

QUANTIFICAÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* POR PCR QUANTITATIVO EM PLANTAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

Luciana Vieira Beja¹; Daiene Souza Santos², Regina Costa de Oliveira³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: lucianabeja@gmail.com¹

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail:

daiene_ss@yahoo.com.br²

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br³

Área do Conhecimento: Genética de microrganismos

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*, PCR quantitativo, Clorose Variegada de Citros

INTRODUÇÃO

A *Xylella fastidiosa* (Xf.) é uma bactéria aflagelada, gram-negativa, presente no xilema de uma gama de hospedeiros que inclui pelo menos 28 famílias de mono e dicotiledôneas. Esta bactéria infecta e causa doenças em diversas plantas como alfafa (*Medicago sativa* L.), ameixeira (*Prunus saliciana* Lindl), citros (*Citrus* ssp.), pessegueiro (*Prunus perispermica* L.), videira (*Vitis vinifera* L.) e café (*Coffea* ssp.) (YORINORI *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2002). O isolado 9a5c, que infecta citros, foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado, devido a sua importância socioeconômica na citricultura nacional. Foi detectada pela primeira vez em 1987 no norte do estado de São Paulo nos pomares do Triângulo Mineiro. (SOUZA *et al.*, 2003; WENDLAND *et al.*, 2001; YORINORI *et al.*, 2003). A Clorose Variegada de Citros (CVC) é uma doença causada pela *Xylella fastidiosa* que acomete primeiramente as folhas da copa, levando ao surgimento de manchas amarelas na parte ventral e lesões cor de palha na parte dorsal das folhas. Por esse motivo, essa doença em citros também recebe o nome popular de amarelinho. Outro sintoma é o amadurecimento precoce dos frutos, tornando-os duros e pequenos, queimados do sol e perdendo assim seu valor comercial. Esses sintomas são causados por estresse hídrico que é causado pela oclusão vascular devido à formação de biofilme, goma, tilose e matriz exopolimérica. A maneira pela qual a doença se estabelece e evolui a partir do ponto de infecção ainda não está elucidada, assim como a relação entre quantidade de bactérias no xilema e severidade dos sintomas. Essa doença também pode ser transmitida através de enxertos contaminados ou por insetos vetores, da subfamília Cicadellinae e Cercopidae, conhecidos popularmente como cigarrinha, que se alimentam da seiva do xilema. (SOUZA *et al.*, 2003; COLETTA-FILHO *et al.*, 2001)

OBJETIVOS

Este projeto tem por objetivo a implementação de uma plataforma para detectar, através de PCR quantitativo em tempo real, a presença de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Citrus sinensis* para monitoramento do processo de infecção após inoculação experimental em plantas jovens.

METODOLOGIA

Primeiramente, células de *X. fastidiosa*., da linhagem 9a5c foram crescidas em meio PW para construir uma curva de crescimento com base nos valores de densidade óptica (DO₆₀₀) e na contagem de células que foi realizada, com o auxílio de uma câmara de Neubauer, em três momentos do crescimento bacteriano: fase inicial, fase exponencial e estacionária. O DNA das bactérias cultivadas em laboratório foi extraído, para construção de uma curva padrão e para simular as condições àquelas encontradas em amostras de plantas infectadas e um ramo de *Citrus sinensis* foi coletado, esterilizado, e triturado em Nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino, e então foi adicionado uma suspensão contendo 10⁷ células de *X. fastidiosa* com DO₆₀₀ = 0,175. Foram realizadas três inoculações em três lotes diferentes de mudas de *Citrus sinensis* com culturas de *X. fastidiosa* 9a5c, com poucas passagens em meio de cultura e mantidas em meio PW por 6 dias. Gotas de 20 µl da suspensão bacteriana foram aplicadas de 3 a 4 pontos do caule da planta com a mesma deitada. Em seguida, com o auxílio de agulhas de insulina, foram feitos pequenos furos, na região da gota, na epiderme da planta, sem perfurá-la. Diluições do DNA controle, obtido na extração, variando de 1000 a 0,0001 ng/µl, foram utilizadas para a construção da curva padrão para as reações de Real Time qPCR com o reagente SYBR[®] Green e com a sonda TaqMan[®], ambas fabricadas pela Applied Biosystems. Para a extração de DNA das bactérias das plantas infectadas experimentalmente, aproximadamente 20 folhas de *Citrus sinensis* assintomáticas foram coletadas, esterilizadas e trituradas com Nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino e então foram adicionados os tampões adequados para que tal reação ocorra. E então, o material extraído foi concentrado a 100 ng/µl, para as reações de Real Time qPCR com o reagente SYBR[®] Green.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas infectadas, como descrito anteriormente, começaram a apresentar sintomas de CVC depois de 4 meses da inoculação experimental, o que indica sucesso no procedimento. Até o presente momento foram realizadas duas extrações de plantas infectadas experimentalmente, a primeira 4 meses após a primeira inoculação e, a outra, 5 meses após a primeira inoculação. Com base nos dados analisados, pôde-se verificar um aumento populacional de *X. fastidiosa*, estando assim de acordo com estudos anteriores que demonstraram uma maior concentração de bactérias em folhas infectadas há mais tempo. (MACHADO et al., 1997), o que pode também estar intimamente associado ao desenvolvimento da doença CVC (OLIVEIRA et al., 2002). O crescimento populacional de *X. fastidiosa* detectado em regiões diferentes do xilema está representado na Figura 1, onde se pôde verificar um aumento populacional de *X. fastidiosa* no xilema das folhas de *Citrus sinensis* de acordo com o envelhecimento das plantas (inoculação 1). Nas inoculações 2 e 3 houve uma diminuição populacional de *X. fastidiosa*, podendo ter sido causado em função de baixa amostragem da população ou extração ineficiente. Outro aspecto verificado foi a alta evidência de sintomas nas mudas da segunda inoculação em comparação com as demais, o que corrobora estudos realizados por Lacava e colaboradores (2004), os quais demonstraram que em plantas sintomáticas a população de *X. fastidiosa* é maior que em plantas assintomáticas.

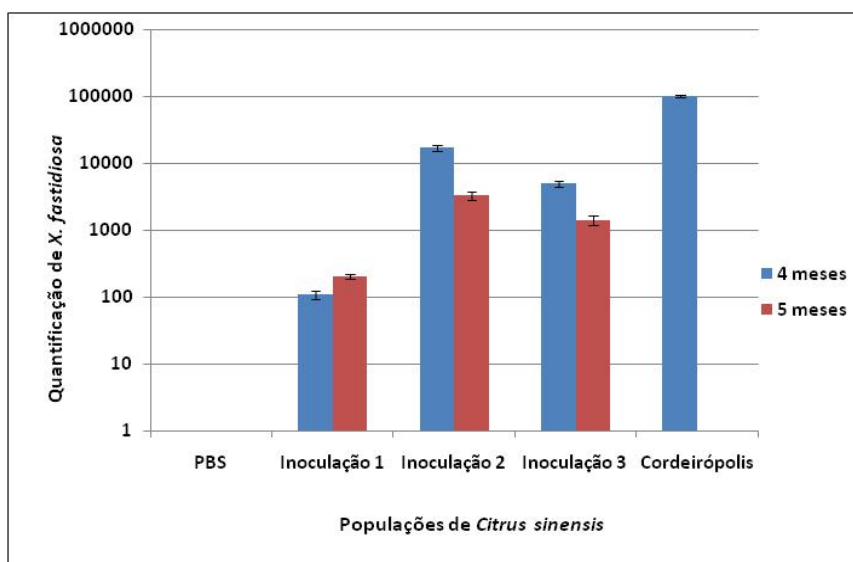


Figura 1: **Quantificação de *X. fastidiosa* em plantas ao longo do tempo:** Mudanças jovens de *Citrus sinensis* foram infectadas em três experimentos separados, identificados como inoculação 1, 2 e 3. Após 4 e 5 meses de infecção, foi extraído o DNA total de 150 mg de pecíolo e nervura foliar e realizadas reações de qPCR em Tempo Real, para quantificação da bactéria *X. fastidiosa*. Em plantas inoculadas apenas com PBS não houve detecção de *X. fastidiosa*; nas plantas da inoculação 1, no período de um mês houve um aumento populacional da bactéria, o que não foi percebido nas inoculações 2 e 3. As plantas originadas do Centro APTA - Cordeirópolis foram usadas como um controle positivo da quantificação da bactéria.

CONCLUSÃO

Através do procedimento utilizado para a infecção experimental das mudas de *Citrus sinensis* pôde-se concluir que as inoculações foram bem sucedidas, pois há o aparecimento de sintomas de CVC em grande parte das plantas infectadas. Interessantemente pôde-se verificar que apesar do nível populacional de *X. fastidiosa* ter diminuído após um mês na inoculação 2, os sintomas da doença estão mais evidentes que nas demais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, Welington L.; MARCON, Joelma; MACCHERONI, Walter Jr.; van ELSAS, Jan. D.; van VUURDE, Jim W.L.; AZEVEDO, João L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n. 10, p. 4906 – 4914, 2002.

OLIVEIRA, Regina Costa de; YANAI, Giane Mie; H.MUTO, Nair; LEITE, Daniela Batista; A.SOUZA, Alesandra; D.COLETTA FILHO, Helvécio; MACHADO, Marcos Antonio; NUNES, L. R. . Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. **Fems Microbiological Letters**, Holanda, v. 216, p. 15-21, 2002

Machado, M. A., Targon, M. L. P. N., Beretta, M. J. G., Laranjeira, F. F., Carvalho, S. A.. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja ‘pêra’ com clorose variegada de citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**. v.22 p. 30 - 33, 1997.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR, W.; AZEVEDO, J. L.. Interaction between endophytic bacterial from citrus plants and the

phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. Letters in Applied Microbiology. v. 39 p. 55 – 59, 2004

YORINORI, Marcos A.; RIBAS, Alessandra F.; UENO, Bernardo; MASSOLA, Nelson S. Jr.; LEITE, Rui P. Jr. Detecção de *Xylella fastidiosa* em Germoplasma de Cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**.v.28, n.4, p. 427 – 430, 2003.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsa de estudo concedida e a FAPESP pela bolsa de D.S.S. e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.