



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Reinaldo Rodrigues de Souza Neto

Resistência derivada do patógeno mediada pela toxina  
de um sistema toxina-antitoxina de *Xylella fastidiosa*

**CAMPINAS**

**2016**

**Reinaldo Rodrigues De Souza Neto**

**Resistência derivada do patógeno mediada pela toxina de um sistema toxina-antitoxina de *Xylella fastidiosa***

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL  
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO  
REINALDO RODRIGUES DE SOUZA NETO E  
ORIENTADO PELA PROFA. DRA. ALESSANDRA

*Orientadora: Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA*

**CAMPINAS**

**2016**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2013/21924-6

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

So89r Souza-Neto, Reinaldo Rodrigues de, 1991-  
Resistência derivada do patógeno mediada pela toxina de um sistema  
toxina-antitoxina de *Xylella fastidiosa* / Reinaldo Rodrigues de Souza Neto. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Plantas transgênicas. 2. Clorose variegada dos citros. 3. Cancro citrico.  
I. Souza, Alessandra Alves de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Pathogen derived resistance mediated by toxin of toxin-antitoxin system from *Xylella fastidiosa*

**Palavras-chave em inglês:**

Transgenic plants

Citrus variegated chlorosis

Citrus canker

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

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

**Banca examinadora:**

Alessandra Alves de Souza [Orientador]

Cristina Elisa Alvarez Martins

Juarez Pires Tomaz

**Data de defesa:** 12-08-2016

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

Campinas, 12 de agosto de 2016.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza (orientadora)

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez

Prof. Dr. Juarez Pires Tomaz

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar em cada escolha na minha vida, por me dar forças para que eu conclua mais uma etapa, e por colocar pessoas incríveis na minha vida.

Aos meus pais por todo amor, carinho, confiança, e também por todo o sacrifício que fizeram em suas vidas para me dar educação de qualidade.

À minha irmã pelo carinho, amor, companheirismo, e por sempre apoiar todas as minhas decisões e me chamar a atenção quando necessário.

À minha orientadora Dra. Alessandra Alves de Souza, que tenho grande admiração e carinho, por contribuir com toda a minha formação científica. Agradeço por toda paciência, dedicação e conhecimento proporcionado.

Aos meus amigos da sala da pós-graduação II, e do laboratório de biotecnologia pela convivência, amizades, discussões e momentos de descontração. Em especial aos meus grandes amigos Marquinho e tia Rachel, com quem criei grandes laços e tenho grande admiração.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pela oportunidade de desenvolver meu projeto em um excelente laboratório.

Ao Juarez Pires Tomaz, pela amizade e todo o conhecimento proporcionado durante o meu início no meio científico.

Aos membros do grupo *Xylella/Xanthomonas*, pelas discussões e sugestões para o meu desenvolvimento do trabalho. Em especial à Simone, Isabela, Maria Julia, Paula e Isis que foram fundamentais para o desenvolvimento dos experimentos com *Xanthomonas citri*.

À minha segunda família, República Boia Fria, por toda amizade, companheirismo, e momentos excepcionais que vivemos juntos.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de cursar o mestrado, e pelos conhecimentos adquiridos nas disciplinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da bolsa de estudo (Projeto nº 2013/21924-6) que permitiu o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

A laranja doce é uma das culturas mais importantes produzidas no Brasil dada a sua importância econômica para a agricultura nacional. Contudo, esse setor vem sofrendo grandes perdas econômicas devido a problemas de ordem fitossanitária como doenças e pragas. Dentre esses, as doenças bacterianas como a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, e o Cancro Cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causam grandes prejuízos para a produção de laranja doce. Dentre as tecnologias que visam a obtenção de plantas resistentes a fitopatógenos, a transgenia apresenta-se como uma ferramenta biotecnológica para a obtenção de variedades tolerantes/resistentes a diferentes patógenos. Dentro das estratégias de transgenia, a resistência derivada do patógeno (RDP) tem demonstrado ser promissora para o controle dos fitopatógenos de citros. Nesta vertente, um possível candidato para conferir resistência a CVC e ao cancro cítrico seria o gene *mqsR* que codifica uma toxina de um sistema toxina-antitoxina de *X. fastidiosa*. Essa toxina é uma endorribonuclease e já foi descrita por abolir a patogenicidade de *X. fastidiosa* quando a bactéria superexpressa a mesma. Dessa forma, MqsR possui potencial para transformação genética de plantas visando resistência a *X. fastidiosa*, podendo levar à inibição do crescimento e, conseqüentemente, redução na colonização da bactéria e dos sintomas. *X. citri* não possui esse sistema toxina-antitoxina homólogo em seu genoma, em função disso, plantas transgênicas superexpressando a toxina MqsR poderiam também interferir na colonização dessa bactéria, diminuindo os sintomas de Cancro Cítrico. Nesse estudo, plantas transgênicas de tabaco e citros superexpressando a toxina MqsR foram obtidas, e a presença do transgene foi confirmada por GUS, PCR, expressão gênica e proteica. Essas plantas foram desafiadas com *X. fastidiosa* e demonstraram redução da sintomatologia comparadas às plantas não transformadas. Também foi verificado que a população de *X. fastidiosa* foi significativamente menor nas plantas transgênicas, demonstrando que possivelmente a toxina interferiu na multiplicação e colonização da bactéria e, conseqüentemente, reduziu os sintomas da doença. Também foi verificado que a toxina MqsR pôde penetrar nas células de *X. citri* e inibir o seu crescimento. Em folhas destacadas das plantas transgênicas de citros infiltradas com *X. citri* foi verificada redução da colonização e população da bactéria, sendo possível detectar a toxina dentro da célula da bactéria, demonstrando que, assim

como observado para *X. fastidiosa*, a toxina MqsR também alterou o comportamento de *X. citri*. Dando suporte ao fenótipo observado, foi demonstrada a repressão de genes associados à multiplicação e colonização da bactéria. Em casa de vegetação também foi observada redução na severidade de sintomas nas plantas transgênicas ao longo do tempo. Desse modo os resultados sugerem que a toxina superexpressa pela planta pode interferir na multiplicação e colonização de *X. fastidiosa* e *X. citri*, promovendo resistência a ambos os patógenos.

## ABSTRACT

Sweet orange is one of the most important cultures produced in Brazil given its economic importance for national agriculture. However, this sector suffers big losses due phytosanitary problems as diseases and pests. Among them, the bacterial diseases such as Citrus Variegated Chlorosis (CVC) caused by *Xylella fastidiosa*, and citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* generate big losses to sweet orange production. Among the technologies that aim to obtain resistance to plant pathogens, transgenesis can be used as a biotechnological tool to obtain tolerant/resistant plants for different pathogens. Among strategies of transgenesis, pathogen derived resistance (PDR) has been showed promising to control citrus pathogens. In this way, a possible candidate gene to confer tolerance against CVC and citrus canker would be the *mqsR* gene, which encodes a toxin of a toxin-antitoxin system from *X. fastidiosa*. This toxin is an endoribonuclease and was already described to abolish the pathogenicity of *X. fastidiosa* when the bacterium overexpress the toxin. In this way MqsR has potential for genetic transformation of plants aiming tolerance to *X. fastidiosa*, being able to inhibit growth, consequently, reduce bacterial colonization and symptoms. *X. citri* does not have an homologous of this TA system in its genome, thus, transgenic plants overexpressing MqsR toxin could also interfere in *X. citri* colonization, decreasing the symptoms of citrus canker. In this study, were obtained transgenic plants of tobacco and citrus overexpressing the MqsR toxin, which were confirmed by GUS, PCR, gene and protein expression. These plants were challenged with *X. fastidiosa* and showed a reduction of symptoms when compared with non-transformed plants. Also it was verified that the population of *X. fastidiosa* was significantly smaller in transgenic plants, showing that the toxin possibly interfered with bacterial multiplication and colonization and, consequently, decreased the disease symptoms. It was also verified that the MqsR toxin could penetrate in *X. citri* cells and inhibit their growth. In detached leaves of transgenic citrus plants infiltrated with *X. citri* was verified a reduction of bacterial colonization and population, and the toxin was detected inside the bacterial cells, showing that, as observed in *X. fastidiosa*, the MqsR toxin altered the behavior of *X. citri*. Supporting the observed phenotype, it was showed a repression of genes associated with bacterial multiplication and colonization. In greenhouse conditions, it was also verified a reduction of severity of symptoms in transgenic plants in a time course experiment. Therefore, the findings suggest that the

toxin overexpressed by the plant can be interfering with the multiplication and colonization of *X. fastidiosa* and *X. citri*, leading to tolerance to both pathogens.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>16</b> |
| 1. LARANJA DOCE E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....   | 16        |
| 2. CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS .....  | 17        |
| 3. <i>Xylella fastidiosa</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS .....  | 19        |
| 4. SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA BACTERIANOS .....  | 21        |
| 5. UTILIZAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE RESISTÊNCIA DERIVADA DO<br>PATÓGENO (RDP).....  | 26        |
| <b>JUSTIFICATIVA</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>CAPÍTULO 1. Avaliação da superexpressão da toxina MqsR em<br/>plantas transgênicas de tabaco e citros quanto a resistência a <i>Xylella fastidiosa</i></b><br>..... | <b>29</b> |
| RESUMO .....   | 29        |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 30        |
| 2. HIPÓTESE .....  | 32        |
| 3. OBJETIVOS .....   | 33        |
| 3.1. Objetivos Gerais .....  | 33        |
| 3.2. Objetivos Específicos.....  | 33        |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 34        |
| 4.1. Tabaco .....  | 34        |
| 4.1.1. Construção e transformação genética.....  | 34        |
| 4.1.2. Ensaio Histoquímico de gene $\beta$ -glucuronidase .....  | 34        |
| 4.1.3. Extração de DNA e PCR para confirmação de transgenia  | 35        |
| 4.1.4. Expressão relativa do gene <i>mqsR</i> nas plantas<br>transgênicas.....   | 35        |
| 4.1.5. Desafio de plantas transgênicas com <i>X. fastidiosa</i> .....  | 36        |
| 4.1.6. Avaliação de incidência e severidade de sintomas .....  | 36        |
| 4.1.7. Análise de correlação .....   | 37        |
| 4.1.8. Quantificação da população de <i>X. fastidiosa</i> nas plantas<br>transgênicas por qPCR.....  | 38        |
| 4.2. Citros.....   | 39        |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.2.1. | Construção e transformação genética.....  | 39 |
| 4.2.2. | Ensaio Histoquímico de GUS .....  | 39 |
| 4.2.3. | PCR para confirmação de transgenia.....   | 39 |
| 4.2.4. | Expressão relativa do gene <i>mqsR</i> nas plantas transgênicas.....                      | 40 |
| 4.2.5. | <i>Immunoblot</i> para confirmação da produção da MqsR pela planta.....                   | 40 |
| 4.2.6. | Desafio de plantas transgênicas com <i>X. fastidiosa</i> .....                            | 41 |
| 4.2.7. | Avaliação de incidência e severidade de sintomas .....                                    | 41 |
| 4.2.8. | Análise de correlação .....   | 42 |
| 4.2.9. | Quantificação da população de <i>X. fastidiosa</i> por isolamento.....                    | 42 |
| 5.     | RESULTADOS .....  | 44 |
| 5.1.   | Tabaco.....   | 44 |
| 5.1.1. | Ensaio Histoquímico de GUS .....  | 44 |
| 5.1.2. | PCR para confirmação de transgenia.....   | 44 |
| 5.1.3. | Expressão relativa do gene <i>mqsR</i> nas plantas transgênicas.....                      | 45 |
| 5.1.4. | Avaliação de incidência e severidade de sintomas .....                                    | 46 |
| 5.1.5. | Análise de correlação .....   | 47 |
| 5.1.6. | Quantificação da população de <i>X. fastidiosa</i> nas plantas transgênicas por qPCR..... | 47 |
| 5.2.   | Citros.....   | 48 |
| 5.2.1. | Ensaio Histoquímico de GUS .....  | 48 |
| 5.2.2. | PCR para confirmação de transgenia.....   | 49 |
| 5.2.3. | Expressão relativa do gene <i>mqsR</i> nas plantas transgênicas.....                      | 50 |
| 5.2.4. | <i>Immunoblot</i> para confirmação da produção da MqsR pela planta.....                   | 50 |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2.5. Avaliação de incidência e severidade de sintomas .....  | 51        |
| 5.2.6. Análise de correlação .....   | 55        |
| 5.2.7. Quantificação da população de <i>X. fastidiosa</i> por<br>isolamento.....   | 55        |
| 6. DISCUSSÃO .....   | 57        |
| 7. CONCLUSÃO GERAL.....  | 60        |
| <b>CAPÍTULO 2. Avaliação da superexpressão da toxina MqsR em<br/>plantas transgênicas de citros quanto a resistência a <i>Xanthomonas citri</i> subsp.<br/><i>citri</i>.....</b> |           |
| <b>61</b>  | <b>61</b> |
| RESUMO .....   | 61        |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 62        |
| 2. HIPÓTESE .....  | 64        |
| 3. OBJETIVO.....   | 65        |
| 3.1. Objetivo Geral .....  | 65        |
| 3.2. Objetivos Específicos.....  | 65        |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 66        |
| 4.1. <i>Immunoblot</i> para a detecção da toxina dentro da <i>X. citri</i> .....   | 66        |
| 4.2. Curva de crescimento da <i>X. citri</i> na presença da toxina MqsR.....   | 66        |
| 4.3. Obtenção e confirmação de plantas transgênicas visando resistência a <i>X.<br/>citri</i> .....  | 67        |
| 4.4. Expressão relativa do gene <i>mqsR</i> em planta transgênica de Carrizo.....  | 67        |
| 4.5. Avaliação da sintomatologia e a população de <i>X. citri</i> em folha<br>destacada.....   | 67        |
| 4.6. Detecção da toxina em <i>X. citri</i> infiltrada em folha destacada.....  | 68        |
| 4.7. Expressão relativa de genes de <i>X. citri</i> infiltrada em folha destacada .....  | 68        |
| 4.8. Avaliação dos sintomas através de inoculação por pulverização nas plantas<br>transgênicas em casa de vegetação .....  | 69        |
| 4.9. Análise de correlação dos dados .....   | 69        |
| 5. RESULTADOS .....  | 70        |
| 5.1. <i>Immunoblot</i> para a detecção da toxina dentro de <i>X. citri</i> .....   | 70        |
| 5.2. Curva de crescimento de <i>X. citri</i> na presença da toxina MqsR.....   | 70        |
| 5.3. Obtenção e confirmação de plantas transgênicas de Carrizo.....  | 71        |
| 5.4. Expressão relativa do gene <i>mqsR</i> em Carrizo transgênica .....   | 72        |
| 5.5. Avaliação da sintomatologia e a população de <i>X. citri</i> em folha<br>destacada.....   | 72        |

|      |  |           |
|------|--|-----------|
| 5.6. | Detecção da toxina em <i>X. citri</i> infiltrada em folha destacada.....   | 75        |
| 5.7. | Expressão relativa de genes de <i>X. citri</i> infiltrada em folha destacada .....                                     | 76        |
| 5.8. | Avaliação da sintomatologia através de inoculação por pulverização nas plantas transgênicas em casa de vegetação ..... | 77        |
| 5.9. | Análise de correlação de dados.....  | 80        |
| 6.   | DISCUSSÃO .....  | 81        |
| 7.   | CONCLUSÃO GERAL.....   | 84        |
|      | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>84</b> |
|      | <b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO ....</b>  | <b>85</b> |
|      | <b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>   | <b>87</b> |
|      | <b>ANEXO I. Declaração de bioética .....</b>   | <b>95</b> |
|      | <b>ANEXO II. Declaração de direitos autorais.....</b>  | <b>96</b> |

## INTRODUÇÃO

O suco de laranja doce está entre as principais *commodities* produzidas no Brasil, sendo o maior produtor mundial da cultura (FAO, 2012). A produção da safra 2015/16 de laranja doce foi em torno de 300 milhões de caixas (<[www.citrusbr.com](http://www.citrusbr.com)>), o que equivale em torno 15,75 milhões de toneladas da fruta (<[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>). Grande parcela dessa produção é originada no estado de São Paulo, que é responsável por cerca de 71,8% do total produzido no país (<[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>). Contudo, o setor tem sofrido significativas perdas econômicas devido a problemas de ordem fitossanitários como pragas e doenças. Dentre essas, as doenças bacterianas têm causado grande impacto negativo na produção de laranja doce, sendo as principais: Huanglongbing (HLB), causado pelas bactérias *Candidatus liberibacter asiaticus* e *Candidatus liberibacter americanus*, o Cancro Cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada por *Xylella fastidiosa*.

*X. fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa e sua colonização na planta é restrita aos vasos do xilema. Esta produz e secreta uma densa matriz composta por exopolissacarídeos (EPS), a qual é utilizada para agregação da bactéria e formação de biofilme (ROPER et al., 2007). Além de estar diretamente associado com a patogenicidade da *X. fastidiosa* (SOUZA et al., 2003), o biofilme bacteriano também confere algumas vantagens adaptativas à bactéria para a sua sobrevivência, tais como aquisição de nutrientes (COSTERTON et al., 1995), e resistência/tolerância a compostos antimicrobianos (RODRIGUES et al., 2008; MURANAKA et al., 2012).

A resistência do biofilme a compostos antimicrobianos é dada pela estrutura física e/ou química da matriz de exopolissacarídeos, assim como a arquitetura do biofilme, evitando que o antibiótico tenha ação nas camadas mais profundas do mesmo (MAH, A OTOOLE, 2001). Outro mecanismo associado ao biofilme que também está envolvido na resistência a multidrogas é a ativação de bombas de efluxo, que possuem como função a extrusão das moléculas tóxicas para fora da célula (BROOUN, LIU, LEWIS, 2000; RODRIGUES et al., 2008).

Já foi reportado também que em comunidades bacterianas densas, como o biofilme, ou em situações de estresse, ocorre a formação de células persistentes (SHAH et al., 2006). Essas células apresentam estágio fisiológico diferente das fases exponencial e estacionária, no qual a célula não se multiplica e não morre, exibindo baixíssimos níveis de tradução e, conseqüentemente, tolerância a muitas drogas, o

que confere vantagens adaptativas à bactéria (SHAH et al., 2006). O perfil de expressão gênica dessas células também é muito distinto, ocorrendo a indução da expressão de genes de sistemas toxinas-antitoxinas (TA) (SHAH et al., 2006).

Os sistemas TA, em sua maioria, são operon contendo uma toxina estável, letal para a célula bacteriana, e uma antitoxina cognata instável que inibe a ação da toxina (WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014). Em condições normais de crescimento a bactéria produz níveis suficientes de antitoxina para bloquear a ação da toxina, entretanto, em situações de estresse o balanço entre toxina e antitoxina é alterado devido à instabilidade da antitoxina, permanecendo uma concentração maior de toxina que pode atuar na indução de morte celular programada, formação de biofilme, inibição de crescimento ou formação de células persistentes (WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014).

As células persistentes apresentam-se em estágio fisiológico de dormência, no qual não há morte, nem multiplicação das células, geralmente encontradas em populações muito densas ou que estão sob algum estresse (SHAH et al., 2006). Muranaka et al., (2012) demonstram que em células persistentes de *X. fastidiosa* sob estresse por compostos antimicrobianos ocorre a indução de doze sistemas TA do tipo II, sendo que desses o gene, *XF2490*, homólogo ao *mqsR* de *E. coli* e caracterizado como uma endoribonuclease com especificidade pelo motivo GCU (LEE et al., 2014, MERFA et al., 2016), foi o mais induzido em concentrações inibitórias de crescimento. Em trabalho recente foi demonstrado que *X. fastidiosa* superexpressando MqsR inibiu crescimento bacteriano e movimento celular, como consequência, houve ausência de patogenicidade *in planta* (MERFA et al., 2016). Devido a isto, possivelmente plantas superexpressando essa toxina poderiam interferir na colonização e patogenicidade de *X. fastidiosa*.

Assim, baseado na estratégia de resistência derivada do patógeno (RDP), nesse trabalho foram obtidas plantas transgênicas superexpressando a toxina MqsR do sistema MqsR/A de *X. fastidiosa* visando resistência a *X. fastidiosa* e também a *X. citri*.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. LARANJA DOCE E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A laranja doce, cujo nome científico é *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, é de grande destaque para o agronegócio brasileiro, visto que além de o país ser o maior produtor mundial dessa cultura (FAO, 2012), esta contribui para o desenvolvimento social através da geração de muitos empregos diretos e indiretos. A produção brasileira para a safra 2015/16 foi cerca de 300 milhões de caixas (<www.citrusbr.com>), e sua produção concentra-se principalmente nos estados de Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Sergipe, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo este último o maior produtor do país com cerca de 71,8% da produção nacional de laranja doce (<www.sidra.ibge.gov.br>).

Os produtos gerados a partir da laranja doce podem ser de diversos tipos como óleos essenciais, essências, D-limoneno, pectina, álcool, entre outros (<www.citrusbr.com>; <www.citrosuco.com.br>). Contudo, os principais produtos são: o suco de laranja concentrado congelado (*Frozen Concentrated Orange Juice*, FCJO), ao qual é destinado quase toda a produção de laranja doce, e o suco não concentrado (*Not From Concentrated Orange Juice*, NFC) que recebe pequena parcela dessa produção. Os sucos são quase totalmente destinados à exportação. Na safra 2015/16 houve uma exportação de 913,8 mil toneladas de suco e os principais compradores são União Europeia e os EUA (<www.citrusbr.com>) conforme pode ser visualizado na Tabela 1.

**Tabela 1: Principais compradores do suco de laranja brasileiro**

| Países                | Quantidade de suco (toneladas) |
|-----------------------|--------------------------------|
| <b>União Europeia</b> | 628.392                        |
| <b>EUA</b>            | 164.532                        |
| <b>Outros</b>         | 120.876                        |

Fonte: Adaptado de www.citrusbr.com

Apesar da alta produção de laranja doce e do seu suco, há previsões de declínio de 18% da produção para a safra de 2016/17, devido a elevadas temperaturas na época de florada, o que acarreta na queda das flores e frutos em formação (<www.fundecitrus.com.br>). Além dos fatores climáticos envolvidos, o aumento

progressivo de pragas e doenças, associado à negligência com o controle desses, tem causado maiores perdas de produção.

Dentre esses, as doenças bacterianas são de importância econômica para o setor e embora atualmente o Huanglongbing (HLB), causado pelas bactérias *Candidatus liberibacter asiaticus* e *Candidatus liberibacter americanus*, seja o principal problema para a citricultura brasileira, as doenças Cancro Cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada por *Xylella fastidiosa* ainda têm significativa influência na redução de produção e no seu custo final, devido ao manejo das doenças.

## 2. CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

A CVC, também conhecida como “amarelinho dos citros”, foi identificada inicialmente em 1987 na cidade de Macaúbal no noroeste do estado de São Paulo e disseminada rapidamente nos anos seguintes, pois não se conhecia sua origem (COLETTA-FILHO; SOUZA, 2014). A CVC é uma doença específica de laranja doce, com a cultivar Pera como a mais suscetível à doença e a cultivar Westin a menos. As demais espécies do gênero *citrus* são tolerantes ou resistentes à doença (BOVÉ; AYRES, 2007).

Os sintomas da doença são descritos como murcha da folha, pontuações cloróticas similares à deficiência de zinco na parte adaxial da folha, enquanto que na região abaxial da é possível verificar um material similar a uma goma acastanhada, e nos frutos ocorre a redução do tamanho e endurecimento do mesmo (Figura 1) (BOVÉ; AYRES, 2007).



**Figura 1. Sintomas de CVC. A: Sintomas de pontuações cloróticas na região adaxial da folha. B: Do lado esquerdo o fruto sintomático de tamanho reduzido e do lado direito o fruto assintomático com tamanho normal.**

A identificação de bactéria *X. fastidiosa* como agente causal da CVC foi realizada através de seu isolamento e confirmada por testes sorológicos utilizando a técnica de ELISA (CHANG et al., 1993). Após essa descoberta, diferentes linhas de pesquisa começaram a ser estudadas, o que resultou na identificação da cigarrinha como inseto vetor na transmissão natural da bactéria entre as plantas (ROBERTO et al., 1996), podendo ser entre pomares (transmissão primária) ou entre as plantas dentro de um mesmo pomar (transmissão secundária) (LARANJEIRA, BERGAMIN, AMORIM, 1998). Atualmente já são descritas 13 espécies de cigarrinha que podem transmitir a estirpe causadora da CVC (ROBERTO et al., 1996; KRÜGNER et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002).

Além das infecções naturais, as plantas também podem ser infectadas através de enxertia de borbulhas contaminadas. O conhecimento dessa informação acarretou na adoção de uma série de medidas preventivas para evitar que *X. fastidiosa* estivesse presente no sistema de produção de mudas (COLETTA-FILHO, DE SOUZA, 2014). Tais medidas de manejo foram a aplicação de inseticidas para controle do vetor, podas dos ramos doentes em estágios iniciais da doença e eliminação da planta em estágios severos de sintomas (COLETTA-FILHO, BORGES, MACHADO, 2000). A partir dessas propostas de manejo, em 2003, o sistema de produção de mudas no estado de São Paulo, que antes era a céu aberto, passou a ser produzido em regime de telado certificado segundo a Lei Nº 10711, de 05 de agosto de 2003. Com a aplicação dessa legislação e desse novo sistema, o surgimento de sintomas em plantas com menos de 2 anos diminuiu significativamente e, em uma média de 8 anos, houve um aumento de 21% na produção de laranja doce (GONÇALVES et al., 2011).

Atualmente, a CVC é uma doença endêmica espalhada por todas as regiões produtoras do Brasil e do estado de São Paulo, contudo, a incidência da doença vem caindo constantemente nos últimos anos. Isto é dado o manejo eficiente da doença resultado de muitos anos de pesquisa, assim como a excessiva aplicação de inseticida para controle do inseto vetor do HLB, que consequentemente também controla a cigarrinha, inseto vetor da CVC (FUNDECITRUS, 2015). Contudo, em outras regiões do país onde a produção de mudas não é realizada sob o sistema de telado ainda há grande incidência da doença, como é o caso de regiões do litoral norte da Bahia, onde a incidência é superior 70% (OLIVEIRA et al., 2014).

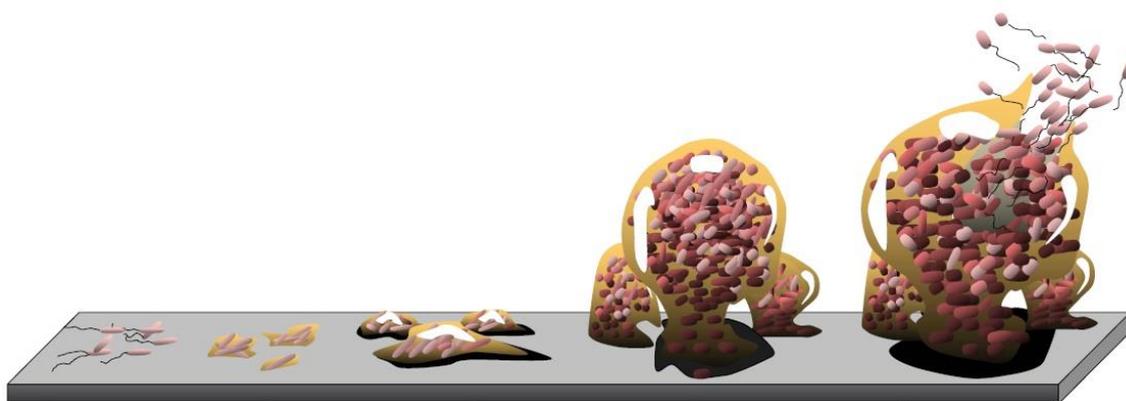
Apesar da eficiência do manejo da doença, há estimativa de 120 milhões de dólares de danos econômicos anuais gerados pela CVC (BOVÉ, AYERS, 2007). Desta forma, há busca excessiva por novas estratégias de controle da doença visando a redução de custos e aumento de produtividade da laranja doce.

### **3. *Xylella fastidiosa*: CARACTERÍSTICAS GERAIS**

*X. fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa e possui grande importância econômica devido à sua capacidade de colonizar eficientemente múltiplas plantas hospedeiras e 13 espécies de cigarrinha (inseto vetor) (COLETTA-FILHO & DE SOUZA 2014). Esta bactéria é restrita aos vasos do xilema, e coloniza uma grande variedade de hospedeiros como alfafa, ameixa, pêssigo, café, carvalho, pera, sendo as doenças de maior importância econômica a CVC em laranja doce e a *Pierce's disease* (PD) em videira (CHATTERJEE, ALMEIDA, LINDOW, 2008). Saponari et al., (2013) reportaram *X. fastidiosa* como agente causal da Síndrome do Declínio Rápido da Oliveira na região da Apúlia na Itália, o qual consiste no primeiro relato dessa bactéria causando doença na Europa.

Dada a importância econômica dessa bactéria, a estirpe 9a5c, agente causal da CVC, foi o primeiro fitopatógeno a ser sequenciado (SIMPSON et al., 2000), o que culminou em grande avanço de estudos genéticos e genômicos.

Uma das mais importantes características de *X. fastidiosa* é a capacidade de formar biofilme bacteriano. Este é constituído de um aglomerado de células bacterianas envolto de uma matriz hidratada de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (HATHROUBI et al., 2016). Em *X. fastidiosa*, o biofilme está diretamente associado à sua patogenicidade, uma vez que a hipótese mais aceita é que a formação de biofilme bloqueia o fluxo de seiva nos vasos de xilema levando ao aparecimento de sintomas. A formação de biofilme apresenta diferentes estágios: adesão das células na superfície, multiplicação bacteriana e maturação do biofilme, seguida da dispersão das células com a finalidade de colonizar novos nichos (Figura 2) (MONROE, 2007).



**Figura 2. Desenvolvimento de um biofilme. Iniciando na adesão das células, seguido da multiplicação e maturação do biofilme até a dispersão das células. Adaptado de Monroe (2007).**

O biofilme confere várias vantagens adaptativas às bactérias como aquisição de nutrientes, superfície para adesão e multiplicação e também resistência/tolerância a compostos antimicrobianos (SHAH et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; MURANAKA et al., 2012; HATHROUBI et al., 2016). Já foi reportado também que em células em biofilme, quando em contato com compostos antimicrobianos, há a indução de genes específicos relacionados a bombas de efluxo (RODRIGUES et al., 2008; HATHROUBI et al., 2016). Estas são, na verdade, sistemas de transporte, que são responsáveis pela extrusão de compostos tóxicos para fora da célula, podendo ser metabólitos secundários e bactericidas (HATHROUBI et al., 2016), desta forma exportando os componentes tóxicos para fora da célula, impedindo com que esses atinjam o seu alvo. Genes associados a bombas de efluxo também foram induzidos em biofilme de *X. fastidiosa* na presença de cobre, tais como transportadores ABC, que são relacionados ao transporte de íons metálicos, e membros da família de proteínas RND, que estão associados ao transporte de diferentes tipos de moléculas (RODRIGUES et al., 2008). Neste mesmo trabalho foi possível obter RNA de alta qualidade de *X. fastidiosa*, mesmo em concentrações inibitórias de cobre, com o qual foi demonstrado a expressão de genes relacionados a resistência a cobre, sugerindo que este penetrou nas células, mas não foi capaz de eliminar toda a população, o que fornece indícios da presença de células persistentes nessa condição.

As células persistentes apresentam-se em um estágio fisiológico no qual as mesmas não se multiplicam e não morrem, e podem ser originadas de forma estocástica ou sob influência de algum tipo de estresse (SHAH et al., 2006;

HATHROUBI et al., 2016). Estas células também são encontradas em populações densas como em fase estacionária e em biofilmes maduros, chegando a compor cerca de 1% da população (SHAH et al., 2006). Devido ao seu estágio fisiológico de dormência, estas células apresentam nível de tradução muito baixo (SHAH et al., 2006). Dado que um grupo importante de antibióticos atuam na inibição da síntese proteica, e uma vez que essas células estão com baixo nível de tradução, os antibióticos perdem seu alvo de atuação, desta forma, tornam as células tolerantes a estes compostos. Estas células ainda apresentam um perfil de expressão gênica diferenciado dos demais estágios fisiológicos, com a indução de sistemas toxina-antitoxina (TA) (SHAH et al., 2006). Esses sistemas codificam proteínas que interferem em funções celulares essenciais como tradução e replicação, induzindo a persistência das células (LEWIS, 2008).

Através de uma análise de microarranjos, foi demonstrado o perfil de expressão gênica do biofilme de *X. fastidiosa* em resposta a dosagens subinibitórias e inibitórias de compostos antimicrobianos (MURANAKA et al., 2012), no qual foi verificado uma repressão de genes associados a funções metabólicas e movimento, e a indução de doze sistemas TA nessa bactéria, evidenciando a presença de células persistentes.

Baseado nessas informações o biofilme bacteriano de *X. fastidiosa* além de favorecer a adaptação celular para sobrevivência na planta e inseto, também contribui com a proteção das células bacterianas utilizando de diferentes mecanismos genéticos para sobrevivência em condições de estresse.

#### **4. SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA BACTERIANOS**

Os sistemas TA são sistemas genéticos constituídos de dois genes em operon, sendo uma toxina estável que possui ação letal para a célula bacteriana, e uma antitoxina cognata instável que inibe a ação da toxina (WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014). Em situações normais de crescimento, a antitoxina liga-se à toxina impedindo a ação da mesma e promovendo o crescimento bacteriano. Em situações de estresse a antitoxina é degradada por proteases liberando a toxina para exercer a sua ação, o qual pode inibir o crescimento bacteriano (Figura 3) (WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014).

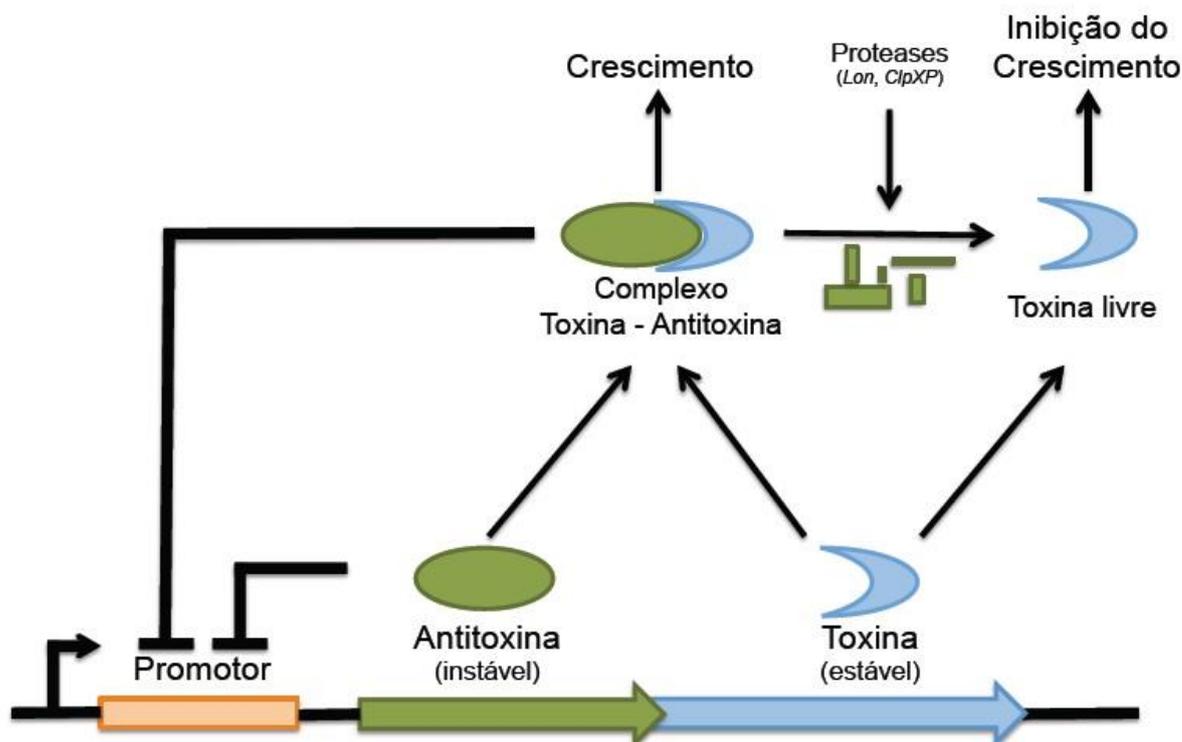


Figura 3. Esquema representativo de um sistema TA do tipo II, o qual mostra a relação dentro do sistema em diferentes condições. Em condições normais de crescimento o promotor é reprimido pela antitoxina, e também pelo complexo toxina-antitoxina formado. Em situações de estresse a antitoxina é degradada por proteases e liberando a toxina que pode inibir o crescimento bacteriano (Merfa, 2015).

Inicialmente, esses sistemas TA foram encontrados em *E. coli*, em baixo número de cópias nos plasmídeos e associados à manutenção desses, uma vez que nas células filhas sem o plasmídeo a antitoxina era degradada facilmente devido à sua instabilidade, desta forma liberando a toxina para atuar, matando a célula, e levando a morte pós segregação (GERDES, RASMUSSEN, MOLIN, 1986).

Posteriormente, os sistemas TA também foram encontrados em cromossomos e atualmente são associados a diversas funções biológicas como formação de células persistentes, morte celular programada, formação de biofilme, controle no crescimento e resposta a estresse geral (ENGELBERG-KULKA et al., 2006; WANG, WOOD, 2011; WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014). Embora todas as toxinas são proteínas, as antitoxinas podem tanto proteínas como RNAs. Os sistemas TA são classificados atualmente em cinco tipos de acordo com a natureza e ação da antitoxina (WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014).

Tipo I: As antitoxinas são pequenos RNAs variando de 50 a 200 nucleotídeos, cujo alvo de atuação é através do pareamento no sentido antisenso do mRNA da toxina cognata.

Tipo II: As antitoxinas são proteínas e atuam formando um complexo proteico com a toxina, tornando-a inativa, e ligando o complexo à sequência de DNA do sistema, reprimindo sua transcrição.

Tipo III: As antitoxinas são pequenos RNAs que possuem um pseudo nó, o qual liga-se diretamente a toxina.

Tipo IV: A antitoxina é uma proteína que interage diretamente com o alvo da toxina, ao invés de ligar-se à toxina.

Tipo V: A antitoxina é uma proteína endoribonuclease que cliva especificamente o mRNA da toxina cognata.

Um possível sistema tipo VI foi encontrado em *Caulobacter crescentus*, chamado de *socAB*, possui o modo de ação da antitoxina SocA diferente de todos os outros tipos de sistemas TA descritos (AAKRE et al., 2013; MARKOVSKI, WICKNER, 2013; CHAN, ESPINOSA, YEO, 2016). Essa antitoxina atua como um adaptador proteolítico para degradação da toxina SocB pelas proteases ClpXP, uma vez que sem a antitoxina, as proteases não degradam a toxina (AAKRE et al., 2013; MARKOVSKI, WICKNER, 2013)

Apesar dos vários tipos de sistemas TA descritos, a maioria dos trabalhos concentra-se nos sistemas do tipo II visto que são mais abundantes nos genomas. Diversos sistemas TA dessa classe foram reportados, tais como MqsR/A, Phd/Doc, HipA/B, MazE/F, RelB/E e VapB/C (WEN, BEHIELS, DEVREESE, 2014).

A grande maioria dos trabalhos envolvendo sistemas TA são descritos em bactéria que causam doenças em seres humanos tais como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* além de outras, geralmente associando esses sistemas a doenças crônicas, uma vez que induzem a formação de células persistentes, e essas células são tolerantes a compostos antimicrobianos utilizados nos tratamentos das doenças. Quando essas células não estão mais em contato com o antibiótico, voltam a crescer, promovendo a doença novamente. Contudo, recentemente, esses sistemas também vêm sendo estudados em fitopatógenos almejando o melhor entendimento sobre o seu papel biológico para a bactéria.

Unterholzner et al. (2013) demonstraram que o sistema TA *stbD/E* de *Erwinia pyrifoliae*, agente causal das doenças “*black stem blight*” em pera asiática e “*fire blight*” em pera, contribui com uma notável estabilidade para o plasmídeo pEP26 o qual é hospedeiro do sistema. