

ANÁLISE *IN PLANTA* DA EXPRESSÃO DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS COM O PROCESSO INFECCIOSO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

Daiene Souza Santos¹; Regina Lúcia Batista Costa de Oliveira²; Luiz Roberto Nunes³

Estudante do Curso de Biologia; e-mail: daiene_ss@yahoo.com.br¹

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: lnunes@umc.br³

Área do Conhecimento: Genômica Funcional

Palavras-chaves: *Xylella fastidiosa*; Microarray; Genômica Funcional

INTRODUÇÃO

A metodologia de hibridação em microarranjos de DNA, apesar de apresentar grande capacidade de processamento e permitir identificar genes diferencialmente expressos entre duas condições experimentais testadas a partir de milhares de genes analisados simultaneamente, apresenta limitações quanto à imprecisão quantitativa de seus resultados. Além disso, tais experimentos tradicionalmente necessitam de uma grande quantidade de material (RNA), o que pode ser difícil de conseguir, dada a dificuldade em obter grande massa da bactéria, sobretudo em situações extra-laboratoriais, como é o caso de bactérias crescendo no interior dos vasos xilemáticos das plantas hospedeiras. Desta forma, informações acerca da expressão gênica global de *Xylella fastidiosa in planta* só puderam ser obtidas de maneira indireta, através de experimentos de hibridação em microarranjos de DNA envolvendo RNA de células cultivadas em um meio de cultura (3G10-R) que mimetiza algumas condições químicas do xilema de plantas hospedeiras.

Estes experimentos identificaram vários genes potencialmente envolvidos com o processo de colonização vegetal e/ou patogenicidade, como bacteriocinas (*cvaC* - potencialmente envolvidas em competição com outros microorganismos endofíticos), fatores de adesão (*fimA*, *uspA1* e *hsf*) e a Alquilhidroperóxido Redutase (*ahpF*, associada à resistência ao “burst oxidativo dos tecidos infectados”). Alguns destes resultados estão ainda de acordo com aqueles obtidos por de Souza *et al.* (2003), que identificaram genes potencialmente envolvidos com a patogenicidade desta bactéria. Infelizmente, no entanto, embora tais condições de cultivo busquem simular aquelas encontradas no interior da planta, não há como garantir que o comportamento da bactéria cultivada seja idêntico àquele verificado durante a infecção *in planta*. Isto equivale a dizer que a superativação de tais genes no interior de plantas infectadas ainda carece de confirmação direta. Uma vez que, em termos práticos, não é viável isolar diretamente do xilema a massa de bactérias necessária para extrair uma quantidade de RNA para a realização de experimentos de hibridação em microarranjos, optamos por conduzir tais estudos através da técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR), que alia uma elevada precisão quantitativa e um alto grau de sensibilidade.

OBJETIVOS

O projeto se propôs a implementar uma plataforma para quantificação, através de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR), de variações na expressão de três genes identificados como diferencialmente expressos em experimentos de hibridação em

microarranjos de DNA, envolvendo RNA de células de *Xylella fastidiosa* cultivadas em um meio artificial 3G10-R. É nosso interesse, não apenas confirmar de maneira mais precisa os resultados das hibridações em array, mas verificar se esta modulação acontece também em bactérias obtidas do interior de plantas infectadas. Três genes foram escolhidos para estes estudos: a adesina *hsf* (ORF Xf1529), a bacteriocina *cvaC* (ORF Xf0263) e a alquilhidroperóxido redutase *ahpF* (ORF Xf1531)

METODOLOGIA

Células de *Xf* 9a5c foram crescidas em meio de 3G10-R e incubadas a 28° C em agitador orbital, a 125 rpm e o crescimento celular foi monitorado diariamente, com base na turbidez do meio com o auxílio de um espectrofotômetro pela absorbância a 600nm (DO₆₀₀), até que se atingisse uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0.25 (final da fase exponencial de crescimento). Atingida a densidade requerida, parte da cultura foi separada para extração de RNA, enquanto o restante foi centrifugado e o pellet ressuspenso em tampão PBS. Esta suspensão final foi utilizada para inocular plantas de *Citrus sinensis* com o auxílio de uma seringa hipodérmica. A suspensão bacteriana foi inoculada na base do pecíolo de folhas jovens e as plantas infectadas foram incubadas por 30 dias a uma temperatura de 20-25 °C, com fotoperíodo natural.

