

UNICAMP

BÁRBARA CAROLINE NIZA SILVA

**TRANSFORMAÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* COM GFP, COLONIZAÇÃO EM CITROS
E IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL PARA O INSETO
VETOR: NOVAS ABORDAGENS NO ESTUDO DO PATOSSISTEMA CVC**

***XYLELLA FASTIDIOSA* GFP TRANSFORMATION, ITS COLONIZATION PROCESS IN
CITRUS AND IMPLEMENTATION OF ARTIFICIAL DIET SYSTEM FOR INSECT
VECTOR: NEW APPROACHES IN THE STUDY OF CVC PATHOSYSTEM**

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

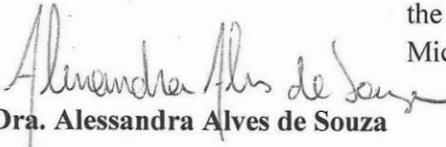
BÁRBARA CAROLINE NIZA SILVA

TRANSFORMAÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* COM GFP, COLONIZAÇÃO EM CITROS
E IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL PARA O INSETO
VETOR: NOVAS ABORDAGENS NO ESTUDO DO PATOSSISTEMA CVC

XYLELLA FASTIDIOSA GFP TRANSFORMATION, ITS COLONIZATION PROCESS IN
CITRUS AND IMPLEMENTATION OF ARTIFICIAL DIET SYSTEM FOR INSECT
VECTOR: NEW APPROACHES IN THE STUDY OF CVC PATHOSYSTEM

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética de
Microorganismos.

Dissertation presented to the Biology
Institute of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for
the degree of Master, in the area of
Microorganisms Genetics.


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

N655t Niza, Bárbara, 1989-
Transformação de *Xylella fastidiosa* com GFP, colonização em citros e implementação do sistema de dieta artificial para o inseto vetor : novas abordagens no estudo do patossistema CVC / Bárbara Caroline Niza Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. *Xylella fastidiosa*. 2. Clorose variegada dos citros. 3. Cítricos. 4. Insetos vetores. 5. Proteína verde fluorescente. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Xylella fastidiosa* GFP transformation, its colonization process in citrus and implementation of artificial diet system for insect vector : new approaches in the study of CVC pathosystem

Palavras-chave em inglês:

Xylella fastidiosa

Citrus variegated chlorosis

Citrus

Insect vectors

Green fluorescent protein

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Alessandra Alves de Souza [Orientador]

Camila Caldana

João Roberto Spotti Lopes

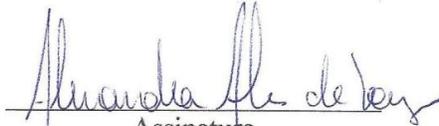
Data de defesa: 22-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 22 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Alessandra Alves De Souza (orientadora)


Assinatura

Dr. João Roberto Spotti Lopes


Assinatura

Dra. Camila Caldana


Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Assinatura

Prof. Dr. Welington Luiz De Araujo

Assinatura

**TRANSFORMAÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* COM GFP, COLONIZAÇÃO EM CITROS
E IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL PARA O INSETO
VETOR: NOVAS ABORDAGENS NO ESTUDO DO PATOSSISTEMA CVC**

A citricultura brasileira é um importante setor para a economia do país, contribuindo com superávits comerciais e geração de empregos, entretanto, o setor passa por uma grave crise econômica em decorrência do alto custo de produção e do baixo valor pago pela caixa de laranja no Brasil. O principal motivo do alto custo de produção é a alta incidência de pragas e doenças que atingem essa cultura. Dentre as doenças, a Clorose Variegada do Citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e transmitida a seus hospedeiros por cigarrinhas vetoras, é a que até hoje causou mais danos à citricultura brasileira. O mecanismo de patogenicidade da *X. fastidiosa* permanece não conclusivo porém a hipótese mais aceita está relacionada à facilidade da bactéria em colonizar o hospedeiro, ou seja, em se movimentar e multiplicar dentro dos vasos do xilema da planta infectada, seguido da formação do biofilme. O conhecimento da doença bem como das interações planta-patógeno e vetor-patógeno estão muito avançados para a doença de Pierce (PD), doença causada pela *X. fastidiosa* em videiras nos Estados Unidos. Esse avanço no conhecimento para PD ocorreu principalmente devido à obtenção de estirpes geneticamente modificadas da bactéria, permitindo a execução de estudos funcionais e de colonização. A implementação da aquisição de *X. fastidiosa* em sistema de dieta artificial para estudos com o vetor também foi de grande contribuição para esse avanço, uma vez que esse sistema elimina a utilização de plantas fonte para aquisição da bactéria. Em citros, sabe-se que existem fontes de resistência natural à CVC como tangerinas, tangors, limas e limões, entretanto, todas as variedades de laranja doce plantadas no Brasil são suscetíveis a essa doença. Sabe-se também que há uma resposta genética diferente entre um genótipo resistente e o suscetível quando inoculados com *X. fastidiosa*, porém, não se conhece como se dá a colonização *in planta*, e se existe uma correlação entre a resposta genética da planta e o comportamento da bactéria. Buscando melhorar o entendimento dos fatores envolvidos no patossistema CVC este trabalho teve como objetivo a obtenção de uma estirpe patogênica de *X. fastidiosa* de citros transformada com a proteína verde fluorescente (GFP) afim de avaliar sua colonização *in planta* em genótipos parentais e híbridos de citros, resistentes e suscetíveis, além da implementação da aquisição de *X. fastidiosa* por cigarrinhas vetores por meio do sistema de dieta artificial. A obtenção do transformante de *X. fastidiosa* expressando GFP permitiu o acompanhamento da colonização da bactéria nos vasos do xilema de plantas suscetíveis e resistentes e a avaliação mostrou uma colonização diferenciada entre caule e pecíolo. Também foi verificado um padrão diferencial de colonização dos caules de genótipos suscetíveis em relação aos resistentes, no qual a bactéria parece não capaz de se mover em genótipos resistentes, permanecendo aprisionada no xilema primário dessas plantas, sugerindo um possível mecanismo de resistência. A implementação da aquisição de células bacterianas em sistema de dieta artificial foi estabelecida com sucesso para vetor e estirpe de *X. fastidiosa* em citros, abrindo perspectivas para vários estudos na área de interação vetor-patógeno e transmissão da CVC.

***XYLELLA FASTIDIOSA* GFP TRANSFORMATION, ITS COLONIZATION PROCESS IN
CITRUS AND IMPLEMENTATION OF ARTIFICIAL DIET SYSTEM FOR INSECT
VECTOR: NEW APPROACHES IN THE STUDY OF CVC PATHOSYSTEM**

The citrus agribusiness is an important segment for the country economy, contributing to employment and trade surpluses, however, it is passing through an economic crisis on behalf of the high cost of production and the low price paid by the orange box in Brazil. The main reason for the high cost of production is the high incidence of pests and diseases affecting this crop. Among the diseases, the Citrus Variegated Chlorosis (CVC) is caused by the bacterium *Xylella fastidiosa* and transmitted to its hosts by sharpshooters, and it is the disease that more damage have been causing to the citrus agribusiness in Brazil. The *X. fastidiosa* pathogenicity mechanism still not clear but the currently accept hypothesis is related to its facility to colonize the host, in other words, on move and multiply within the xylem vessels of an infected host, followed by the biofilm formation. The knowledge about the disease and the interactions between plant-pathogen and vector-pathogen are advanced for the Pierce disease, which is caused by *X. fastidiosa* on grapes in the United States. This occurs mainly on behalf of bacterial mutant's obtainment, allowing functional and colonization studies, besides the artificial diet system establishment for insect vectors studies, once this system eliminates the use of source plant acquisition, a limiting factor for *X. fastidiosa* acquisition since its colonization in host plants is random. In citrus, is known that natural resistant sources against CVC exists like tangerine, tangors, limes and lemons, while all the sweet orange varieties grown in Brazil are susceptible. Also, was verified a different genetic response between a resistant and a susceptible genotype when inoculated with *X. fastidiosa*, although, the colonization process *in planta* still unknown as well as if there is a correlation between the plant genetic response and the bacterial behavior. In order to better understand the factors involved in the CVC pathosystem, this work had the goal of obtain a pathogenic *X. fastidiosa* strain from citrus transformed with the green fluorescent protein (GFP) to evaluate its colonization *in planta* on parent and hybrid citrus genotypes, resistant and susceptible, besides de *X. fastidiosa* artificial acquisition by the insect vector using the artificial diet system. Was obtained a *X. fastidiosa* strain transformed with the GFP which allowed the bacterial colonization monitoring within the xylem vessels of resistant and susceptible plants and this evaluation showed a differential colonization of stems and petioles. Was also verified a different stem colonization pattern between resistant and susceptible genotypes on which the bacteria seems to be not able to move in resistant ones, staying contained into the primary xylem of these plants, suggesting a possible mechanism of resistance. The bacterial cells acquisition on artificial diet system was successfully established using a citrus insect vector and bacterial strain, opening perspectives for various studies on vector-pathogen interaction and transmission of CVC.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
HIPÓTESES.	24
CAPÍTULO I - TRANSFORMAÇÃO DE ESTIRPE PATOGÊNICA DE <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> DE CITROS COM GFP E SUA RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	25
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1.1. VISÃO GERAL	25
1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA BACTÉRIA E SEU COMPORTAMENTO <i>IN PLANTA</i>	26
1.3. PARALELO CVC E PD	26
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. LINHAGENS DE <i>X. FASTIDIOSA</i>	28
3.2. OBTENÇÃO DE TRANSFORMANTES DE <i>X. FASTIDIOSA</i> POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA.....	28
3.2.1. Confirmação da integração do vetor no genoma da bactéria.....	29
3.3. ENSAIOS FENOTÍPICOS COMPARATIVOS ENTRE AS ESTIRPES.....	30
3.3.1. Morfologia de crescimento	30
3.3.2. Ensaio de Agregação.....	30
3.3.3. Produção de exopolissacarídeos totais (EPS)	30
3.3.4. Avaliação dos sintomas em casa-de-vegetação	31
3.4. TESTES FENOTÍPICOS COMPARATIVOS ENTRE A ESTIRPE TRANSFORMADA E O TIPO SELVAGEM	31
3.4.1. Curva de crescimento.....	31
3.5. DETECÇÃO DA LINHAGEM TRANSFORMADA DE <i>X. FASTIDIOSA IN PLANTA</i>	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. OBTENÇÃO DE TRANSFORMANTES DE <i>X. FASTIDIOSA</i> DE CITROS	32
4.1.1. Estabilidade dos transformantes	34
4.2. FATORES MORFOLÓGICOS INFLUENCIAM NA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO	36
4.3. A LINHAGEM TRANSFORMADA NÃO TEVE SUAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS AFETADAS	38
4.4. ESTABILIDADE DA ESTIRPE TRANSFORMADA COM GFP <i>IN PLANTA</i>	40

5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO II – DIFFERENTIAL COLONIZATION PATTERNS OF <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> IN RESISTANT, SUSCEPTIBLE AND HYBRID CITRUS GENOTYPES.....	49
ABSTRACT	49
INTRODUCTION	50
MATERIAL AND METHODS.....	51
BACTERIAL STRAINS AND GROWTH CONDITIONS	51
PLANT MATERIALS, INOCULATION AND EXPERIMENTAL DESIGN	51
BACTERIAL POPULATION AND MOVEMENT ANALYSIS BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (QPCR)	52
XYLEM MORPHOLOGY ANALYSIS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	53
FLUORESCENCE MICROSCOPY ANALYSES	53
RESULTS	54
MOVEMENT AND BACTERIAL POPULATION OF <i>X. FASTIDIOSA</i> IN THE GENOTYPES	54
DIFFERENCES IN XYLEM VESSEL MORPHOLOGIES DO NOT EXPLAIN THE DIFFERENCES IN THE COLONIZATION PROCESS.....	58
PETIOLE AND STEM COLONIZATION PATTERNS BETWEEN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT GENOTYPES	60
DISCUSSION	62
ACKNOWLEDGEMENTS.....	65
REFERENCES	65
CAPÍTULO III – AQUISIÇÃO DE <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> CAUSADORA DA CVC EM SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL.....	69
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	69
1.1. IMPORTÂNCIA DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR INSETOS	69
1.2. INTERAÇÕES ENTRE VETORES E PATÓGENOS.....	69
1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS INSETOS VETORES E DA TRANSMISSÃO DE PATÓGENOS.....	70
1.4. EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO	72
1.5. <i>X. FASTIDIOSA</i> E O VETOR - O QUE SE SABE SOBRE ESSAS INTERAÇÕES NO PATOSSISTEMA PD	73
2. OBJETIVO GERAL.....	75
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
3. MATERIAL E MÉTODOS	76

3.1. APRENDIZADO DA AQUISIÇÃO DE <i>X. FASTIDIOSA</i> UTILIZANDO O SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL COM INSETOS VETORES DA DOENÇA DE PIERCE	76
3.1.1. Aprendizado da metodologia em estágio na Universidade da Califórnia em Berkeley	76
3.1.2. Preparo dos diferentes meios de cultura e cultivo da bactéria	76
3.1.3. Cultivo e manutenção das colônias de inseto	76
3.1.4. Preparo das plantas para manutenção das colônias de inseto e para experimentos de transmissão.....	77
3.1.5. Experimentos de aquisição/ transmissão	78
3.1.6. Extração de DNA dos insetos e detecção de <i>X. fastidiosa</i>	81
3.2. IMPLEMENTAÇÃO DA AQUISIÇÃO DE <i>X. FASTIDIOSA</i> CAUSADORA DA CVC UTILIZANDO O SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL.....	81
3.2.1. Insetos utilizados.....	81
3.2.2. Estirpe de <i>X. fastidiosa</i> e meios de cultura	81
3.2.3. Aquisição de células de <i>X. fastidiosa</i> por dieta artificial	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1. RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O ESTÁGIO NA UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA EM BERKELEY	83
4.1.1. Estabelecimento da metodologia	83
4.1.2. Aquisição/ transmissão por <i>G. cythura</i>	87
4.2. ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA DE DIETA ARTIFICIAL COM CIGARRINHAS VETORAS DA <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> CAUSADORA DA CVC	88
4.2.1. Experimentos de aquisição em dieta artificial	89
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
6. REFERÊNCIAS	94

**À VIDA,
POR SUA FANTÁSTICA MAESTRIA
E MINUCIOSA PRECIOSIDADE.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que me permitiu até hoje e pela força dada todos os dias para a caminhada.

À minha querida família (pai, mãe e irmã) por todos esses anos de convivência, amor, respeito e momentos compartilhados. Agradeço em especial ao meu pai, que por ocasião da vida acabou passando mais tempo comigo e me trilhando sempre pelo melhor caminho. Graças a ele que hoje escrevo essa dissertação.

À minha querida orientadora, Ale, a quem devo toda a minha formação científica. Orgulho-me muito de ter tido essa excelente pesquisadora como minha tutora no desenhar de minha carreira profissional, principalmente pela sua idoneidade, dedicação e vontade em dar o seu melhor sempre. Além de orientadora ela foi sempre uma grande amiga, posso dizer que uma segunda mãe para mim.

À minha segunda família, pessoal do alojamento, com quem convivi pelos últimos 2 anos e meio e com quem compartilhei a maior parte dos momentos do mestrado. Queridos amigos aos quais sempre terei como boas lembranças. Ina, Laís, Diogo, Cíntia, Rosinha, Gabi e Simone, muito obrigada pela amizade.

Ao meu namorado, Fausto, pelo companheirismo, amor, paciência e compreensão.

À minha amiga de todos os momentos, companheira das coisas boas e ruins, Simone. Obrigada querida, por tudo o que você me ensinou, me fez enxergar de outra forma, da forma boa, mesmo quando eu achei que não existia forma boa nessas situações. Você será sempre muito querida.

Ao meu amigo Valtinho, pelo companheirismo e ensinamento de muitas coisas sobre a ciência e sobre a vida.

Aos pesquisadores do Centro de Citricultura, Dr. Helvécio e Dr. Takita, pela disponibilidade e ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

Ao Dr. Marcos, diretor do Centro de Citricultura e pesquisador, pelos ensinamentos e por prover toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento dos estudos.

Ao pessoal do laboratório do Dr. João Lopes, pelo suporte com os insetos vetores e os experimentos. Em especial à Mariana, pela disponibilidade sempre que necessária.

Ao Prof. Dr. João Lopes, pelos ensinamentos, suporte com os insetos vetores, e por sua contribuição crítica quanto ao trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Almeida da Universidade da Califórnia em Berkeley, pela ótima recepção em seu laboratório e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Fabien Labroussaa, pós-doutor do laboratório do Dr. Rodrigo Almeida, por todos os ensinamentos durante o estágio na Universidade da Califórnia.

Ao pessoal do laboratório de Berkeley onde estagiei por cinco meses, pela paciência, compreensão e amizade.

À pesquisadora da Universidade da Califórnia-Berkeley, Clélia Baccari pelos ensinamentos e suporte durante o estágio.

Ao brilhante pesquisador a quem tive a honra de conhecer e ser instruída, Alexander Purcell.

Ao técnico pesquisador da Unesp-Rio Claro, Pablo Henrique Nunes, pelo suporte com a microscopia de varredura.

Aos amigos maravilhosos os quais tive a oportunidade de conviver durante o estágio nos Estados Unidos. Anne, Vincent, Maxime e David.

Aos colegas de trabalho e amigos que fiz durante o desenvolvimento do trabalho, pela convivência, experiências compartilhadas e ajuda no laboratório.

Aos amigos e colegas de trabalho, Marcus, Dani e Bruna por toda a ajuda no desenvolver dos experimentos.

Ao Kleber, pela disponibilidade sempre que necessária e pelo bom humor.

Aos professores e pesquisadores que em algum momento participaram e deram suas valiosas sugestões para o enriquecimento do trabalho: Prof. Dr. Marcelo Dornelas; Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo; Prof. Dra. Anete Pereira de Souza; Prof. Dr. João Lopes, Dra. Camila Caldana, Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo e Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento da bolsa de estudo.

**“HÁ UM TEMPO EM QUE É PRECISO ABANDONAR AS ROUPAS USADAS,
QUE JÁ TÊM A FORMA DO NOSSO CORPO,
E ESQUECER OS NOSSOS CAMINHOS QUE NOS LEVAM SEMPRE AOS MESMOS LUGARES.
É O TEMPO DA TRAVESSIA: E SE NÃO OUSARMOS FAZÊ-LA, TEREMOS FICADO, PARA SEMPRE,
À MARGEM DE NÓS MESMOS”.**

FERNANDO PESSOA

INTRODUÇÃO

Os cítricos são o 4º grupo de frutas mais consumidos no mundo, e o suco de laranja é a bebida de fruta mais consumida (NEVES *et al.* 2011). Dentre os cítricos, as laranjas doce são as mais plantadas e consumidas para os mais diversos fins, sendo a manufatura de suco *in natura* e concentrado o principal (BOVÉ & AYRES, 2007). Nesse contexto, o Brasil é um produtor e exportador de destaque, sendo a exportação da commodity suco de laranja concentrado, a mais expressiva do país (NEVES *et al.* 2011). Somos responsáveis por metade da produção de todo o suco de laranja consumido no mundo, gerando somente com as exportações, cerca de 1,5 a 2,5 bilhões de dólares ao ano. No ano de 2013, aproximadamente 162.000 plantas de laranja produtivas resultaram em uma safra estimada correspondente a 268.350 caixas com 40 kg de laranja cada (CITRUSB, 2014).

Entretanto, apesar dos elevados números relacionados ao setor, a incidência de pragas e doenças tem causado muitos prejuízos, e conseqüentemente, danos econômicos ao setor. Na última década, mais de 40 milhões de árvores foram erradicadas em decorrência de problemas dessa ordem, causando uma perda de aproximadamente 80 milhões de caixas de laranja por ano (NEVES *et al.* 2011).

Dentre as principais doenças destaca-se a clorose variegada do citros ou CVC, conhecida popularmente como amarelinho em decorrência de seu sintoma típico de variação clorótica nas folhas de laranjeiras (TEIXEIRA *et al.* 2004). A CVC é a doença que até hoje mais causou danos à citricultura brasileira, sendo responsável pela erradicação de aproximadamente 26.4 milhões de árvores produtivas até o ano de 2009 (NEVES *et al.* 2011). As estimativas dos danos econômicos causados pela CVC são da ordem de 100 milhões de dólares anuais, devido principalmente, à perda de produtividade das plantas afetadas e dos custos para controle do inseto vetor (BOVÉ & AYRES, 2007). Essa doença é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e afeta todas as variedades de laranja doce do país, em todos os estados produtores (FUNDECITRUS, 2014). Os sintomas da CVC incluem variação típica nas folhas mais velhas, com áreas cloróticas na parte superior e lesões correspondentes castanho-claro com a presença de um material tipo goma na parte inferior. Os frutos afetados são pequenos, duros e não possuem valor comercial (Fig. 1) (TEIXEIRA *et al.* 2004).



Figura 1. Sintomas da CVC. À esquerda, folhas com pontos cloróticos e necróticos em decorrência da colonização de *X. fastidiosa*. À direita, fruto normal e fruto tipo “coquinho” afetado pela doença.

O agente causal desta doença, *X. fastidiosa*, é uma bactéria gram-negativa limitada ao xilema das plantas hospedeiras e ao lúmen do canal alimentar de insetos vetores (cigarrinhas - família Cicadellinae), responsáveis por sua transmissão entre as plantas (HOPKINS, 1995). O manejo das doenças causadas por este patógeno é difícil, pois a colonização vascular das plantas atingidas limita o acesso de agentes bactericidas (BACCARI & LINDOW, 2011). Possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo membros de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (HOPKINS & ADLERZ, 1988). Além da CVC, a *X. fastidiosa* está associada a doenças em culturas economicamente importantes como ameixeira, videira, pessegueiro, entre outras (PURCELL & HOPKINS, 1996; LIMA *et al.* 1998). Recentemente, foi detectada como o agente causal de uma nova doença que está devastando oliveiras na Itália, local onde até então não havia sido relatada a presença dessa bactéria, constituindo o primeiro foco no continente europeu (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013; ILARD & LORETI, 2014).

Nos diferentes hospedeiros, a bactéria é capaz de colonizar os vasos do xilema, disseminando-se por toda a extensão da planta e formando biofilme (NEWMAN *et al.* 2003). Quando em alta densidade celular, os sintomas das doenças surgem (NEWMAN *et al.* 2004). Entretanto, o exato mecanismo de patogenicidade permanece indefinido (CHATTERJEE *et al.* 2008). Em citros, sabe-se que ela é capaz de causar doença apenas em laranjas doce e apesar de colonizar por um breve período de tempo as tangerinas, tangors, limas e limões, não é capaz de causar doença nesses genótipos (LARANJEIRA *et al.* 1998; COLETTA-FILHO *et al.* 2007). Em

laranja doce a emergência dos sintomas é bastante inconstante em termos de tempo, surgindo em média após 6 meses da infecção, mas podendo variar até anos (LOPES *et al.* 2005).

Apesar das informações disponíveis, pouco se sabe sobre como acontece a colonização da bactéria dentro do hospedeiro citros. Não se conhece como se dá a distribuição e multiplicação bacteriana nos fenótipos contrastantes de resposta à CVC, ou seja, plantas resistentes versus suscetíveis. É conhecida a resposta genética global de um genótipo resistente e um suscetível quando infectados com a bactéria (DE SOUZA *et al.* 2007A; 2007B; 2009), porém, a correlação desses dados com a colonização da bactéria dentro desses hospedeiros, que até o momento é a hipótese mais aceita para seu mecanismo de patogenicidade, permanece desconexa.

Ao menos 13 espécies de cigarrinhas já foram identificadas como vetores da *X. fastidiosa* em citros (LOPES & KRUGNER, 2013; ALMEIDA *et al.* 2014). Entretanto, ainda não se tem para o patossistema CVC, informações a respeito das interações vetor-patógeno e quais são os sinais mediadores para que a aquisição e transmissão da bactéria aconteçam. Estudos nessa área são altamente influenciados pela eficiência com que o vetor é capaz de adquirir a bactéria a partir de uma planta fonte, evento esse mais uma vez, altamente dependente da localização e população bacteriana dentro da planta, o que dificulta a interpretação dos resultados que são reais e não artefatos ocasionados da condição experimental.

Com o intuito de obter um entendimento global desse patossistema, ou seja, como são as interações entre o hospedeiro citros-*X. fastidiosa* e inseto vetor, buscou-se nesse trabalho, obter uma estirpe patogênica da bactéria que afeta citros, transformada com a proteína verde fluorescente com o objetivo de estudar sua colonização *in planta*. Além disso, visando estudar a interação com o inseto vetor, buscou-se implementar a aquisição de *X. fastidiosa* em meio artificial, com o objetivo de eliminar a aquisição a partir de plantas fonte, minimizando erros de interpretação dos resultados.

HIPÓTESES:

Os fatores relacionados à virulência de *X. fastidiosa in planta* podem ser investigados com o uso de uma linhagem patogênica da bactéria transformada com GFP.

Cigarrinhas vetoras da *X. fastidiosa* em citros são capazes de adquirir a bactéria em sistema de dieta artificial.

CAPÍTULO I - TRANSFORMAÇÃO DE ESTIRPE PATOGENICA DE *XYLELLA FASTIDIOSA* DE CITROS COM GFP E SUA RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. VISÃO GERAL

Xylella fastidiosa é uma bactéria capaz de hospedar inúmeras espécies de plantas bem como causar diversas doenças (PURCELL & HOPKINS, 1996). Dentre as doenças causadas por essa bactéria destacam-se a CVC nas laranjeiras do Brasil e a doença de Pierce (PD) que ocorre em videiras nos Estados Unidos, por seu significativo impacto econômico (CHATTERJEE *et al.* 2008). *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ser sequenciado (SIMPSON *et al.* 2000) por um consórcio brasileiro, dando início a um amplo campo de pesquisa baseado no genoma atípico dessa bactéria comparado a outras bactérias gram-negativas fitopatogênicas. Embora o primeiro genoma publicado tenha sido de uma estirpe de citros, estudos funcionais (NEWMAN *et al.* 2004; ROPER *et al.* 2007) e de colonização (FRY & MILHOLLAND, 1990; KRIVANEK & WALKER, 2005) para o entendimento do mecanismo de patogenicidade se sobressaíram para estirpes de videira e sua interação com o hospedeiro, bem como mais recentemente, as interações entre bactéria e vetor (KILLINY & ALMEIDA, 2009; KILLINY *et al.* 2012). Dessa forma, o volume de conhecimento gerado a respeito da doença de Pierce está muito além do que se sabe para CVC.

Dentre os motivos para esse avanço do conhecimento no patossistema PD está a obtenção de transformantes de *X. fastidiosa*, ou seja, de linhagens geneticamente modificadas, o que possibilita o estudo funcional dos genes dessa bactéria. Inúmeros são os exemplos de transformantes para estirpes de PD (MENG *et al.* 2005; LI *et al.* 2007; REDDY *et al.* 2007; CHATTERJEE *et al.* 2008; KUNG & ALMEIDA, 2014) e conseqüentemente, diversos genes já tiveram suas funções desvendadas, facilitando o entendimento da doença e abrindo caminhos para a busca por soluções para o problema. Entretanto, para estirpes patogênicas de citros ainda não há estabelecido um protocolo de transformação e isso tem sido um entrave para os avanços no entendimento da interação *X. fastidiosa*-citros.

1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA BACTÉRIA E SEU COMPORTAMENTO *IN PLANTA*

X. fastidiosa tem formato de bastonete e tamanho variável, podendo chegar até 0,5 µm de diâmetro e 4 µm de comprimento. Caracteriza-se pelo crescimento lento em meio de cultura, sendo suas colônias circulares e discretas (CHAGAS *et al.* 1992).

Não possui genes de avirulência (*avr*) bem como não apresenta sistema de secreção tipo III (SIMPSON *et al.* 2000), características bem comuns entre bactérias fitopatogênicas. Nos hospedeiros coloniza os vasos do xilema, movimentando-se de um vaso ao outro através da degradação das “pit” membranas (PM), pontoações nas quais não há o depósito de parede celular secundária, compostas pela parede celular primária que separa vasos adjacentes e a lamela média entre as células (MAUSETH, 1988; FISHER, 2000). Essa parede primária é composta por pectina, celulose, hemicelulose e proteínas (KEEGSTRA *et al.* 1973; CARPITA & GIBEAUT; 1993). Acredita-se que por sua capacidade de formar biofilme e migrar através dos vasos do xilema, seu mecanismo de patogenicidade esteja relacionado à capacidade em colonizar a rede do xilema da planta hospedeira, espalhando-se por toda a extensão da planta e iniciando vários focos de formação de biofilme, e conseqüentemente ocasionando os sintomas típicos da doença como estresse hídrico e danos aos frutos (NEWMAN *et al.* 2004; RIBEIRO *et al.* 2004).

Não são conhecidos os motivos diretamente relacionados ao surgimento dos sintomas (NEWMAN *et al.* 2003). Em citros, a planta infectada sofre um declínio no vigor e estresse por déficit hídrico, provavelmente em decorrência das disfunções fisiológicas acarretadas pela colonização da bactéria na planta (ALMEIDA *et al.* 2014), porém, não se sabe se as manchas cloróticas nas folhas são consequência do bloqueio físico do fluxo do xilema acarretado pela colonização da bactéria, ou se é o efeito da liberação de toxinas bacterianas (DE SOUZA *et al.* 2004; CHATTERJEE *et al.* 2008) ou ainda, se são resultado da resposta da planta contra o patógeno. A hipótese mais provável na verdade é que o surgimento da doença seja uma combinação de todos esses fatores.

1.3. PARALELO CVC E PD

Como comentado anteriormente, o conhecimento a respeito da doença e toda a interação videira-*X. fastidiosa*-vetor está mais avançado para PD do que para CVC. Essa situação é decorrente de diversos fatores: tempo de descoberta da doença, que no caso de PD surgiu bem antes da CVC (PURCELL, 2013; ALMEIDA *et al.* 2014); facilidade de cultivo e trabalho com o

hospedeiro, sendo videira uma planta de crescimento rápido, fácil cultivo e propagada vegetativamente, ao passo que citros é uma planta arbórea, de crescimento lento, caule lenhoso e conseqüentemente, mais laboriosa para se trabalhar; o processo de colonização e desenvolvimento da doença em citros é bem mais lento e a população bacteriana menor (ALMEIDA *et al.* 2001), o que acarreta em baixa eficiência de transmissão pelo inseto vetor. As taxas de transmissão das estirpes bacterianas que afetam citros variam de 1 a 30% em média enquanto que as estirpes que causam a PD são transmitidas a taxas que vão de 60 a 90% (PURCELL, 2013). E por fim, o maior gargalo para os estudos de interação planta-patógeno, a falta de transformantes para estirpes patogênicas de citros. Apesar de ainda não ser uma técnica trivial para *X. fastidiosa*, a transformação genética como ferramenta de genoma funcional está bem estabelecida para estirpes de videira (KUNG & ALMEIDA, 2011), enquanto que os protocolos de transformação quando testados para estirpes de citros, não geram transformantes ou, ainda quando geram, estes acabam se perdendo com o cultivo, o que inviabiliza os estudos de colonização no hospedeiro.

Para o estudo de PD, diversas estratégias foram utilizadas para entendimento do processo de colonização no hospedeiro, tais como: estudo em genótipos contrastantes e híbridos (FRY & MILHOLLAN, 1990; KRIVANEK *et al.* 2005), acompanhamento do movimento e população bacteriana por isolamento (FRY & MILHOLLAN, 1990; HILL & PURCELL, 1995), PCR quantitativo (FRANCIS *et al.* 2006), imunocaptura (HILL & PURCELL, 1995), diferentes tipos de microscopia (NEWMAN *et al.* 2003; FRITSCHI *et al.* 2008), estirpes transformadas (NEWMAN *et al.* 2003; NEWMAN *et al.* 2004; ROPER *et al.* 2007), entre outras abordagens (KRIVANEK *et al.* 2005; MADDOX & LAUR, 2010). Ao passo que para a CVC poucos são os estudos de interação planta-patógeno (ALMEIDA *et al.* 2001; COLETTA-FILHO *et al.* 2007), e na grande maioria dos casos os estudos de interação foram feitos em nível de expressão gênica (DE SOUZA *et al.* 2007; 2009; RODRIGUES *et al.* 2013) e não propriamente a interação física hospedeiro-bactéria, faltando então a conexão entre as respostas genéticas de hospedeiro e patógeno com o comportamento de *X. fastidiosa* dentro dos vasos do xilema de citros.

Diante do panorama descrito acima o objetivo da presente pesquisa foi obter uma estirpe patogênica de *X. fastidiosa* de citros transformada com a proteína verde fluorescente (GFP), abrindo perspectivas para investigar possíveis mecanismos de resistência/ suscetibilidade de diferentes genótipos à CVC.

2. OBJETIVO GERAL:

Obter estirpe patogênica de citros transformada geneticamente e entender quais os fatores que influenciam na eficiência de transformação.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter estirpe de *X. fastidiosa* contendo o gene que codifica para a proteína verde fluorescente (GFP) visando o estudo da colonização em citros.

- Investigar possíveis fatores que influenciam a eficiência de transformação das estirpes de citros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS DE *X. FASTIDIOSA*

As transformações e as análises fenotípicas foram realizadas com as estirpes 9a5c (SIMPSON *et al.* 2000), U24D, 11399 (COLETTA-FILHO *et al.* 2001) e J1a12 (MONTEIRO *et al.* 2001). Estas foram isoladas de plantas de laranja Pêra com sintomas de CVC (mantidas em casa-de-vegetação) ou recuperadas diretamente do estoque a -80° C. Para cultivo, as linhagens foram mantidas em meio sólido PWG (DAVIS *et al.* 1981) em incubadora do tipo BOD a 28° C. Repicagens semanais foram feitas até no máximo 10 passagens, visando evitar a perda de patogenicidade devido a sucessivos cultivos *in vitro* (DE SOUZA *et al.* 2003).

3.2. OBTENÇÃO DE TRANSFORMANTES DE *X. FASTIDIOSA* POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

O vetor pKLN59 (NEWMAN *et al.* 2003) utilizado na obtenção de estirpe transformada com GFP (Fig. 2) foi gentilmente cedido pelo Dr. Lindow da Universidade da Califórnia – Berkeley. Esse vetor foi construído utilizando-se duas regiões homólogas ao genoma de *X. fastidiosa* com aproximadamente 1,5 kb clonadas, de forma que ocorra a inserção do gene de interesse por dupla recombinação homóloga, utilizando-se de um gene de resistência à canamicina como fator de seleção. O plasmídeo foi transformado por eletroporação utilizando a metodologia descrita por Newman *et al.* (2003) adaptada. Para tal, células com no máximo 5 dias de crescimento no meio PWG foram coletadas do meio de cultura (4 placas por estirpe) e lavadas três vezes em glicerol 10% gelado, centrifugando as células a 6000 rpm por 10 min a 4° C entre

as lavagens. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 µl de glicerol 10% e 50 µl foram utilizados no procedimento de transformação. Para eletroporação utilizou-se de 5 – 10 µg do plasmídeo adicionado a 50 µl de células competentes previamente colocadas em cuvetas de 0,1 cm e submetidos a condições de eletroporação de: 200 Ω, 25 µF e 1.8 V ou 400 Ω, 25 µF e 1.8 V em aparelho GenePulser (Bio-Rad). Após eletroporação, as células foram ressuspensas em 1ml de meio PW líquido sem antibiótico e mantidas em agitação a 150 rpm e 28° C por 24h. Após esse período, foram plaqueadas em meio sólido contendo 50 µg/ml de canamicina e em seguida foram incubadas a 28° C em BOD até aparecimento das primeiras colônias. A seleção dos clones contendo o vetor pKLN59 foi feita pela observação da emissão de coloração verde da colônia quando excitada no comprimento de onda correspondente ao GFP (495 a 540 nm) e posterior PCR para verificação da estirpe transformada, bem como para confirmar se realmente se tratava da *Xylella fastidiosa* com “primers” específicos (POOLER & HARTUNG, 1995; COLETTA-FILHO *et al.* 2001).

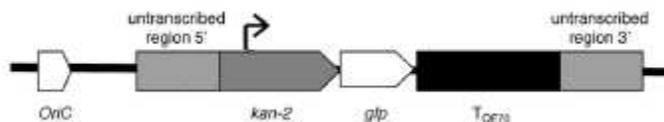


Figura 2. Esquema da construção do cassete pKLN59 (NEWMAN *et al.* 2003) utilizado na transformação de *X. fastidiosa*.

3.2.1. Confirmação da integração do vetor no genoma da bactéria

Para confirmar a inserção do vetor pKLN59 no genoma da estirpe de *X. fastidiosa* transformada, foi realizada uma PCR com os “primers” Untxb2 F e R projetados por Newman *et al.* (2003). Esses “primers” foram projetados para ancorar na região não transcrita utilizada na construção do vetor (Fig. 2). Em uma linhagem não transformada, espera-se que o fragmento amplificado tenha 1,5 kb, ao passo que em uma linhagem a qual ocorreu a recombinação e a consequente inserção do cassete no genoma bacteriano, espera-se os mesmos 1,5 kb mais o gene da GFP fusionado ao gene de resistência à canamicina e o terminador utilizado, totalizando um fragmento de aproximadamente 4 kb.

3.3. ENSAIOS FENOTÍPICOS COMPARATIVOS ENTRE AS ESTIRPES

3.3.1. Morfologia de crescimento

Placas do meio PWG contendo as 4 estirpes utilizadas (1 placa para cada estirpe) com crescimento de 7 dias em BOD a 28° C foram raspadas, independentemente, ressuspensas em tampão PBS e a OD_{600nm} ajustada em 0,3. Em seguida, plotes de 10 µl da suspensão celular foram plaqueados em meio PWG e sua morfologia de crescimento foi avaliada em lupa estereoscópica após 7 dias de crescimento nas condições descritas (BOD a 28° C).

3.3.2. Ensaio de Agregação

Células de *X. fastidiosa* crescidas por 7 dias em meio PWG foram raspadas e ressuspensas em 5 ml de água estéril. A OD₆₀₀ foi ajustada para aproximadamente 0,5. As amostras foram colocadas em descanso para permitir a precipitação celular. As amostragens foram feitas após 20, 80 e 140 minutos nas quais 1 ml da parte superior da suspensão foi coletada e medida em OD₆₀₀ seguindo protocolo adaptado de Cruz *et al.* (2012). Foi realizada a análise de variância seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância, entre as 4 estirpes utilizadas, para cada um dos tempos amostrados, utilizando 4 repetições biológicas para cada estirpe e 3 repetições técnicas.

3.3.3. Produção de exopolissacarídeos totais (EPS)

Para análise da produção de EPS total entre as estirpes, primeiramente foi elaborada uma curva de glicose utilizada como referência para a quantificação da produção de EPS segundo Morris (1948). As 4 estirpes foram plaqueadas e crescidas por 7 dias em meio PWG. As placas foram raspadas e as células ressuspensas em 400 µl de água estéril. A OD₆₀₀ foi ajustada em 0,25 para todas. Adicionou-se então 800 µl de clorofórmio à suspensão bacteriana para extração de carboidratos, misturou-se vortexando a suspensão e em seguida centrifugou-se para separação das frações das amostras (14000 rpm, 10 min; Centrífuga Eppendorf 5415 D). Foram retirados 400 µl da fase superior (aquosa) e misturados com 800 µl do reagente de anthrone (Sigma-solução estoque de 1 mg/ml em H₂SO₄ concentrado 95–98% w/v). A mistura foi então incubada a 90 °C por 10 min e a OD medida a 630 nm. O conteúdo de carboidratos totais foi calculado com base na regressão linear obtida pela curva de glicose. Nesse ensaio, utilizou-se 3 réplicas biológicas para cada estirpe, com 3 réplicas técnicas de leitura. Foi feita a análise de variância

entre as 4 estirpes testadas, seguida da comparação de médias a 5% de significância utilizando o teste de Tukey.

3.3.4. Avaliação dos sintomas em casa-de-vegetação

Para inoculação em laranja doce, as estirpes foram recuperadas do estoque mantido a -80° C e 4 gotas de 10 µl cada, foram plotadas por placa de meio PWG. Após 7 dias de crescimento, as células crescidas foram ressuspensas em água estéril e novamente plotadas da mesma maneira em novas placas de PWG afim de promover um crescimento mais vigoroso. Os inóculos foram preparados a partir destas placas de PWG contendo as estirpes após 7 dias de crescimento. As células foram ressuspensas em tampão PBS e sua OD₆₀₀ ajustada em 0,4 (correspondente a aproximadamente 10⁹ células de *X. fastidiosa*). As suspensões celulares foram inoculadas pelo método de perfuração por agulha segundo Almeida *et al.* (2001). Foram utilizadas 5 plantas de laranja doce (Pera) enxertadas sobre limão cravo, com aproximadamente dois meses após a enxertia, para cada estirpe testada, totalizando 20 plantas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação para avaliação dos sintomas.

3.4. TESTES FENOTÍPICOS COMPARATIVOS ENTRE A ESTIRPE TRANSFORMADA E O TIPO SELVAGEM

Embora já relatado por Newman *et al.* (2003) que a inserção da construção contendo a GFP ocorre numa região não transcrita, e possivelmente não interfere no fenótipo da bactéria, foram feitos experimentos para comparação de algumas características biológicas de ambas linhagens para confirmar esta informação. Os testes realizados foram curva de crescimento, ensaio de agregação e produção de exopolissacarídeos totais. A metodologia dos ensaios de agregação e produção de exopolissacarídeos totais foi a mesma descrita para os testes fenotípicos entre as estirpes no tópico 3.3., bem como a análise estatística.

3.4.1. Curva de crescimento

O inóculo inicial de ambas as linhagens foi padronizado com o valor de absorvância de aproximadamente 0,14 medidos a OD₆₀₀. Estes foram então colocados em tubos de ensaio contendo meio PW líquido em agitação constante a 120 rpm a 28° C. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas por 5 dias para fazer as diluições seriadas, que foram plaqueadas em meio PWG e

armazenadas em BOD 28°C até o surgimento das colônias. As colônias foram contadas em lupa e os valores calculados para determinação das unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). Nesse ensaio foram utilizadas 5 réplicas biológicas para cada tempo avaliado, com 2 réplicas técnicas cada. A análise de variância e comparação de médias foi realizada comparando-se o tipo selvagem com o transformante, para cada tempo de avaliação. Foi utilizado o teste de Tukey a 5% de significância.

3.5. DETECÇÃO DA LINHAGEM TRANSFORMADA DE *X. FASTIDIOSA* IN PLANTA

Um total de 80 plântulas de laranja doce foram inoculadas pelo método de perfuração por agulha (ALMEIDA *et al.* 2001), com os diferentes isolados obtidos da linhagem 11399-GFP e 5 plântulas com a linhagem selvagem para controle negativo da fluorescência. A presença da bactéria fluorescente foi monitorada em microscópio de fluorescência Olympus BX61, por cortes no pecíolo de folhas acima do ponto de inoculação. As imagens obtidas foram capturadas utilizando o software “DP Controller” e as imagens compostas foram projetadas no “Image-Pro MC 6.1”. Os cortes e as análises foram realizados conforme descrito por Newman *et al.* (2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DE TRANSFORMANTES DE *X. FASTIDIOSA* DE CITROS

Nesse trabalho buscou-se obter uma estirpe patogênica de citros transformada com GFP para possibilitar estudos de colonização no hospedeiro citros. Adaptando o método de transformação por eletroporação (NEWMAN *et al.* 2003) para as condições das estirpes utilizadas foi possível obter duas estirpes transformadas (Fig. 3), a patogênica 11399 e a não patogênica J1a12, já descrita anteriormente como transformável (MONTEIRO *et al.* 2001; KOIDE *et al.* 2004). Em uma das tentativas de transformação, chegou-se a obter colônias da estirpe 9a5c resistentes ao antibiótico, porém, com baixíssima expressão da GFP (Fig. 4), o que ao longo das repicagens acabou não se mantendo e a bactéria parou de crescer. A estirpe U24D nunca resultou em transformantes. A eficiência de transformação foi variável em relação ao número de células por concentração de plasmídeo utilizado, bem como o número de tentativas de transformação para a obtenção das estirpes geneticamente modificadas (Tabela 1). A eficiência de transformação da estirpe patogênica 11399 foi 40 vezes maior que a não patogênica e a eficiência do plasmídeo controle (sem o gene da GFP) foi ainda maior. A eficiência de

transformação por eletroporação é muito variável e de baixa reprodutibilidade (WIRTH *et al.* 1989), dependendo de vários fatores, como o estágio de crescimento das células, por exemplo. Foi observado que alguns fatores da morfologia de crescimento das estirpes como formação de agregados celulares, tempo de crescimento e produção de exopolissacarídeos, tiveram grande influência na eficiência de transformação, de modo que quanto maior o tempo de crescimento, quantidade de exopolissacarídeos produzidos e agregação celular, menor a eficiência de transformação da estirpe.

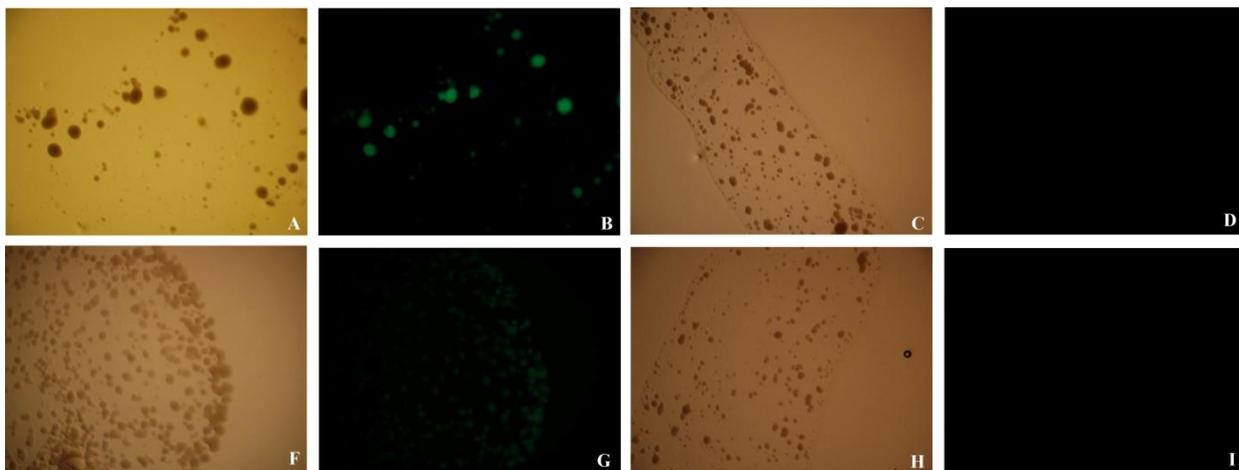


Figura 3. A - estirpe 11399 de *Xylella fastidiosa* transformada com GFP observada em lupa de fluorescência luz branca; B – a mesma estirpe transformada observada em luz com filtro para GFP (aumento de 2,5X); C – estirpe 11399 selvagem observada em luz branca e D – a mesma estirpe selvagem observada em luz com filtro para GFP (aumento de 3,5X). F – Estirpe J1a12 de *X. fastidiosa* transformada com GFP observada em lupa de fluorescência com luz branca; G – a mesma estirpe transformada observada em luz com filtro para GFP (aumento de 2,5X); H – estirpe J1a12 selvagem observada em luz branca e I – a mesma estirpe selvagem observada em luz com filtro para GFP (aumento de 1,5X).

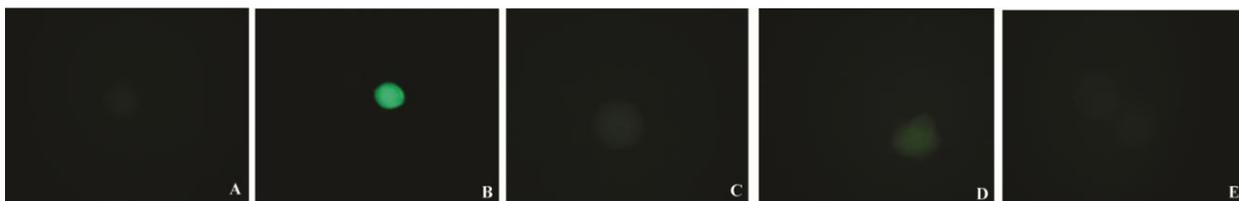


Figura 4. A – Colônia de J1a12 transformada com GFP observada um mês da transformação; B – a mesma linhagem após 3 meses de repicagens; C – colônia de 9a5c transformada com GFP observada 20 dias após a transformação; D – a mesma linhagem após 3 meses de repicagens e E – colônia tipo selvagem de 9a5c.

Tabela 1. Eficiência de transformação das diferentes estirpes testadas

Estirpe	Número de tentativas de transformação	Eficiência de transformação (cel./ μ g de vetor)
9a5c	10	-
U24D	7	-
11399	5	45
J1a12	9	1,4

4.1.1. Estabilidade dos transformantes

O vetor utilizado neste trabalho (pKLN59) foi projetado para resultar numa intensa expressão da proteína verde fluorescente, uma vez que, foi construído de modo a integrar o cassete no cromossomo bacteriano por dupla recombinação homóloga em uma região logo após o promotor do gene do 16S ribossomal. Dessa forma, caso integrado, o cassete se valeria da ação do promotor local para sua expressão, permanecendo expresso constitutivamente, possibilitando o estudo da colonização *in planta* (NEWMAN *et al.* 2003).

As estirpes transformantes obtidas, 11399 (patogênica) e J1a12 (não patogênica), permaneceram estáveis, sendo que a 11399-GFP foi inoculada em plantas de laranja doce e manteve sua expressão, o que indica que provavelmente o vetor se integrou ao genoma da bactéria, além do fato de esta mesma linhagem transformada ter sido repicada durante 8 meses em meio PWG sem o fator de seleção (canamicina) e foi verificada a mesma fluorescência, assim como observado por Newman *et al.* (2003) para a estirpe de PD transformada com esse mesmo plasmídeo. Para confirmação da integração do cassete ao genoma da 11399, foi realizada uma PCR conforme descrito no item material e métodos 3.2.1. O resultado obtido confirmou a inserção do cassete ao genoma da estirpe transformada (Fig. 5). A estirpe J1a12-GFP expressava fracamente o gene da GFP logo após a transformação, entretanto, após sucessivas repicagens com o fator de seleção, passou a expressar fortemente o gene, como pode ser observado na figura 3. Os testes de PCR para verificação se a estirpe transformada era mesmo a 11399 revelou que não houve contaminação, ou seja, de fato se tratava da estirpe utilizada na transformação (Fig. 6).

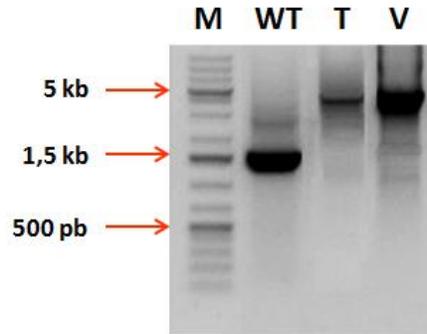


Figura 5. PCR de confirmação da inserção do cassete da GFP no genoma da estirpe transformada. M – marcador 1kb plus (Invitrogen); WT – Amplificação do DNA de 11399 selvagem; T –Amplificação do DNA de 11399+GFP; V – Amplificação do vetor utilizado como controle positivo.

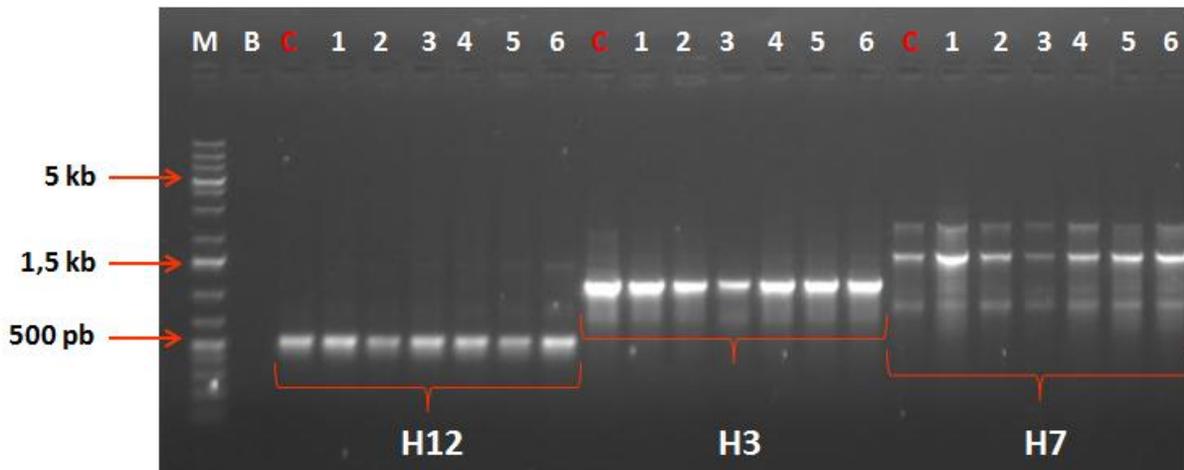


Figura 6. M – marcador de 1kb plus (Invitrogen); PCR com “primers” SSR específicos para a estirpe 11399 de *X. fastidiosa*, 1º H12, 2º H3 e 3º H7. A letra C indica o DNA selvagem de 11399 e os números de 1 a 6 correspondem às colônias de 11399 transformadas com pKLN59.

A estirpe J1a12 foi utilizada como controle neste trabalho, uma vez que, sabe-se que a mesma é passível de transformação genética (MONTEIRO *et al.* 2001; KOIDE *et al.* 2004), porém, por ser não patogênica, esta estirpe não foi alvo de testes comparativos como foi realizado para a 11399.

4.2. FATORES MORFOLÓGICOS INFLUENCIAM NA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO

Como comentado anteriormente, foi percebido com as sucessivas tentativas de transformação da *X. fastidiosa*, que algumas características morfológicas das estirpes tiveram influência na eficiência de transformação. Estágio de crescimento, produção de exopolissacarídeos e formação de agregados celulares foram as características altamente relacionadas à maior ou menor facilidade na obtenção, por eletroporação, de estirpes geneticamente modificadas de *X. fastidiosa* de citros. A figura 7 mostra a morfologia de crescimento das 4 estirpes testadas, bem como os sintomas desencadeados por elas em plantas suscetíveis à CVC. Nota-se claramente a diferença de morfologia das estirpes, sendo U24D a mais agregativa (Fig. 8) e também com maior produção de exopolissacarídeos (Fig. 9) e J1a12 (não patogênica) a estirpe com menor expressão de ambas as características. Interessantemente, *in planta*, U24D é a estirpe mais agressiva, ou seja, mais virulenta, seguida da 9a5c, 11399 e por fim a J1a12 que é não patogênica.

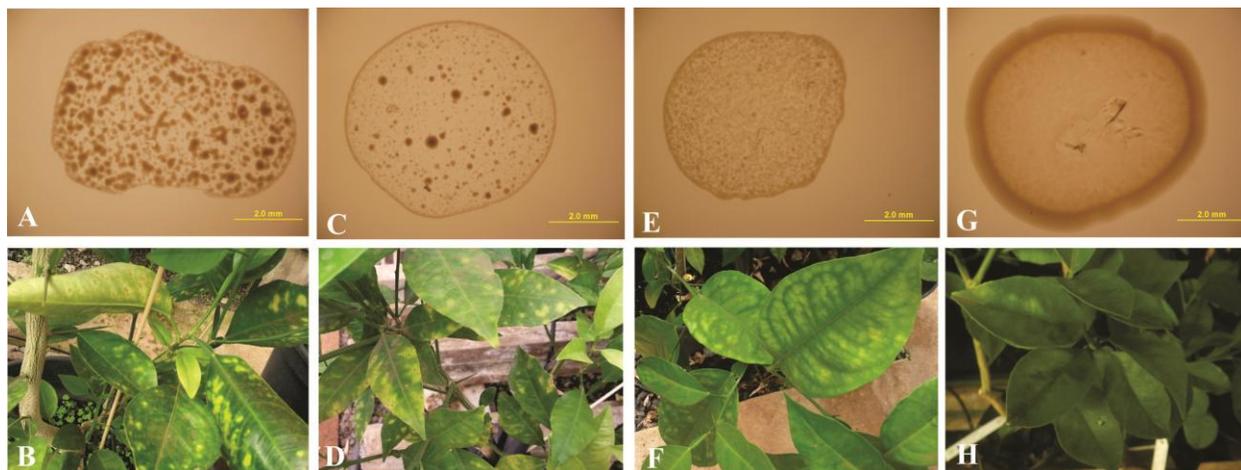


Figura 7. Morfologia de crescimento das estirpes testadas e sintomatologia causada por elas em citros. A – U24D em meio PWG e B – sintomas em planta de citros infectada com U24D; C e D – o mesmo para 9a5c; E e F – o mesmo para 11399; G e H – o mesmo para J1a12.

O teste de Tukey a 5% de significância confirmou a diferença significativa entre as estirpes transformáveis (11399 e J1a12) e as não transformáveis (U24D e 9a5c) para os ensaios de agregação celular e produção de EPS total (Fig. 8 e 9). As estirpes transformáveis apresentaram menor formação de agregados celulares (Fig. 8) e menor produção de exopolissacarídeos totais (Fig. 9) o que poderia explicar a maior facilidade de transformação,

uma vez que esses fatores podem agir como barreiras à entrada de DNA para a célula quando eletroporada (BUCKLEY *et al.* 1999). Outro fator importante observado é o tempo de crescimento. Após 5 dias de crescimento em meio PWG as células bacterianas começam a entrar na fase estacionária (KUNG & ALMEIDA, 2014), fase na qual as bactérias param de se multiplicar e iniciam preferencialmente a síntese de compostos do metabolismo secundário. Nesse caso, após 5 dias de crescimento, as 4 estirpes testadas não foram transformáveis, nem mesmo a J1a12, que é a estirpe com menos agregados celulares e produção de EPS, confirmando a influência do tempo de crescimento na transformação genética dessas estirpes por eletroporação.

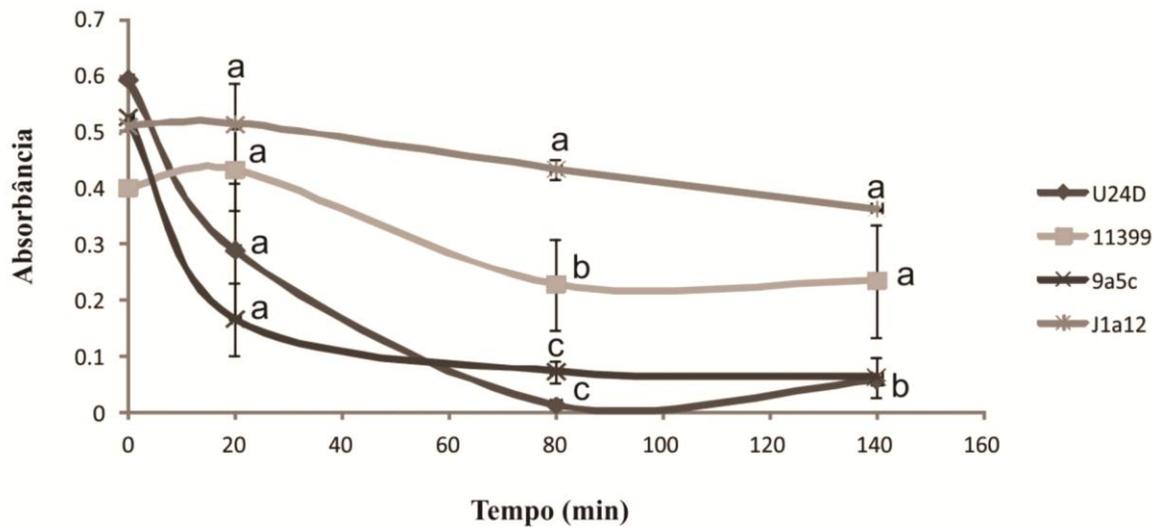


Figura 8. Formação de agregados celulares para as quatro estirpes avaliadas. As barras indicam o desvio padrão entre as réplicas biológicas. Letras iguais não apresentam diferença estatística no teste de Tukey a 5% de significância.

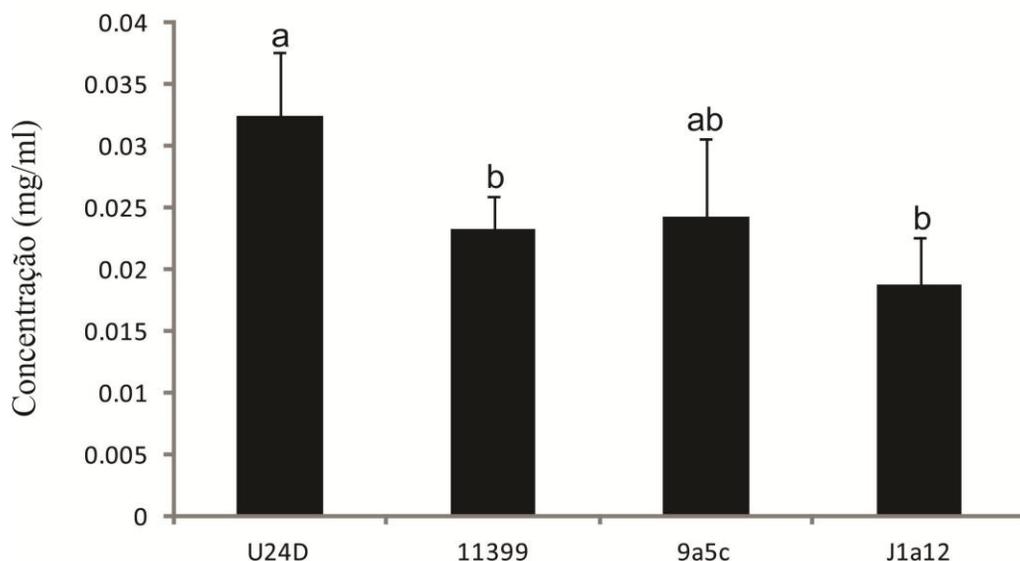


Figura 9. Produção de exopolissacarídeos totais das 4 estirpes avaliadas expressa em mg/ml. As barras indicam o desvio padrão entre as réplicas biológicas. Letras iguais não apresentam diferença estatística no teste de Tukey a 5% de significância.

4.3. A LINHAGEM TRANSFORMADA NÃO TEVE SUAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS AFETADAS

Os testes fenotípicos realizados entre a linhagem transformante de 11399 e o tipo selvagem referentes à curva de crescimento (Fig. 10), ensaio de agregação (Fig. 11) e produção de exopolissacarídeos totais (Fig. 12) não mostraram diferença significativa, sugerindo que a linhagem que expressa a GFP não teve suas características biológicas afetadas pela transformação.

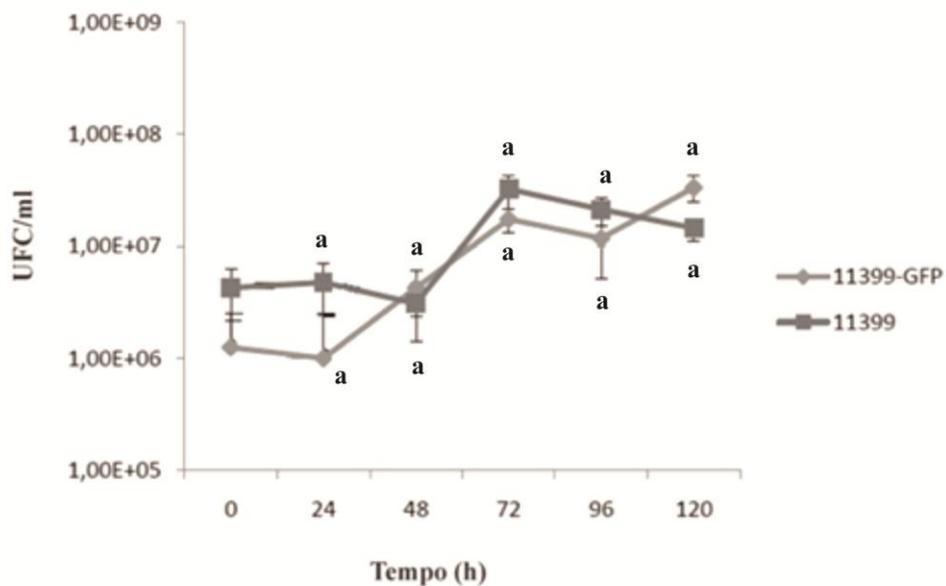


Figura 10. Curva de crescimento comparativo entre a estirpe transformada 11399-GFP e o tipo selvagem 11399. As barras indicam o desvio padrão entre as réplicas biológicas. Letras iguais não representam diferença significativa (Tukey 5%).

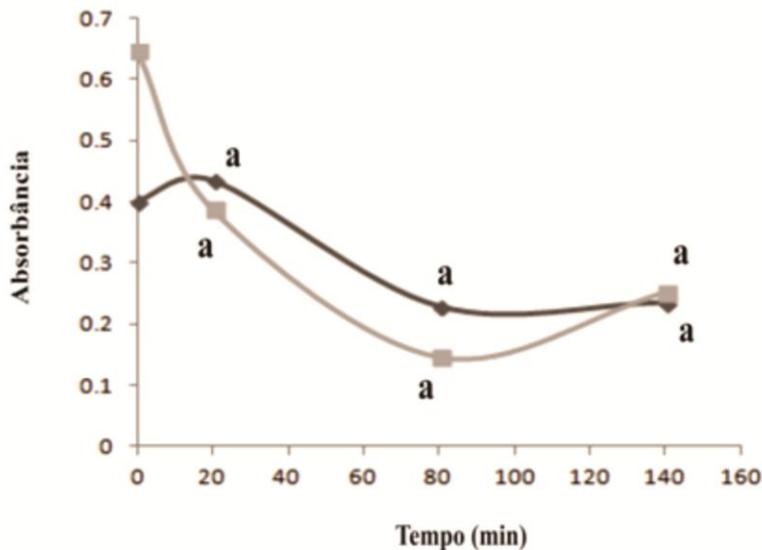


Figura 11. Ensaio de agregação de celular entre a estirpe transformada 11399+GFP e o tipo selvagem 11399. Letras iguais não representam diferença significativa (Tukey 5%).

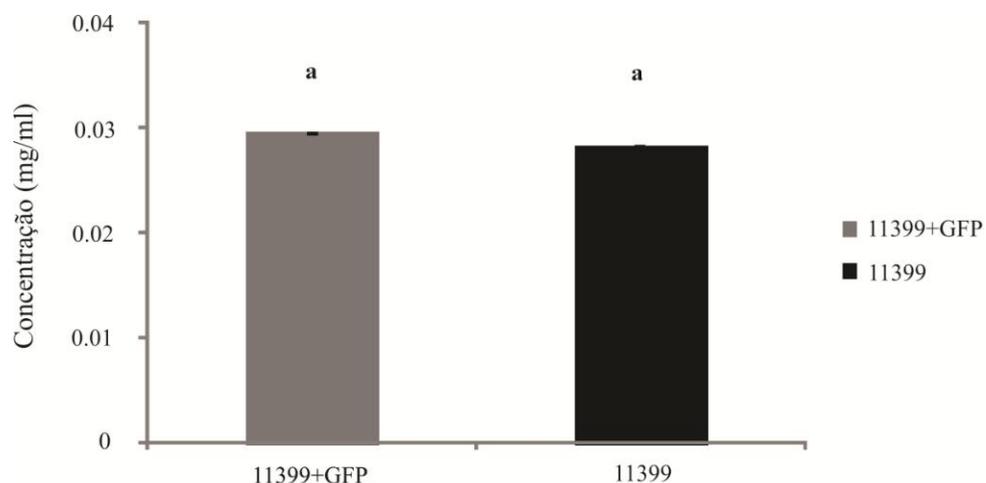


Figura 12. Produção de exopolissacarídeos totais por 11399+GFP (GFP) e 11399 selvagem (WT). Letras iguais não representam diferença significativa (Tukey 5%).

4.4. ESTABILIDADE DA ESTIRPE TRANSFORMADA COM GFP *IN PLANTA*

Foi possível detectar a presença da bactéria expressando GFP nos vasos do xilema de laranja doce. Foram observadas bactérias em cortes de pecíolos imediatamente acima do ponto de inoculação 2 e 8 meses após a inoculação (Fig. 13). Com esse resultado, confirmamos a estabilidade do transformante e a possibilidade de estudos do processo de colonização da *X. fastidiosa* em genótipos de citros.

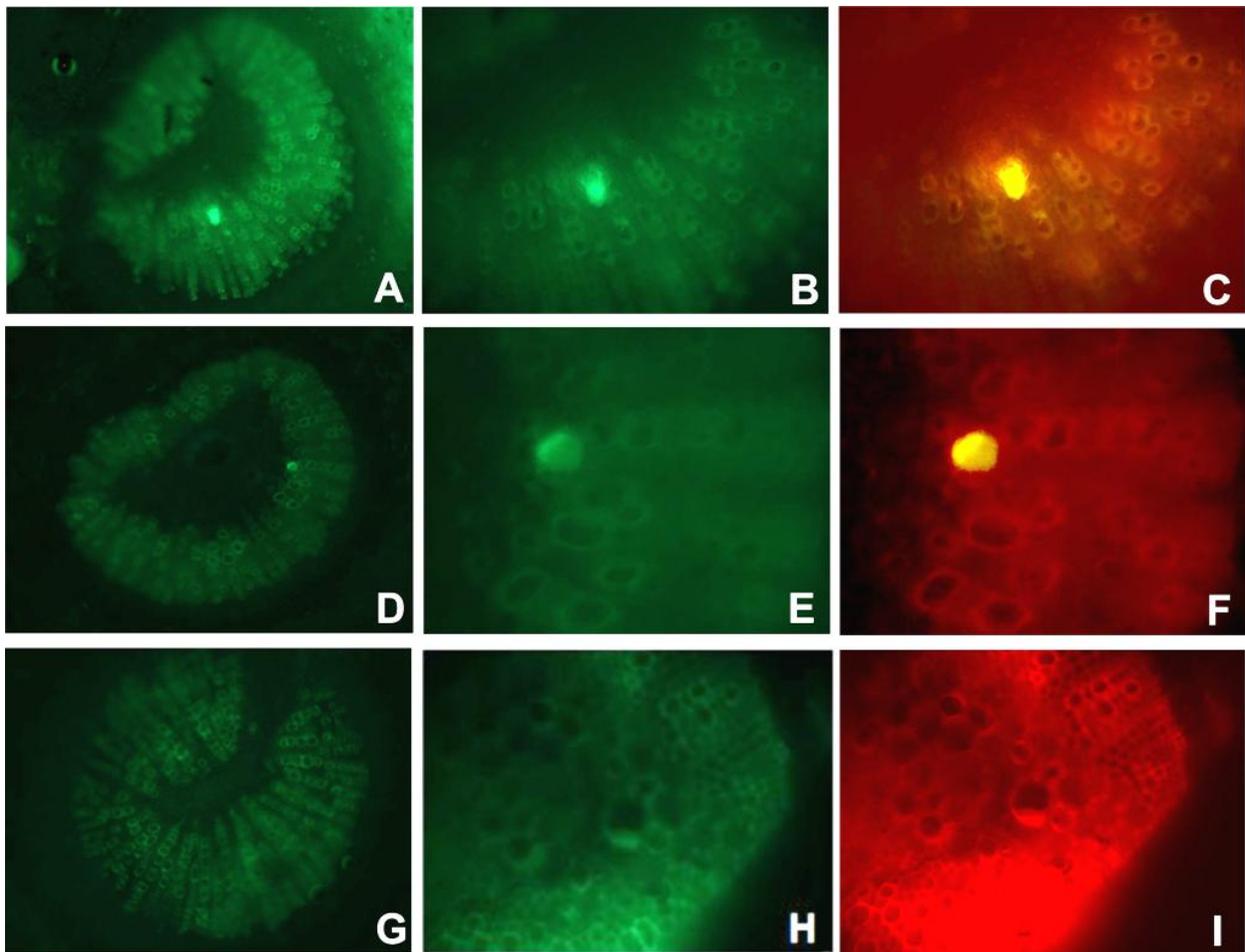


Figura 13. Painel de cortes transversais do pecíolo imediatamente acima do ponto de inoculação avaliados após 2 meses. As imagens A corresponde a uma réplica biológica com aumento de 10X. As imagens B e C são a mesmo com aumento de 40X, sendo que a imagem C corresponde a uma composição entre o filtro verde e vermelho, destacando a bactéria no tecido da planta. D, E e F – outra réplica biológica nas mesmas condições de A, B e C. Imagens G, H e I correspondem ao controle negativo inoculado com a bactéria selvagem.

5. CONCLUSÃO

A obtenção de um transformante estável com a proteína verde fluorescente, o primeiro patogênico de citros, constitui uma importante ferramenta de estudos, uma vez que essa modificação permite o acompanhamento do transformante *in planta*, no inseto vetor, entre outras abordagens de estudo.

6. REFERÊNCIAS:

1. Almeida RPP, Coletta-Filho HD, Lopes JRS. 2014. *Xylella fastidiosa*. In: Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins. Ed. Liu, D. CRC Press, 884:841-850. ISBN: 9781466553965.
2. Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS. 2001. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Dis.* 85:382-386.
3. Baccari C, Lindow SE. 2011. Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology* 101:77-84.
4. Bové JM, Ayres AJ. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* 59:346-354.
5. Buckley ND, Vadeboncoeur C, Leblanc DJ, Lee LN, Frenette M. 1999. An Effective Strategy, Applicable to *Streptococcus salivarius* and Related Bacteria, To Enhance or Confer Electroporation Competence. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3800–3804.
6. Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-10.
7. Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S. 2008. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Ver. Phytopathol.* 46:243–271.
8. Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE. 2008B. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:2670–2675.
9. CitrusBR: Associação Nacional de Exportadores de Sucos Cítricos. Disponível em: <http://www.citrusbr.com>. Acesso em: 25 junho 2014.
10. Coletta-Filho HD, Pereira EO, Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yale M, Machado MA. 2007. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange × Murcott tangor. *Plant Pathology* 56:661–668.

11. Coletta-Filho HD, Takita MA, Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a Variable Number of Tandem Repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4091-4095.
12. Chagas CM, Rossetti V, Beretta MJG. 1992. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil, *J. Phytopathol.* 134: 306.
13. Cruz LF, Cobine PA, De La Fuentea L. 2012. Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation and twitching motility. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1321-1331.
14. Davis MJ, French J, Schaad NW, 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6:309–14.
15. De Souza AA, Takita MA, Amaral A, Coletta-Filho HD, Machado MA. 2009. Citrus Responses to *Xylella fastidiosa* Infection, the Causal Agent of Citrus Variegated Chlorosis. In: Tennant P, Benkeblia N (Eds) *Citrus III. Tree and Forestry Science and Biotechnology* 3 (Special Issue 2), 73-80.
16. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Goldman GH, Yanai GM, Muto NH, Costa de Oliveira R, Nunes LR, Machado MA. 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol. Plant. Microbiol. Interact.* 16:867-875.
17. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Yanai GM, Muto NH, Costa de Oliveira R, Nunes LR, Machado MA. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 237:341-353.
18. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Campos MA, Teixeira JEC, Targon MLPN, Carlos EF, Ravasi JR, Fischer CN, Machado MA. 2007B. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 965-971.
19. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Carlos EF, Locali-Fabris EC, Amaral AM, Freitas-Astúa J, Silva-Pinhati ACO, Boscariol-Camargo RL, Berger IJ, Rodrigues CM, Reis MS,

- Machado MA. 2007A. Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30:957-964.
20. European Food Safety Authority. 2013. Statement of EFSA on host plants, entry and spread pathways and risk reduction options for *Xylella fastidiosa*. Wells *et al.* *EFSA Journal* 11(11):3468, 50 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3468.
21. Fisher DB. 2000. Long-distance transport. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 730–784.
22. Francis M, Lin H, Cabrera-La Rosa J, Doddapaneni H, Civerolo EL. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 115:203–213.
23. Fritschi FB, Lin H, Walker MA. 2008. Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. *Plant Dis.* 92:276-286.
24. Fry SM, Milholland RD. 1990. Multiplication and Translocation of *Xylella fastidiosa* in Petioles and Stems of Grapevine Resistant, Tolerant, and Susceptible to Pierce’s Disease. *Journal Series of the North Carolina Agricultural Research Service* 80:61-65.
25. Fundecitrus: Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Home/Default.aspx>>. Acesso em: 13 maio 2014.
26. Hill BL, Purcell AH. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* 85:1368–1372.
27. Hopkins DL, Adlerz WC. 1988. Natural host of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Dis.* 72: 429-431.
Hopkins DL. 1985. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce’s Disease of grapevine. *Phytopathology* 75:713-717.

28. Hopkins DL. 1995. *Xylella fastidiosa*. In: Singh, U.S., Singh RP, Kohmoto K. (eds) Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Vol. 1 – Prokaryotes.
29. Ilardi V, Loreti S. 2014. Plant Biosecurity: Diagnosis in Plant Pathology. Biosafety 3: e143. doi:10.4172/2167-0331.1000e143.
30. Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P. 1973. The structure of plant cell walls. III. A modelo of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. Plant Physiol. 51:188-196.
31. Killiny N, Almeida RPP. 2009. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial plant pathogen. PNAS 106: 22416–22420.
32. Killiny N, Rashed A, Almeida RPP. 2012. Disrupting the Transmission of a Vector-Borne Plant Pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 78:638–643.
33. Koide T, Zaini PA, Moreira LM, Vêncio RZN, Matsukuma AY, Durham AM, Teixeira DC, El-Dorry H, Monteiro PB, Da Silva ACR, Verjosvski-Almeida S, Silva AM, Gomes SL. 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. Journal of Bacteriology 186:5442-5449.
34. Krivanek AF, Stevenson JF, Walker MA. 2005. Development and comparison of symptom indices for quantifying grapevine resistance to Pierce’s disease. Phytopathology 95:36-43.
35. Krivanek AF, Walker MA. 2005. *Vitis* resistance to Pierce’s disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. Phytopathology 95:44-52.
36. Kung SH, Almeida RPP. 2011. Natural competence and recombination in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Appl. Environ. Microbiol. 77:5278–5284.
37. Kung SH, Almeida RPP. 2014. Biological and genetic factors regulating natural competence in a bacterial plant pathogen. Microbiology 160:37–46.

38. Laranjeira FF, Pompeu Junior J, Harakava R, Figueiredo JO, Carvalho SA, Coletta-Filho HD, 1998. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condição de campo. *Fitopatologia Brasileira* 23:147–54.
39. Li Y, Hao G, Galvani CD, Meng Y, De La Fuente L, Hoch HC, Burr TJ. 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* 153:719–726.
40. Lima, JEO, Miranda VS, Hartung JS, Brlansky RH, Coutinho A, Roberto SR, Carlos EF. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* 82: 94-97.
41. Lopes JRS, Krugner R. 2013. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*, *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*, J.K. Brown (ed.), APS Press, Saint Paul, MN, pp. xx–xx.
42. Lopes SA, Teixeira DC, Fernandes NG, Ayres AJ, Torres SCZ, Barbosa JC, Li WB. 2005. An experimental inoculation system to study citrus–*Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Dis.* 89:250-254.
43. Maddox CE, Laur LM, Tian L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* 60:53-58.
44. Mauseth JD. 1988. *Plant Anatomy*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA.
45. Meng Y, Li Y, Galvani CD, Hao G, Turner JN, Burr TJ, Hoch HC. 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilusdriven twitching motility. *J. Bacteriol.* 187:5560–5567.
46. Monteiro PB, Teixeira DC, Palma RR, Garnier M, Bové JM, Renaudin JL. 2001. Stable Transformation of the *Xylella fastidiosa* Citrus Variegated Chlorosis Strain with *oriC* Plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2263-2269.
47. Morris DL. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107:254-255.

48. Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R. 2011. O retrato da citricultura brasileira, São Paulo: CitrusBR p. 138.
49. Newman KL, Almeida RPP, Purcell AH, Lindow SE. 2003. Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7319–7327.
50. Newman KL, Almeida RPP, Purcell AH, Lindow SE. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:1737–1742.
51. Pooler MR, Hartung JS. 1995. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381.
52. Purcell AH, Hopkins DL. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* 34: 131-151.
53. Purcell AH. 2013. Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:16.1–16.18.
54. Reddy JD, Reddy SL, Hopkins DL, Gabriel DW. 2007. TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 403–410.
55. Ribeiro RV, Machado EC, Oliveira RF. 2004. Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology* 53:334-340.
56. Rodrigues CM, De-Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. 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* 14:676 Online [<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/676>].
57. Roper MC, Greve LC, Warren GJ, Labavitch JM, Kirkpatrick BC. 2007. *Xylella fastidiosa* Requires Polygalacturonase for Colonization and Pathogenicity in *Vitis vinifera* Grapevines. *MPMI* 20: 411–419.
58. Simpson AJG, Reinach FC, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151–59.

59. Teixeira DC, Rocha SRP, Santos MA, Mariano AG, Li WB, Monteiro PB. 2004. A Suitable *Xylella fastidiosa* CVC Strain for Post-Genome Studies. *Current Microbiology* 49:396–399.

60. Wirth R, Friesenegger A, Fiedler S. 1989. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* 216:175-177.

CAPÍTULO II – DIFFERENTIAL COLONIZATION PATTERNS OF *XYLELLA FASTIDIOSA* IN RESISTANT, SUSCEPTIBLE AND HYBRID CITRUS GENOTYPES

Short title: *Xylella fastidiosa* citrus colonization

B. Niza^{ab}, H. D. Coletta-Filho^a, M. V. Merfa^{ab}, M. A. Takita^a, A. A. de Souza^{a*}

^aCentro de Citricultura Sylvio Moreira - Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil; ^bInstituto de Biologia, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil

* A. A. de Souza - alessandra@centrodecitricultura.br

Keywords: GFP-labelled *X. fastidiosa* CVC strain, citrus variegated chlorosis, xylem vessel structure, resistance mechanism, citrus hybrids, quantitative PCR.

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a phytopathogenic bacterium that causes disease in many different crops worldwide. In Brazil, it causes citrus variegated chlorosis (CVC), which is a disease responsible for economic loss in citrus agribusiness. Variable host responses to bacterial colonization and disease development have been observed. In this work, we studied the colonization processes of a pathogenic GFP-labelled *X. fastidiosa* citrus strain in the parents Pera sweet orange and Murcott tangor and two resulting hybrids, which exhibited contrasting responses to CVC. *X. fastidiosa* showed increased populations and movement in the petioles of the susceptible genotypes, and these trends increased over time, with opposite behaviours being observed in the resistant genotypes. Much lower populations of *X. fastidiosa* were observed for all genotypes in the stems, but the trends were similar to those of the petioles, with increased populations in the susceptible genotypes and decreased populations in the resistant plants. The assessment of the *X. fastidiosa* colonization process in xylem vessels by fluorescence microscopy showed a random colonization in petioles independent of the genotype. In contrast, a different colonization pattern was observed in stems. The bacteria were able to laterally move and spread throughout the secondary xylem in the susceptible plants, and in the resistant plants, *X. fastidiosa* was found

only in the primary xylem, even at 150 days after inoculation. These findings suggest a possible genetic mechanism underlying resistance because no morphological differences were found in the stems of either the susceptible or resistant plants, as shown by scanning electron microscopy.

INTRODUCTION

Xylella fastidiosa is a phytopathogen that causes many diseases in a wide range of hosts worldwide (PURCELL, 2013). Recently, it has been found in olive trees in Italy, constituting a new focus of infection in Europe (ILARD & LORETI, 2014). In Brazil, it was first reported in 1993 as the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC) (CHANG *et al.* 1993), and it is responsible for the economic loss of approximately 100 million dollars every year (BOVÉ & AYRES, 2007).

This bacterium was first isolated from grapevines in 1973 in California, and it was found to be the causal agent of the Pierce's disease (PD) in grapes (PURCELL, 2013). Many studies have focused on the colonization process of *X. fastidiosa*, which is believed to underlie its pathogenicity because this bacterium has no type III secretion system or avr genes, and it is able to form a biofilm in the xylem vessels of its hosts (SIMPSON *et al.* 2000; MANSFIELD *et al.* 2012). Much is known with regard to *X. fastidiosa* colonization in grapes, and this information is based mainly, on studies using culturing, enzyme-linked immunosorbent assay, and scanning electron microscopy to analyse both the multiplication and translocation of the bacterium in the petioles and stems of susceptible, tolerant and resistant genotypes (FRY & MILHOLLAND, 1990; HILL & PURCELL, 1995; KRIVANEK & WALKER, 2005; PÉREZ-DONOSO *et al.* 2010; SUN *et al.* 2011). The first study of grapes using a GFP-transformed strain of *X. fastidiosa* for evaluating the colonization process *in planta* was carried out by Newman *et al.* (2003), who revealed that the most remarkable colonization characteristic in relation to symptom expression is the complete blockage of xylem vessels. Recently, Baccari & Lindow (2011) used a GFP-labelled grape strain to evaluate *X. fastidiosa* colonization in different grape genotypes by fluorescence microscopy and verified that the stem colonization process is different from the petioles', suggesting a possible resistance mechanism.

In citrus, the *X. fastidiosa* colonization process *in planta* has never been assessed, although some information regarding the susceptibility of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) has been reported. It is known that the movement and population of bacteria as well as

symptom development in susceptible varieties of sweet orange are lower compared with those of grapes (ALMEIDA *et al.* 2001; LOPES *et al.* 2005). In addition, a hybrid citrus population from a cross between sweet orange cv. Pera and tangor cv. Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*) has been tested and demonstrated to possess different levels of susceptibility unrelated to the calibre and number of the xylem vessels (Coletta-Filho *et al.* 2007).

In this work, we used a pathogenic GFP-labelled *X. fastidiosa* citrus strain to investigate the colonization process in citrus hosts with differing levels of susceptibility to *X. fastidiosa* infection, including two hybrids. Considering the importance of host-pathogen interactions in the development of disease, we focused on the behaviour of *X. fastidiosa* within the xylem vessels of the different citrus genotypes to gain better understanding of the possible underlying resistance mechanisms.

MATERIAL AND METHODS

BACTERIAL STRAINS AND GROWTH CONDITIONS

The *X. fastidiosa* CVC strains used in this study included the 11399 wild-type strain (COLETTA-FILHO *et al.* 2001) and the sequenced strain 9a5c (SIMPSON *et al.* 2000). An 11399 transformant expressing GFP (11399-GFP) was used to monitor the colonization process of the xylem vessels. This modified strain was obtained by electroporation using the pKLN59 plasmid and the method described by Newman *et al.* (2003). All inocula were grown on PWG medium (DAVIS *et al.* 1981) at 28° C for 7 days, and the OD_{600nm} was standardised to 0.5 in PBS, corresponding to 10⁹ CFU/mL.

PLANT MATERIALS, INOCULATION AND EXPERIMENTAL DESIGN

Seedlings from the four citrus genotypes were grafted onto Rangpur limes and grown in greenhouse conditions, including two parents, sweet orange (*C. sinensis*) cv. Pera and tangor (*C. sinensis* x *C. reticulata*) cv. Murcott, as the susceptible and resistant genotypes, respectively, and two hybrids, one resistant (RH-34) and one susceptible (SH-260) to *X. fastidiosa* infection and CVC. These hybrids were previously challenged and evaluated for *X. fastidiosa* resistance (COLETTA-FILHO *et al.* 2007). For the bacterial inoculation, 10-µL drops of the standardised bacterial suspension were inoculated using a needle (ALMEIDA *et al.*, 2001) in the centres of the seedlings stems. The inoculation point was labelled for further analyses. Initially, fifty plants

from each genotype were inoculated with the bacteria, and fluorescence microscopy screening was performed of the petiole adjacent to the inoculation site for the selection of only *X. fastidiosa*-infected plants for further evaluation. Three biological replicates of each genotype were used for two evaluations at 90 and 150 days after inoculation (DAI), in which the plants were analysed for bacterial population and movement and the colonization patterns within the plant xylem vessels.

BACTERIAL POPULATION AND MOVEMENT ANALYSIS BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR)

The colonization process of *X. fastidiosa* in the different evaluated citrus genotypes was analysed at 90 and 150 DAI, focusing on the bacterial populations in the petioles and stems, which were sampled at different distances from the inoculation point to verify movement. All petioles were collected at 5 cm intervals starting at the inoculation point and treated as independent pools. The stems were cut into segments of 5 or 10 cm, which were individually processed. The plant tissue from each section was weighed and completely macerated in liquid nitrogen. DNA extraction was performed according to the CTAB method adapted from Murray & Thompson (1980). To evaluate the bacterial population within the host, we established a standard curve using known concentrations of *X. fastidiosa* DNA mixed with plant DNA as described by Oliveira *et al.* (2002). All qPCR results were obtained by correlating the Ct (cycle threshold) with the linear regression equation ($y = -3.6448x + 44.117$) obtained from the standard curve ($R^2 = 0.9996$). The qPCR was performed on an ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) using TaqMan Master Mix (Applied Biosystems). The primers, probes and reaction conditions used were previously described (OLIVEIRA *et al.* 2002). Reactions were performed in triplicate (technical replicates), and all plates had negative (DNA from *X. fastidiosa*-free plant) and positive controls (DNA from CVC-symptomatic plant), and three points of the standard curve were used as the internal controls. The estimation of bacterial concentration for each sample was performed based on the initial plant tissue weight, and the results are shown as the number of cells/g of plant tissue. Based on the standard curve, the detection cut-off was set to 100 bacterial cells with a corresponding threshold cycle of Ct = 37.

XYLEM MORPHOLOGY ANALYSIS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Stems from the parental sweet orange and tangor Murcott were used for the evaluation of xylem vessel morphology through longitudinal cross-sections. Triplicates of the top, middle, and basal segments of the stem from *X. fastidiosa*-free plants were incubated at room temperature for 2 hours in Karnovsky buffer (2.5% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2) and washed twice for 5 minutes with the same buffer. For dehydration, the samples were incubated for 10 minutes each in an ascending series of acetone solutions (50%, 70%, 90%, 95% and 100%). The samples were then critical-point dried with the Balzers CPD030 dryer, fixed on aluminium supports with double-sided carbon tape and coated with gold using the Balzers SCD050 sputter coater. The stem vessel morphologies were observed and photographed with the Hitachi TM3000 scanning electron microscope.

FLUORESCENCE MICROSCOPY ANALYSES

Fluorescence microscopy was carried out to assess the *X. fastidiosa* colonization patterns as described by Newman *et al.* (2003). The destructive sampling of the petioles and stems was conducted for three 5-cm sections of the plant, one below and two above the inoculation point (IP). Twelve sequential hand-sectioned slides were analysed as technical replicates for each point of evaluation. The cross-sections were examined with the Olympus BX6 epifluorescence microscope at magnifications of 4x, 8x, 10x and 20x. GFP fluorescence was captured using the U-MWB2 filter (band pass of 520 nm) for the stems and U-MGFPHQ (band pass of 495 to 540 nm) for the petioles (Olympus). Two experiments were conducted. In the first experiment, the colonization patterns of *X. fastidiosa* within the xylem vessels of the petioles and stems were qualitatively assessed, separately, at 90 and 150 DAI, in each cross-section of all four evaluated genotypes, which totalled approximately 264 stem and 144 petiole cross sections per genotype with three biological replicates. A second experiment was carried out to confirm the patterns of colonization obtained from the first experiment. In this case, only the parental genotypes were used for microscopy analysis, which was performed similar to the first experiment. The bacteria were inoculated into two areas of the plant stems, and the evaluation was conducted at a point between the two areas at 30 and 60 DAI, using three biological replicates. For this experiment, 24 stem cross-sections were evaluated for each plant at each time point.

RESULTS

MOVEMENT AND BACTERIAL POPULATION OF *X. FASTIDIOSA* IN THE GENOTYPES

To verify bacterial movement, we quantified the populations of cells in the petioles and stems along the plant at two different time points after inoculation (Fig. 1 and 2). At 90 DAI, *X. fastidiosa* cells were detected only in the petioles of the resistant hybrid, with a migration of 15 cm above the IP (Fig. 1a). At 150 DAI, no *X. fastidiosa* cells were detected in the petioles of the resistant hybrid, and bacterial cells were detected in the resistant parent only at the IP (Fig. 1b). However, more colonized petioles were observed in the susceptible genotypes, particularly the hybrid, which showed a 7-fold higher bacterial population that moved farther along the plant compared to the parent (Fig. 1b).

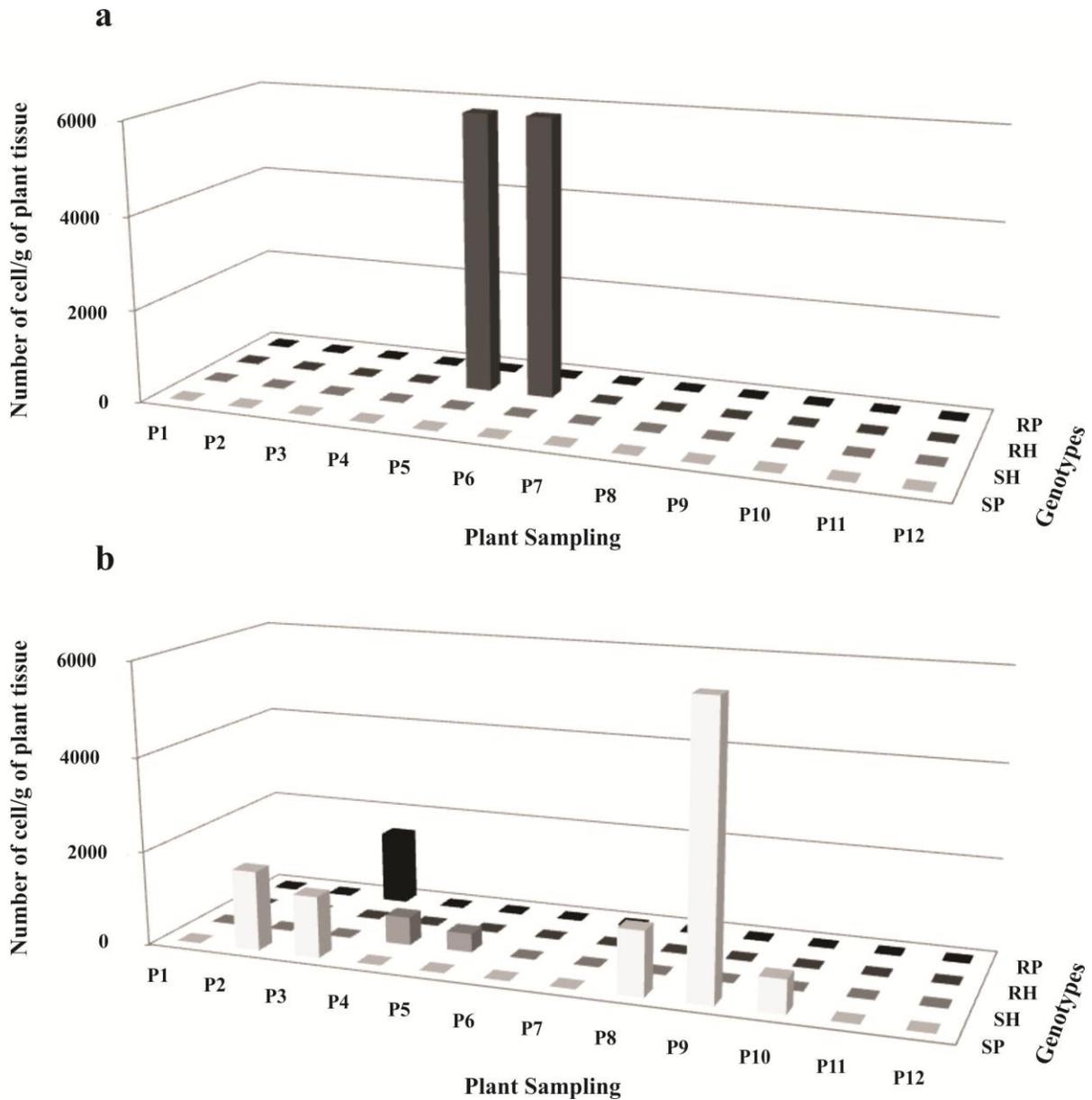


Figure 1. Bacterial population and movement within petioles of the four analyzed genotypes after 90 and 150 days of inoculation. (a) – quantitative results of bacterial population and movement within petioles after 90 days of inoculation. SP – susceptible parent; SH – susceptible hybrid; RH – resistant hybrid; RP – resistant parent. P1 (-15 to -10 cm); P2 (-10 to -5 cm); P3 (-5 to 0 cm); P4 (0 to 5 cm); P5 (5 to 10 cm); P6 (10 to 15 cm); P7 (15 to 20 cm); P8 (20 to 25 cm); P9 (25 o 30 cm); P10 (30 to 35 cm); P11 (35 to 40 cm) and P12 (40 to 45 cm). (b) – Same as in (a) after 150 days of inoculation.

At 90 DAI, the stems of the resistant genotypes showed bacteria only at the IP. No bacteria were detected at 150 DAI in the resistant hybrid, as verified in the petioles of this genotype (Fig. 1 and 2), and the resistant parent showed a decrease of 2.8-fold at 150 DAI, suggesting that *X. fastidiosa* was not multiplying or moving in these genotypes (Fig. 2a and 2b). The susceptible hybrid presented a slight increase in bacterial population with clear movement towards the top of the plant when evaluated at 150 DAI (Fig. 2a and 2b), indicating that it was more highly susceptible to *X. fastidiosa* colonization than the susceptible parent, which showed a decrease in bacterial population and movement (Fig. 2a and 2b). A similar colonization pattern was also observed in fluorescence microscopy for all genotypes (data not shown).

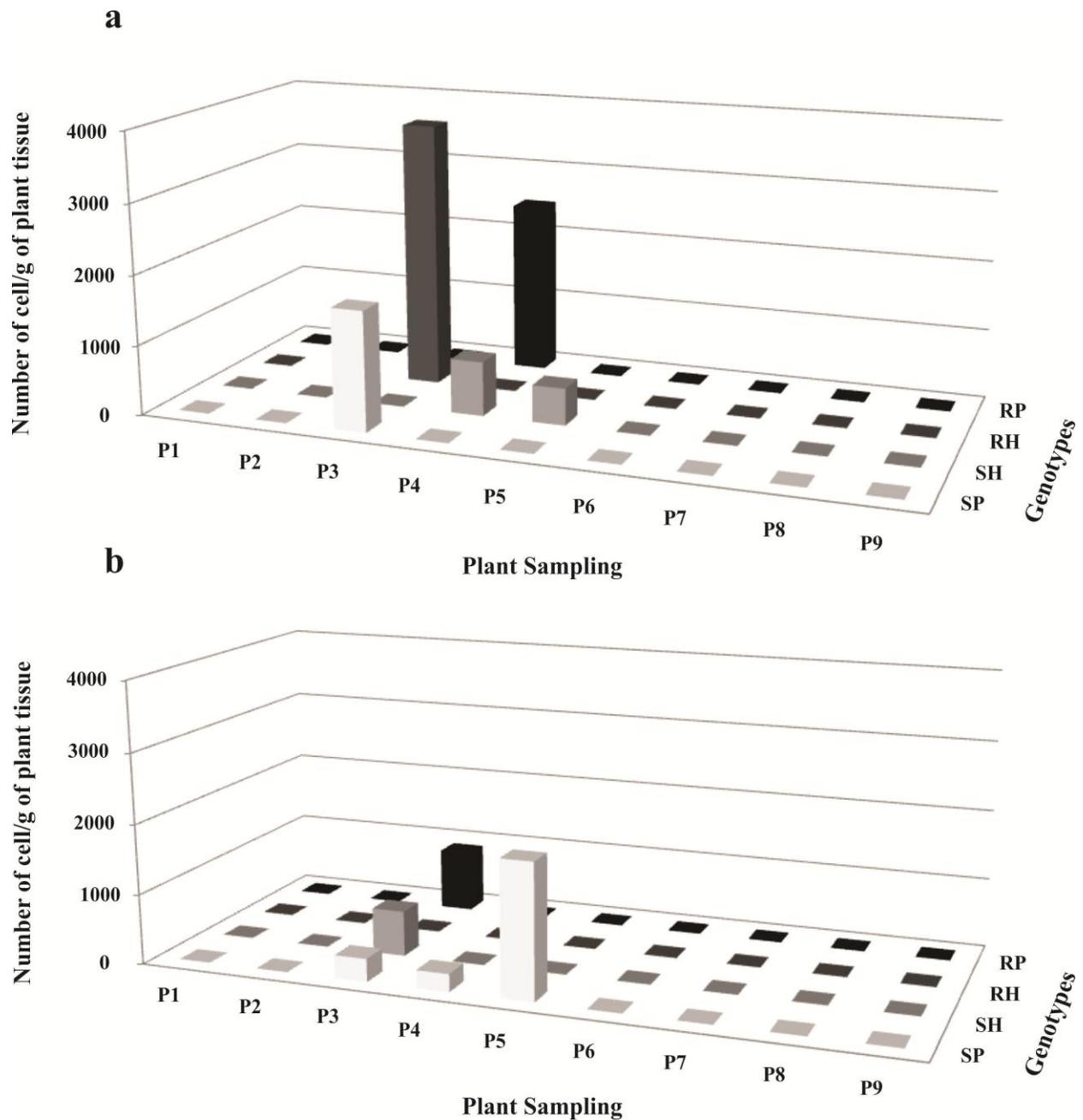


Figure 2. Bacterial population and movement within stems of the 4 analyzed genotypes after 90 and 150 days of inoculation. (a) – quantitative results of bacterial population and movement within stems after 90 days of inoculation. SP – susceptible parent; SH – susceptible hybrid; RH – resistant hybrid; RP – resistant parent. P1 (-15 to -10 cm); P2 (-10 to -5 cm); P3 (-5 to 0 cm); P4 (0 to 5 cm); P5 (5 to 10 cm); P6 (10 to 20 cm); P7 (20 to 30 cm); P8 (30 to 40 cm) and P9 (40 to 45 cm). (b) – Same as in (a) after 150 days of inoculation.

DIFFERENCES IN XYLEM VESSEL MORPHOLOGIES DO NOT EXPLAIN THE DIFFERENCES IN THE COLONIZATION PROCESS

The differences observed for the colonization process among the genotypes evaluated led to the hypothesis that morphological differences in stem xylem vessel architecture could result in the susceptibility or resistance to *X. fastidiosa* colonization. The morphological analysis of these xylem vessels revealed four types of secondary cell wall depositions. There were 2 to 5 layers of cells in the primary xylem, depending on the cross-section location (data not shown), which contained helical and scalariform depositions (Fig. 3a and 3b). The secondary xylem was basically composed of short, pitted vessels connected to each other by simple perforation plates (Fig. 3). These element vessels were surrounded by fibres and parenchymal cell layers and did not show a regular distribution pattern. A comparison of the susceptible and resistant parents did not reveal any differences (Fig. 3a, c and 3b, d), showing that they possessed highly similar types of secondary cell wall depositions and distributions of element vessels.

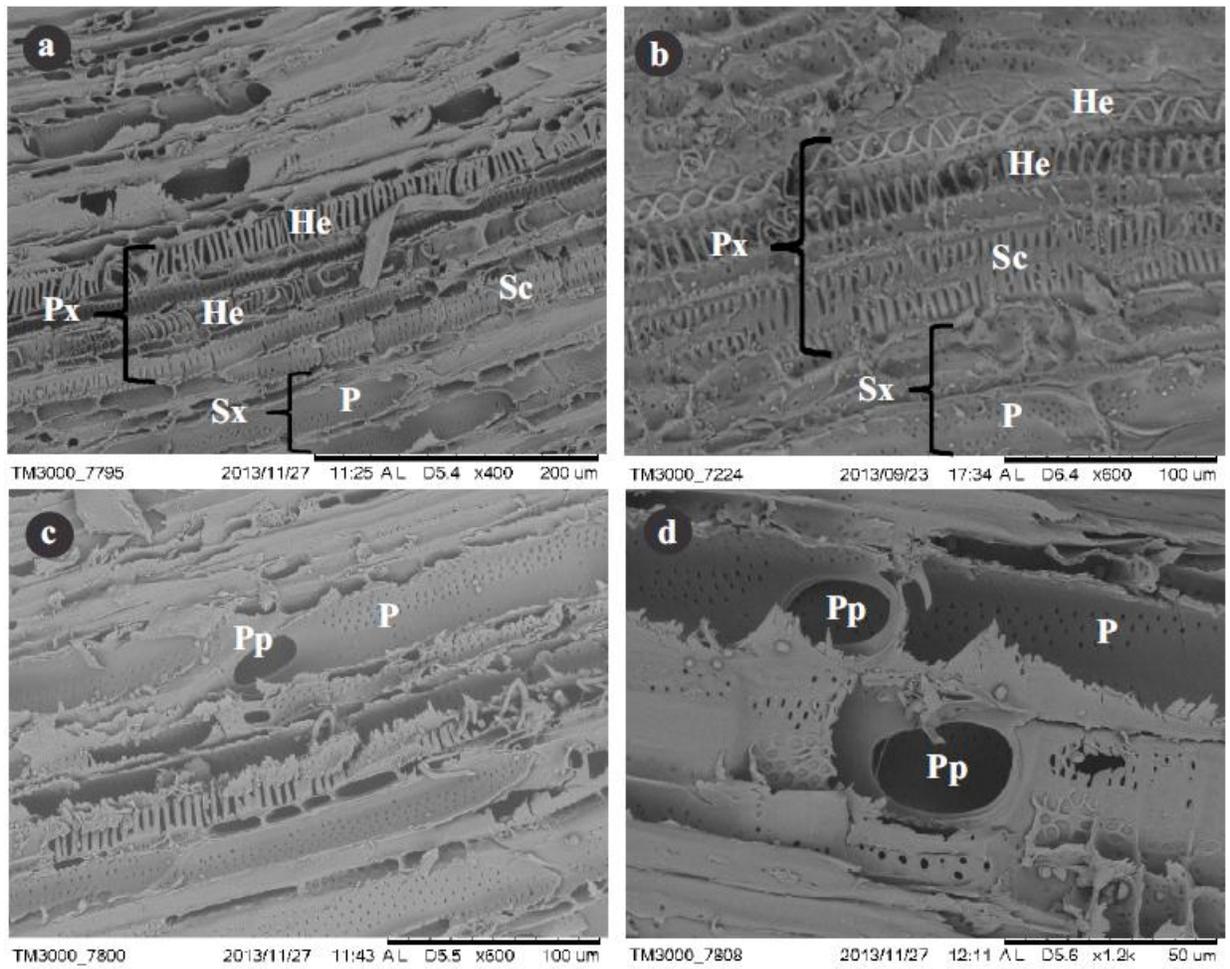


Figure 3. Scanning electron microscopy of susceptible (a and c) and resistant parent (b and d) stem xylem vessels. (a and b) – Primary (Px) and secondary xylem (Sx) in longitudinal stem cross-section. Cells of the primary xylem present the helical (He) and scalariform (Sc) thickness while the secondary xylem is composed of pitted secondary cell wall deposition (P). (c and d) – Simple perforation plate (Pp) between two secondary xylem element vessels.

PETIOLE AND STEM COLONIZATION PATTERNS BETWEEN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT GENOTYPES

The colonization patterns of the xylem vessels in the stems and petioles of the parents and hybrids were evaluated using the green fluorescence-labelled strain of *X. fastidiosa*, 11399-GFP. The petiole xylem vessels were randomly colonized in all four analysed genotypes (Fig. 4) at the two sampling time points (data not shown).

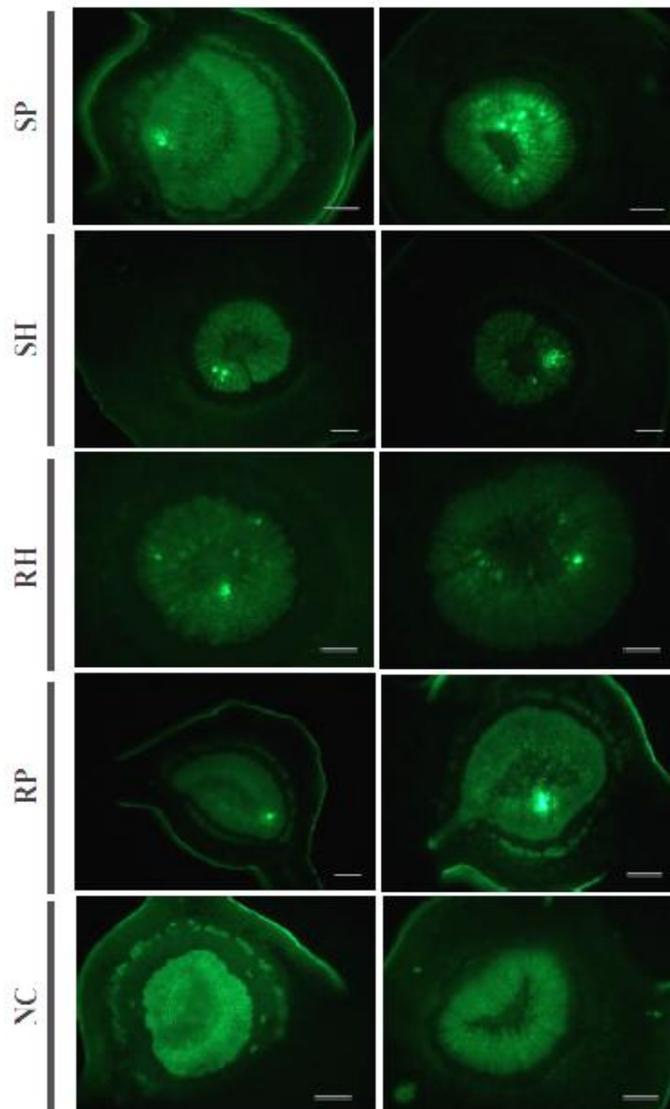


Figure 4. Randomly colonization of *X. fastidiosa*-GFP in petioles analyzed by fluorescence microscopy. Transversal cross-sections above the inoculation point at 90 days after inoculation were evaluated for susceptible parent (SP); SH – susceptible hybrid; RH – resistant hybrid; RP – resistant parent and NC – negative control inoculated with dead bacteria.

In contrast, different *X. fastidiosa* colonization patterns were observed in the stems of the resistant and susceptible genotypes (Fig. 5), in which *X. fastidiosa* was able to colonize both the primary and secondary xylems of the susceptible genotypes with a tendency to move laterally throughout the secondary xylem over time. In the resistant genotypes, *X. fastidiosa* appeared to be trapped in the primary xylem of the stems and did not enter the secondary xylem, even at the latest time point. In addition, primary xylem colonization in the resistant plants decreased at 150 DAI (Fig. 5).

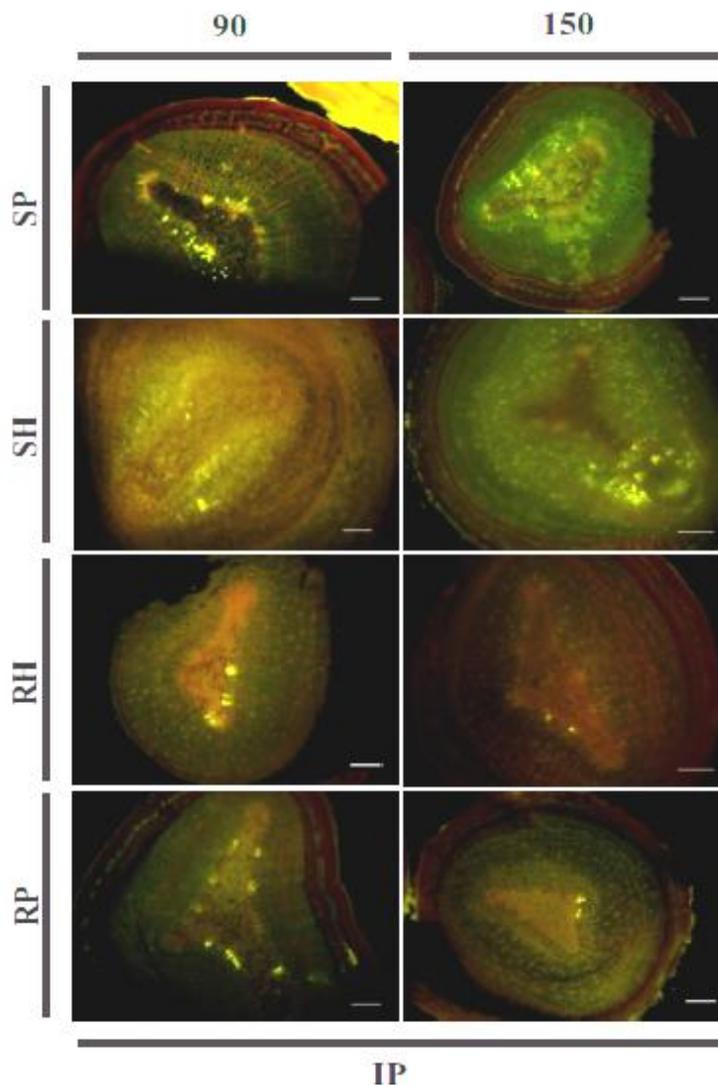


Figure 5. Different colonization pattern of *X. fastidiosa*-GFP in stem analyzed by fluorescence microscopy. Transversal cross-sections above the inoculation point at 90 and 150 days after inoculation were evaluated for susceptible parent (SP); SH – susceptible hybrid; RH – resistant hybrid; RP – resistant parent.

The same pattern was confirmed in the stems of the parents in an independent experiment (Fig. 6).

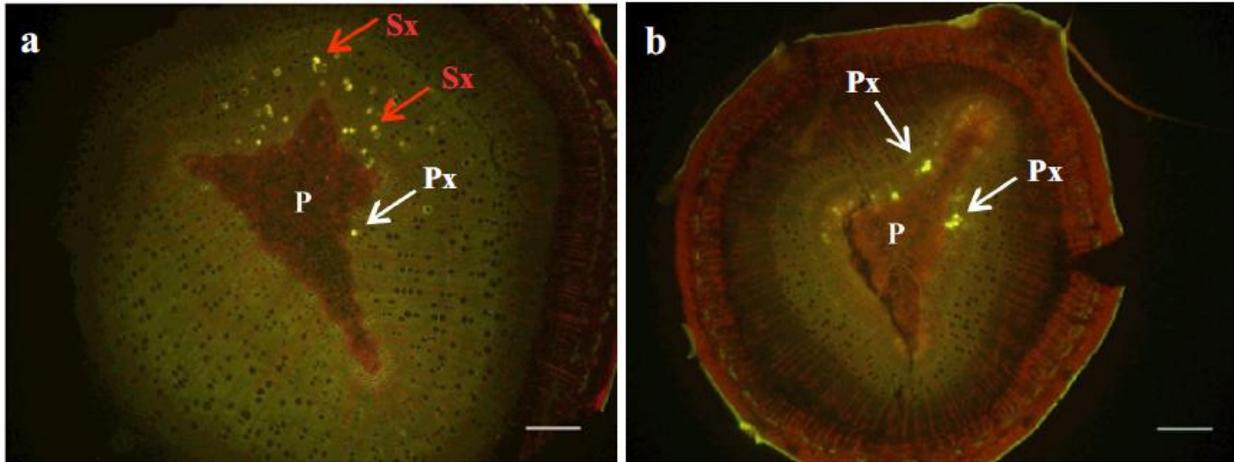


Figure 6. *X. fastidiosa* colonization pattern in transversal cross-section of stems from susceptible (a) and resistant (b) citrus genotypes. Figure (a) exhibits the primary and secondary xylem colonization in the susceptible parent, indicated by the white and red arrows respectively. Figure (b) exhibits primary xylem colonization in the resistant parent, indicated by white arrows. P – pith; Px – primary xylem; Sx – secondary xylem. The Px corresponds to 2 to 5 cell layers around the P.

DISCUSSION

The pathogenicity of *X. fastidiosa* has been well investigated because it is the causal agent of important plant diseases (MANSFIELD *et al.* 2012). The most accepted hypothesis for its disease-causing mechanism is related to its ability to move and colonize the xylem vessels of the host (CHATTERJEE *et al.* 2008). This bacterium is able to cause CVC in all sweet orange (*C. sinensis*) varieties, but other citrus genotypes such as mandarins (*C. reticulata*), limes (*C. aurantifolia*), lemons (*C. limon*) and tangors (*C. sinensis* x *C. reticulata*), are resistant to CVC in field conditions (LARANJEIRA *et al.* 1998), although under greenhouse conditions, this bacterium has been shown to briefly colonize mandarins and tangors (DE SOUZA *et al.* 2007, COLETTA-FILHO *et al.* 2007). Genetic studies have been performed to assess the genes involved in the defence responses of these resistant genotypes compared to the susceptible sweet orange (DE SOUZA *et al.* 2009, GMITTER *et al.* 2012, RODRIGUES *et al.* 2013). However, no information is available regarding the bacterial activities within the xylem vessels in susceptible and resistant citrus genotypes, which ultimately may culminate in the success of the infection.

Importantly, this work focuses on two different aspects of bacterial colonization; changes over time and movement inside of the plant.

Our results revealed that *X. fastidiosa* possessed difficulties in migrating and multiplying in the resistant genotypes, in which the majority of the bacteria remained close to the inoculation point. In contrast, in the susceptible genotypes, the bacteria were able to more efficiently colonize the host over time. This is very similar to previous studies of grape (KRIVANEK & WALKER, 2005; BACCARI & LINDOW, 2011); however, in contrast with grape, the decreased populations observed in citrus occurred even in the petioles of the resistant plants, suggesting a stronger response in resistant citrus genotypes compared to grape.

Despite the overall similar behaviours of citrus and grape, bacterial movement was slower in citrus, as previously demonstrated (ALMEIDA *et al.* 2001). Three biological features may explain these differing behaviours; first, the CVC strain 11399, like 9a5c, possesses a frameshift in the polygalacturonase precursor-encoding gene, which is responsible for pectin degradation (SIMPSON *et al.* 2000). Pectin comprises approximately 40% of the pit membrane composition of plants (CARPITA & GIBEAUT, 1993), and it is known that polygalacturonase activity greatly affects movement inside of plants and is necessary for the successful infection and pathogenicity of *X. fastidiosa* in grape (ROPER *et al.* 2007). Additionally, *Vitis vinifera* (grape vine) exhibits predominantly apical growth, and therefore, this plant grows much faster, facilitating the spread of the bacteria through the plant, while citrus trees exhibit slow cambial and apical growth, which is not supportive of bacterial movement. Finally, the xylem structures differ in these two plants. In the stems of grape, the secondary cell wall is mainly composed by scalariform element vessels (SUN *et al.* 2006), which are more permissive to lateral intervessel bacterial migration. On the other hand, our results showed that the stems of both the susceptible and resistant citrus genotypes possessed a secondary xylem composed of pitted element vessels, which were almost fully coated with lignin; thus, they were likely more restrictive to bacterial migration. We observed higher bacterial populations in the petioles compared to the stems in the citrus plants. This has also been verified for grape (BACCARI & LINDOW, 2011) and may be explained by the xylem structures. In both citrus and grape, the xylems in the petioles are more permissive to bacterial spread compared to the stems. It has been demonstrated that the petioles of citrus possess all types of xylem secondary cell walls, with the majority being pitted element vessels (ALVES *et al.* 2009); however, the proportion of these vessels in the petioles is much

lower than in stems, and thus, colonization could be more easily attained in the petioles. Grape petioles have higher proportions of helical element vessels, which are much more permissive to bacterial spread than the scalariform elements observed in the stems (BACCARI & LINDOW, 2011). This could explain why the bacteria were more prevalent in the petioles of both plant species.

Despite the observation that stem xylem morphology may be a resistance factor in the colonization of *X. fastidiosa*, no obvious morphological or structural differences in the element vessels within the fibres and parenchymal cells were found in the stems of the susceptible and resistant citrus genotypes. Interestingly, fluorescence microscopy revealed that in the resistant genotypes, colonization was restricted to a few primary xylem vessels, and in the susceptible genotypes, the bacteria laterally spread throughout the secondary xylem. This trend of impeding bacterial movement to the secondary xylem vessels could result from a genetic response of the resistant host because it has recently been verified by RNAseq that the resistant genotype responds to *X. fastidiosa* infection by inducing genes related to the synthesis and modification of secondary xylem cells in an attempt to prevent bacterial movement and multiplication (RODRIGUES *et al.* 2013). These results are in accordance with our fluorescence microscopy observations, suggesting that cell wall modifications in resistant genotypes may represent strategies for impairing the movement of *X. fastidiosa* throughout the secondary xylem. It is known that the insect vector, which prefers to feed on young shoots (MIRANDA *et al.* 2008), preferentially inoculates *X. fastidiosa* cells into the primary xylem. Thus, we speculate that in resistant genotypes, the bacteria is recognised and trapped in the primary xylem, triggering defence responses that lead to bacterial death, as previously suggested (DE SOUZA *et al.* 2009; RODRIGUES *et al.* 2013). We observed this response only in the stems, suggesting that the stems possessed a barrier to colonization.

In conclusion, this is the first report documenting the infection of *X. fastidiosa* in citrus stems which compares its colonization patterns in both resistant and susceptible genotypes. We revealed that the resistant plants are able to prevent the movement of the bacteria from the primary xylem as a resistance mechanism.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Luis F. C. da Silva from Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC for greenhouse plant propagation; and Pablo Henrique Nunes from Universidade Estadual de São Paulo-UNESP/Rio Claro for assistance in microscopy analyses. This work was supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2010/50840-7 and 2013/17485-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - INCT-Citros 08/57909-2, 573848/08-4). B.N. is a fellow MSc. from FAPESP (2011/14307-5), H.D.C.F, M.A.T. and A.A.D.S. are recipients of research fellowships from CNPq.

REFERENCES

1. Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS. 2001. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Dis.* **85**, 382–386.
2. Alves E, Leite B, Pascholati SF, Ishida ML, Andersen PC. 2009. *Citrus sinensis* Leaf Petiole and Blade Colonization by *Xylella fastidiosa*: Details of Xylem Vessel Occlusion. *Sci. Agric.* **66**, 218–224.
3. Baccari C, Lindow SE. 2011. Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology* **101**, 77–84.
4. Bové JM, Ayres AJ. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* **59**, 346–354.
5. Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**, 1–30.
6. Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V and Bové JM. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **27**, 137–142.
7. Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S. 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 243–71.

8. Coletta-Filho HD, Pereira EO, Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yale M, Machado MA. 2007. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange × Murcott tangor. *Plant Pathology* **56**, 661–668.
9. Coletta-Filho HD, Takita MA, De-Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA. 2001. Differentiation of Strains of *Xylella fastidiosa* by a Variable Number of Tandem Repeat Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4091–4095.
10. Davis MJ, French J, Schaad NW. 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* **6**, 309–14.
11. De Souza AA, Takita MA, Amaral A, Coletta-Filho HD, Machado MA. 2009. Citrus Responses to *Xylella fastidiosa* Infection, the Causal Agent of Citrus Variegated Chlorosis. In: Tennant P, Benkeblia N (Eds) Citrus III. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* **3** (Special Issue 2), 73–80.
12. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Campos MA, Teixeira JEC, Targon MLPN, Carlos EF, Ravasi JR, Fischer CN, Machado MA. 2007. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* **30**, 965–971.
13. Fry SM, Milholland RD. 1990. Multiplication and Translocation of *Xylella fastidiosa* in Petioles and Stems of Grapevine Resistant, Tolerant, and Susceptible to Pierce’s Disease. *Journal Series of the North Carolina Agricultural Research Service* **80**, 61–65.
14. Gmitter Jr FG, Chen C, Machado MA, De Souza AA, Ollitrault P, Froehlicher Y, Shimizu T. 2012. Citrus genomics. *Tree Genetics & Genomes* **8**, 611–626.
15. Hill BL, Purcell AH. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* **85**, 1368–1372.
16. Ilardi V, Loreti S. 2014. Plant Biosecurity: Diagnosis in Plant Pathology. *Biosafety* **3**, e143. doi:10.4172/2167-0331.1000e143.

17. Krivanek AF, Walker MA. 2005. *Vitis* resistance to Pierce's disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. *Phytopathology* **95**, 44–52.
18. Laranjeira FF, Pompeu Junior J, Harakava R, Figueiredo JO, Carvalho SA, Coletta-Filho HD, 1998. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condição de campo. *Fitopatologia Brasileira* **23**, 147–54.
19. Lopes AS, Teixeira DC, Fernandes NG, Ayres AJ, Torres SCZ, Barbosa JC, Li WB. 2005. An experimental inoculation system to study citrus–*Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Dis.* **89**, 250–254.
20. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. 2012. Review Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**, 614–629.
21. Miranda MP, Viola DN, Marques RN, Bonani JP, Lopes JRS. 2008. Locais e período de alimentação da cigarrinha vetora de *Xylella fastidiosa*, *Bucephalagonia xanthophis* (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE), em mudas cítricas. *Rev. Bras. Frutic.* **30**, 913–918.
22. Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321–4325.
23. Newman KL, Almeida RPP, Purcell AH, Lindow SE. 2003. Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7319–7327.
24. Oliveira AC, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH, Machado MA. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay PCR. *Phytopathology* **92**, 1048–1054.
25. Pérez-Donoso AG, Sun Q, Roper MC, Greve LC, Kirkpatrick B, Labavitch JM. 2010. Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and *Xylella fastidiosa*-Infected Grapevines. *Plant Physiology* **152**, 1748–1759.

26. Purcell, AH. 2013. Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 16.1–16.18.
27. Rodrigues CM, De-Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. 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**, 676 Online [<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/676>].
28. Roper MC, Greve LC, Warren GJ, Labavitch JM, Kirkpatrick BC. 2007. *Xylella fastidiosa* Requires Polygalacturonase for Colonization and Pathogenicity in *Vitis vinifera* Grapevines. *MPMI* **20**, 411–419.
29. Simpson AJG, Reinach FC, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**, 151–59.
30. Sun Q, Greve LC, Labavitch, JM. 2011. Polysaccharide Compositions of Intervessel Pit Membranes Contribute to Pierce’s Disease Resistance of Grapevines. *Plant Physiology* **155**, 1976–1987.
31. Sun Q, Rost TL, Matthews MA. 2006. Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Am. J. Bot.* **93**, 1567–1576.

CAPÍTULO III – AQUISIÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* CAUSADORA DA CVC EM SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. IMPORTÂNCIA DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR INSETOS

Doenças associadas a insetos vetores são um grande problema atualmente devido à sua alta incidência, variedade de patógenos e gama de hospedeiros, sejam eles animais e/ou vegetais (GUBLER, 2008). Vetores e patógenos interagem de diversas formas, desde mecanismos simples de transmissão até complexas interações nas quais o patógeno se estabelece e multiplica dentro do vetor (KILLINY & ALMEIDA, 2009). De acordo com Killiny e Almeida (2009B), nas últimas décadas, doenças transmitidas por insetos vetores têm ganhado espaço na preocupação da sociedade, no entanto, apesar da importância dos vetores de doenças nesses sistemas, os esforços de pesquisa estão voltados para a compreensão dos mecanismos moleculares das interações patógeno-hospedeiro em detrimento da interação patógeno-vetor. Deste modo, o rompimento desta última relação representa uma grande fonte potencial ainda inexplorada para o controle de doenças.

1.2. INTERAÇÕES ENTRE VETORES E PATÓGENOS

Para que ocorra a transmissão de um patógeno e, conseqüentemente, a dispersão da doença causada por ele em hospedeiros suscetíveis são necessárias na maioria dos casos, moléculas sinalizadoras. Essas moléculas podem ter diferentes origens tais como sinais moleculares provenientes da resposta de estresse do hospedeiro à infecção (BLUA & PERRING, 1992), moléculas originárias da própria população do patógeno (GRANT & JONES, 2009), ou ainda moléculas que mediam a expressão de genes do hospedeiro ou patógeno. Esses sinais são importantes uma vez que a eficiência de aquisição e inoculação de um determinado patógeno por seu vetor é frequentemente contexto-dependente (POWER, 1996; BRISSON *et al.* 2008; LOPES *et al.* 2009).

Uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, estresses ambientais, dentre outros fatores, desencadeiam mudanças na expressão gênica de patógenos de humanos, animais e plantas, resultando em novos fenótipos que aumentam a aptidão individual do patógeno (CAMILLI & BASSLER, 2006; SCHILD *et al.* 2007). Mudanças fenotípicas são especialmente

importantes para patógenos com complexos ciclos de vida que devem sobreviver em diferentes ambientes tais como vetor e hospedeiro. Por esse motivo, muitas bactérias patogênicas apresentam plasticidade fenotípica, permitindo-lhes a exploração de ambientes variados (KILLINY & ALMEIDA, 2009).

Dentre os sinais do patógeno bacteriano, a sinalização célula-célula é uma comunicação importante para o sucesso do estabelecimento de patógenos com complexos ciclos de vida e múltiplos hospedeiros, como o *Vibrio cholerae*, por exemplo, o qual além de ser patógeno de humanos também coloniza a superfície de artrópodes em ambientes aquáticos (PRUZZO *et al.* 2008). Assim também se comporta o fitopatógeno *X. fastidiosa*, o qual coloniza o estomodeu de cigarrinhas vetores para se disseminar, além de colonizar seus inúmeros hospedeiros (ALMEIDA *et al.* 2005; CHATTERJEE *et al.* 2008B).

1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS INSETOS VETORES E DA TRANSMISSÃO DE PATÓGENOS

Patógenos transmitidos por insetos podem circular dentro do corpo do vetor após a aquisição e, eventualmente, serem inoculados em novos hospedeiros durante eventos de salivação dos insetos (patógenos circulativos). Alternativamente, esses patógenos podem se aderir a várias secções do aparelho bucal dos vetores, os quais são estruturalmente parte do exoesqueleto, evitando a circulação por todo o inseto (NAULT, 1997). Interações moleculares em ambos os modelos, como já explicado anteriormente, determinam o sucesso da transmissão (FROISSART *et al.* 2002; HOGENHOUT *et al.* 2008).

A maioria dos fitopatógenos não circulativos são vírus que se ligam à superfície cuticular do aparelho bucal dos insetos (frequentemente estiletos maxilares), são não persistentes e não propagativos no vetor (NG & FALK, 2006). Entretanto, segundo Purcell e Finlay (1979), a bactéria *X. fastidiosa* é uma exceção, a qual coloniza (persiste e multiplica) o pré-cibário de cigarrinhas vetores (KILLINY & ALMEIDA, 2009 B; HILL & PURCELL, 1995). Embora a colonização de *X. fastidiosa* nesses vetores seja persistente na vida adulta, ninfas perdem a infectividade quando passam pela muda, uma vez que a camada cuticular do intestino anterior (pré-cibário) faz parte do exoesqueleto, que é trocado a cada ecdise (ALMEIDA & PURCELL, 2003).

X. fastidiosa pode ser transmitida por diversas espécies de cigarrinhas que se alimentam da seiva do xilema (PURCELL, 1997). Essencialmente, são três as etapas para transmissão da

bactéria às plantas. Primeiramente, o patógeno deve ser adquirido de uma planta infectada. Na segunda etapa, a *X. fastidiosa* deve se aderir à cutícula do pré-cibário do inseto, seguindo-se à colonização desta superfície. Por fim, a transmissão, caso a inoculação do patógeno seja bem sucedida em um hospedeiro suscetível, gerando uma nova infecção (CHATTERJEE *et al.* 2008).

Sabe-se hoje, que a bactéria naturalmente formadora de biofilme *in vitro* (DE SOUZA *et al.* 2004) e *in planta* (ALVES *et al.* 2009), é capaz também de formar biofilme dentro do pré-cibário dos insetos vetores (Fig. 1) (ALMEIDA & PURCELL, 2006). Desse modo, *X. fastidiosa* é capaz de estabelecer-se, multiplicar-se e permanecer no vetor durante toda a vida adulta deste (ALMEIDA *et al.* 2005).

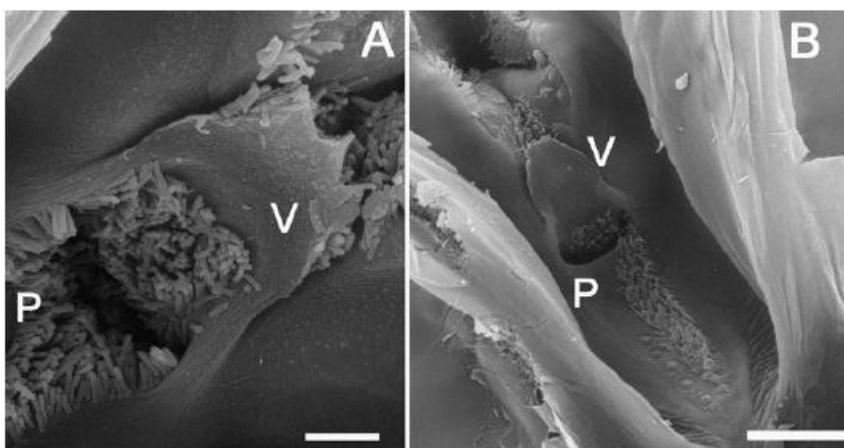


Figura 1. Colonização do pré-cibário em *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) A – Detalhes da colonização da cavidade da válvula pré-cibarial (P) e a válvula sem colonização (V). B – Visão da região do estomodeu e cibário colonizadas. Fonte: Almeida & Purcell, 2006 adaptada.

Dentre os vetores de *X. fastidiosa* incluem-se as cigarrinhas (Hemiptera) pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae), Cercopidae e Cicadidae (LOPES, 1996; ROBERTO *et al.* 1996; HICKEL *et al.* 2001; PAIÃO *et al.* 2002), sendo os membros da subfamília Cicadellinae os de maior relevância na transmissão desta bactéria (SEVERIN, 1949). Diversas espécies são transmissoras da bactéria em citros. Treze dentre dezessete espécies testadas até o momento foram confirmadas como transmissoras (ROBERTO *et al.* 1996; KRUGNER *et al.* 2000; YAMAMOTO *et al.* 2002; LOPES & KRUGNER, 2013), sendo que as espécies *Acrogonia citrina*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, e

Oncometopia facialis destacam-se por visitar mais frequentemente árvores de citros e portanto, possuem maior probabilidade de transmissão (ALMEIDA *et al.* 2014).

Diferentemente da maioria dos patógenos que se multiplicam nos vetores, a falta de especificidade *X. fastidiosa*-espécie do vetor é uma característica marcante deste sistema (PURCELL, 1989). Essencialmente, todas as espécies de cigarrinha em Cicadellinae, são capazes de transmitir todas as estirpes de *X. fastidiosa*, embora com diferentes eficiências de transmissão. A eficiência aparentemente está mais associada às populações bacterianas dentro das plantas e com a interação vetor-hospedeiro do que à interação bactéria-vetor (HILL & PURCELL, 1997). Trabalhos com transmissão de estirpes de *X. fastidiosa* da América do Sul por vetores da América do Norte são um exemplo desse aspecto da transmissão, assim como estirpes de diferentes hospedeiros transmitidos por vetores comuns (DAMSTEEGT *et al.* 2006; ALMEIDA & PURCELL, 2003; MARUCCI *et al.* 2008). Além disso, *X. fastidiosa* é transmitida por vetores sem um período latente (tempo entre a aquisição do patógeno e sua inoculação em uma nova planta) (PURCELL & FINLAY, 1979).

Entretanto, apesar de todas essas informações a respeito da transmissão de *X. fastidiosa* a seus hospedeiros e sua interação com insetos vetores, todo o conhecimento detalhado adquirido nesta área é proveniente de estudos com o patossistema da doença de Pierce (PD), causada pela *X. fastidiosa* em videiras na Califórnia, Estados Unidos (ALMEIDA *et al.* 2014). Com base no conhecimento sobre as interações patógeno-vetor e transmissão para PD, extrapola-se esse conhecimento para as outras doenças que possuem *X. fastidiosa* como agente causal. Existe, porém, a necessidade de estudos nessa área para o patossistema *X. fastidiosa*-citros, uma vez que mesmo possuindo o patógeno comum, as doenças causadas por ele são distintas nos diferentes hospedeiros, e por isso, apresenta particularidades dada a interação específica de cada hospedeiro e vetor com o patógeno.

1.4. EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO

A eficiência de aquisição e inoculação da *X. fastidiosa* aumenta com o tempo de acesso do vetor à planta infectada (PURCELL & FINLAY, 1979). Os eventos de aquisição e transmissão são modulados por sinais moleculares tanto originários da própria população bacteriana como do hospedeiro em resposta à infecção, como por exemplo, a degradação da pectina componente das paredes celulares vegetais, sendo um evento contexto-dependente e suas

eficiências são totalmente afetadas pelas interações planta-patógeno-vetor (KILLINY & ALMEIDA, 2009).

A eficiência de transmissão é dependente de diversos fatores, dentre os quais tempo de acesso à aquisição e inoculação, distribuição e população de *X. fastidiosa* no hospedeiro até mesmo a preferência alimentar do vetor são importantes variáveis (HILL & PURCELL, 1995).

Para PD a eficiência de transmissão fica em torno de 90% como média entre todos os vetores (HILL & PURCELL, 1995), ao passo que para os vetores conhecidos como transmissores da *X. fastidiosa* causadora da CVC a taxa de transmissão varia de 1% a 30% (MARUCCI *et al.* 2008) para um período de acesso de 4 dias. Dada a não especificidade da ocorrência de transmissão entre a combinação estirpe de *X. fastidiosa*-espécie do vetor, há a necessidade de estudos para determinar a eficiência de transmissão para cada combinação de interesse, uma vez que, como pode-se observar pelas diferentes taxas de transmissão, esse dado não é passível de extrapolação (ALMEIDA *et al.* 2014).

Nesse sentido, a utilização de um sistema eficiente para estudos com o inseto vetor se faz essencial para o aumento do conhecimento na área de transmissão da *X. fastidiosa* causadora da CVC.

1.5. X. FASTIDIOSA E O VETOR - O QUE SE SABE SOBRE ESSAS INTERAÇÕES NO PATOSSISTEMA PD

Uma das características únicas desta bactéria é o fato dela interagir com superfícies de polissacarídeos de revestimento tanto na planta hospedeira quanto no vetor (CHATTERJEE *et al.* 2008). Nas plantas, como um organismo limitado ao xilema, *X. fastidiosa* fica confinada nos vasos do xilema, compostos pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina. Nas cigarrinhas vetores, coloniza a superfície do pré-cibário, que faz parte do exoesqueleto dos insetos, composto primariamente por quitina (ALMEIDA & PURCELL, 2006).

Até o ano de 2009, pouco se sabia sobre interações moleculares específicas entre o estomodeu do vetor e a bactéria. Sabia-se que a *X. fastidiosa* é capaz de formar biofilme sobre a cutícula do pré-cibário e cibário dos vetores, o que adicionalmente ao fato dela ser transmitida sem a necessidade de um período latente, sugere que sua transmissão se dá a partir desse local (PURCELL & FINLAY, 1979). Também já era sabido que a sinalização célula-célula, “quorum sensing”, desempenha papel importante no processo de transmissão, embora esse processo

envolva muitos genes e uma regulação complexa, inviabilizando a distinção das interações específicas para que ocorra a transmissão (NEWMAN *et al.* 2004; CHATTERJEE *et al.* 2008B). Entretanto, desde 2009, descobriu-se que *X. fastidiosa* possui proteínas de ligação à carboidratos na superfície de sua célula (KILLINY & ALMEIDA, 2009B), e que células bacterianas possuem afinidades diferentes de ligação à polissacarídeos, sendo que muitas vezes, a presença de N-acetilglucosamina livre no meio, por exemplo, mostrou-se competitiva à adesão da bactéria a outros carboidratos, inclusive à própria superfície de adesão ao inseto (KILLINY *et al.* 2012). Foi sugerido também pelos mesmos autores, que as adesinas afimbriais HxfA e HxfB teriam um papel importante na adesão inicial das bactérias ao estomodeu do vetor, as quais também são reguladas por “quorum sensing”. Interessantemente, o sistema de “quorum sensing” de *X. fastidiosa* suprime a virulência *in planta*, pois mutantes deficientes na sinalização são supervirulentos, mas deficientes na colonização do vetor e transmissão (NEWMAN *et al.* 2004), sugerindo que a comunicação célula-célula em *X. fastidiosa* regularia positivamente a transmissão deste patógeno.

Muitas são as informações a respeito dessa interação (*X. fastidiosa*-vetor) para a doença de Pierce principalmente devido à implementação do sistema de dieta artificial (KILLINY & ALMEIDA, 2009), sugerido anteriormente por Chatterjee *et al.* (2008) como ferramenta essencial no desenvolvimento de estudos dessa natureza, uma vez que, o uso de plantas fonte para aquisição pelo vetor é pouco eficiente e altamente variável de acordo com os hábitos alimentares dos insetos, população e distribuição da bactéria pela planta, entre outros inúmeros fatores adicionadores de variáveis.

A implementação da aquisição de células de *X. fastidiosa* em dieta artificial utilizando sachês (Fig. 2) está viabilizando a identificação dos sinais moleculares reguladores da transmissão. Foi descoberto, por exemplo, que a degradação da pectina é um sinal molecular fundamental para o sucesso da aquisição e inoculação da *X. fastidiosa* em videiras (KILLINY & ALMEIDA, 2009).



Figura 2. Sachê utilizado na aquisição de células de *X. fastidiosa* em dieta artificial. A – imagem do sachê durante a inserção do inseto. B – sachê pronto (KILLINY & ALMEIDA, 2009). As setas indicam os itens que compõem o sistema.

A carência de estudos entre patógeno-vetor em detrimento da interação planta-patógeno é evidente. Em relação à CVC especificamente, essa carência é ainda maior por não dizer a quase inexistência de estudos nessa área. A dificuldade em se trabalhar com as condições do patossistema CVC é um fator adicional e diante deste cenário, necessita-se impulsionar pesquisas relacionadas à transmissão desta doença tão importante para a citricultura brasileira. Desta forma, a implementação do sistema de dieta artificial para cigarrinhas vetoras, desenvolvido por Killiny e Almeida (2009), se faz necessária para impulsionar os estudos com vetores no patossistema CVC.

2. OBJETIVO GERAL:

Estabelecer o protocolo de aquisição de *Xylella fastidiosa* causadora da CVC em sistema de dieta artificial por cigarrinhas vetoras desta doença.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aprender a metodologia da aquisição de *X. fastidiosa* em dieta artificial desenvolvida para o patossistema PD em estágio na Universidade da Califórnia em Berkeley.
- Testar e ajustar o protocolo de dieta artificial para aquisição de *X. fastidiosa* pela cigarrinha *Bucephalagonia xanthophis*, vetor desta bactéria em citros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. APRENDIZADO DA AQUISIÇÃO DE *X. FASTIDIOSA* UTILIZANDO O SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL COM INSETOS VETORES DA DOENÇA DE PIERCE

3.1.1. Aprendizado da metodologia em estágio na Universidade da Califórnia em Berkeley

Para a implementação do sistema de dieta artificial com cigarrinhas vetoras de doenças causadas por *X. fastidiosa*, foi realizado um estágio de 5 meses no laboratório do professor Dr. Rodrigo Almeida, um dos idealizadores do sistema e colaborador deste trabalho, na Universidade da Califórnia em Berkeley. Nos itens abaixo, a descrição detalhada da metodologia desenvolvida durante o estágio que teve como objetivo implementar o sistema para outra espécie de cigarrinha vetor da *X. fastidiosa* causadora da doença de Pierce, a *Graphocephala cythura*.

3.1.2. Preparo dos diferentes meios de cultura e cultivo da bactéria

Os meios de cultura empregados no crescimento da bactéria utilizada nos ensaios de aquisição em dieta artificial foram o XFM sólido (ALMEIDA *et al.* 2004) e o XFM+ácido galacturônico (AG – monômero constituinte da pectina) (KILLINY & ALMEIDA, 2009). O ácido galacturônico tem sido usado no preparo do meio de cultura em decorrência da facilidade de sua utilização em comparação à pectina, uma vez basta adicionar o AG previamente dissolvido, ao meio de cultura. O meio de cultura PWG foi utilizado para manutenção da bactéria. A estirpe Temecula (causadora da doença de Pierce em videira) (VAN SLUYS *et al.* 2003) foi a utilizada nos experimentos. Para isso, *X. fastidiosa* foi crescida por 7 a 10 dias em meio de cultura sólido apropriado.

3.1.3. Cultivo e manutenção das colônias de inseto

Graphocephala atropunctata (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) – “blue-green sharpshooter” – BGSS e *Graphocephala cythura* (BALLMAN *et al.* 2011) (Fig. 3) foram os insetos utilizados nos experimentos. Cada colônia era composta por 40 a 50 insetos adultos em uma planta de manjeriço (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) contida em uma gaiola (Fig. 4). Para as colônias de *G. cythura*, que já estavam estabelecidas, a planta de manjeriço utilizada na manutenção dessas colônias foi substituída a cada duas semanas. Os insetos BGSS foram coletados em jardins da cidade de Berkeley e confinados em gaiolas.

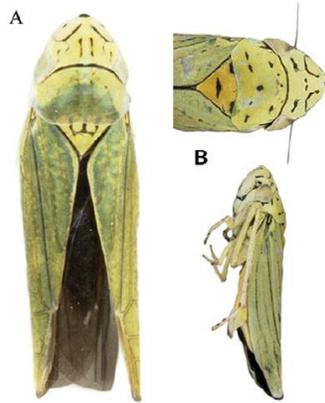


Figura 3. A - *G. cythura*, B - *G. atropunctata* (BALLMAN *et al.* 2011 adaptada).



Figura 4. Gaiolas utilizadas na manutenção e reprodução dos insetos vetores.

No caso do BGSS, os insetos adultos coletados nos jardins foram mantidos por 2 semanas em cada planta de manjeriçao para ovoposição. Após a retirada desses adultos, as plantas de manjeriçao utilizadas na ovoposição foram semanalmente trocadas para limpeza de possível contaminação com *X. fastidiosa* (KILLINY *et al.* 2012). Os adultos provenientes da ovoposição foram utilizados nos experimentos por estarem isentos da infecção por *X. fastidiosa*, uma vez que esse patógeno não é transmitido transovarianamente (FREITAG & FRAZIER, 1954).

3.1.4. Preparo das plantas para manutenção das colônias de inseto e para experimentos de transmissão

Para manutenção das colônias de inseto, sementes de manjeriçao foram plantadas a cada 2 semanas. Após esse período, as plântulas foram replantadas em vasos de 5 litros com substrato

Supersoil (Rod Mclellan Company, San Mateo, CA) e crescidas em casa de vegetação por mais duas semanas para que ficassem prontas para uso nas gaiolas.

Para os experimentos de transmissão foram utilizadas mudas dormentes de videira *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, livres de doenças, gentilmente providas pela “Foundation Plant Services” da Universidade da Califórnia, Davis. Duas bandejas com mudas de videira preenchidas com a mistura de perlita e vermiculita como substrato foram colocadas em câmara úmida para brotamento. Após desenvolvimento das raízes (5 a 6 semanas), as mudas com brotações foram transplantadas em potes quadrados de 10 cm preenchidos com o substrato Supersoil (RASHED *et al.* 2011).

3.1.5. Experimentos de aquisição/ transmissão

Células de *X. fastidiosa* foram crescidas por 7 a 10 dias nos meios XFM e XFM+AG (monômero da pectina), e ressuspensas na solução de dieta artificial (L-glutamina, 0.7 mM; L-asparagina, 0.1 mM; citrato de sódio, 1 mM; pH 6.4) (KILLINY & ALMEIDA, 2009). A suspensão celular final foi ajustada em 10^8 UFC/mL (OD600 = 0.25). Cada repetição continha 35µl da suspensão celular colocada em um frasco plástico de 1 cm de diâmetro, aberto nas duas extremidades e coberto com uma camada de parafilme esticado na abertura superior, sobre a qual foi depositada a suspensão celular, recoberta por outra camada de parafilme, permanecendo a extremidade inferior aberta. Foi utilizado um inseto por frasco, chamado aqui de sachê, pela extremidade aberta, que foi em seguida fechada com uma rolha (Fig. 5). Após um período de acesso à aquisição da *X. fastidiosa* de 4h a 20 °C, os insetos foram transferidos para manjericões para um período de acesso à colonização (variável). No caso dos experimentos de transmissão, os insetos foram transferidos para videiras (1 inseto por planta) para um período de acesso à inoculação de 24h. Os períodos de acesso à aquisição, colonização e inoculação podem ser variáveis de acordo com o interesse. Após 2 meses, foi feito o isolamento de *X. fastidiosa* das videiras utilizadas nos experimentos de transmissão, seguindo protocolos previamente estabelecidos (HILL & PURCELL, 1995).



Figura 5. Sachê utilizado na aquisição de *X. fastidiosa* em dieta artificial.

Abaixo, tabelas de 1 a 5 referentes aos experimentos realizados:

*NII – Número de insetos inicial

*PAA – Período de acesso à aquisição de 4 horas

*PAI – Período de acesso à inoculação de 24 horas

*PAC – Período de acesso à colonização (variável)

Tabela 1. Experimento 1. Aquisição por *G. cythura*

		XFM	XFM+AG
PAC em manjericões	Após PAA	15 insetos	15 insetos
	Após 3 dias	Todos vivos	Todos vivos
PAC em manjericões	Após PAA	15 insetos	15 insetos
	Após 10 dias	11 vivos	5 vivos

Tabela 2. Experimento 2. Aquisição e transmissão por *G. cythura* e BGSS

	<i>G. cythura</i>		BGSS	
	XFM	XFM+AG	XFM	XFM+AG
Transmissão - NII	12	12		12
Após PAA	9 vivos	10 vivos	-	11 vivos
Após PAI	5 vivos	6 vivos		10 vivos
Aquisição - NII	24	24	12	12
Após PAA	22 vivos	18 vivos	Todos vivos	Todos vivos
Após 3 dias de PAC	6 vivos	8 vivos	-	-
Após 7 dias de PAC	6 vivos	7 vivos	11 vivos	10 vivos

Tabela 3. Experimento 3. Aquisição e transmissão por *G. cythura* e BGSS

	<i>G. cythura</i>		BGSS	
	XFM	XFM+AG	XFM	XFM+AG
Transmissão - NII	12	12	-	12
Após PAA	6 vivos	8 vivos		12 vivos
Após PAI	2 vivos	5 vivos		Todos vivos
Aquisição - NII	12	12	12	12
Após PAA	7 vivos	9 vivos	12 vivos	12 vivos
Após 3 dias de PAC	5 vivos	5 vivos	-	-
Após 7 dias de PAC	6 vivos	5 vivos	11 vivos	4 vivos *

* Insetos desaparecidos

Tabela 4. Experimento 4. Diferentes tempos de aquisição por BGSS e *G. cythura*

		<i>G. cythura</i>		BGSS	
		XFM	XFM+AG	XFM	XFM+AG
NII	-		11	-	8
Após PAA (h)	2		10 vivos		8 vivos
NII	15		15	-	8
Após PAA (h)	3	11 vivos	14 vivos		8 vivos
NII	-		12	10	10
Após PAA (h)	4		11 vivos	Todos vivos	Todos vivos
	2	-	8 vivos	-	7 vivos
Após 5 dias de PAC	3	8 vivos	11 vivos		6 vivos
	4	-	10 vivos	6 vivos	Todos vivos

Tabela 5. Experimento 5. Aquisição e transmissão por *G. cythura* e BGSS

	<i>G. cythura</i>		BGSS	
	XFM	XFM+AG	XFM	XFM+AG
NII	20	20	-	-
Após PAA de 3:30h	14 vivos	16 vivos		
NII	-	-	15	15
Após PAA de 4h00	-	-	Todos vivos	Todos vivos
Após 3 dias de PAC	10 vivos	12 vivos	15 vivos	14 vivos
Após PAI	10 vivos	10 vivos	15 vivos	12 vivos

3.1.6. Extração de DNA dos insetos e detecção de *X. fastidiosa*

O início do procedimento da extração de DNA dos insetos utilizados nos experimentos consistiu da maceração dos insetos em equipamento Precellys 24 Lysis & Homogenization (Bertin Technologies) com uso de “beads” de metal e foi continuado utilizando-se o protocolo comercial do kit QIAGEN DNeasy Blood and Tissue.

O número de células bacterianas foi estimado utilizando-se uma curva padrão que correlaciona a quantidade de DNA bacteriano ao número de células (FRANCIS *et al.* 2006). A quantificação absoluta foi realizada utilizando-se SYBR Green Mix (Applied Biosystems) em equipamento termociclador real-time 7500 (Applied Biosystems) seguindo protocolo descrito por Daugherty *et al.* (2009). Os “primers” utilizados foram o HL5 e HL6 projetados por Francis *et al.* (2006).

Para avaliar o efeito de inibidores na PCR quantitativa, alíquotas de DNA de insetos livres de *X. fastidiosa* foram misturados com uma quantidade fixa do DNA bacteriano e utilizados em ensaios comparativos para determinar o nível de sensibilidade na detecção do DNA de *X. fastidiosa* assim como Francis *et al.* (2006)

3.2. IMPLEMENTAÇÃO DA AQUISIÇÃO DE *X. FASTIDIOSA* CAUSADORA DA CVC UTILIZANDO O SISTEMA DE DIETA ARTIFICIAL

3.2.1. Insetos utilizados

Foram utilizadas nos experimentos de aquisição de *X. fastidiosa* em dieta artificial cigarrinhas da espécie *Bucephalagonia xanthophis*. Essas foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. João Lopes da Esalq/USP para a realização de todos os experimentos.

3.2.2. Estirpe de *X. fastidiosa* e meios de cultura

Para os experimentos de aquisição foi utilizada a estirpe sequenciada 9a5c e os meios de cultura utilizados foram o PWG para manutenção e XFM e XFM+AG para os ensaios de aquisição, assim como realizado no estágio na UC Berkeley.

3.2.3. Aquisição de células de *X. fastidiosa* por dieta artificial

A metodologia utilizada foi a descrita por Killiny e Almeida (2009) e adaptada para as condições da estirpe testada, a 9a5c, a qual foi crescida por 10-15 dias em meio XFM

(ALMEIDA *et al.* 2004) e XFM+ácido galacturônico e o protocolo foi seguido como descrito anteriormente (Fig. 6). Foram utilizadas ao menos 10 repetições por tratamento para cada experimento realizado, sendo realizados 3 experimentos. Depois de um período de 4 horas de aquisição da bactéria a 24° C na luz, os insetos foram transferidos para plantas de manjeriço e mantidos por um período de acesso de 3 dias para multiplicação das células bacterianas que foram capazes de se aderir ao aparelho bucal e iniciarem a colonização.

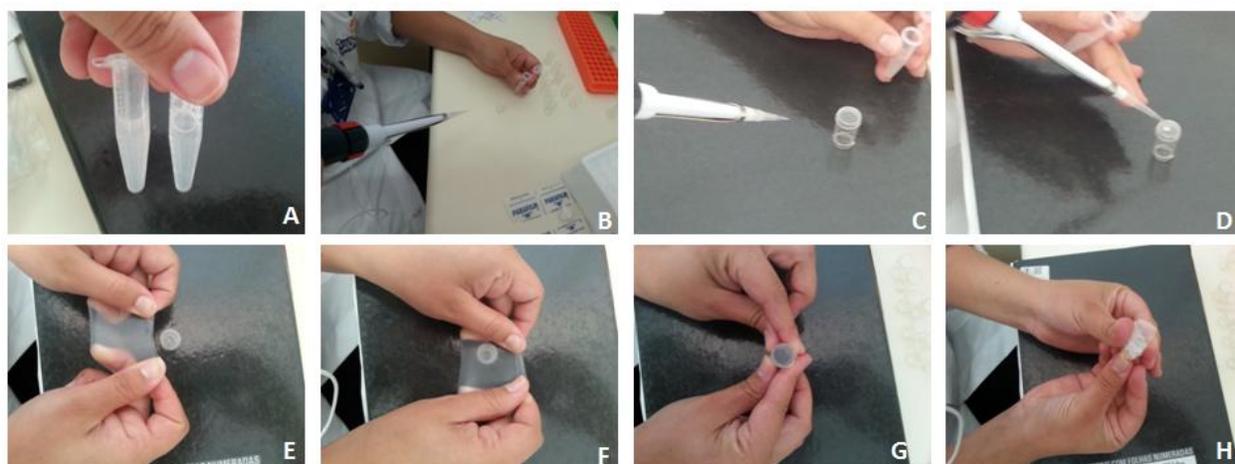


Figura 6. Etapas para o preparo dos sachês. A – células de *X. fastidiosa*, estirpe 9a5c, crescidas em meio XFM e XFM+AG por 10 dias, ressuspensas na solução de dieta artificial; B a H – preparo do sachê. Coloca-se a primeira camada de parafilme sobre o sachê, em seguida depositam-se os 35 µl da suspensão celular e então, coloca-se a segunda camada de parafilme sobre a suspensão, de modo a espalhar toda a gota sobre a superfície. Por fim, veda-se a abertura inferior com uma rolha após o inseto ter sido inserido.

Para análise da aquisição foi feita a extração de DNA dos insetos utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), conforme indicação do fabricante. O único ajuste da metodologia foi a maceração do inseto, utilizando o equipamento TissueLyser (Qiagen) e duas “beads” de metal de 3 mm por repetição, no tampão de lise do kit. Após extração prosseguiu-se a PCR com os primers RST31/33 (MISANVAGE *et al.* 1994) e CVC-1 e 272-2-int (POOLER & HARTUNG, 1995). Foram utilizados em média 300 ng de DNA total (DNA do inseto + possível DNA da bactéria) para a detecção. Utilizou-se o Master Mix Dream Taq 2X (Fermentas) e os respectivos primers na concentração de 0,3µM. A temperatura de anelamento utilizada foi de 55° C. A PCR foi então avaliada por corrida de eletroforese em gel de agarose 1% e revelada em fotodocumentadora, utilizando brometo de etídio como intercalante de DNA. Para análise de

aquisição foi contado o número de cigarrinhas positivas quanto à presença da bactéria e a porcentagem de positivos calculada em relação ao número total de insetos utilizados. Controles negativos (insetos com aquisição somente da dieta, sem células) e positivos (DNA da bactéria) foram utilizados para interpretação dos resultados obtidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O ESTÁGIO NA UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA EM BERKELEY

4.1.1. Estabelecimento da metodologia

Os insetos BGSS e *G. cythura* foram utilizados nos experimentos. *G. cythura* foi testada quanto à aquisição em dieta artificial por ser uma espécie próxima a *G. atropunctata* (BALLMAN *et al.* 2011) e portanto, um possível vetor de *X. fastidiosa*. A implementação da aquisição em dieta artificial para essa outra espécie de cigarrinha, a *G. cythura*, foi muito interessante e útil para o aprendizado da metodologia, pois mimetizou o estabelecimento de todo o processo que deveria ser feito para a implementação do sistema no Brasil.

Os experimentos mostraram que *G. cythura* é uma espécie mais sensível ao sistema de dieta artificial em comparação ao BGSS, uma vez que a mortalidade da primeira espécie foi maior (Tabela 7). Outro ponto importante observado foi o preparo dos sachês. Nos dois últimos experimentos realizados com as duas espécies, a mortalidade foi menor, indicando que o preparo cuidadoso dos sachês é essencial para o funcionamento correto do experimento, uma vez que a solução da dieta com as células de *X. fastidiosa* deve estar totalmente acessível aos insetos, e isso depende do quanto esticada está a camada de parafilme dos sachês.

*PAA – Período de acesso à aquisição de 4 horas

*PAI – Período de acesso à inoculação de 24 horas

*PAC – Período de acesso à colonização (variável)

Tabela 7. Taxa de sobrevivência dos insetos nos experimentos realizados expressa em porcentagem

Experimento		<i>G. cythura</i>		BGSS		
		XFM	XFM+AG	XFM	XFM+AG	
1. Aquisição	Após PAA	100%	100%	-	-	
	Após PAC	86.66%	66.66%			
2. Transmissão	Após PAA	75%	83%	-	91.66%	
	Após PAI	55.55%	60%		90.90%	
2. Aquisição	Após PAA	91.66%	75%	100%	100%	
	Após PAC	54.54%	83.33%	91.6%	83.33%	
3. Transmissão	Após PAA	50%	66.66%	-	100%	
	Após PAC	33.33%	62.5%	-	100%	
3. Aquisição	Após PAA	62.5%	75%	100%	100%	
	Após PAC	73.3%	55.5%	91.66%	33.33% *	
4. Aquisição		2h	-	90.9%	100%	
	Após PAA	3h	73.3%	93.33%	100%	
		4h	-	83.33%	100%	
		2h	-	88.88%	-	87.5%
	Após PAC	3h	72.72%	84.61%	-	75%
		4h	-	80%	75%	100%
5. Aquisição	Após PAA	70%	80%	100%	100%	
	Após PAC	71.42%	75%	100%	93.33%	
Transmissão	Após PAI	50%	50%	100%	80%	

* Insetos desaparecidos

Considerando que esta foi a primeira vez que o sistema de dieta artificial foi testado para a cigarrinha *G. cythura*, foi necessário testar algumas variáveis como o tempo de aquisição e a posição dos sachês.

No início, foi verificado que *G. cythura* apresentava maior mortalidade. Observando seu comportamento foi notado que esta espécie não era capaz de se manter em contato com a membrana de parafilme para se alimentar, os insetos logo que se aderiam à membrana já se desprendiam, caindo para a outra extremidade do sachê. Isso pode ter acontecido por diferentes motivos como comportamento ou morfologia da espécie por exemplo. Para solucionar esse problema, passou-se a posicionar os sachês invertidamente, ou seja, com a solução da dieta na extremidade inferior (Fig. 7). Dessa maneira, os insetos já ficavam em contato com a membrana de parafilme e passaram a se alimentar mais eficientemente, diminuindo a taxa de mortalidade.

O tempo de aquisição também foi testado. Nesses experimentos, normalmente 4 horas são suficientes para a aquisição da bactéria como demonstrado por Killiny *et al.* (2012). Uma vez que a mortalidade de *G. cythura* estava alta com 4 horas de acesso à aquisição, foram testados

diferentes tempos, embora após a mudança na posição dos sachês para a aquisição e o modo de preparo destes, foi observado que o tempo de aquisição não era o problema e então se passou a utilizar 3h30 ou 4h00 de acesso à aquisição.

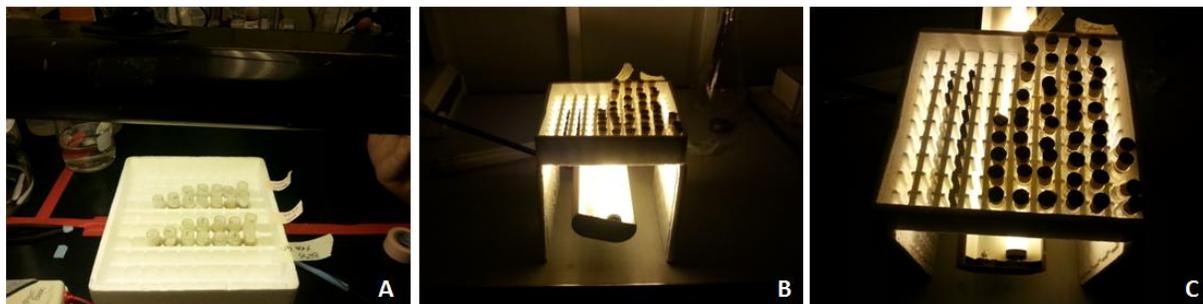


Figura 7. Diferentes posições dos sachês para o período de acesso à aquisição. A – aquisição por BGSS. Destaque para a posição dos sachês nos quais os insetos mimetizam a alimentação na parte inferior das folhas, permanecendo de abdome para cima. B e C – aquisição por *G. cythura*. Neste caso, a posição invertida dos sachês permitiu o contato dos insetos com a membrana de parafilme que continha a solução da dieta artificial com células de *X. fastidiosa*, uma vez que *G. cythura* aparentemente não foi capaz de permanecer em contato com a membrana para se alimentar na outra posição.

Para determinar qual a forma de avaliação dos insetos positivos para aquisição da bactéria foram realizados testes para a extração de DNA de *G. cythura* e a qPCR para quantificação das células de *X. fastidiosa*. Para tal, foram utilizados 6 insetos inteiros e outros 6 os quais tiveram suas cabeças retiradas para a extração de DNA, uma vez que na literatura já havia sido reportada a interferência na quantificação bacteriana quando se utiliza o inseto inteiro para a extração (BEXTINE *et al.* 2004).

O método de extração do DNA testado foi eficiente, resultando em bom rendimento e pureza do DNA extraído tanto do inseto inteiro quanto somente da cabeça (dados não mostrados). Além disso, foi testada a concentração ótima de DNA do inseto adicionada de DNA de *X. fastidiosa* para a quantificação bacteriana por qPCR. Essa avaliação foi feita utilizando DNA do inseto (inteiro e somente a cabeça separadamente) padronizado em 100 ng por reação, ao qual foi adicionado DNA bacteriano em concentrações crescentes de 1 a 10^7 células (curva padrão), comparando a eficiência de detecção nessa condição à eficiência da curva padrão diluída em água. Não foi verificada diferença na eficiência de detecção entre o DNA de insetos

inteiros e somente a cabeça, portanto, optou-se por utilizar os insetos inteiros para a extração de DNA (dados não mostrados).

A concentração ótima de DNA do inseto para detecção de células bacterianas também foi testada. Nesse caso, foi observado que quanto mais DNA do inseto na reação, menos eficiente foi a detecção de *X. fastidiosa*, como pode ser observado nos gráficos abaixo (Fig. 8).

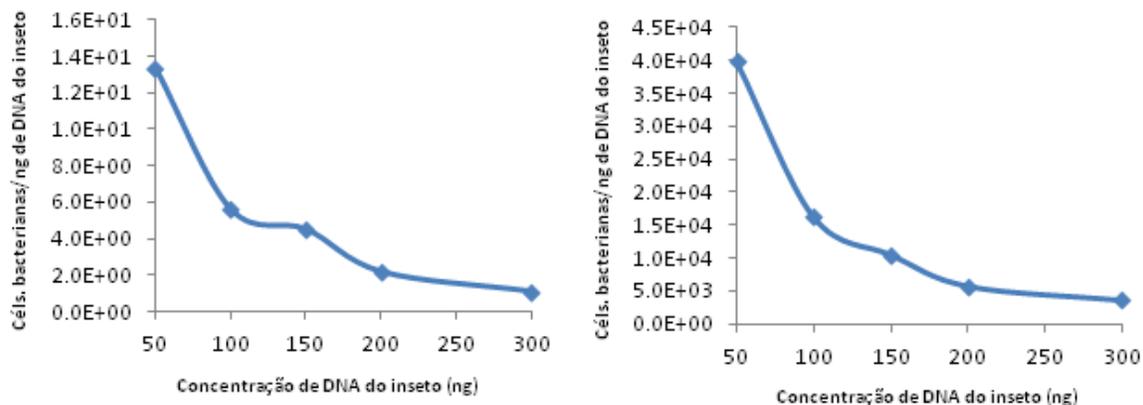


Figure 8. Gráficos de detecção de células de *X. fastidiosa* em função da concentração de DNA do inseto. Em ambos os gráficos pode-se observar a perda da sensibilidade na detecção de células bacterianas com o aumento da concentração do DNA do inseto. Esquerda – DNA bacteriano na concentração de 10^2 células. Direita – DNA bacteriano na concentração de 10^5 células.

Após os testes de extração de DNA dos insetos e quantificação de *X. fastidiosa* por qPCR foi definido que seriam utilizados 50 ng do DNA de inseto extraído por reação correlacionado à curva de dissociação da corrida de qPCR, uma vez que foi observado um pico de amplificação inespecífico em algumas reações (dados não mostrados).

Desse modo, foram consideradas positivas as amostras que tiveram ao menos 100 células bacterianas detectadas (considerando que o limite de detecção de células bacterianas nas condições utilizadas na reação, segundo a curva padrão utilizada, foi de 100) e quando a amplificação ocorreu na mesma temperatura de dissociação da amplificação da curva padrão utilizada.

4.1.2. Aquisição/ transmissão por *G. cythura*

Dentre os experimentos com *G. cythura*, a alta mortalidade dos insetos inviabilizou a análise de alguns deles. A alta mortalidade cria um viés nos dados tornando os resultados não verdadeiros. Apesar disso, a transmissão foi avaliada para as videiras do experimento 2, sendo: para BGSS-XFM a transmissão foi de 0% e para BGSS-XFM+AG foi de 72,7% ao passo que para *G. cythura*-XFM foi também de 0% e *G. cythura*-XFM+GA foi de 30%. Esse resultado sugere baixa eficiência de inoculação de *G. cythura* como vetor utilizando esse sistema.

Sessenta insetos foram utilizados no total do experimento 1, sendo 30 para aquisição de células crescidas em XFM e 30 em XFM+GA. O número de insetos iniciais, mortos após aquisição e inoculação, assim como insetos desaparecidos para cada experimento podem ser verificados nas tabelas de 1 a 5, no tópico material e métodos. Após o período de acesso à aquisição de 4 horas na posição original dos sachês, ou seja, aquela na qual o inseto fica com o abdome para cima, nenhum dos insetos havia morrido, entretanto, muitos deles estavam quase mortos. No primeiro experimento já foi possível observar a limitação desta espécie para permanecer em contato com a membrana de parafilme nessa posição. Foi observado que os insetos não eram capazes de se fixar à membrana e dessa forma, não paravam de cair e tentar se alimentar novamente. Após o período de acesso à aquisição os insetos foram colocados separadamente em manjericões (XFM e XFM+AG), onde foram deixados por 3 dias para a primeira coleta (metade dos insetos) e 10 dias para a segunda coleta (a outra metade).

Esse período em manjericões é chamado de período de acesso à colonização, no qual as bactérias se aderem ao pré-cibário e cibário dos insetos vetores e iniciam a formação do biofilme. A evolução da colonização dos insetos vetores depende da espécie do inseto e da estirpe de *X. fastidiosa* (ALMEIDA & PURCELL, 2006). Em geral, como pode ser observado na tabela 7, *G. cythura* é mais sensível ao sistema de dieta artificial, mostrando menor taxa de sobrevivência dos insetos após as diferentes etapas do processo.

Após todos os testes de extração de DNA e detecção da bactéria por qPCR, foi realizado o primeiro experimento (1 – tabela 1) para avaliar o comportamento de *G. cythura* nos sachês. Os resultados obtidos foram: 13% de aquisição de células crescidas em XFM e 37% em XFM+AG, com média de 182 e 69 células/ng de DNA do inseto vetor, respectivamente. Apesar de ter sido observada maior eficiência de aquisição nos insetos que se alimentaram na dieta com células crescidas em XFM+AG, assim como observado por Killiny & Almeida (2009), ainda

assim a taxa se mostrou bem menor quando comparada a outros estudos utilizando BGSS, os quais variam entre 60 a 90% (KILLINY & ALMEIDA, 2009; KILLINY *et al.* 2012). Porém, como já discutido anteriormente, após a mudança no preparo e posição dos sachês, foi observado que a taxa de aquisição para *G. cythura* aumentou.

O resultado do primeiro experimento mostrou que *G. cythura* é capaz de adquirir células de *X. fastidiosa* em dieta artificial.

No último experimento (5) já estava sendo utilizada a posição invertida do sachê para a aquisição e conseqüentemente, a taxa de mortalidade foi menor (Tabela 7). Nesse experimento os sachês foram cuidadosamente preparados, uma vez que foi observado que essas duas variáveis tinham alta influência nos resultados para aquisição de *X. fastidiosa* em dieta artificial por *G. cythura*. Os resultados para esse experimento foram: aquisição da bactéria crescida em XFM por BGSS de 20% e 57% por essa mesma espécie para XFM+AG e para *G. cythura* foi também de 20% para XFM e 83% para XFM+AG, mostrando taxas de aquisição bem maiores em comparação com o primeiro experimento para esta espécie de cigarrinha.

As taxas de aquisição e transmissão dependem de diferentes fatores como preferência do local de alimentação do inseto (partes jovens ou mais velhas da planta) (DAUGHERTY *et al.* 2010), tempo de alimentação na planta (ALMEIDA & BACKUS 2004; BACKUS *et al.* 2005), nível de infecção da planta (população bacteriana) (HILL & PURCELL, 1997), fatores esses que são eliminados quando se utiliza a aquisição em dieta artificial, uma vez que, se tem o controle das condições do experimento.

Com esses experimentos foi possível concluir que a espécie de cigarrinha *G. cythura* é uma nova espécie capaz de adquirir células de *X. fastidiosa* em dieta artificial e transmiti-la à videira.

4.2. ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA DE DIETA ARTIFICIAL COM CIGARRINHAS VETORAS DA *XYLELLA FASTIDIOSA* CAUSADORA DA CVC

Desde o cultivo da bactéria em meio definido, XFM e XFM+AG, necessário para a transmissão da bactéria em dieta artificial (KILLINY & ALMEIDA, 2009), notamos um crescimento menos vigoroso da estirpe 9a5c quando comparado às estirpes de PD, muito provavelmente devido às suas particularidades fenotípicas e genotípicas selecionadas ao longo da sua co-evolução com seus respectivos hospedeiros, videira (PD) e citros (CVC). Particularmente

entre os meios XFM e XFM+AG, também não foi observado diferença no crescimento da bactéria, o que acontece claramente para a estirpe de PD - Temecula (KILLINY & ALMEIDA, 2009). Isso se dá muito provavelmente devido à possível falta da função da poligalacturonase - *pglA* (SIMPSON *et al.* 2000), enzima responsável pela degradação da pectina, cuja sequência do gene está em “frameshift” nos genomas das estirpes de citros utilizadas neste estudo. Uma vez que o XFM é um meio definido (ALMEIDA *et al.* 2004) e a adição de ácido galacturônico (monômero constituinte da pectina), que mimetiza parte da composição das paredes celulares vegetais (CARPITA & GIBEAUT, 1993) seria substrato específico para essa enzima – PglA, e como as estirpes de citros muito provavelmente não produzem essa enzima funcional, essa molécula específica não está sendo utilizada e por isso não verificamos um crescimento mais vigoroso para o meio XFM+AG (dados não mostrados).

4.2.1. Experimentos de aquisição em dieta artificial

Os três primeiros experimentos, de implementação do sistema, foram realizados com a cigarrinha vetor da CVC, *Bucephalonia xanthophis* (YAMAMOTO *et al.* 2001). O delineamento experimental, bem como o número de insetos após os respectivos períodos de acesso à aquisição (PAA) e de acesso à colonização (PAC), estão descritos nas tabelas de 8 a 10.

Tabelas 8 a 10. Delineamento experimental e número de insetos após cada etapa do experimento.

*PAA – Período de acesso à aquisição de 4 horas

*PAC – Período de acesso à colonização (variável)

Tabela 8. Experimento I

Tratamentos	Número inicial	Mortos após PAA (4 horas)	Número final avaliado após PAC
XFM	15	8	15 dos quais 9 mortos
XFM+AG	18	3	16 dos quais 3 mortos
CN	4	2	4 dos quais 2 mortos

Tabela 9. Experimento II

Tratamentos	Número inicial	Mortos após PAA (4 horas)	Número final avaliado após PAC
XFM	10	-	10 todos vivos
XFM+AG	10	-	10 todos vivos
CN	4	1	4 dos quais 1 morto

Tabela 10. Experimento III

Tratamentos	Número inicial	Mortos após PAA (4 horas)	Número final avaliado após PAC
XFM	13	2	13 dos quais 4 mortos
XFM+AG	14	2	14 dos quais 3 mortos
CN	2	1	2 dos quais 1 morto

*CN – **Controle Negativo:** insetos alimentados somente com a solução da dieta

Nos experimentos de aquisição utilizando a metodologia da dieta artificial não houve nenhum problema ao qual não se pode solucionar. Desde o cultivo da bactéria em meio definido, que apesar de não tão vigoroso como para a estirpe de PD-Temecula, porém com crescimento, até o comportamento dos insetos nos sachês de aquisição, que aparentemente não foi tão estressante aos insetos, a decorrência da metodologia conforme aprendida na UC Berkeley, foi implementada com sucesso, e por fim, obtivemos insetos com aquisição da bactéria em dieta artificial, alcançando o objetivo principal do trabalho (Fig. 9; Tabela 11).

Os três experimentos de aquisição foram realizados com a estirpe 9a5c. Para avaliação dos experimentos, foi definido que seriam considerados positivos os insetos que apresentassem amplificação do fragmento do genoma bacteriano quando submetidos à PCR com dois pares de “primers” diferentes, o CVC-1/272-2-int (POOLER & HARTUNG, 1995) e o RST31/33 (MISANVAGE *et al.* 1994) independentemente. A figura 9 mostra o resultado do experimento I de aquisição avaliado por PCR, a qual foi realizada com dois pares de “primers” diferentes para detecção de *X. fastidiosa*. Obteve-se 5 insetos positivos dentre 15 testados para o tratamento XFM (amostras 1-1, 1-4, 1-5, 1-6 e 2-1) e 2 para o XFM+AG dentre 16 testados (2-8 e 2-10).

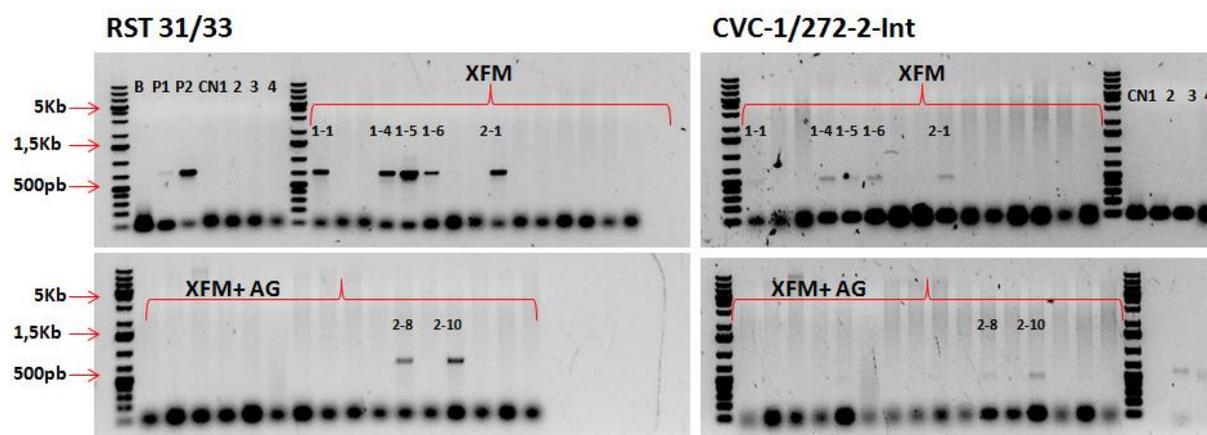


Figura 9. Resultados do experimento I de aquisição em dieta artificial para cigarrinhas *Bucephalagonia xanthophis*. À esquerda – resultado da PCR com os “primers” RST31/33 (banda esperada de 700 pb) na qual B – branco (mix sem DNA); P1 e P2 – controles positivos; CN1; 2; 3 e 4 – controles negativos 1, 2, 3 e 4 para os “primers” RST31/33. Em destaque as amostras que tiveram amplificação e os dois tratamentos avaliados (XFM e XFM+AG). À direita – resultado da PCR com os “primers” CVC-1/272-2-int (banda esperada de 500 pb).

O experimento de aquisição de *X. fastidiosa* em dieta artificial foi realizado 3 vezes, utilizando a estirpe 9a5c crescida nos meios XFM e XFM+AG. A tabela 11 apresenta o número de positivos para cada experimento em relação ao número total de insetos avaliados por tratamento e por experimento, bem como as taxas de aquisição expressas em porcentagem.

Tabela 11. Resultados dos três experimentos de aquisição em dieta artificial realizados.

Experimento	Tratamento	Número de positivos em relação ao total	Taxa de aquisição em porcentagem
I	XFM	5/ 15	33%
	XFM+AG	2/ 16	12%
II	XFM	4/ 10	40%
	XFM+AG	4/ 10	40%
III	XFM	3/ 13	23%
	XFM+AG	1/ 14	7%

As porcentagens de aquisição em dieta artificial com células de *X. fastidiosa* que infecta citros ficaram em torno de 32% para XFM e 20% para XFM+AG, que ficou dentro da faixa do que já foi constatado para a transmissão, que geralmente varia de 1% a 30% para os vetores da CVC em condições naturais (MARUCCI *et al.* 2008; LOPES & KRUGNER, 2013). Ainda não

existem dados na literatura de taxas de aquisição para estirpes de *X. fastidiosa* causadora da CVC em sistema de dieta artificial, pois até o momento, trabalhou-se somente com experimentos utilizando plantas fonte como inóculo para a aquisição da bactéria pelos insetos (MARUCCI *et al.* 2008).

Quando se compara as taxas de aquisição em dieta artificial obtidas para *G. cythura* (XFM-20% e XFM+AG-83%) e *G. atropunctata* (XFM-20% e XFM+AG-57%) durante estágio nos Estados Unidos, ambas vetores de *X. fastidiosa* causadora de PD, observa-se taxas de aquisição bem maiores para ambas em relação à *Bucephalagonia xanthophis* (XFM-32% e XFM+AG-20%), vetor da *X. fastidiosa* causadora da CVC. Apesar da menor taxa de aquisição em dieta artificial, os dados estão de acordo com o que se encontra naturalmente para a transmissão das diferentes estirpes, uma vez que vetores das estirpes causadoras de PD transmitem a taxas de 90% em média (HILL & PURCELL, 1995) e os vetores das estirpes causadoras da CVC ficam em torno de 30% (MARUCCI *et al.* 2008).

Tratando-se especificamente desta espécie de cigarrinha, *Bucephalagonia xanthophis*, em trabalho anterior foram verificadas taxas de transmissão de 5% para citros e 3,5% para café (MARUCCI *et al.* 2008), o que comparado aos resultados obtidos para aquisição em dieta artificial deste trabalho, mostra a provável maior eficiência de aquisição quando em sistema de dieta artificial.

Em relação às taxas de aquisição entre os meios XFM e XFM+AG, não houve diferença significativa na aquisição em meio adicionado do monômero da pectina, diferente do encontrado para transmissão da estirpe de PD-Temecula no trabalho de Killiny e Almeida (2009), onde a degradação da pectina (ou seu monômero) aumentou as taxas de aquisição. Considerando o que foi encontrado nos nossos experimentos, pode-se sugerir que a regulação gênica das estirpes de citros necessária para a aquisição pode ser diferente da requerida para estirpes de videira, uma vez que estas possuem a poligalacturonase funcional (ROPER *et al.* 2007), e, portanto, poderiam utilizar a degradação da pectina como sinal biológico para mudanças transcricionais, ao passo que para as estirpes de citros, que possuem a sequência da poligalacturonase em “frameshift” (SIMPSON *et al.* 2000) e muito provavelmente não funcional, essas poderiam ter sofrido seleção para utilizar outras moléculas sinalizadoras afim de promover sua dispersão. Dessa forma a aquisição em sistema de dieta artificial no patossistema CVC poderia ser ainda melhorada,

utilizando fontes de carbono alternativas como a celulose, o glucano e xilano, por exemplo, os quais a bactéria tem enzimas funcionais para sua degradação.

Por fim, os resultados obtidos mostraram que a espécie de cigarrinha *Bucephalagonia xanthophis*, vetor da *X. fastidiosa* causadora da CVC, é capaz de adquirir a bactéria em sistema de dieta artificial. A implementação desse protocolo para o patossistema CVC constitui um importante passo para impulsionar estudos de interação vetor-patógeno e transmissão da *X. fastidiosa* - CVC. Abrem-se perspectivas para o estudo do papel de diferentes fontes de carbono na aquisição da bactéria pelo vetor e eficiência de transmissão de diferentes estirpes de *X. fastidiosa* selvagens e mutantes.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Foi obtida estirpe patogênica de citros transformada com GFP, o que possibilitou o estudo da colonização *in planta*. Observou-se que características morfológicas como a formação de agregados celulares e produção de EPS totais podem estar relacionadas à eficiência de transformação de *X. fastidiosa* pelo método de eletroporação.

Foi possível o estudo da colonização de *X. fastidiosa in planta* utilizando a estirpe modificada com GFP nos diferentes genótipos de resposta contrastante à CVC e esse estudo revelou um possível mecanismo de resistência, no qual a colonização do caule de genótipos suscetíveis mostrou um padrão onde a bactéria é capaz de se mover vasolateralmente e se espalhar pelo xilema secundário, o que não ocorreu no caule de genótipos resistentes, nos quais a bactéria permaneceu somente no xilema primário, se mostrando incapaz de colonizar o hospedeiro resistente.

O protocolo de aquisição de *X. fastidiosa* causadora da CVC por cigarrinhas vetores em dieta artificial foi implementado com sucesso. O estabelecimento deste protocolo constitui importante passo para o progresso no conhecimento da interação vetor-patógeno dentro do patossistema CVC.

6. REFERÊNCIAS:

1. Almeida, R.P.P. and Purcell, A.H. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). J. Econ. Entomol. 96:264–71.
2. Almeida RPP, Mann R, Purcell AH. 2004. *Xylella fastidiosa* Cultivation on a Minimal Solid Defined Medium. Current Microbiology. 48:368–372.
3. Almeida RPP, Backus EA. 2004. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Say) EPG waveform characterization and quantification. Ann. Entomol. Soc. Am. 97:838–851.
4. Almeida RPP, Blua MJ, Lopes JRS, Purcell AH. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. Ann. Entomol. Soc. Am. 98:775–786.
5. Almeida RPP, Purcell AH. 2006. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization on the precibarium of sharpshooter vectors relative to transmission to plants. Ann. Entomol. Soc. Am. 99:884–890.
6. Almeida RPP, Coletta-Filho HD, Lopes JRS. 2014. *Xylella fastidiosa*. In: Manual of Security Sensitive Microbes and Toxins. Ed. Liu, D. CRC Press, 884:841-850. ISBN: 9781466553965.
7. Alves E, Leite B, Pascholati SF, Ishida ML, Andersen PC. 2009. *Citrus sinensis* Leaf Petiole and Blade Colonization by *Xylella fastidiosa*: Details of Xylem Vessel Occlusion. Sci. Agric. 66:218-224.
8. Ballman ES, Rugman-Jones PF, Stouthamer R, Hoddle MS. 2011. Genetic Structure of *Graphocephala atropunctata* (Hemiptera: Cicadellidae) Populations Across Its Natural Range in California Reveals Isolation by Distance. J. Econ. Entomol. 104:279-287.
9. Bextine B, Tuan SJ, Shaikh H, Blua M, Miller TA. 2004. Evaluation of Methods for Extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the Glassy-Winged Sharpshooter. J. Econ. Entomol. 97:757-763.
10. Backus EA, Habibi J, Yan F, Ellersieck M. 2005. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implication for transmission of *Xylella fastidiosa*. Ann. Entomol. Soc. 98:787–813.

11. Blua MJ, Perring TM. 1992. Alatae production and population increase of aphid vectors on virus-infected host plants. *Oecologia* 92:65–70.
12. Brisson D, Dykhuizen DE, Ostfeld RS. 2008. Conspicuous impacts of inconspicuous hosts on the Lyme disease epidemic. *Proc. R. Soc. London Ser B* 275:227–235.
13. Camilli A, Bassler BL. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311:1113–1116.
14. Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-10.
15. Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S. 2008. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:243–271.
16. Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE. 2008B. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:2670–2675.
17. De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Yanai GM, Muto NH, Costa de Oliveira R, Nunes LR, Machado MA. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 237: 341-353.
18. Damsteegt VD, Brlansky RH, Phillips PA, Roy A. 2006. Transmission of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis, by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *Plant Dis.* 90:567-570.
19. Daugherty MP, Bosco D, Almeida RPP. 2009. Temperature mediates vector transmission efficiency: inoculum supply and plant infection dynamics. *Ann. Appl. Biol.* 155:361–369.
20. Daugherty MP, Lopes JRS, Almeida RPP. 2010. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. *Ecol. Entomol.* 35:360-366.
21. Francis M, Lin H, Cabrera-La Rosa J, Doddapaneni H, Civerolo EL. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 115:203–213.

22. Freitag JH, Frazier NW. 1954. Natural infectivity of leafhopper vectors of Pierce's disease virus of grape in California. *Phytopathology* 44:7-11.
23. Froissart R, Michalakis Y, Blanc S. 2002. Helper component transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathology* 92:576–579.
24. Grant MR, Jones JDG. 2009. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324:750–752.
25. Gubler DJ. 2008. The global threat of emergent/ reemergent vector-borne diseases. In *Vector borne diseases: understanding the environmental, human health, and ecological connections*. The National Academies Press, Washington, DC, p. 43–64.
26. Hill BL, Purcell AH. 1995. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85: 209–212.
27. Hill BL, Purcell AH. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87:1197–201.
28. Hickel ER, Ducroquet JPHJ, Leite Jr RP, Leite RMVBC. 2001. Fauna de Homoptera: Auchenorrhyncha em pomares de ameixeira de Santa Catarina. *Neotropical Entomology* 30:725-729.
29. Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:327–359.
30. Killiny N, Almeida RPP. 2009. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial plant pathogen. *PNAS* 106: 22416–22420.
31. Killiny N, Almeida RPP. 2009 (B). *Xylella fastidiosa* Afimbrial Adhesins Mediate Cell Transmission to Plants by Leafhopper Vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 521-528.
32. Killiny N, Rashed A, Almeida RPP. 2012. Disrupting the Transmission of a Vector-Borne Plant Pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:638–643.

33. Killiny N, Almeida RPP. 2014. Factors Affecting the Initial Adhesion and Retention of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa* in the Foregut of an Insect Vector. *Applied and Environmental Microbiology* 80:420–426.
34. Krugner R, Lopes MTVC, Santos JS, Beretta MJG, Lopes JRS. 2000. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists. 13-18 September 1998, Campinas, SP, Brazil. Proceedings. p 423.
35. Lopes JRS. 1996. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. *Laranja* 17:79-92.
36. Lopes JRS, Daugherty MP, Almeida RPP. 2009. Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. *Entomol. Exp. Appl.* 131:216–224.
37. Lopes JRS, Krugner R. 2013. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*, *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*, J.K. Brown (ed.), APS Press, Saint Paul, MN, pp. xx–xx.
38. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. 2012. Review Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:614–629.
39. Marucci RC, Lopes JRS, Cavichioli RR. 2008. Transmission Efficiency of *Xylella fastidiosa* by Sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in Coffee and Citrus. *J. Econ. Entomol.* 101:1114-1121.
40. Misanvage GV, Thompson CM, Hoopkins DL, Leite RMVBC, Stall RE. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84:446-461.
41. Nault LR. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:521–541.

42. Newman KL, Almeida RPP, Purcell AH, Lindow SE. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:1737–1742.
43. Ng JCK, Falk BW. 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:183–212.
44. Paião FG, Meneguim AM, Casagrande EC, Leite Jr RP. 2002. Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 27:67.
45. Pooler MR, Hartung JS. 1995. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381.
46. Power AG. 1996. Competition between viruses in a complex plant-pathogen. *Ecology* 77:1004–1010.
47. Pruzzo C, Vezzulli L, Colwell RR. 2008. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 10:1400–1410.
48. Purcell AH, Finlay A. 1979. Evidence for non-circulative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology* 69:393–395.
49. Purcell AH. 1989. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In K. F. Harris [ed.], *Advances in disease vector research* 6:243-266.
50. Purcell AH. 1997. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? *J. Plant Pathol.* 79:99-105.
51. Rashed A, Killiny N, Kwan J, Almeida RPP. 2011. Background matching behavior and pathogen acquisition: plant site preference does not predict the bacterial acquisition efficiency of vectors. *Arthropod-Plant Interact* 5:97–106.
52. Roberto SR, Coutinho A, Lima JEO, Miranda VS, Carlos EF. 1996. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros, *Fitopatol. Bras.*, 21:517-518.

53. Roper MC, Greve LC, Warren GJ, Labavitch JM, Kirkpatrick BC. 2007. *Xylella fastidiosa* Requires Polygalacturonase for Colonization and Pathogenicity in *Vitis vinifera* Grapevines. *MPMI* 20:411–419.
54. Schild S, Tamayo R, Nelson EJ, Qadri F, Calderwood SB, Camilli A. 2007. Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholera* after release into the environment. *Cell Host Microbe* 2:264–277.
55. Severin HHP. 1949. Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers, *Hilgardia* 19: 190.
56. Simpson AJG, Reinach FC, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151–59.
57. Van Sluys MA, De Oliveira MC, Monteiro-Vitorello CB, Miyaki CY, Furlan LR *et al.* 2003. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J. Bacteriol.* 185:1018 –1026.
58. Yamamoto PT, Pria Júnior WD, Roberto SR, Felipe MR, Freitas EP. 2001. Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. *Neotropical Entomology* 30:175–177.
59. Yamamoto PT, Roberto SR, Pria Jr WD, Felipe MR, Miranda VS, Teixeira DC, Lopes JRS. 2002. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathol.* 28:178-181.

