

PERFIL TRANSCRICIONAL DE *XYLELLA FASTIDIOSA* DURANTE A INFECÇÃO DE CITROS

Ana Marie Pereira de Souza¹; Daiene Souza Santos², Regina Costa de Oliveira³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: marie.ps@hotmail.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

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram-negativa, aflagelada, em forma de bastonete, de crescimento lento e aeróbico estrito. Após a sua instalação e multiplicação nas plantas, ocorre a obstrução dos vasos xilemáticos, tornando deficiente a distribuição dos componentes necessários para o desenvolvimento normal do hospedeiro (WELLS, 1987). Por este motivo, é considerada agente causal de diversas doenças que afetam plantas ornamentais, frutíferas e cultivares de grande importância econômica. Dentre as doenças estão o mal de Pierce das videiras, “PhonyPeach” dos pessegueiros, escaldadura foliar de cafeeiros e a CVC (Clorose Variegada de Citros) que afeta todas as variedades de laranja doce (FUNDECITRUS, 2008).

A CVC conhecida popularmente por amarelinho, devido a uma clorose foliar generalizada, teve seu primeiro relato em 1987, e hoje sabe-se que esta é a mais importante fitopatogenia associada a *X. fastidiosa*, pois 39,19% dos pomares brasileiros estão infectados com esta bactéria, o que causa enormes prejuízos à agroindústria de citros, afetando principalmente a qualidade dos frutos, tornando-os de tamanho reduzido e imprestáveis para a comercialização *in natura* ou para a produção de suco concentrado (FUNDECITRUS, 2008; ALVES, 2003). Devido a este problema socioeconômico na citricultura nacional, o projeto envolveu inicialmente experimentos de inoculação de *Xf* 9a5c em plantas de *Citrus sinensis*, o monitoramento dos sintomas da infecção e a tentativa da descoberta de eventuais diferenças na expressão gênica em plantas sintomáticas e plantas não sintomáticas, através da técnica de hibridação em microarranjos aliados à amplificação de RNA, para que fosse possível o estudo das interações patógeno-hospedeiro imprevistas até o momento. No entanto, os experimentos de extração de RNA de *Xf* 9a5c em mudas de citrus infectadas foram frustrados, devido à quantidade extremamente pequena de células de bactérias encontradas no interior dos vasos xilemáticos, corroborando com Hinton e colaboradores (2004), que descreveram o rendimento de bactéria obtida *in vivo* sendo quase sempre escasso, o que proporciona baixo rendimento de RNA.

OBJETIVOS

O projeto visa o estudo da expressão gênica em *Xf* 9a5c in planta, através da técnica de hibridação em microarranjos de DNA. Uma vez que não foi possível a extração de RNA de *X. fastidiosa in planta*, em quantidade e qualidade compatível com as análises pretendidas, o objetivo do atual trabalho foi alterado para o monitoramento da expressão gênica em bactérias mantidas por longo tempo em meio de cultura, quando comparadas a bactérias recentemente isoladas de plantas infectadas, através da técnica Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time-qPCR).

METODOLOGIA

Células infectivas de *Xf* 9a5c foram cultivadas em 40 mL de meio de cultura CCON, a 28° C em agitador orbital (EnvironShaker, Lab-Line), a 125 rpm e o crescimento celular foi monitorado diariamente, com base na turbidez do meio com o auxílio de um espectrofotômetro (Ultrospec 2100pro, AmershamBiosciences) pela absorbância a 600nm (DO₆₀₀) até atingir a fase exponencial de crescimento. Foram utilizados 2 grupos de bactérias com diferentes quantidades de passagem pelo meio de cultura: (i) células recém retiradas da planta hospedeira, apresentando 4 passagens e (ii) células com inúmeras passagens e mantidas em cultivo *in vitro* há vários anos.

Quando as culturas atingiram o início da fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ ~ 0,4 após quatro dias de cultivo) as células de *Xf* 9a5c foram centrifugadas e submetidas à extração de RNA total utilizando Trizol. O RNA total obtido a partir de cada cultura, foi quantificado através de absorbância a 260nm e 280nm, com o auxílio de um espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e para a verificação da integridade do RNA, submeteu-se as mostras ao gel de eletroforese, onde padrões de migração foram visualizados sob luz ultravioleta.

Após, o RNA total obtido das culturas foi submetido à purificação pelo sistema RNeasy, da Qiagen, e ao enriquecimento de RNAm com o kit MICROBExpress™ (Ambion) que removeu RNAs ribossomais 16S e 23S. Em seguida os RNAm enriquecidos, foram submetidos a amplificação, através da reação de poliadenilação seguida de transcrição reversa para a construção do cDNA dupla fita, com uso do kit MessageAmp™ II-Bacteria (Ambion).

Finalmente do cDNA dupla-fita obtido, foi utilizado 100ng, para as reações de Real Time qPCR com o reagente SYBR® Green para a verificação da expressão gênica de *Xf* 9a5c. Esta técnica, desenvolvida para quantificar DNA genômico, é realizada em equipamentos capazes de detectar o momento exato da amplificação de um gene, atingindo níveis mais altos de sensibilidade e menor risco de contaminação devido ao formato fechado da reação (KUBISTA et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As culturas de *Xf* 9a5c em meio CCON cresceram satisfatoriamente e apresentaram fase exponencial de crescimento no quarto dia de cultivo. O método de eletroforese foi eficiente para avaliar a qualidade do RNA extraído através da integridade das bandas 16S e 23S de RNA ribossomal.

O kit MICROBExpress™ (Ambion), é adequado para a realização do processo de enriquecimento de RNAm e o kit MessageAmp™ II-Bacteria (Ambion), se mostrou por meio de poliadenilação, eficiente para a amplificação do RNAm, porém apresentou uma redução de aproximadamente 50% da massa inicial utilizada.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real RT-qPCR funcionou com sucesso e através desta técnica comprovou-se que genes supostamente envolvidos com patogenicidade como *Xf* 0262, *Xf* 0487 e *Xf* 2121, bem como, alguns fatores de adesão, menos expressos pela bactéria, estão diretamente ligados ao seu poder de infectividade para com a planta hospedeira, que por sua vez, pode ser responsável pelo surgimento dos sintomas de CVC, corroborando com o descrito por Souza e colaboradores (2003).

Nossos resultados indicam o porquê de plantas, comprovadamente infectadas por *Xf* 9a5c no início deste trabalho, não apresentarem sintomas. O fato é que as células utilizadas para a infecção, provavelmente pouco expressaram genes de virulência capazes de debilitar o hospedeiro.

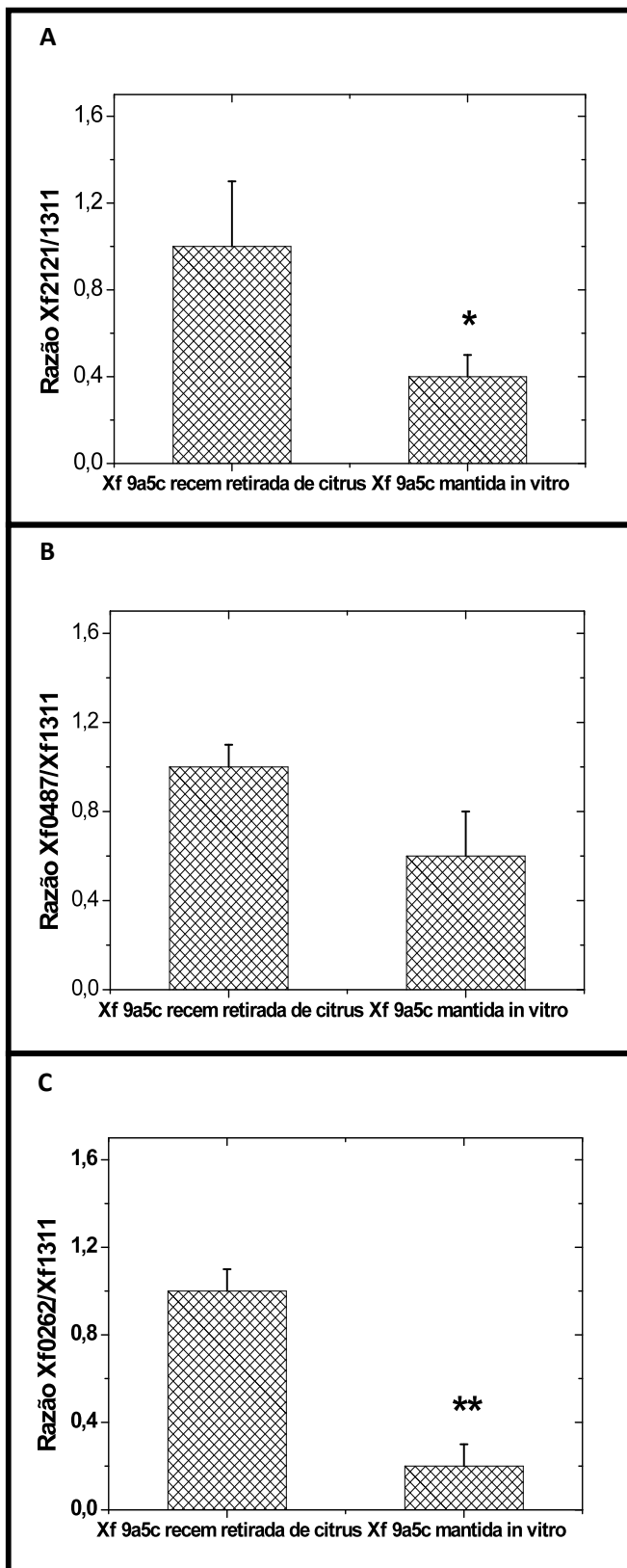


Figura 1 – Razão da expressão gênica nos diferentes grupos experimentais (Células de *Xf* 9a5c recém retiradas de citrus e células de *Xf* 9a5c mantidas in vitro) por RT-PCR. A – Razão Xf 2121/Xf1311, mostrou uma diminuição do grupo *Xf*9a5c mantidas in vitro comparado ao grupo *Xf*9a5c recém retiradas de citrus, B – Razão Xf 0487/Xf1311, apresentou-se inalterado entre os grupos apesar da tendência a diminuir no grupo *Xf*9a5c mantidas in vitro e C – Razão Xf 0262 / Xf1311, mostrou uma diminuição do grupo *Xf* 9a5c mantidas in vitro comparado ao grupo *Xf* 9a5c recém retiradas de citrus. Para análise estatística foi utilizada *test t*. * $p < 0,04$ e ** $p < 0,01$.

CONCLUSÃO

De acordo com a pesquisa realizada no atual trabalho, foi possível concluir que os mecanismos utilizados pela bactéria *Xylella fastidiosa*, durante a infecção de seus hospedeiros são ainda obscuros e indefinidos, devido à dificuldade de obtenção de quantidades suficientes de RNA de células presentes no xilema das plantas para a realização da expressão gênica. A amplificação das amostras de RNA *in vitro* de *Xf* 9a5c foi um excelente método para multiplicar a quantidade do material obtido dos meios de cultura que poderá ser empregado futuramente para viabilizar o estudo da expressão gênica *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. *Xylella fastidiosa* – Adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. 2003. 122f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. - Universidade São Paulo. Piracicaba. 2003.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. 2008. Disponível em www.fundecitrus.com.br. Acesso em 11 de janeiro de 2011.

HINTON, J. C. D.; HAUTEFORT, I.; ERIKSSON, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M. (2004) Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. **Current Opinion in Microbiology**, 7: 277-282

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FORROTAM, A.; JOÁK, J.; *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; & MACHADO, M.A. (2003). Analysis of Gene Expression in Two Growth States of *Xylella fastidiosa* and Its Relationship with Pathogenicity. **Mol. Plant Microbe Interact.** 16(10):867-75

WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, HSUEH-YUN; WEISBERG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. Nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 2, p. 136-143, 1987.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas de estudo concedidas e a FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.