Para coletar as células de *Xf* dos vasos xilemáticos após os períodos de tempo determinados, as folhas inoculadas foram retiradas e cada uma delas teve a extremidade do pecíolo selada com parafina aquecida. Estas folhas foram então submetidas a um processo de desinfecção com lavagens sucessivas em soluções de etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e água MilliQ corrente. Depois disso, a nervura central de cada folha foi isolada, a extremidade parafinada do pecíolo foi removida e as células coletadas através da centrifugação dos pecíolos em tubo Eppendorf, por 20 a 30 minutos a 21.000Xg.

Amostras de RNA para controle foram obtidas a partir das células crescidas em meio de cultura através de um protocolo de extração com solução de Fenol ácido. Para a análise de expressão gênica de *X. fastidiosa in planta*, por sua vez, as amostras de RNA foram extraídas de bactérias isoladas do xilema de plantas infectadas, pela purificação com o kit RNeasy (Qiagen), conforme especificações do fabricante.

Toda a massa de RNA obtida foi então convertida em cDNA simples fita através de uma reação de transcrição reversa, na qual são utilizados Random Primer Solution (9-mers), dNTPs, DTT, First-Strand Buffer (Invitrogen) e Superscript II[®] (200 U/μl) (Invitrogen). A reação foi então incubada a 42° C por 2 horas e o RNA foi degradado pela adição de RNase A. O cDNA simples fita resultante foi, então, purificado e concentrado em Microcon[®] YM-30, quantificado através do NanoDrop ND-1000 e submetido às reações de qPCR.

Todas as reações de qPCR foram realizadas, em triplicata, no aparelho ABI 7500 da Applied Biosystems, utilizando um kit Taq-Man[®] EZ RT-PCR conforme orientações do fabricante (Applied Biosystems). Conjuntos de “primers” + sondas, específicos para a amplificação de cada um dos genes bem como um quarto conjunto TaqMan para amplificar uma seqüência da ORF Xf1311 – utilizada como normalizador em experimentos de quantificação relativa dos 3 genes escolhidos, foram sintetizados pelo sistema TaqMan, da Applied Biosystems.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos de qPCR foram conduzidos com RNA obtido de bactérias extraídas diretamente de plantas infectadas. Todos estes genes foram identificados como modulados em bactérias cultivadas em 3G10-R, sendo que dois deles estão diretamente

envolvidos com processos de infecção e colonização do hospedeiro (adesina *hsf* - ORF Xf1529 e a bacteriocina *cvaC* - ORF Xf0263), enquanto o terceiro (alquilhidroperóxido redutase *ahpF* - ORF Xf1531), está envolvido na resposta bacteriana ao stress oxidativo gerado pelo hospedeiro. Os resultados destes experimentos confirmaram a super-regulação destes 3 genes em células isoladas diretamente do interior de plantas, após 2 dias de infecção experimental (Figura 1). Reações de qPCR também foram conduzidos com RNA obtido de células de *Xf* mantidas *in planta* por um período de 30 dias, sendo que neste caso, verificamos superexpressão apenas nos casos da *hsf* e da *ahpF* (Figura 1).

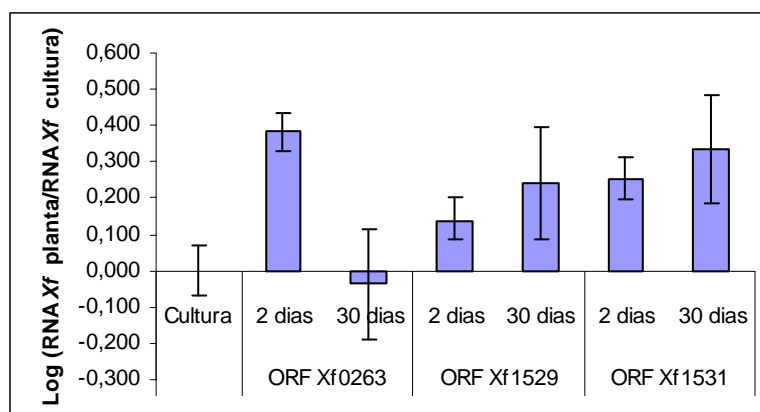


Figura 1 - Verificação da expressão gênica de *Xylella fastidiosa* in planta através de qPCR. Variações na modulação transcricional foram calculadas tendo os níveis de expressão *in vitro* como calibrador e estão representadas no gráfico pelo Log (RNA *Xf* planta/RNA *Xf* cultura). Os experimentos de qPCR foram realizados em triplicata. O gráfico mostra o valor médio e seus respectivos desvios padrões.

Desta forma, verificou-se que, os três genes, apesar de superexpressos in planta, apresentam comportamentos diferenciados ao longo do processo de colonização/infecção. A bacteriocina apresenta um aumento de expressão de quase duas vezes e meia após 2 dias de infecção, reduzindo sua expressão para os mesmos valores pré-infecção, após 30 dias. Já os genes *hsf* e *ahpF* apresentaram aumentos de ~1,4 e 1,8 vezes após 2 dias de infecção, elevando estes valores para 1,7 e 2,1 vezes após 30 dias de infecção.

A diferença na expressão *cvaC*, levando a um aumento na produção de bacteriocina nos primeiros dois dias de infecção pode ser interpretada como uma estratégia de instalação e antagonização de outras bactérias naturalmente presentes no interior da planta, proporcionando vantagem competitiva dentro do xilema durante os primeiros momentos de infecção. Estudos anteriores, como o de Lacava *et al.* (2004), sugerem que possa realmente haver uma interação entre *Xylella fastidiosa* e endofíticos como *Curtobacterium flaccumfaciens* e *Methylobacterium* sp.

Uma vez que o inseto vetor inocula a bactéria diretamente dentro do vaso xilemático, acredita-se que um mecanismo de adesão eficiente possa ser essencial à sobrevivência da bactéria neste ambiente turbulento. Desta forma, faz sentido verificar a superexpressão contínua do gene *hsf*, que codifica uma fibrila de superfície pertencente à família de adesinas auto-transportadoras de alto peso molecular. Este gene é muito similar ao gene *hsf* de *Haemophilus influenzae* do tipo b, cujo produto desempenha um importante papel na colonização do trato respiratório humano (Hallström *et al.*, 2006). É possível, portanto, que a superexpressão deste gene em *X. fastidiosa* aja como um fator de virulência, proporcionando um mecanismo de adesão com a superfície do vaso

xilemático e/ou com outras bactérias, contribuindo para a formação de biofilme e de agregados celulares, que contribuem para o processo de oclusão do vaso xilemático – um sintoma típico da CVC.

Já o gene *ahpF*, que pode estar envolvido na resposta bacteriana ao stress oxidativo gerado pelo hospedeiro (Loprasert *et al.*, 1997), praticamente dobrou sua expressão durante os primeiros 30 dias de infecção, o que é bastante interessante, uma vez que um dos principais mecanismos de defesa dos vegetais contra microrganismos invasores é o chamado “burst” oxidativo, caracterizado pelo aumento na produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na região da infecção. (Cussioli *et al.*, 2003).

CONCLUSÕES

Experimentos de análise de expressão gênica por qPCR com amostras de RNA obtidas de bactérias isoladas diretamente do interior dos vasos xilemáticos constituem uma maneira viável de averiguar pontualmente a expressão de diferentes genes e seu eventual envolvimento com o desenvolvimento da Clorose Variegada de Citros (CVC). Além disso, estes experimentos reforçam a idéia de que as características químicas de 3G10-R são capazes de induzir muitos genes naturalmente expressos por *X. fastidiosa* durante o processo de colonização do xilema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cussioli, J.R. R.; Alves, S.V.; de Oliveira, M.A.; Netto, L.E.S. (2003) Organic Hydroperoxide Resistance Gene Encodes a Thiol-dependent Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(13): 11570–11578.
- de 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.
- Hallström, T.; Trajkovska, E.; Forsgren, A.; Riesbeck, K. (2006) *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *J Immunol.* **177**(1):430-436.
- Lacava, P.T.; Araújo, W.L.; Marcon, J.; Maccheroni JR, X.; Azevedo, J.L. (2004) Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology.* 39:55-59.
- Loprasert, S.; Atichartpongkun, S.; Whangsuk, W.; Mongkolsuk, S. (1997) Isolation and Analysis of the *Xanthomonas* Alkyl Hydroperoxide Reductase Gene and the Peroxide Sensor Regulator Genes *ahpC* and *ahpF-oxyR-orfX*. *Journal of Bacteriology.* **179**(12): 3944–3949.