas típicas a necrotófitos, ocorrendo então uma sinalização mediada por etileno na qual o fator de transcrição codificado por *RAP2.2* é o responsável por induzir a expressão de proteínas de resposta que irão combater a doença.

## ***CAPÍTULO II. Nicotiana tabacum* como planta modelo para estudo da interação com *X. fastidiosa***

### **7. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **7.1. Caracterização quantitativa da colonização de *X. fastidiosa* em *N. tabacum***

##### **7.1.1. Cultivo das plantas e preparo do inóculo**

Todas as plantas de tabaco utilizadas foram da variedade Havana. As sementes foram previamente germinadas em sementeira e posteriormente transplantadas para

vasos com capacidade de 0,5 l contendo substrato de pinus comercial (Plantmax-Eucatex). As plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação com temperatura em torno de 27-30°C. As plantas foram irrigadas automaticamente duas vezes por dia e fertilizadas quando necessário. Para os ensaios de inoculação foi utilizada a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* na segunda repicagem, após isolamento de plantas sintomáticas de laranja doce, e cultivadas durante 7 dias. Tanto o isolamento como crescimento da bactéria foram feitos em meio PW a 28°C, após isso a bactéria foi retirada das placas com alça de platina e ressuspensa em tampão PBS para posteriores inoculações nas plantas. A concentração do inóculo foi padronizada pela OD à 600nm e pela contagem de UFC/ml após diluição serial e plaqueamento. Ensaios preliminares evidenciaram que uma OD=0,8 correspondia a cerca de 10<sup>7</sup>UFC/ml. E esta concentração foi utilizada nos experimentos.

### **7.1.2. Inoculação das plantas e avaliação da eficiência de inoculação**

Todas as inoculações foram feitas em plantas de tabaco de 5 a 6 semanas e cerca de 10 cm de altura. Um volume de 15µl de suspensão bacteriana (OD=0,8) foi aplicado na haste principal da planta, próximo a região da base do pecíolo foliar, através de perfurações com agulha entomológica (Almeida et al., 2001). Para futuras amostragens o local de inoculação foi identificado com uma fita colorida. Um total de 85 plantas foram inoculadas com *X. fastidiosa* e 21 com PBS como controle negativo. A eficiência de inoculação foi estimada por qPCR aos 25 e 40 dias após inoculação (dai) selecionando apenas as plantas infectadas para futuras análises até 114 dai.

### **7.1.3. Extração de DNA, curva padrão e quantificação de *X. fastidiosa* por qPCR**

Pecíolos de cada amostra foliar (150 mg) foram macerados em nitrogênio líquido e usados para extração de DNA total usando o método desenvolvido por Murray & Thompson (1980). O DNA foi eluído em 30µl de tampão de eluição (0,1 volume de Tris-EDTA, 20 µg/µl de RNase) e a concentração estimada usando NanoDrop<sup>TM</sup> 8000 (Thermo Scientific). Todas as amostras de DNA foram padronizadas para concentração de cerca de 250 ng/µl. A amplificação foi realizada em um volume de 25µl contendo 12,5µl de TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500nM da sonda TAQCVC (5'-

(6FAM)AAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TC(TAMRA)-3'), 525 nM dos primers CVC-1 (AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA) e CCSM-1 (GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT) (Oliveira et al., 2002) e 0,5 µg da amostra de DNA. Para todas as corridas experimentais sempre foi utilizado controles negativo (DNA de planta inoculado com PBS) e positivo (DNA genômico de bactéria). Todas as amostras foram processadas em duplicata. A amplificação e captura do sinal foi realizada usando ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). A curva padrão para quantificação de *X. fastidiosa* foi produzida usando como referência  $2.94 \times 10^{-6}$  ng para um genoma da estirpe 9a5c. Quantidades conhecidas de DNA total bacteriano foram misturadas com DNA de plantas saudáveis de tabaco para obter uma faixa de  $10^2$  a  $10^8$  células/mg de tecido vegetal. A curva padrão obtida [ $y = -3.0153x$  (número de cópias de DNA) + 36.38] mostrou uma variação linear correlacionando DNA (número de cópias) com a medida de fluorescência (valores de CT), além de um coeficiente  $R^2$  de 0,9901. Todas as análises estatísticas para comparação de médias foram realizadas por teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

#### **7.1.4. Colonização de *X. fastidiosa* e correlação com sintomas**

As plantas infectadas com *X. fastidiosa* previamente selecionadas foram avaliadas quanto aos padrões de colonização, expressão de sintomas e quantificação bacteriana ao longo da infecção.

A multiplicação de *X. fastidiosa* nas plantas foi estimada aos 25, 60, 80, 95, 104 e 114 dias após inoculação coletando 3 folhas de 3 plantas para cada tempo amostral. Usando este experimento *time course* também foi estimado o número mínimo de células de *X. fastidiosa* necessário para expressão de sintomas (*threshold*). Folhas assintomáticas foram amostradas aos 25 e 95 dai e a população do patógeno (concentração) comparada contra folhas apresentando sintomas de nível 1 (de acordo com escala diagramática estabelecida, que será descrita posteriormente) amostradas aos 80 e 95 dai. A média das populações de três folhas de cada condição fenotípica foi comparada estatisticamente pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

A colonização de *X. fastidiosa* em plantas de tabaco com diferentes graus de incidência de sintomas nas plantas (25, 50, 75 e 100% de folhas sintomáticas) também foi estimada pela amostragem de folhas distantes cerca de 10 cm (P1), 30 cm (P2) e 50 cm (P3) acima do ponto de inoculação. A incidência de sintomas nas plantas foi realizada através da contagem do número de folhas sintomáticas e assintomáticas em cada planta.

A partir disso, foi estabelecida a porcentagem de folhas sintomáticas em cada planta com relação ao total de folhas. Pelo menos três plantas de cada grau de incidência e um mínimo de 9 folhas para cada um dos três pontos foram usadas nas análises. A análise estatística para comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) seguido de análise de correlação de Pearson entre os dados de população bacteriana e incidência de sintomas nas plantas.

#### **7.1.5. Desenvolvimento e validação da escala diagramática**

Para elaboração da escala diagramática, folhas sintomáticas apresentando ampla variedade de severidades foram coletadas de plantas de tabaco infectadas e utilizadas nos experimentos descritos acima. Para estimativa da área sintomática foliar, cada folha foi escaneada usando HP Photosmart, arquivadas em formato TIFF e as imagens processadas com o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A área total foliar e a área sintomática foram estimadas e as folhas com menores e maiores níveis de severidade foram estabelecidas, levando em consideração a distribuição da severidade nas 187 folhas amostradas (ANEXO C), prevenindo erros como a superestimação da severidade por usar um nível máximo de severidade muito alto e raro (Amorim et al., 1993; Corrêa et al, 2009). Após estabelecer os níveis mínimo e máximo de severidade, quatro níveis intermediários foram estabelecidos com base na lei de acurácia visual de Weber-Fechner (Horsfall & Barratt, 1978). Buscou-se reproduzir na escala padrão, formas e espalhamento padrão da lesão. Para validar a escala diagramática foram usadas 137 imagens escaneadas e coloridas de folhas sintomáticas com diferentes severidades da doença. Cinco avaliadores sem experiência em avaliar doenças de plantas estimaram a severidade dessas amostras sem a escala. Duas semanas depois, os mesmos avaliadores estimaram novamente a severidade das imagens, em ordem diferente, porém com o auxílio da escala proposta. O conjunto de dados de cada avaliador foi utilizado para estabelecer uma regressão linear entre a severidade real como variável independente e a severidade estimada como variável dependente, antes e após o uso da escala.

A acurácia de cada avaliador antes e após o uso da escala foi determinada por teste t de Student ( $P < 0,05$ ) aplicado para testar a hipótese nula  $H_0: a = 0$  (intersecção da reta) e  $H_0: b = 1$  (inclinação) que são os indicadores usuais de acurácia (Kranz, 1988). A precisão dos avaliadores foi obtida pelos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e pela distribuição de erros (Nutter et al., 2006). O melhor avaliador foi comparado aos outros avaliadores para

medir a reprodutibilidade da escala (Belasque Jr et al., 2005). Todas as análises foram realizadas utilizando o software EXCEL 2010.

#### **7.1.6. Correlação entre severidade e colonização bacteriana**

A correlação entre níveis de severidade da doença nas folhas e concentração de bactéria foi estimada usando amostras coletadas aos 104 dai. Folhas foram classificadas em cinco níveis de severidade da doença de acordo com escala diagramática e a concentração bacteriana foi estimada por qPCR, conforme descrito acima. Pelo menos três folhas de cada nível de severidade foram usadas e a análise estatística para comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) seguido de análise de correlação de Pearson.

### **7.2. Avaliação do potencial de soy*BiPD* em conferir tolerância a *X. fastidiosa* usando tabaco como planta modelo**

#### **7.2.1. Cultivo das plantas e preparo do inóculo**

Os mutantes de tabaco para o gene soy*BiPD* (superexpressando e silenciado) foram obtidos através de parceria com a Profa. Dra. Elizabeth Fontes da Universidade Federal de Viçosa. Essas plantas foram originadas a partir de trabalhos do seu grupo de pesquisa (Alvim et al., 2001). Tanto o processo de cultivo das plantas como a preparação do inóculo foram realizados assim como descrito anteriormente (item 7.1.1)

#### **7.2.2. Inoculação e expressão de sintomas**

Dois experimentos biológicos foram conduzidos em épocas distintas, em que cada um consistiu da inoculação com 9a5c de 15 plantas superexpressando *BiPD*, 15 silenciadas, e 10 selvagens. Outras 5 plantas de cada tratamento foram inoculadas com tampão PBS como controles negativos. O inóculo utilizado apresentou população estimada em  $4,6 \times 10^7$  células/ml para o primeiro e  $1,4 \times 10^6$  células/ml para o segundo experimento. O processo de inoculação baseou-se no método de perfuração por agulha e

foi realizado assim como descrito anteriormente (item 7.1.2). Após a inoculação houve o acompanhamento semanal das plantas para verificação da expressão dos sintomas.

### **7.2.3. Análise da incidência e severidade dos sintomas**

As análises de incidência foram realizadas cerca de 80 dias após inoculação nos dois experimentos. A análise de incidência de sintomas nas folhas foi realizada através da contagem do número de folhas sintomáticas e assintomáticas em cada planta. A partir disso, foi estabelecida a porcentagem de folhas sintomáticas em cada planta com relação ao total de folhas, estabelecendo então uma média para cada tratamento. A análise de severidade dos sintomas foi realizada apenas no segundo experimento aos 80 dias após inoculação, e baseou-se no uso da escala diagramática para estimar níveis de sintomas de 1 a 6 nas folhas de cada planta. Após esta estimativa foi calculada a nota média de severidade para cada planta, estabelecendo então uma média para cada tratamento. As análises estatísticas para comparação de médias de incidência e severidade foram realizadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **7.2.4. Análise da população bacteriana por qPCR**

Pecíolos de folhas sintomáticas foram separados, macerados, pesados e utilizados para extração de DNA usando protocolo de Murray & Thompson, 1980. O DNA extraído foi utilizado para quantificação da bactéria por qPCR conforme descrito anteriormente (item 7.1.3)

### **7.2.5. Isolamento de *X. fastidiosa* e PCR das colônias**

O isolamento foi realizado através da coleta de folhas sintomáticas e posterior lavagem em água corrente. Em uma câmara de fluxo laminar foram separados os pecíolos e deixados em contato com hipoclorito comercial e álcool 70% por 1min em cada solução, sendo então colocados em água destilada estéril por 2 min. Após isso, foram cortadas as extremidades dos pecíolos e macerados com auxílio de um bastão de metal em microtubo contendo tampão PBS. O material foi pesado e então realizada a diluição serial para plaqueamento em meio PW. As placas foram mantidas em estufa a 28°C e as colônias crescidas foram contadas após 3 semanas. Algumas colônias individuais



originadas foram utilizadas para PCR com *primers* específicos para *X. fastidiosa* de citros CVC-1 (AGATGAAAACAATCATGCAAA) e 272-2 int (GCCGCTTCGGAGAGCATTCT) (Pooler & Hartung, 1995) visando confirmar que as colônias obtidas eram da bactéria *X. fastidiosa*.

#### **7.2.6. Confirmação da expressão do transgene por RT-PCR semi-quantitativo**

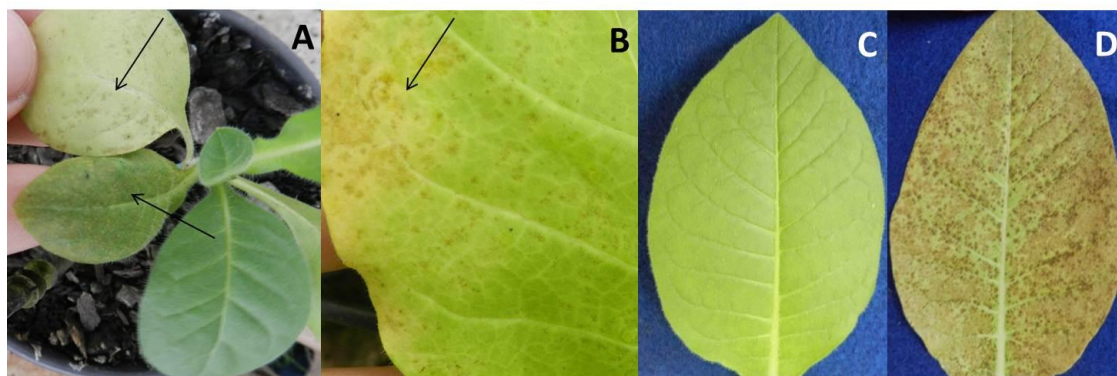
A expressão do gene *BiPD* foi avaliada através de extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR semi-quantitativo. A extração de RNA total de folhas foi realizada de acordo com a técnica descrita por Logemann *et al.* (1987) com modificações. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel 1% de agarose contendo formaldeído 37% (Merck) como agente denaturante (Sambrook *et al.*, 1989) e sua concentração foi medida no NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific). Antes da síntese do cDNA 6,4µg do RNA total foi tratado com desoxirribonuclease (DNase I, Life Technologies) + tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl) durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguidos de 10 minutos a 65°C com solução stop de 25mM EDTA (Life Technologies). O cDNA foi sintetizado em reações de 50µl, a partir de 6µg do RNA total utilizando-se 2µl da enzima transcriptase reversa (ImProm II Reverse Transcriptase, Dialab), oligonucleotídeo oligodT18 concentração final 600µM (Life Technologies), tampão 1x Reaction Buffer (Dialab), MgCl<sub>2</sub> concentração final 25mM (Dialab), dNTP concentração final 200µM (Eppendorf) e 50U de RNAGuard RNase Inhibitor (Amersham Biosciences). Os cDNAs foram amplificados com oligonucleotídeos específicos para o gene *BiPD* (F-ATCTGGAGGAGCCCTAGGCGGTGG e R-CATCGCAAGACCGGCAACAGGAT) e para o controle endógeno NtActin (F-TCCATGCTCAATGGGATACT e R-TTCAACCCCTTGTCTGTGAT). O RT-PCR semi-quantitativo possibilita a amplificação de transcritos por PCR comum e análise em gel de agarose. Para analisar o nível de expressão dos transcritos, basta retirar alíquotas da reação de PCR em diferentes ciclos para análise no gel e comparação com controles endógenos. Isso resulta em bandas mais fortes de acordo com o avanço dos ciclos de amplificação. Em nossas análises, para visualizar se o gene *BiPD* era expresso ou não, foram retiradas alíquotas das reações ao fim de 35 ciclos da PCR e análise em gel de agarose 1%.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1. Caracterização quantitativa da colonização e sintomatologia de *X. fastidiosa* em *N. tabacum*

#### 8.1.1. Sintomatologia e eficiência de inoculação

Sintomas iniciais foram observados em algumas plantas aos 25 dias após inoculação (dai) enquanto a maioria das plantas começou a apresentar sintomas bem evidentes e característicos tais como “pequenas lesões escuro-alaranjadas” (Lopes et al., 2000) por volta de 50 dai (figura 14). Segundo Lopes et al (2000), que avaliou os sintomas de tabaco inoculado com *X. fastidiosa* estirpe 9a5c, que causa CVC, o aparecimento de sintomas ocorreu inicialmente após 8 semanas da primeira inoculação (foram feitas duas) e todas as plantas foram sintomáticas após 10 semanas, enquanto no trabalho de Francis et al (2008), que utilizou estirpe de *X. fastidiosa* que causa doença em videiras, sintomas característicos de “*escaldadura foliar*” ocorreram por volta de 4 a 6 semanas após inoculação. Nesse trabalho os sintomas ocorreram mais rápido, provavelmente devido a idade das plantas usadas para inoculação, 6 semanas ao invés dos 2 meses utilizados em Francis et al., (2008) e Lopes et al., (2000), e algumas condições que induzem estresse, descritas por Francis et al. (2008), para gerar sintomas em um período mais curto, tais como vasos pequenos e altas temperaturas (27-30°C). Ainda, vale ressaltar que nesse trabalho foi usada a variedade Havana, enquanto que em Lopes et al (2000) foi usada a variedade RP1, e possivelmente a variedade Havana possa ser mais suscetível a colonização pelo patógeno e, conseqüentemente, induzir sintomas mais rápido.



**Figura 14.** Sintomas desenvolvidos em *N. tabacum* cv. Havana após inoculação com a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*. **A.** Sintomas iniciais cerca de 25 dai. **B.** Folha mostrando

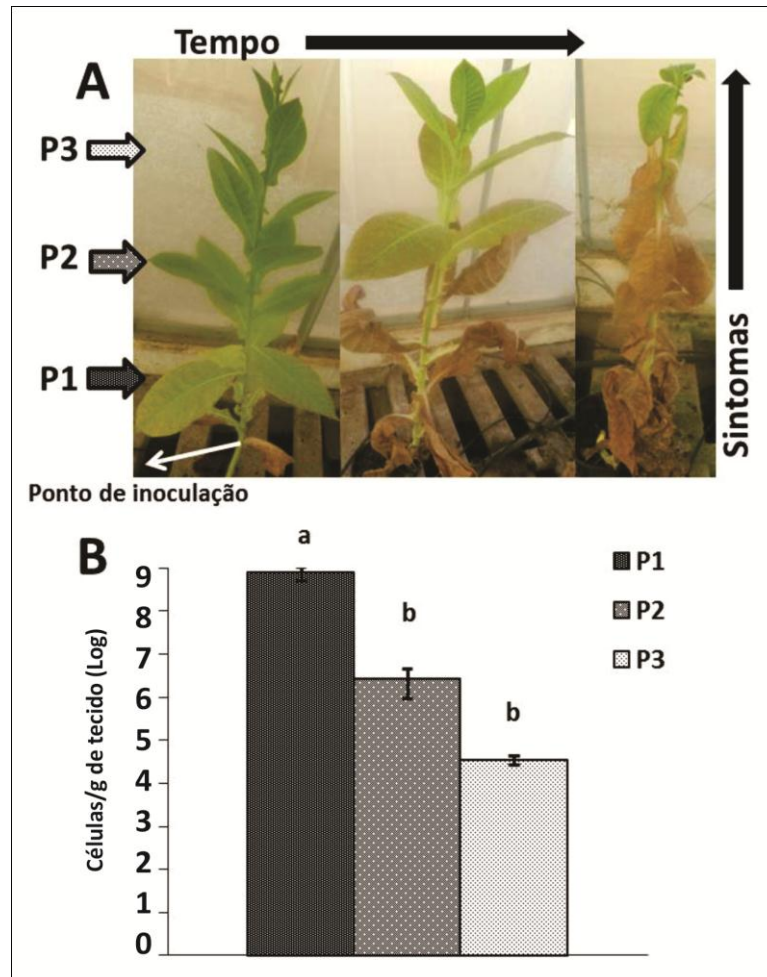
sintomas característicos por volta de 50 dai. **C** e **D**. Controle inoculado com PBS e uma folha sintomática aos 95 dai, respectivamente. Setas indicam os locais de sintomas.

Foram constatados sintomas em 69% das plantas inoculadas (59 de 85 plantas), o que demonstra a eficiência do processo de inoculação. Nem todas as plantas apresentaram sintomas, ou seja, a eficiência não atingiu 100%, provavelmente por falhas da metodologia no momento da inoculação. A ineficiência de inoculação mecânica de *X. fastidiosa* é comum em diversos hospedeiros (Coletta-Filho et al., 2007), pois no momento da inoculação a bactéria deve atingir os vasos do xilema e iniciar o processo de colonização, o que muitas vezes não ocorre devido as condições de inoculação e condições experimentais como temperatura, umidade, população bacteriana inicial, etc. Neste trabalho, a inoculação realizada possibilitou a geração de sintomas característicos e também contribuiu para a maior praticidade do bioensaio. A redução do tempo entre a inoculação, período de incubação da doença e aparecimento dos sintomas em relação a estudo anterior (Lopes et al., 2000) contribuiu para tornar este bioensaio ainda mais prático e rápido, algo importante para acelerar as pesquisas sobre a interação planta-patógeno envolvendo *X. fastidiosa*.

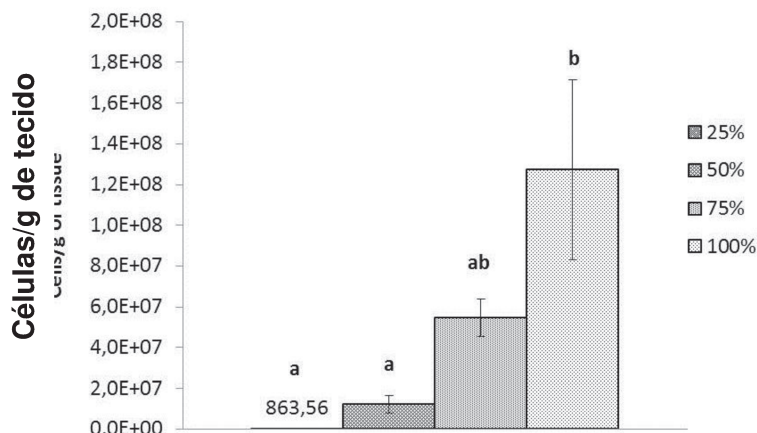
### **8.1.2. Padrão de colonização da bactéria e evolução dos sintomas**

Ao visualizarmos o padrão de sintomatologia apresentado pelas plantas (figura 15A) constatamos que os sintomas evoluíam progressivamente da base (ponto de inoculação) para o ápice, conforme relatado anteriormente (Lopes et al., 2000). Considerando que *X. fastidiosa* forma biofilme nos vasos xilemáticos da planta investigamos se havia correspondência entre a progressão dos sintomas e a quantidade de bactéria presente em determinados pontos da planta. Como visualizado na figura 15B, a população bacteriana encontrada nos diferentes pontos avaliados da planta foi correspondente à evolução dos sintomas e ao movimento da bactéria. Provavelmente a bactéria primeiro coloniza e forma biofilme na parte mais próxima ao ponto de inoculação (base) e depois se dispersa e coloniza em direção ao ápice. Essa maior população bacteriana na base formando biofilme para colonização da planta conforme evoluem os sintomas, foi observado na quantificação de folhas do ponto P1 (figura 16). Conforme demonstrado na figura 16 houve uma correlação positiva (0,861210) entre o aumento da incidência dos sintomas na planta e o aumento da população bacteriana. Este resultado é similar ao que

é observado para citros (Alves et al., 2004) e videira (Killiny & Almeida, 2011) onde os sintomas da doença estão diretamente relacionados à presença e população da bactéria.



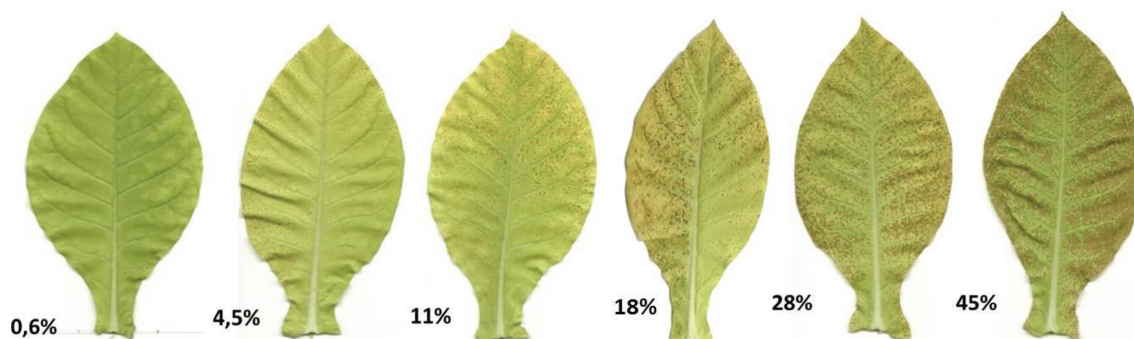
**Figura 15.** Correspondência entre sintomas e quantidade de bactéria na planta. **A.** Evolução dos sintomas nas plantas. **B.** Quantificação bacteriana por qPCR em três partes das plantas. Barras indicam as médias e letras diferentes acima das barras apontam diferença significativa por teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figura 16.** Correlação entre população bacteriana na base (ponto P1) e incidência de sintomas nessas plantas. Incidência = porcentagem de folhas sintomáticas em relação ao total da planta. Barras indicam as médias e letras diferentes acima das barras apontam diferença significativa por teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 8.1.3. Escala diagramática e validação

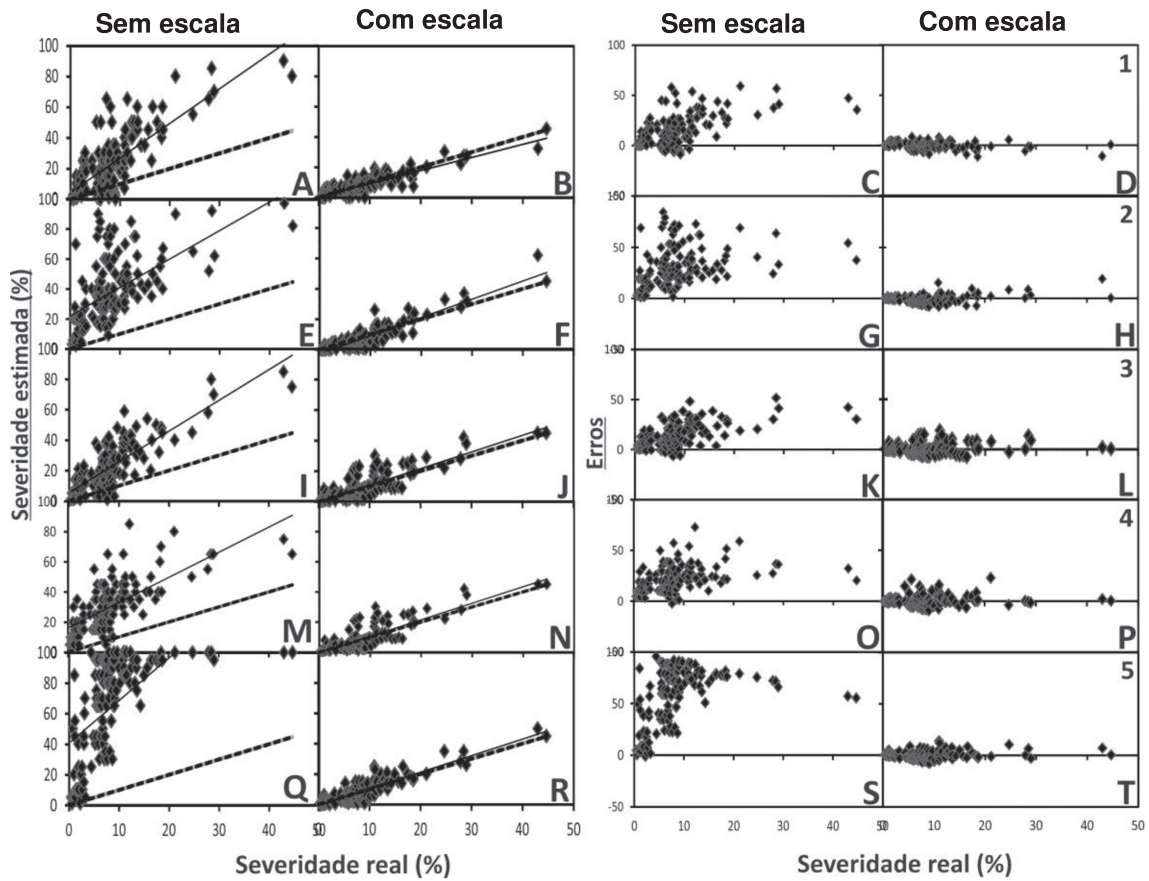
Devido as dificuldades enfrentadas para avaliação do grau de severidade da doença, seja em experimentos de transgenia ou diferentes níveis de virulência entre estirpes de *X. fastidiosa*, uma escala diagramática foi desenvolvida e os seus níveis de severidade estão apresentados na figura 17.



**Figura 17.** Escala diagramática para avaliar a severidade de sintomas de *X. fastidiosa* em tabaco. Cada folha representa um nível de severidade e porcentagens abaixo das folhas representam a área afetada pelo sintoma.

Essa escala foi validada por 5 avaliadores sem experiência prévia, através da avaliação de severidade em imagens de 137 folhas sintomáticas com e sem o auxílio da escala diagramática conforme descrito previamente nos materiais e métodos. As análises de precisão das estimativas dos avaliadores para validação da escala foram baseadas por

meio da análise de regressão linear simples e distribuição dos resíduos ou erros (figura 18).



**Figura 18.** Gráficos mostrando resultados da validação da escala por 5 avaliadores. Cada linha de gráficos corresponde a um mesmo avaliador (A-D;E-H;I-L;M-P;Q-T). A primeira coluna (A, E, I, M e P) de gráficos mostra a severidade estimada sem escala por cada avaliador enquanto a segunda coluna usando a escala (B, F, J, N e R). A terceira coluna de gráficos (C, G, K, O e S) mostra os erros (diferença entre severidade estimada e real) de cada avaliador sem escala, enquanto a quarta coluna usando a escala (D, H, L, P e T). A linha cheia representa a regressão linear entre a severidade real e estimada, enquanto a linha pontilhada é a situação ideal ( $y = x$ ).

De modo geral os avaliadores tiveram bastante dificuldade na avaliação da severidade sem o auxílio da escala, uma vez que, os sintomas se apresentaram de difícil mensuração e induziram uma forte superestimação da área afetada. Além disso, a falta de experiência em avaliações deste tipo pode ter contribuído para potencializar os erros, como pode ser observado pelos pontos acima da linha pontilhada na figura 18 (sem escala). Por outro lado, as análises realizadas com o auxílio da escala corrigiram essa tendência de superestimação (figura 18 com escala).

Todos os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das regressões lineares aumentaram com o auxílio da escala, enquanto os resíduos foram diminuídos consideravelmente (figura 18 e tabela 3). Segundo o critério utilizado nos programas *Distrain* (Tormelin & Howell, 1988) e *Disease.Pro* (Nutter Jr & WORAWITLIKIT, 1989) erros ou resíduos dentro de um intervalo de 5% acima ou abaixo do real são considerados excelentes e menores que 10% são considerados bons. Dessa forma, de acordo com os dados sumarizados na tabela 3 podemos dizer que as avaliações com o auxílio da escala de modo geral tiveram alta precisão, com um mínimo de mais de 94 % de erros aceitáveis e mais de 70% de erros menores que 5%. Essa precisão também é constatada pelos valores de  $R^2$  variando de 0,67 a 0,81. A análise de acurácia revelou que os valores do coeficiente  $a$  foram muito superiores antes do uso da escala. Isso reflete a superestimação das estimativas visualizadas anteriormente (figura 18), porém o uso da escala diminuiu esses valores, tornando-os significativamente iguais a 0 em 4 dos 5 avaliadores ( $p=0,05$ ). Já os valores do coeficiente  $b$ , embora diferentes de 1, se aproximaram bastante deste valor com o uso da escala. Para avaliar a reprodutibilidade das análises foi escolhido o avaliador 5 (considerado o melhor) para a comparação com os demais, em razão do seu alto valor de  $R^2$  e coeficiente angular  $a$  estatisticamente igual a 0 ( $p=0,05$ ). Os resultados revelaram grande reprodutibilidade entre as avaliações (tabela 3), haja vista que as comparações entre os avaliadores tiveram altos valores de  $R^2$ , no mínimo 92% de erros aceitáveis e mais de 80% de erros menores que 5%. Apesar dos coeficientes angulares  $a$  e  $b$  diferirem de 0 e 1 ( $p=0,05$ ), respectivamente, temos uma grande aproximação a esses valores com o uso da escala.

**Tabela 3.** Parâmetros de avaliação obtidos da validação da escala.

Avaliadores	Sem escala				Com escala				
	$a^{(i)}$	$b^{(ii)}$	$R^2$	Erros > 10%	$a$	$b$	$R^2$	Erros > 10%	Erros > 5%
<b>1</b>	4.46*	2.25*	0.59	55%	0.55 <sup>N</sup>	0.86*	0.74	1.4%	17%
<b>2</b>	21.97*	1.89*	0.35	94%	-2.70*	1.19*	0.83	1.4%	19%
<b>3</b>	5.48*	2.02*	0.68	54%	-0.33 <sup>N</sup>	1.09*	0.70	5.8%	25%
<b>4</b>	16.03*	1.67*	0.50	80%	-0.65 <sup>N</sup>	1.07*	0.67	5.8%	28%
<b>5</b>	40.59*	2.81*	0.38	87%	-0.54 <sup>N</sup>	1.09*	0.81	1.4%	14%
<b>5 vs 1</b>	0.83 <sup>N</sup>	0.35*	0.30	85%	1.72*	0.71*	0.73	2.9%	24%
<b>5 vs 2</b>	7.03*	0.41*	0.29	55%	2.49*	0.83*	0.82	2.9%	17%
<b>5 vs 3</b>	-0.94 <sup>N</sup>	0.37*	0.46	85%	0.65 <sup>N</sup>	0.95*	0.78	6.6%	25%
<b>5 vs 4</b>	4.36*	0.40*	0.59	95%	0.38 <sup>N</sup>	0.93*	0.73	3.6%	21%

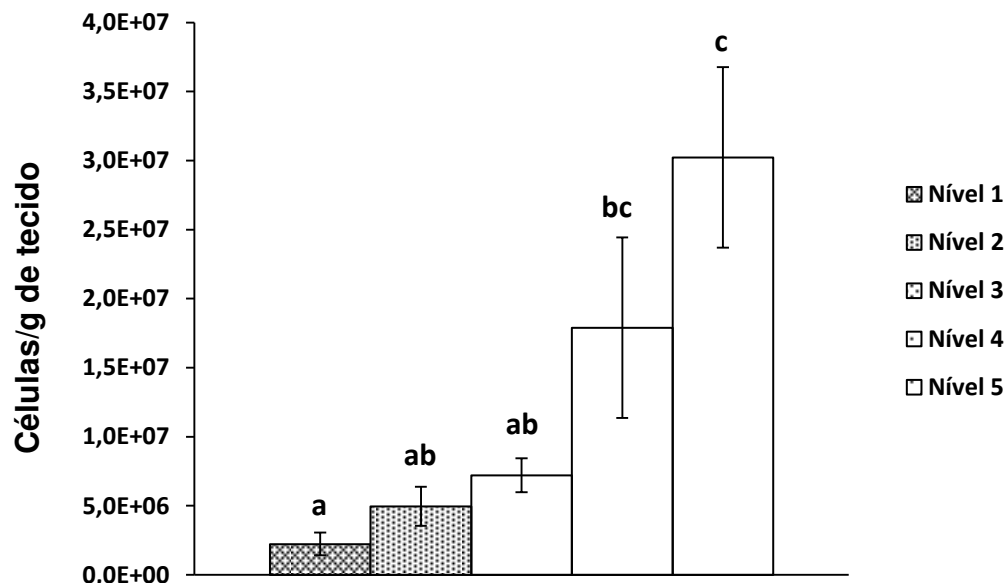
(i) asterisco indica que o valor da intersecção da reta (a) foi diferente de zero pelo teste t ( $p = 0.05$ ), N indica que não há diferença estatística entre zero e a ( $p = 0.05$ );  
(ii) asterisco indica que o valor do coeficiente de inclinação da reta (b) foi diferente de 1 pelo teste t ( $p = 0.05$ ), N indica que não há diferença estatística entre b and 1 ( $p = 0.05$ ).

Em outras validações de escalas (Corrêa et al., 2009; Yadav et al., 2013) é comum verificar altos valores de  $R^2$ , porém costuma-se trabalhar com um número menor de imagens em relação a esta análise. Essa maior quantidade de imagens na validação propicia condições mais reais e próximas às análises de severidade realizadas em casa-de-vegetação, porém pode gerar mais erros pela fadiga visual dos avaliadores. Além disso, ao analisarmos as severidades estimadas sem escala temos constatado uma imensa dificuldade para correta aferição, em função dos sintomas serem de difícil mensuração (pequenos pontos dispersos e às vezes não perceptíveis). Assim, as análises revelaram que o uso da escala foi responsável pelo aumento da precisão, acurácia e reprodutibilidade das estimativas pelos avaliadores, validando seu uso para avaliações de severidade da doença causada por *X. fastidiosa* na planta modelo *Nicotiana tabacum*.

#### **8.1.4. Correlação entre severidade da doença e população bacteriana**

Ao constatar a forte relação entre sintomatologia e presença da bactéria que ocorre em tabaco, resolvemos investigar se a quantidade de bactéria em pecíolos de folhas era variável de acordo com os diferentes níveis de severidade apresentados por elas. Por conta da distribuição de sintomas nas folhas (ANEXO C) não foi possível obter uma média das folhas com o mais alto nível sintomático (escassas), porém os demais níveis sintomáticos demonstraram que há o aumento da população bacteriana conforme o nível de severidade aumenta (figura 19). Esse resultado foi confirmado pela análise de correlação de Pearson que gerou um valor de 0,75171, demonstrando uma significativa correlação entre os níveis de severidade foliar (variável independente) e a população bacteriana (variável dependente).



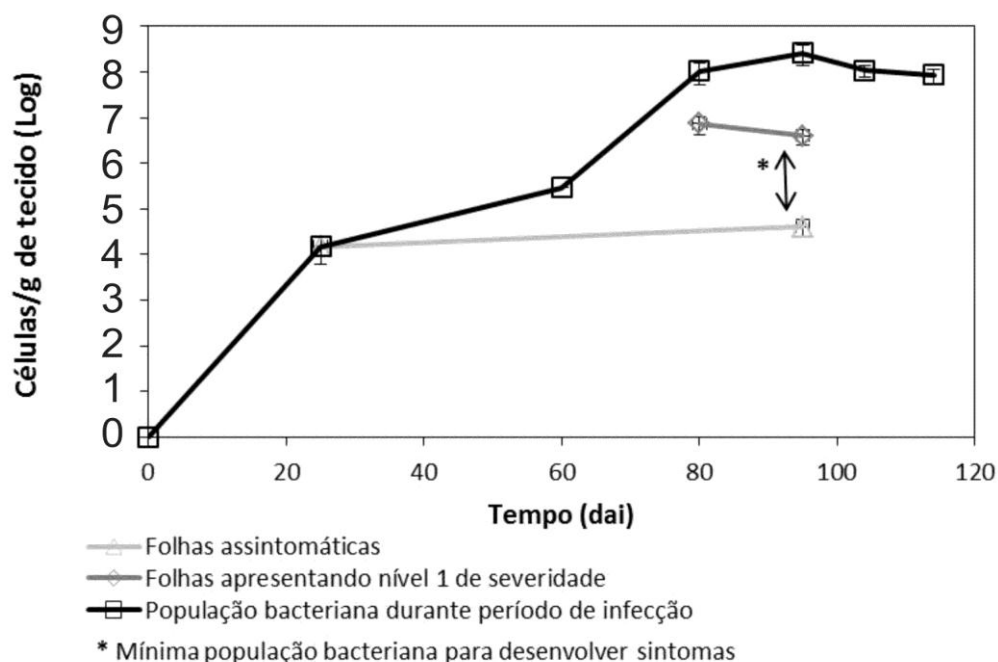


**Figura 19.** Gráfico mostrando a correlação entre níveis de severidade e população bacteriana quantificada por qPCR. Barras indicam as médias e letras diferentes acima das barras apontam diferença significativa por teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Esses resultados nos permitem avaliar de forma quantitativa a colonização da planta através da severidade apresentada pelas folhas. A partir disso podemos estabelecer uma estimativa padrão da população de células de acordo com o nível de severidade apresentado pela folha. Esse resultado reflete em uma redução de tempo e custos para estimativa da população bacteriana na planta, algo que atualmente se baseia em qPCR e isolamento bacteriano de partes da planta (Andreote et al., 2006; Dandekar et al., 2012; De La Fuente et al., 2013). Considerando que há muita variação desde o inóculo até as condições ambientais utilizadas, o ideal seria uma padronização prévia por qPCR em folhas de diferentes severidades do mesmo experimento. A partir disso, pode-se considerar a população bacteriana presente nas demais folhas do experimento com base no respectivo nível de severidade da padronização prévia. Essa estratégia permite uma avaliação quantitativa adequada com economia de tempo e de recursos financeiros.

### 8.1.5. Quantificação bacteriana durante período de infecção

Durante o período de infecção a bactéria aumentou sua população no interior da planta até atingir um platô de crescimento por volta de 80 dai. Esse platô se manteve até o início da senescência da planta (figura 20), que ocorreu por volta de 114 dai.



**Figura 20.** População bacteriana durante período de infecção e mínima quantidade de bactéria para geração de sintomas. Traço preto indica a população bacteriana ao longo do período de infecção. Traço cinza claro indica a população bacteriana presente em folhas assintomáticas aos 25 e 95 dai. Traço cinza escuro indica a população bacteriana presente em folhas com nível 1 de severidade coletadas aos 80 e 95 dai. Seta indica o intervalo que compreende a população mínima necessária para gerar sintomas em folhas.

A quantidade de bactéria em folhas assintomáticas de dois pontos distantes (25 e 95 dai), antes e após o período de incubação da doença, não variou significativamente pelo teste t ( $P < 0.05$ ), sugerindo certa constância da população no período (cerca de  $4 \times 10^4$  células/g de tecido). Por sua vez, em folhas sintomáticas de severidade nível 1 observa-se que a população bacteriana foi maior e também não variou significativamente pelo teste t ( $P < 0.05$ ) entre dois pontos após o período de incubação (cerca de  $4 \times 10^6$  células/g de tecido). Por outro lado as médias dos pontos assintomáticos diferiram significativamente dos pontos sintomáticos de nível 1 ( $P < 0,05$ ). Podemos dizer então que a quantidade mínima de bactéria suficiente para gerar sintomas nas folhas de tabaco está compreendida entre essas duas populações ( $4,1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^6$  células/g de tecido).

### **8.1.6. Utilização de tabaco como planta modelo para estudos da interação com *X. fastidiosa***

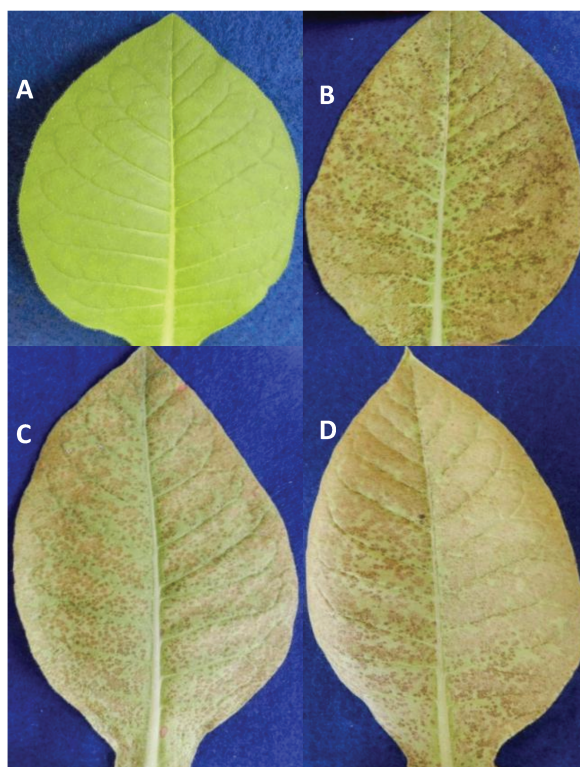
Resultados de quantificação por qPCR de *X. fastidiosa* que coloniza uva (Temecula-1) em tabaco SR1 mostraram uma população final de  $10^7$  a  $10^8$  células/g de tecido vegetal (Francis et al., 2008). Esses resultados foram bem similares ao encontrado nos nossos estudos (figura 20), indicando que diferentes estirpes de *X. fastidiosa* colonizam eficientemente a planta de tabaco. Porém, se compararmos com a população de citros que é em torno de  $4,9 \times 10^5$  células/g, após 8 a 12 meses de inoculação (Oliveira et al., 2002), podemos verificar que o tabaco realmente é um hospedeiro altamente suscetível e apropriado para estudos com *X. fastidiosa*.

Experimentos utilizando *N. tabacum* foram realizados para caracterizar parâmetros quantitativos da planta em resposta à infecção pelo patógeno. Esse tipo de caracterização é importante em estudos de transgenia visando determinar a função do gene em conferir tolerância ao patógeno, pois na maioria das vezes a presença do gene não confere resistência absoluta, mas sim, níveis de tolerância ao patógeno, o que pode ser influenciado também pelo local de inserção do gene no genoma. Dessa forma, torna-se essencial a estipulação de parâmetros quantitativos para se estabelecer os níveis de tolerância que um determinado gene, ou evento de transformação, possa conferir ao patógeno. Esse tipo de abordagem nunca foi levado em consideração anteriormente e até então, são baseados na simples observação da presença de sintomas causado pela *X. fastidiosa* em plantas transgênicas (Dandekar et al., 2012). A escala diagramática elaborada nesse trabalho foi validada para correta aferição da severidade dos sintomas em folhas de *N. tabacum* e também correlacionada com a população bacteriana presente no xilema da folha sintomática correspondente. Outros parâmetros da colonização que foram avaliados nesse trabalho também servirão de base para estudos nas diferentes abordagens que vêm sendo utilizadas com essa planta modelo para *X. fastidiosa* (Andreote et al., 2006; Chatelet et al., 2011; Dandekar et al., 2012; De La Fuente et al., 2013; Francis et al., 2008). Esses resultados também tornam a cultivar Havana ideal para estudos da interação com *X. fastidiosa*, sobretudo de caráter quantitativo.

## 8.2. Avaliação do potencial de soy*BIPD* em conferir tolerância a *X. fastidiosa* usando tabaco como planta modelo

### 8.2.1. Expressão dos sintomas

O aparecimento de sintomas, característico por “pequenas lesões escuro-alaranjadas” (Lopes et al., 2000), ocorreu de forma generalizada tanto nas plantas selvagens como nas transgênicas, não havendo diferenças quanto ao padrão de sintomatologia apresentado (figura 21). Também não houve diferenças quanto ao tempo de incubação da doença, de forma que os sintomas apresentaram-se no mesmo período (cerca de 50 dai) para todos os tratamentos. As plantas controles inoculadas com tampão PBS não apresentaram sintomas, como era esperado.

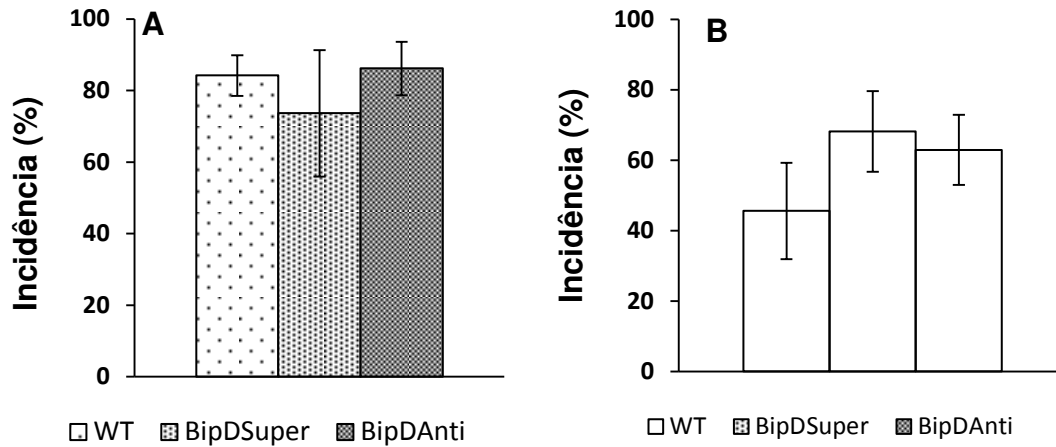


**Figura 21.** Comparação entre os sintomas foliares apresentados nos tratamentos. **A.** Tabaco cv Havana inoculado com PBS. **B.** Tabaco cv Havana inoculado com *X. fastidiosa*. **C.** Tabaco cv Havana inoculado e superexpressando o gene *BiPD*. **D.** Tabaco cv Havana inoculado e com o gene *BiPD* silenciado.

### 8.2.2. Análise da incidência e severidade dos sintomas

Para quantificar a incidência dos sintomas nas folhas nos diferentes tratamentos, foi realizada a contagem do número de folhas com sintomas em cada planta dos tratamentos inoculados, excluindo-se plantas assintomáticas, cuja inoculação não foi eficiente. A figura

22 apresenta a incidência da doença entre os tratamentos nos dois experimentos independentes.

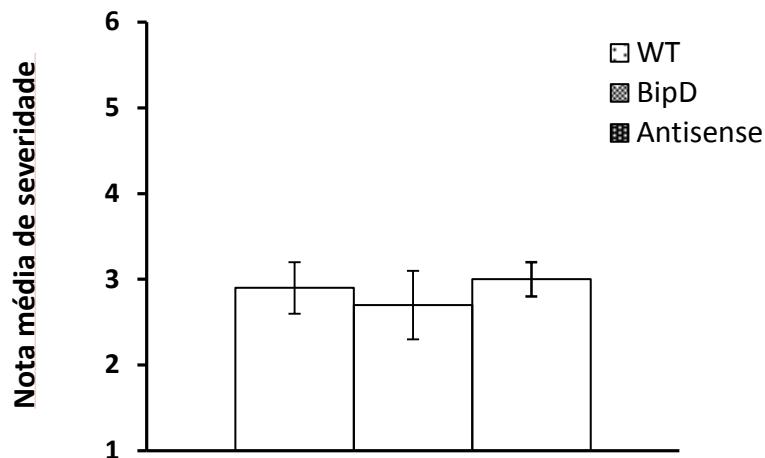


**Figura 22.** Incidência da doença após 80 dias da inoculação com *X. fastidiosa*. **A.** Primeiro experimento biológico. **B.** Segundo experimento biológico. Incidência = porcentagem de folhas sintomáticas em relação ao total da planta. WT = tabaco selvagem. BipDSuper = tabaco superexpressando *BiPD*. BipDAnti = tabaco silenciado para o gene *BiPD*. Medias de no mínimo 8 plantas. Análise estatística para comparação de médias usando teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os resultados de incidência do primeiro experimento biológico não apontaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) (figura. 22A). Esses resultados foram confirmados com o segundo experimento biológico, onde a incidência da doença mais uma vez não diferiu entre os tratamentos (figura 22B). Esses resultados sugerem que a superexpressão do gene *soyBiPD* não alterou a suscetibilidade da planta à bactéria. A diferença na incidência entre o primeiro e segundo experimento pode ser explicada devido à menor quantidade de inóculo utilizada no segundo experimento, gerando menores taxas de incidência. Entretanto, apesar dessas variáveis, os resultados quanto ao comportamento da incidência da doença se mantiveram nos dois tratamentos (figura 22).

Porém, como foi descrito anteriormente, apenas análises de incidência da doença (presença ou ausência de sintomas) não conseguem acessar os diversos níveis de severidade em que a doença pode se manifestar. Dessa forma, no segundo experimento utilizamos a escala diagramática para avaliar a severidade da doença nos tratamentos e avaliar o possível papel do gene *BiPD* em conferir algum grau de tolerância à doença. Como verificado na figura 23, assim como a incidência, os resultados de severidade também não apontaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ), indicando que o gene *BiPD* não tem um papel direto em conferir tolerância à bactéria. Como a

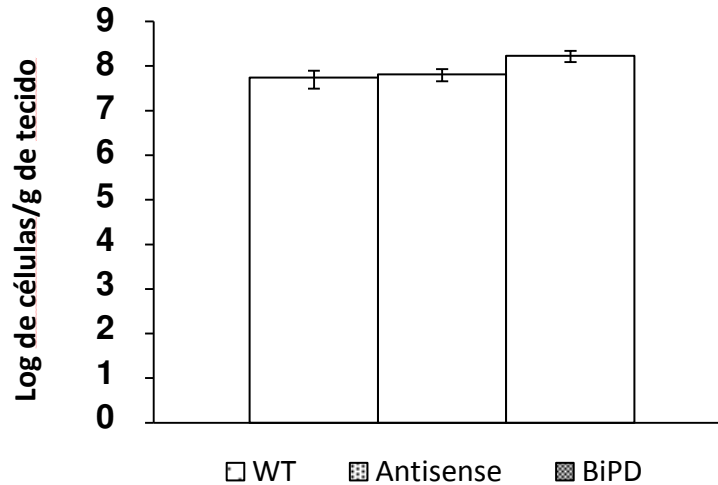
patogenicidade de *X. fastidiosa* está associada ao aumento da população bacteriana na planta hospedeira, no segundo experimento biológico, foi avaliada a população bacteriana nos diferentes tratamentos com o objetivo de verificar se as plantas superexpressando o gene *BiPD* poderiam apresentar uma menor população bacteriana no xilema.



**Figura 23.** Nota média de severidade nos tratamentos após 80 dias da inoculação. WT= tabaco selvagem. BipD= tabaco superexpressando o gene *BiPD*. Antisense= tabaco silenciado para o gene *BipD*. Notas de severidade de 1 a 6 baseadas na escala diagramática desenvolvida. Média de no mínimo 8 plantas. Análise estatística para comparação de médias usando teste de Tukey ( $P<0,05$ )

### 8.2.3. Análise da população bacteriana por qPCR

A quantificação da população bacteriana foi realizada em folhas sintomáticas dos três tratamentos aos 83 dai. Como verificado na figura 24 não houve diferença significativa entre a população dos tratamentos ( $P<0,05$ ), demonstrando a concordância com as demais avaliações realizadas e apontando que o gene *soyBiPD* não está diretamente associado por conferir resistência ou tolerância à *X. fastidiosa*. Consequentemente, a resposta de uma planta resistente a esse patógeno parece não estar diretamente relacionada ao mecanismo que confere resistência ao estresse hídrico, que é o principal papel de *soyBiPD*, como já demonstrado (Alvim et al., 2001; Fietto et al., 2007; Valente et al., 2009). Entretanto antes de concluir que esse gene não confere nenhum grau de tolerância a *X. fastidiosa* em plantas modelo de tabaco, alguns testes foram feitos quanto a confirmação da presença da bactéria nas plantas e verificação da expressão do transgene visando confirmar que os resultados obtidos eram consistentes.



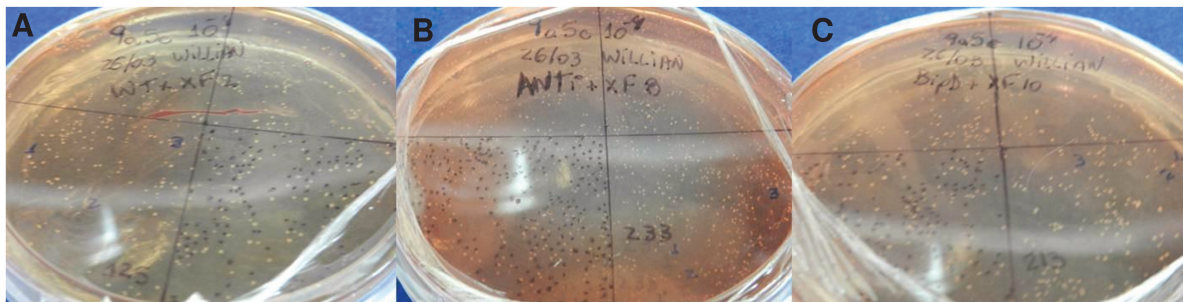
**Figura 24.** Quantificação de *X. fastidiosa* por qPCR nos tratamentos após 83 dias da inoculação. WT - tabaco selvagem. Antisense - tabaco silenciado para o gene *BiPD*. BiPD - tabaco superexpressando o gene *BiPD*.

#### 8.2.4. Confirmação da bactéria nas plantas sintomáticas

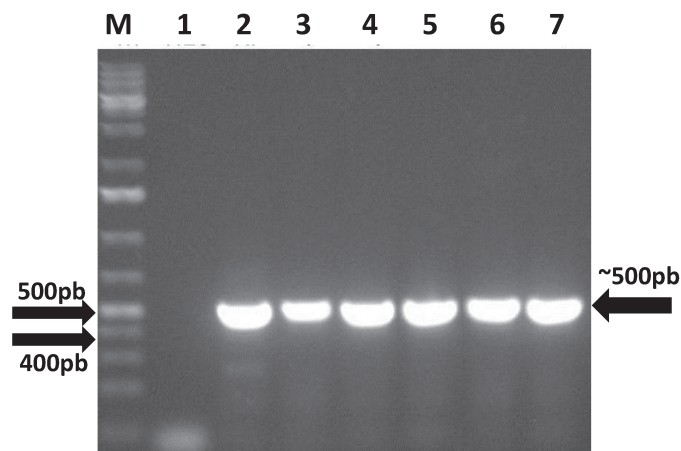
A confirmação da bactéria nas plantas visou ter certeza que os sintomas gerados eram realmente conferidos por *X. fastidiosa*, para isso foi feito isolamento das bactérias de pecíolos de folhas sintomáticas e PCR de colônias utilizando *primers* CVC-1 e 272-int específicos para *X. fastidiosa* (Pooler & Hartung, 1995). Estes *primers* são sequências de nucleotídeos de fragmentos polimórficos obtidos por *RAPD* (Random Amplified Polymorphic DNA) para *X. fastidiosa* que amplificam um fragmento de aproximadamente 500pb.

Os isolamentos foram realizados a partir de pecíolos individuais de plantas sintomáticas de cada tratamento inoculado conforme descrito anteriormente. Utilizou-se também o pecíolo de plantas inoculadas com PBS como controle negativo. As colônias que cresceram em meio PWG foram contadas (Figura 25), multiplicadas pelo fator de diluição e resultaram em  $3,3 \times 10^7$  UFC/g de tecido na planta selvagem,  $5,7 \times 10^7$  UFC/g de tecido na planta superexpressando o gene *BiPD* e  $6,2 \times 10^7$  UFC/g de tecido na planta com o gene *BiPD* silenciado. Esses valores não apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. Não houve crescimento de colônias no isolamento de plantas inoculadas com PBS (controle negativo). Algumas colônias individuais foram utilizadas para PCR com *primers* específicos para *X. fastidiosa* de citros visando confirmar que as colônias obtidas eram de fato da bactéria *X. fastidiosa*. Pode-se visualizar na figura 26 que os fragmentos amplificados correspondem ao tamanho de 500pb, e

consequentemente trata-se da bactéria *X. fastidiosa*. Corroborando com os dados de detecção de *X. fastidiosa* por qPCR, os dados de isolamento confirmam a presença da bactéria colonizando o xilema em pecíolos de folhas sintomáticas e sendo responsável por gerar sintomas, principalmente devido à alta população encontrada (cerca de  $10^7$  CFU/g de tecido). Dessa forma, analisando todos os resultados obtidos quanto a incidência e severidade da doença e população da bactéria dentro da planta, podemos afirmar que não há influência do gene *soyBiPD* na planta hospedeira em conferir resistência a patógeno *X. fastidiosa*, uma vez que, esta foi capaz de infectar e causar sintomas nas plantas de tabaco selvagem, superexpressando ou não expressando esse gene.



**Figura 25.** Placas de isolamento de *X. fastidiosa* estirpe 9a5c a partir de plantas de tabaco inoculadas (diluição  $10^{-4}$ ). **A.** planta selvagem, **B.** planta transgênica com o gene *BiPD* silenciado e **C.** planta transgênica superexpressando o gene *BiPD*.

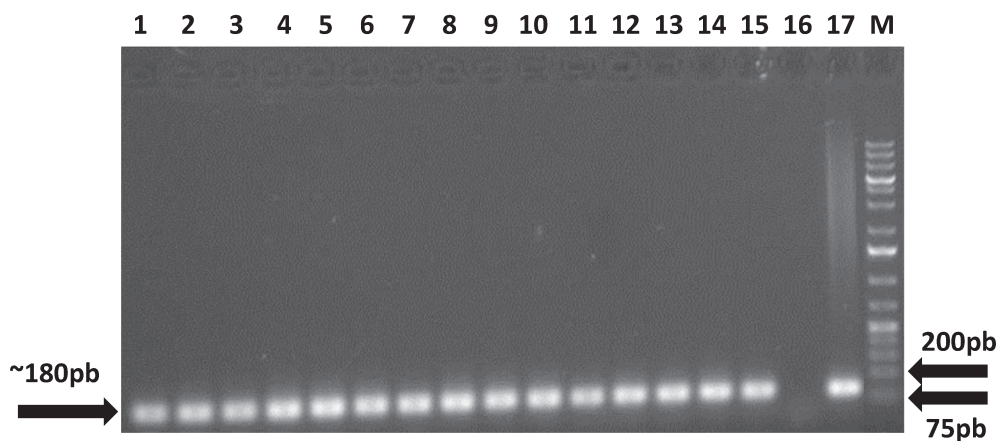


**Figura 26.** Confirmação por PCR específico de colônias de *X. fastidiosa* isoladas de pecíolos de tabacos inoculados. **M.** marcador molecular de 1 kb. **1.** Branco: reação com água. **2 a 7.** Amostras de colônias isoladas.



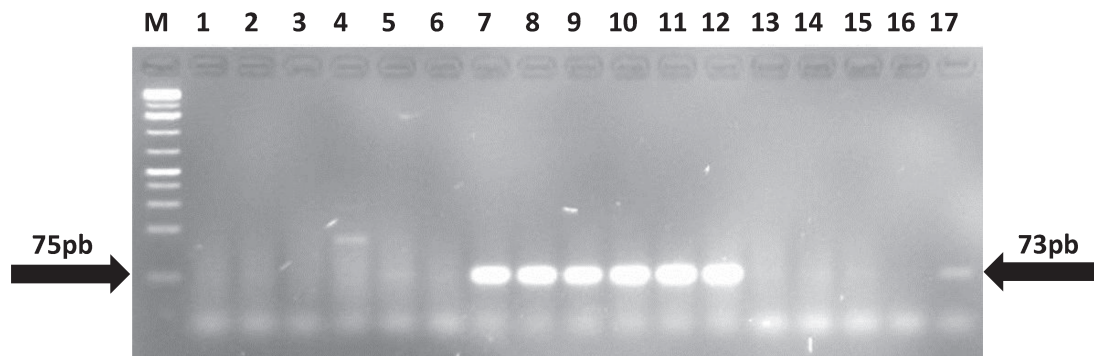
### 8.2.5. Confirmação da expressão do transgene por RT-PCR

Em razão de resultados prévios obtidos, surgiu a hipótese de que talvez as plantas transgênicas não estivessem superexpressando o gene *BiPD*, haja vista que o silenciamento gênico pela própria planta é algo comum em plantas transformadas, sobretudo as quais utilizam promotor de expressão constitutiva como o 35S (Borém, 1999) e talvez, por esse motivo, não tivéssemos obtido diferença entre os tratamentos. Para verificar essa hipótese foram realizadas reações de RT-PCR semi-quantitativo. Para confirmar a qualidade e padronização da quantidade do cDNA, os mesmos foram amplificados com *primers* para o gene *NtActin* que tem expressão constitutiva nas plantas de tabaco (Tan et al., 2013) e utilizado como controle endógeno. Como demonstrado na figura 27, todas as amostras apresentaram amplificação de ~180pb correspondente ao tamanho esperado para *NtActin* e com concentrações similares, comprovando a qualidade e quantidade do cDNA utilizado nas análises.



**Figura 27.** Amplificação do controle endógeno *NtActin* comprovando a qualidade e quantidade dos cDNAs. **1 a 6.** cDNAs de plantas selvagens. **7 a 12.** cDNAs de plantas superexpressando o gene *BiPD*. **13 a 15.** cDNAs de plantas silenciadas para o gene *BiPD*. **16.** Branco: reação com água. **17.** Controle positivo: DNA de planta superexpressando o gene *BiPD*. **M.** Marcador molecular de 1 kb.

Após a confirmação da qualidade e padronização da quantidade dos cDNAs, realizou-se a PCR com *primers* específicos para o gene *BiPD*. Conforme visualizado na figura 28, apenas as amostras das plantas superexpressando o gene *BiPD* apresentaram amplicon de 73pb, correspondente ao tamanho esperado para um fragmento interno do gene *soyBiPD* (acesso AF031241 no GenBank).



**Figura 28.** Confirmação da superexpressão do gene *BiPD* em plantas transformadas. **M.** Marcador molecular de 1 kb. **1 a 6.** cDNAs de plantas selvagens. **7 a 12.** cDNAs de plantas superexpressando *BiPD*. **13 a 15.** cDNAs de plantas mutantes para *BiPD*. **16.** Branco: reação com água. **17.** Controle positivo: DNA de planta superexpressando *BiPD*.

Com os resultados apresentados neste estudo pode-se concluir que o gene *BiPD* está sendo superexpresso nas plantas transgênicas e não foi capaz de conferir tolerância ao patógeno *X. fastidiosa*. Dessa forma, visando a seleção de genes promissores para programas de transgenia em laranja doce para resistência a CVC, este gene não seria escolhido para este fim. Os resultados desse trabalho comprovam a importância do uso de plantas modelo para obtenção de respostas rápidas a cerca da funcionalidade do gene, além de proporcionar economia de tempo e recursos financeiros caso o mesmo fosse transformado em citros, uma vez que, seriam necessários alguns anos de estudo até verificar a possível ineficácia do gene em conferir resistência a CVC. Essa avaliação também serviu como estudo para aplicação dos conhecimentos adquiridos em tabaco, tais como parâmetros de inoculação e o uso da escala diagramática.

### 8.2.6. Possível papel do gene *soyBiPD* em resposta à *X. fastidiosa*

Como dito anteriormente, o gene *soyBiPD* codifica uma chaperonina que está relacionada com a conformação correta de proteínas no retículo endoplasmático (RE). Isso auxilia em casos de estresse abiótico ou biótico quando há aumento da produção de proteínas no RE, evitando o estresse do RE pela geração de proteínas mal-formadas e aglomerados protéicos (Valente et al., 2009). Proteínas de resposta ao estresse, por exemplo, podem finalmente atuar com sua conformação correta, resultando na resistência da planta ao estresse. Além disso, há a possibilidade do gene *BiP* ser induzido por PAMPs, como resposta a ataque de patógenos (Jelitto-Van Dooren et al., 2009). No caso de *X. fastidiosa*, há a indução de estresse hídrico decorrente de sua colonização em

plantas de citros, o que poderia gerar estresse no RE e conseqüentemente ser revertido com a superexpressão de *BiPD* nas plantas. De acordo com essa hipótese, outros genes relacionados à estresse hídrico também foram induzidos por *X. fastidiosa* em *C. reticulata* (De Souza et al., 2007, 2009), sugerindo uma resposta característica. Entretanto, resultados da expressão, incidência e severidade dos sintomas, assim como população bacteriana apontaram esse gene como ineficaz em conferir resistência à *X. fastidiosa* em tabaco. Com isso, podemos concluir que *BiPD* pode não estar associado ao reconhecimento de algum PAMP de *X. fastidiosa* e, conseqüentemente, ter uma participação direta no mecanismo de defesa contra esse patógeno. Possivelmente, *BiPD* estaria relacionado com o combate ao estresse no RE, e esse efeito seria secundário devido a presença do patógeno, ou seja, a ativação do gene *BiPD* na planta tolerante seria uma resposta ao estresse causado pela bactéria e não uma resposta direta a presença do patógeno. Dessa forma, provavelmente a expressão do gene *BiPD* esta relacionada ao estabelecimento do funcionamento normal do RE, e isso acarretaria em melhorias secundárias para a planta infectada, mas que não a tornariam resistente à *X. fastidiosa*.

## 9. Conclusões

- Foi estabelecido e caracterizado o uso de *A. thaliana* e *N. tabacum* como plantas modelo para estudos funcionais visando resistência à *X. fastidiosa*;
- *A. thaliana* foi caracterizada como hospedeira moderadamente resistente à *X. fastidiosa* que coloniza citros, sendo o ecótipo Col-0 selecionado como menos resistente ao patógeno;
- Os bioensaios utilizando *N. tabacum* foram otimizados gerando sintomas em menor tempo. Respostas quantitativas da doença também foram caracterizadas, estabelecendo uma escala diagramática e correlacionando severidade com população bacteriana foliar;
- Como estratégia desenvolvida neste trabalho, o uso de plantas mutantes de *A. thaliana* (hospedeiro moderadamente resistente) em conjunto com plantas transgênicas de *N. tabacum* (hospedeiro suscetível) foi capaz de avaliar, num curto período de tempo, oito genes candidatos a conferir tolerância a *X. fastidiosa*. Dois destes apresentaram

resultados promissores, sendo selecionados para transformação em *C. sinensis* visando tolerância a CVC.

- Também foi comprovada a importância de plantas modelo para acelerar o conhecimento a cerca da funcionalidade de genes visando tolerância a *X. fastidiosa* e evitar gastos de tempo e recursos financeiros caso tais genes fossem estudados diretamente na planta de *C. sinensis*.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D and Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859-68.
- Alves, E., Kitajima, E. W., & Leite, B. (2003). Interaction of *Xylella fastidiosa* with Different Cultivars of *Nicotiana tabacum*: a Comparison of Colonization Patterns. *Journal of Phytopathology*, 151(9), 500–506.
- Alvim, F. C., Carolino, S. M., Cascardo, J. C., Nunes, C. C., Martinez, C. a, Otoni, W. C., & Fontes, E. P. (2001). Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant physiology*, 126(3), 1042–54.
- Amorim, L., Bergamin Filho, A., Palazzo, D., Bassanezi, R. B., Godoy, C. V., & Torres, G. A. M. (1993). Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. *Fitopatologia Brasileira*, 18(2), 174–180.
- Anderson JV, Li QB, Haskell DW, Guy CL (1994) Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.* 104:1395-1370
- Andreote, F. D., Lacava, P. T., Gai, C. S., Araújo, W. L., Maccheroni, W., Overbeek, L. S. Van, & Elsas, J. D. Van. (2006). Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. *Canadian Journal Microbiology*, 52, 419–426.
- Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*, 55: 373-399. 2004
- Balazadeh, S., Jaspert, N., Arif, M., Mueller-Roeber, B., & Maurino, V. G. (2012). Expression of ROS-responsive genes and transcription factors after metabolic formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in chloroplasts. *Frontiers in plant science*, 3(November), 234.
- Belasque Jr, Bassanezi, R. B., Spósito, M. B., Ribeiro, L. M., Junior, W. C. D. J., Amorim, L., ... Citricolas, C. D. P. (2005). Escalas Diagramáticas para Avaliação da Severidade do Cancro Cítrico. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4), 387–394.
- Berkey, Robert. Specific targeting of rpw8 family proteins to and de novo biogenesis of the extrahaustorial membrane in arabidopsis cells invaded by powdery mildew fungus. 2013. 220 f. Thesis (PhD) - Philosophy course, University Of Maryland, College Park, 2013.

- Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406.
- Bohnert HJ, Nelson DE and Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111.
- Bové, J. M. & Ayres, A. J. 2007. Etiology of Three Recent Diseases of Citrus in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Life.* 59: 346 – 354.
- Brakke M and Allen LH (1995) Gas exchange of citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil water content. *J Am Soc Hort Sci* 120:497-504.
- Brasileiro, A C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: Brasileiro, A C. M.; Carneiro, V. T. de C (Ed.). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-Cenargen, 1998. 309 p.
- Campbell, C. L., & Madden, L. V. (1990). *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. (p. 532). New York: John-Wiley & Sons.
- Cepea. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>. Acesso em 14 de setembro de 2012.
- Chatelet, D. S., Wistrom, C. M., Purcell, A. H., Rost, T. L., & Matthews, M. a. (2011). Xylem structure of four grape varieties and 12 alternative hosts to the xylem-limited bacterium *Xylella fastidiosa*. *Annals of botany*, 108(1), 73–85. doi:10.1093/aob/mcr106
- Coletta-Filho, H. D.; Takita, M. A.; O.; De-Souza, A. A.; Aguilar-Vildoso, C. I. and Machado, M. A. 2001. Differentiation of Strains of *Xylella fastidiosa* by a Variable Number of Tandem Repeat Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4091–4095.
- Coletta-Filho, H. D., Pereira, E. O., Souza, a. a., Takita, M. a., Cristofani-Yale, M., & Machado, M. a. (2007). Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. *Plant Pathology*, 56(4), 661–668.
- Corrêa, F. M., Bueno Filho, J. S. S., & Carmo, M. G. F. (2009). Comparison of three diagrammatic keys for the quantification of late blight in tomato leaves. *Plant Pathology*, 58(6), 1128–1133.
- Dandekar, A. M., Gouran, H., Ibáñez, A. M., Uratsu, S. L., Agüero, C. B., McFarland, S., ... Gupta, G. (2012). An engineered innate immune defense protects grapevines from Pierce disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3721–5.
- De La Fuente, L., Parker, J. K., Oliver, J. E., Granger, S., Brannen, P. M., van Santen, E., & Cobine, P. a. (2013). The bacterial pathogen *Xylella fastidiosa* affects the leaf ionome of plant hosts during infection. *PLoS one*, 8(5), 1–9.
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Campos M. A.; Teixeira, E. C. J.; Targon, M. L. P. N.; Carlos, F. E.; Ravasi, J. F.; Fischer, C. N.; Machado, M. A. 2007b. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 965-971
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Targon, M. L. P. N.; Carlos, F. E.; Locali-Fabris, E. C.; Amaral, A. M.; Freitas-Astúa, J.; Silva-Pinhati, A. C. O.; Boscardiol-Camargo, R. L.;

- Breger, I. J.; Rodrigues, C. M.; Reis, M. S.; Machado, M. A. 2007a. Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 957-964
- De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Amaral, A. M.; Coletta-Filho, H. D.; Machado, M. A. 2009. Citrus responses to the *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis. Global Science Books. *Special tissue 2*: 73-80.
- Dominguez, A.; Guerri, J.; Cambra, M.; Navarro, L.; Moreno, P. & Peña, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, v.19, p.427-433, 2000
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 9. 11-15
- Eckardt, N. a. (2002). Plant disease susceptibility genes? *The Plant cell*, 14(9), 1983–6.
- Fietto, L. G., Costa, M. D. L., Cruz, C. D., Souza, A. A., Machado, M. A., & Fontes, E. P. B. (2007). Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family, 3, 881–887.
- Fontes MA, Otoni WC, Carolino SMB, Brommonschenkel SH, Fontes EPB, Fári M, Louro RP (1999) Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. *Plant Cell Rep*. 19:81-87.
- Francis, M., Civerolo, E. L., & Bruening, G. (2008). Improved Bioassay of *Xylella fastidiosa* Using *Nicotiana tabacum* Cultivar SR1. *Plant Disease*, 92(1), 14–20.
- Gillet B, Beyly A, Peltier G and Rey P (1998) Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. *Plant J* 16:257-262.
- Gmitter, F. G. ; Chen. C. ; Machado, M. A. ; De Souza, A. A. ; Ollitrault, P.; Froehlicher, Y. ; Shimizu, T. Citrus genomics. *Tree Genetics & Genomes*, v. 1, p. 1, 2012.
- Gomez-Gomez, L.; Boller, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, v.5, p.1003-1011, 2000.
- Horsfall, J. G., & Barratt, R. W. (1945). An improved grading system for measuring plant diseases. (Abstract). *Phytopathology*, 35(655), 14.
- Ibge. Disponível em:  
[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_imprensa.php?id\\_noticia=2001](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa.php?id_noticia=2001).  
 Acesso em 20 de Dezembro de 2012.
- Irsigler, A. S. T., Costa, M. D. L., Zhang, P., Reis, P. a B., Dewey, R. E., Boston, R. S., & Fontes, E. P. B. (2007). Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics*, 8, 431.
- Jelitto-Van Dooren EP, Vidal, S., & Denecke, J. (1999). Anticipating endoplasmic reticulum stress. A novel early response before pathogenesis-related gene induction. *The Plant cell*, 11(10), 1935–44.
- Jones, J.D.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature*, v.444, p.323-329, 2006.

- Killiny, N., & Almeida, R. P. P. (2011). Gene regulation mediates host specificity of a bacterial pathogen. *Environmental microbiology reports*, 3(6), 791–7.
- Kranz, J. Measuring plant disease *In*: Kranz, J. & Rotem, J.(ed.) Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology, Heidelberg, Springer, 1988, p.35-50.
- Lapin, D., & Van den Ackerveken, G. (2013). Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends in plant science*, 18(10), 546–54.
- Laranjeira, F. F.; Amorin, L.; Bergamin Filho, A.; Aguilar – Vildoso, C. I.; Coletta Filho, H. D.; Fungos, Procariotos e doenças abióticas. P511-566. Editores Mattos Junior, D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Junior, J. 2005. Citros. Ed Makro Color. 929 páginas.
- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J and Bukau B (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 5452–5457.
- Lee J, Hubel A, Schöffl F (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant. J.* 8: 603-612
- Li, W., Zhou, C., Pua, W. D., Teixeira, D. C., Miranda, V. S., Pereira, E. O., ... Purcell, A. H. (2002). Citrus and Coffee Strains of *Xylella fastidiosa* Induce Pierce ' s Disease in Grapevine. *Plant Disease*, 86(11).
- Lopes, S. A., Ribeiro, D. M., Roberto, P. G., França, S. C., & Santos, J. M. (2000). Nicotiana tabacum as an Experimental Host for the Study of Plant – *Xylella fastidiosa* Interactions. *Plant Disease*, 84(8), 827–830.
- Lu, H., Zhang, C., Albrecht, U., Shimizu, R., Wang, G., & Bowman, K. D. (2013). Overexpression of a citrus NDR1 ortholog increases disease resistance in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 4(June), 157.
- Main, C. (1977). Crop destruction – The raison d' e`tre of plant pathology. In *Horsfall JG and Cowling EB (eds) Plant Disease: An Advanced Treatise* (pp. 55 – 78). New York: Academic Press.
- Marques, J.P.R.; Freitas-astua J.; Kitajima, E.W.; Appezzato-da-glória, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, p.1531-1536, 2007.
- McElrone, A. J., Sherald, J. L., & Forseth, I. N. (2001). Effects of Water Stress on Symptomatology and Growth of Parthenocissus quinquefolia Infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, 85(11), 1160–1164.
- Monteiro, P. B., Renaudin, J., Jagoueix-Eveillard, S., Ayres, A. J., Garnier, M., & Bové, J. M. (2001). *Catharanthus roseus* , an Experimental Host Plant for the Citrus Strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, 85(3), 246–251.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962.

- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4325.
- Neves, M.F.; Lopes, F.F. Estratégias para laranja no Brasil. 1. ed. São Paulo: Atlas, p.225, 2005.
- Neves, M.F.; Trombin, V.G; Milan, P.; Lopes, F.F.; Cressoni, F.; Kalaki, R. O retrato da citricultura brasileira. Markestrat, 138 pp, 2010.
- Neves, M.F.; Trombin, V.G.; Milan, P.; Lopes, F.F.; Cressoni, F.; Kalaki, R. O retrato da citricultura brasileira, São Paulo: CitrusBR, p.138, 2011.
- Niza, B.; De Souza, A. A. Obtaining a fluorescent pathogenic strain of *Xylella fastidiosa* for monitoring colonization of host plants. In: 57 Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. Anais do Congresso Brasileiro de Genética, 2011.
- Nürnberger T. & Brunner F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 318-324.
- Nutter, F. W., Esker, P. D., & Netto, R. a. C. (2006). Disease Assessment Concepts and the Advancements Made in Improving the Accuracy and Precision of Plant Disease Data. *European Journal of Plant Pathology*, 115(1), 95–103.
- Nutter Jr, F. W., & Worawitlikit, O. (1989). Disease. Pro: A computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. *Phytopathology*, 79, 1135.
- Oliveira, A. C., Vallim, M. a, Semighini, C. P., Araújo, W. L., Goldman, G. H., & Machado, M. a. (2002). Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology*, 92(10), 1048–54.
- Ortolani AA, Pedro Júnior MJ and Alfonsi RR (1991) Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: Rodrigues O, Viégas F, Pompeu Júnior J and Amaro AA (eds) Citricultura Brasileira. 2nd edition. Fundação Cargill, Campinas, pp 153-195.
- Peña, L.; Martín-trillo, M.; Juárez, J.; Pina, J.; Navarro, L. & Martínez-zapater, J.M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, v.19, p.263-267, 2001.
- Pooler, M.R. & Hartung, J.S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381. 1995.
- Qi, Y., Tsuda, K., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2011). Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 702–708.
- Ribeiro, R. V. Machado, E. C. Oliveira, R. F. 2003. Early photossintetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:167-173.
- Rodrigues, C. M., de Souza, A. a, Takita, M. a, Kishi, L. T., & Machado, M. a. (2013). RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC genomics*, 14(1), 676.
- Rogers, E. E. (2012). Evaluation of *Arabidopsis thaliana* as a model host for *Xylella fastidiosa*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 25(6), 747–54.

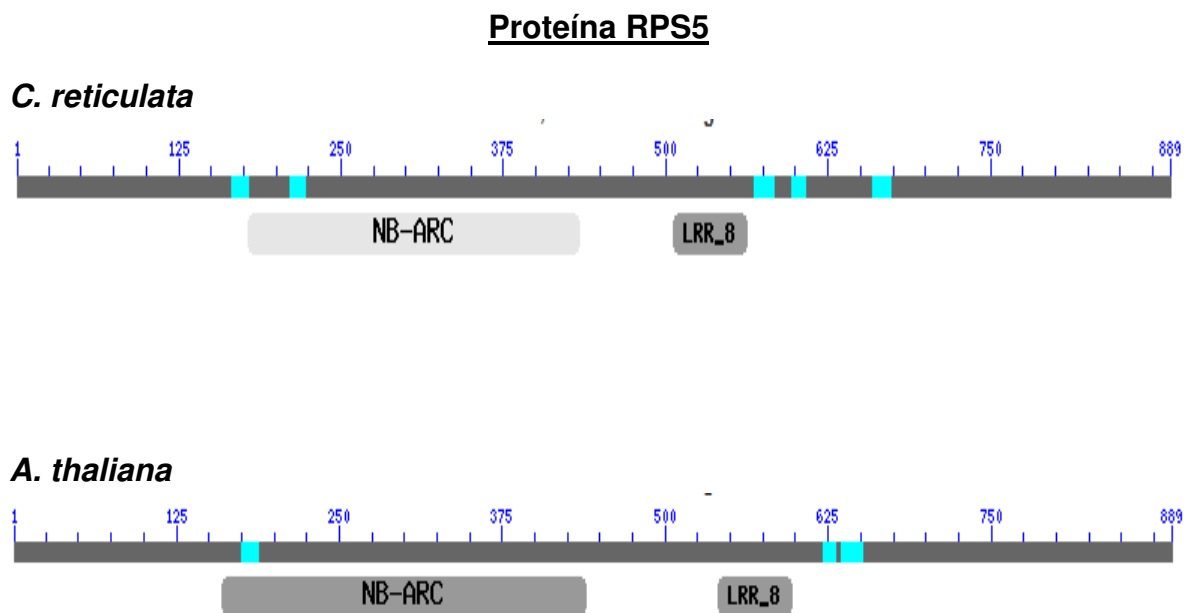


- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sasidharan, R., & Gerstein, M. (2008). Protein fossils live on as RNA. *Nature Genomics*, 453, 729–732.
- Simonich MT, Innes RW. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant Microbe Interact.* 1995 8(4):637-40.
- Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., ... Baptista, C. S. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406, 151–159.
- Singh, K. B., Foley, R. C., Oñate-Sanchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 430-436.
- Song, W.Y.; Wang, G.L.; Chen, L.L.; Kim, H.S.; Pi, L.Y. et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, v.270, p.1804-1806, 1995.
- Sun, X.; Cao, Y.; Yang, Z.; Xu, C.; Li, X. et al. Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant Journal*, v.37, p.517-527, 2004.
- Tan, X., Meyers, B. C., Kozik, A., West, M. a L., Morgante, M., St Clair, D. a, ... Michelmore, R. W. (2007). Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC plant biology*, 7, 56.
- Tan, Zhijing; hu, Yuanlei; lin, Zhongping. Expression of SYMRK affects the development of arbuscular mycorrhiza in tobacco roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, n. 1, p.85-94, jan. 2013.
- Tang, X.; xiao, Y. e zhou, J. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, p.1159-1166, 2006.
- Thomma B.P., Nurnberger T., Joosten M.H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*. 23, 4–15.
- Tormelin, J. R., & Howell, T. A. (1988). Distrain: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. *Plant Disease*, 72, 455–459.
- Valente, M. A. S., Faria, J. a Q. a, Soares-Ramos, J. R. L., Reis, P. a B., Pinheiro, G. L., Piovesan, N. D., ... Fontes, E. P. B. (2009). The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of experimental botany*, 60(2), 533–46.
- Vellanoweth, Robert L.. *Guide to Growing Arabidopsis thaliana: Vellanoweth Lab, CSULA*. 1997. Disponível em: <<http://web.calstatela.edu/faculty/vllnwth/grow.htm>>. Acesso em: 02 maio 2012.
- Warren, R. F., A. Henk, P. Mowery, E. Holub and R. W. Innes, 1998 A mutation within the leucine rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 10: 1439–1452.

- Wirthmueller, L., Maqbool, A., & Banfield, M. J. (2013). On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 11(11), 761–76.
- Yadav, N. V. S., de Vos, S. M., Bock, C. H., & Wood, B. W. (2013). Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology*, 62(2), 325–335.
- Zadoks, J., & Schein, R. (1979). *Epidemiology and Plant Disease Management* (p. 1979). New York: Oxford University Press.
- Zhao, Y., Wei, T., Yin, K.-Q., Chen, Z., Gu, H., Qu, L.-J., & Qin, G. (2012). Arabidopsis RAP2.2 plays an important role in plant resistance to *Botrytis cinerea* and ethylene responses. *The New phytologist*, 195(2), 450–60.
- Zhichang, Zhao et al. Over-expression of Arabidopsis DnaJ (Hsp40) contributes to NaCl-stress tolerance. *African Journal Of Biotechnology*, Chengdu, v. 9, n. 7, p.972-978, 2010.
- Zipfel, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, v.20, p.10-16, 2008.
- Zipfel, C.; Kunze, G.; Chinchilla, D.; Caniard, A.; Jones, J.D. et al. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, v.125, p.749-760, 2006.

## 11. ANEXOS

### A. Alinhamento entre proteínas RPS5 e RAP2.2 de *A. thaliana* e seus homólogos em *C. reticulata*



- Query= *C. reticulata*; Subject = *A. thaliana* (42% de identidade)

>gb|ABB00206.1| disease resistance protein [Arabidopsis thaliana]  
Length=889

Score = 595 bits (1533), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 373/879 (42%), Positives = 519/879 (59%), Gaps = 46/879 (5%)

```

Query 24  KAAYIRNLQENVVALETGLKLEAKNDVMARVVNTERQPMTRLNKVQGWLSGVDVAVKA 83
          + +YI NL +N+ +L+ + L + DV+ R+ E RL++VQ WL+ V ++
Sbjct 25  RGSYIHNLSKNLASLQKAMRMLKARQYDVIRRLETEEFTGRQQLRSQVQVWLTSVLIIQN 84

Query 84  EADELIRHGSQEIEKLCGGYCSKNWSSYKFGKQVAKKLRDAGTLMAGVFEVVAERAP 143
          + D+L+R E+++LCL G+CSK+ K SY++GK+V L++ +L ++G F+VV+E P
Sbjct 85  QFDDLLRSNEVELQRLCLCGFCSKDLKLSYRYGKRVIIMMLKEVESLSSQGFFDVVSEATP 144

Query 144 -----ESAAVGMQSRLEPVWRCLVEEPVGVIGLYGMGGVGGKTTLLTHLNNKFLGQR 194
          + VG + LE W L+E+ GI+GLYGMGGVGGKTTLLT +NNKF +
Sbjct 145  FADVDEIPFQPTIVGQEIMLEKAWNRLMEDGSGILGLYGMGGVGGKTTLLTKINNKF-SKI 203

Query 195  DFHFDFLIWWVVSKDLQIEKIQEIIIGKKVGFNDSSWMKKNLAERAVDIYNVLKEKKEFVLL 254
          LDD+W++V+ VGVP P +D + KV FTTRS +VC MG V CL ++W+LF
Sbjct 204  DDRFDVVIWVVVSRSTVRKIQRDIAEKVGLGGMEWSEKNDNQIADVDIHNVLRRRRKFVLL 263

Query 255  LDDVWQRVDFATVGVPIPPRDKSASKVVFTRSAEVCVWMAHKKFGVGGCLSSANDAWELF 314
          LDD+W++V+ VGVP P +D + KV FTTRS +VC MG V CL ++W+LF
Sbjct 264  LDDIWEKVNLIKAVGVPPYPSKD-NGCKVAFTTRS RDVCGRMGVDDPMEVSCVLPQPEESWDLF 322

Query 315  RQNVGEEITLSDHDAELAQIVAECEGGLPLALITIGQAMAYKKTVEEWRHAIEVLRSSA 374
          + VG+ TL S DI LA+ VA +C GLPLAL IG+AMA K+TV EW HAI+VL SA
Sbjct 323  QMKVGGKNTLGSHPDIPGLARKVARKCRGLPLALNVIGEAMACKRTVHEWCHAIDVLTSSA 382

Query 375  SEFFPGF-DNVLRVFKFSYDSLDPDDTTRSCFLYCCLYPKDYGILKWDLIDCWIGEGFL-EE 432
          +F G D +L V K+SYD+L + +SCFLYC L+P+DY I K L+D WI EGF+ E+
Sbjct 383  IDFSGMEDEILHVLKYSYDNLNGELMKSCFLYCSLFPEDYLIDKEGLVDYWISEGFINEK 442

Query 433  SARFVAENQGYCIVGTLVDAACLEEEIEDDK--VKMHDVVRYMALWIVCEIEEEKRNFLVR 490
          R NQGY I+GTLV ACLK E E +K VKMHDVV R MALWI ++ ++K +VR
Sbjct 443  EGRERNINQGYEIIIGTLVRACLLLEERKSNVNMHDVVREMAWISSDLGKQKEKCIVR 502

Query 491  AGAGLEQAPAVKEWENVRRLSLMQNDIKILSEVPTCPDLHTLFLASNNNLQRITDGGFFK 550
          AG GL + P VK+W VR++SLM N+I+ + + C L TLFL N++ +I+ FF+
Sbjct 503  AGVGLREVPKVKDWNTVRKISLMNNEIEEIFDSHECAALTTLFL-QKNDVVKISAEFFRC 561

Query 551  MP SLKVLKMSHCGDLKVLKPLGMSMLGSELELLDISQTSIGELPEELKLLVNLKCLNLRW 610
          MP L VL +S L +LP +S L SL ++S T I +LP L L L LNL
Sbjct 562  MPHLVLDLSENQSLN--ELPEEISELASLRYFNLSYTCIHQLPVGLWTLKLIHLNLEH 619

Query 611  ATWLSKIPRQLISNSSRLHVLRFATGCSHSEASEDSVLFGGGEVLIQELLGLKYLEVLE 670
          + L I ISN L L + DS L L++EL L++LEV+
Sbjct 620  MSSLGSILG--ISNLWNLRTLGL-----RDSRLLLDMS-LVKELOLLEHLEVIT 665

Query 671  LTLRSSHALQLFFSSNKLKSCIRSLLLDEVGRGTSIIDATAFADLNHLNELRIDSVAEVE 730
          L + SS + S +L CI+ + ++ + + +L +L I +
Sbjct 666  LDISSSLVAEPLLCSQLVECIKEVDFKYLK--EESVRVLTLPMTGNLRKLGKRCG-MR 722

Query 731  ELKIDYTEIVRKR-REPFV--FGSLHRVTLGQCLKLDLTLFVFPAPNLKSLQLLNCRAME 787
          E+KI+ T R + P F +L RV + +C LKDLT+L+FAPNL L++ + +E
Sbjct 723  EIKIERTTSSSSRNKSPTTPCFSNLSRVFIACHGLKDLTWLLFAPNLTFLEVGFSKEVE 782

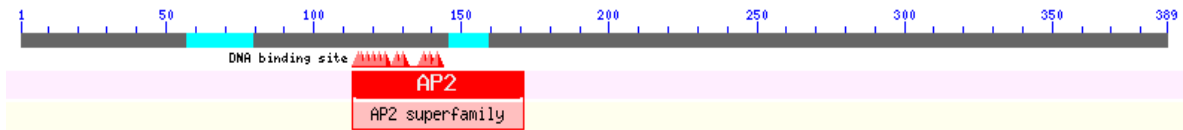
Query 788  EIISVGKFAEVEPVMGHISPFENLQRLHLFDLPRKSIYWKPLPFTHLKEMRVHGCNQLK 847
          +I+S K E I PF L+ LHLF+L LK IY K L F LK + V C +L+
Sbjct 783  DILSEEK---AEEHSATIVPFRKLETLHLFELRGLKRIYAKALHFPCLKVIHVEKCEKLR 839

Query 848  KLPLDSNSA----KFVI-RGEAEGWNRLQWEDDATQIAF 881
          KLPLDS S + VI GE E R++WED ATQ+ F
Sbjct 840  KLPLDSKSGIAGEELVIYYGEREWIERVEWEDQATQLRF 878

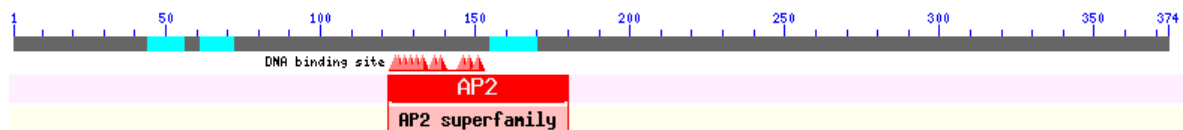
```

## Proteína RAP2.2

### *C. reticulata*



### *A. thaliana*



- Query= *C. reticulata*; Subject = *A. thaliana* (46% de identidade)

Score = 239 bits (611), Expect = 6e-72, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 192/416 (46%), Positives = 248/416 (60%), Gaps = 69/416 (17%)

```

Query 1  MCGGAIISGYIPPTVPGRPKLLTAEYLWPELK-----RSSNKKYSKPIVDDDFEADFQ  53
          MCGGAIIS +IPP  R  ++T E++WP+LK      + SNK+      +DDDFEADFQ
Sbjct 1  MCGGAIISDFIPPP---RSLRVINEFIWPD LKNKVKASKKRSNKRSDFFDLDDDFEADFQ  57

Query 54  GFKDDEEESDIDGDVDVDADLMADIKPF TFSAGRK-----SHGSTAVKHVEQA  102
          GFKDD  S  D +  D  D +  ++KPF F+A  K      ++      V+  EQA
Sbjct 58  GFKDD---SAFDCE---DDDDVFVNVKPFVFTATT KPVASAFVSTGSAYAKTIVESAEQA  111

Query 103  KKSTERKRKNQYRGIRQRPWGKWA AEIRDPTKGV RVWLGT FNTAEEAARAYDAEARRIRG  162
          +KS++RKRKNQYRGIRQRPWGKWA AEIRD P  KG  R  WLGT F+TAE EAARAYDA ARRIRG
Sbjct 112  EKSSKRKRKNQYRGIRQRPWGKWA AEIRDPRKGSREWLGTFDTAEEAARAYDAAARRIRG  171

Query 163  KKAKVNFPDE---TPAAAPKSSVKANS-QKSV--PKACLSPVQPSLNQNFNYLNNSDQDY  216
          KAKVNFP+E  +  +  +  S  K  N+  QKSV  P  ++  VQ  ++  Y  NNS  +
Sbjct 172  TKAKVNFPPEEKNPVSVSQKRPSAKTNNLQKSVAKPNKSVTLVQQPTHLSQQYCNSFDNS  231

Query 217  YNNVSILEEKPOV--NQYGYMGSFPDDGELGFKPFVPTADDTIPVYFNSDQGSNSFDCSDF  274
          +  ++S  +EEKPQ+  NQ+G  SF  G  G++      YF+SDQGSNSFDCS+F
Sbjct 232  FGDMSFMEKPOMYNNQFGLTNSFDAGNGYQ-----YFSSDQGSNSFDCSEF  280

Query 275  GWGEQAPKTP EISSVLEATPEVDESQFVD AVANPMK KLSNSENAVPVQDNNNGKLSLDEL  334
          GW +  PKTPEISS+L      +E+  FV+  N  KKLK  NS+      SD+L
Sbjct 281  GWSDHGPKTPEISSMLVNN---NEASFVEET-NAAKKLKPN SDE-----SDDL  324

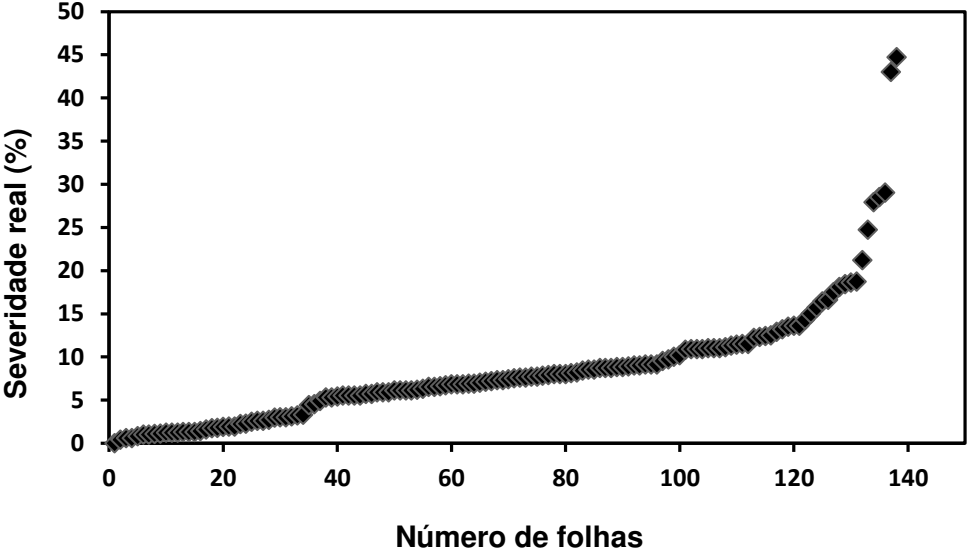
Query 335  LAF-DNQVKFLPMPYPEG SWEASLDAFLNGDNTIQDGGNLMNLWSFDDFPSTILGGVY  389
          +A+  DN +  P+      EA  L  A  G  TQ+  N +  LWS  D+  L  G  +
Sbjct 325  MAYLDNALWDTPLEV-----EAMLGADA-GAVTQEEENPVELWLSLDEINFMLEGDF  374
    
```

**B. Alinhamento entre a proteína BiPD de soja e seu homólogo em *C. reticulata***

- Query= *Glycine max*; Subject = *C. reticulata* (93% de identidade)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1219 bits(3154)	0.0	Compositional matrix adjust.	600/644(93%)	625/644(97%)	2/644(0%)
Query 3	ACSRRGNSLVVLAIVLLGCLSALSNAKEEATKLGTVIGIDLGTTYSCVGVYKNGHVEIIA				62
Sbjct 4	+ +RR SL+VLAI+ GCL A+S AKEEATKLGTVIGIDLGTTYSCVGVYKNGHVEIIA SWARR--SLIVLAIISFGCLFAISIAKEEATKLGTVIGIDLGTTYSCVGVYKNGHVEIIA				61
Query 63	NDQGNRITPSWVAFTDNERLIGEAANKLAAVNPRTIFDVKRLIGRKFEDKEVQRDMKLV				122
Sbjct 62	N+QGNRITPSWVAFTD+ERLIGEAANKLAAVNPRTIFDVKRLIGRKFEDKEVQRDMKLV NNQGNRITPSWVAFTDSERLIGEAANKLAAVNPRTIFDVKRLIGRKFEDKEVQRDMKLV				121
Query 123	PYKIVSKDGKPYIQVKIKDGEVVFSPPEISAMILTKMKETAFAFLGKTIKDAVVTVPAY				182
Sbjct 122	PYKIV+KDGKPYIQVKIKDGE KVFSPPEISAMILTKMKETAFAFLGK I DAVVTVPAY PYKIVNKDGKPYIQVKIKDGETKVFSPPEISAMILTKMKETAFAFLGKKINDAVVTVPAY				181
Query 183	FNDAQRQATKDAGVIAGLNVARIINEPTAAAIAYGLDKKGGKKNILVFDLGGGTFDVSIL				242
Sbjct 182	FNDAQRQATKDAGVIAGLNVARIINEPTAAAIAYGLDKKGGKKNILVFDLGGGTFDVSIL FNDAQRQATKDAGVIAGLNVARIINEPTAAAIAYGLDKKGGKKNILVFDLGGGTFDVSIL				241
Query 243	TIDNGVFEVLATNGDTHLGGEDFDQRIMEYFIKLIKHHGKDISKDNRALGKLRREAERA				302
Sbjct 242	TIDNGVFEVLATNGDTHLGGEDF QRIMEYFIKLIKHHGKDISKDNRALGKLRREAERA TIDNGVFEVLATNGDTHLGGEDFGQRIMEYFIKLIKHHGKDISKDNRALGKLRREAERA				301
Query 303	KRSLSSQHQRVEIESLFDGTFDFSEPLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKKAMDDAGLQKNQ				362
Sbjct 302	KR+LSSQHQRVEIESLFDG DFSEPLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKKAM+DAGLQK+Q KRALSSQHQRVEIESLFDGVDFSEPLTRARFEELNNDLFRKTMGPVKKAMEDAGLQKSQ				361
Query 363	IDEIVLVGGSTRIPKVQQLLKDYFDGKEPKGVNPDEAVAYGAAVQGGILSGEGGDETKD				422
Sbjct 362	IDEIVLVGGSTRIPKVQQLLKDYFDGKEP+KGVNPDEAVAYGAAVQ GILSGEGG+ETKD IDEIVLVGGSTRIPKVQQLLKDYFDGKEPNKGVNPDEAVAYGAAVQEGILSGEGGEETKD				421
Query 423	ILLLDVAPLTLGIETVGGVMTKFI PRNTVIPTKKSQVFTTYDQQQITVSIQVFEGERSLT				482
Sbjct 422	ILLLDVAPLTLGIETVGGVMTK I PRNTVIPTKKSQVFTTYDQQQITVSIQVFEGERSLT ILLLDVAPLTLGIETVGGVMTKLI PRNTVIPTKKSQVFTTYDQQQITVSIQVFEGERSLT				481
Query 483	KDCRNLGKFDLTGIPAPRGTQIEVTFEVDANGILNVKAEDKGTGKAEKIIITNDKGR				542
Sbjct 482	KDCR LGKFDL+GIPAPRGT QIEVTFEVDANGILNVKAEDKGTGK+EKIITN+KGR KDCRLLGKFDLSGIPAPRGTQIEVTFEVDANGILNVKAEDKGTGKSEKIIITNEKGR				541
Query 543	SQEEIERMVRFAEEFAEEDKKVKEKIDARNALETYVYNMKNQINDKDKLADKLESDEKEK				602
Sbjct 542	SQEEIERMVR ++FAEE+KKVKE+IDARN+LETYVYNMKNQ++DKDKLADKLESDEKEK SQEEIERMVR EKKDFAE EKKVKEKIDARNSLETYVYNMKNQVSDKDKLADKLESDEKEK				601
Query 603	IETATKEALEWLDNQS AEKEDYDEKLKEVEAVCNPIITAVYQR		646		
Sbjct 602	IETA KEALEWLDNQS EKEDY+EKLKEVEAVCNPII+AVYQR IETAVKEALEWLDNQSMEKEDYEEKLKEVEAVCNPIISAVYQR		645		

**C. Distribuição da severidade nas folhas amostradas**



## D. Aprovação da CIBio responsável

Formulário de Proposta de Projeto à Comissão de Biossegurança (CIBio)

**Título do Projeto de Pesquisa: Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros**

Data prevista de início: 01/03/2012

Data prevista de conclusão: 28/02/2014

**Pesquisador Principal: Dra. Alessandra Alves de Souza**

Endereço: Rod. Anhanguera km 158 cep 13490970 Cordeirópolis-SP

e-mail: alessandra@centrodecitricultura.br

Telefone residencial: 19-35464912

**Material genético incluído no OGM:**

Gene de resistência a espectinomicina/estreptomicina, gene de resistência a canamicina contendo promotor 35S e terminador 35S; gene repórter GUS contendo promotor Ubiquitina de *Helianthus annuus* e terminador NOS; gene de interesse contendo promotor FMV e terminador OCS

Genes de interesse: genes de *C. reticulata* homólogos a *rps5* e *rap2.2* de *A. thaliana*

**Vetor: vetor comercial (empresa DNA Cloning Service) de nome p9i-Ubi-Gusi contendo origem de replicação pVS1-ORI, gene de resistência a espectinomicina/estreptomicina, gene de resistência a canamicina e gene repórter GUS.**

**Classificação do OGM:**

Classe 1

Classe 2

**Classificação do Nível de Biossegurança do Laboratório**

NB - 1

NB - 2

NB - 3

NB - 4

### Resumo do Projeto

A citricultura brasileira representa um setor comercial muito rico, responsável pela liderança mundial no mercado de suco concentrado congelado e não concentrado. Além destes produtos o Brasil ainda exporta subprodutos da laranja (pectina, óleo, ração), o que no total corresponde a um faturamento de 1,5 bilhões anuais. Apesar disso a produtividade brasileira é baixa, sobretudo em razão da incidência de pragas e doenças. Dentre essas doenças, a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* é uma das que mais prejudicam o setor. Os prejuízos causados pela doença são estimados em 122 milhões de dólares anuais, uma vez que a doença afeta todas as variedades de laranja doce diminuindo a produção de suco concentrado, principal produto exportado. A doença se caracteriza pela redução no tamanho dos frutos em função da colonização da bactéria no xilema da planta, bloqueando o transporte de água e nutrientes para parte aérea. Os programas de melhoramento genético de citros ainda são um desafio em virtude da baixíssima variabilidade genética e do grande avanço de pragas e doenças. Dessa forma há uma grande necessidade de ampliação das bases genéticas e o uso de ferramentas de biotecnologia vêm ao encontro dessa necessidade. Uma dessas ferramentas é a transferência de genes de qualquer organismo de modo a obter uma característica desejada em outro organismo, estratégia comumente chamada transgênia. Estudos realizados pela nossa equipe demonstraram que variedades de tangerina são resistentes à *X. fastidiosa*, ou seja, não apresentaram sintomas típicos da doença, além de possível redução da população bacteriana na planta. Também foi verificado pelo nosso grupo que alguns genes superexpressos durante a infecção podem ser responsáveis pela resistência à *X. fastidiosa* e consequentemente o controle da CVC. Em paralelo à isso, algumas chaperonas conhecidas como Heat shock proteins (Hsps) são conhecidas por estarem relacionadas à resistência a diferentes estresses. Recentemente, a superexpressão de uma chaperona codificada pelo gene *BIPD* de soja conferiu resistência à estresse hídrico em plantas de *Nicotiana tabacum*. Uma vez que *X. fastidiosa* induz estresse hídrico na planta e sabe-se que genes BIP respondem também a elicitores da resposta planta-patógeno, este gene também poderia ser útil no controle da CVC. Com isso, a transferência de todos esses genes para citros seria uma excelente estratégia, não fossem as dificuldades encontradas na transformação. Tais dificuldades como escapes, enraizamento, enxertia, longo ciclo da cultura e muitas variações de resposta entre variedades contribuem para a procura de alternativas como plantas modelo. *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* são plantas modelo muito interessantes para transformação genética, pois possuem protocolos simples, ciclo de vida curto e grande produção de sementes. Além disso, sabe-se que *N. tabacum* é hospedeiro de *X. fastidiosa* e *Candidatus Liberibacter*, bactéria causadora do Huanglongbing. Ainda foi reportado



recentemente que *A. thaliana* é hospedeira para *X. fastidiosa*. Desta forma, este trabalho tem por objetivo a utilização de plantas modelos como *N. tabacum* e *A. thaliana* para o estudo funcional de genes de citros associados à resistência a *X. fastidiosa*.

**Objetivo do Projeto**

A utilização de plantas modelos como *N. tabacum* e *A. thaliana* para o estudo funcional de genes de citros associados à resistência a *X. fastidiosa*.

O trabalho em contenção objetiva a liberação posterior para o meio ambiente?

Sim

Não

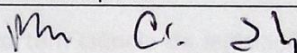
Equipe (nome, função - incluir pesquisadores e equipes de apoio)

Dra. Alessandra Alves de Souza – Pesquisadora

Willian Eduardo Lino Pereira – Mestrando

Luis Fernando Carvalho Silva – técnico de nível superior

Assinatura do presidente da CIBio:



## Termo de Responsabilidade

**Projeto: Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros**

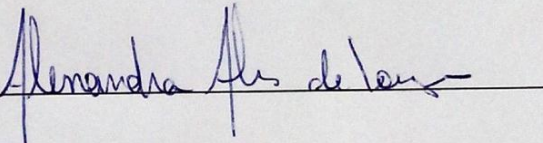
Eu, Alessandra Alves de Souza, pesquisadora responsável pelo projeto, asseguro à CIBio do IAC que:

1. Conheço a Legislação Brasileira (descrita no site <http://www.ctnbio.gov.br>) pertinente ao trabalho com os OGMs envolvidos no presente projeto e concordo com as suas exigências durante toda a vigência deste, inclusive eventuais prorrogações.
2. Toda a equipe participante do projeto tem ciência da legislação (Instruções Normativas da CTNBio), sendo competente para executar o projeto dentro dos preceitos da legislação.
3. Fornecerei à CIBio do IAC um relatório anual das atividades em andamento do projeto referido acima, que subsidiará o relatório anual da CIBio. Este relatório deverá ser enviado atendendo a data determinada pela CIBio.

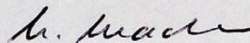
Declaro que todas as informações contidas neste documento são verdadeiras e estou ciente de que o não cumprimento da legislação relativa aos trabalhos com OGM são de minha total responsabilidade, estando sujeito às punições previstas na lei.

Data: 01/03/2012

Assinatura do Pesquisador Principal: \_\_\_\_\_



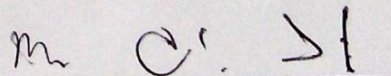
Diretor do Centro de Pesquisa: \_\_\_\_\_



Observações CIBio:

Data: 01/03/12

Assinatura do membro da CIBio de sua unidade: \_\_\_\_\_



Data: 01/03/12

Assinatura do Presidente da CIBio: \_\_\_\_\_

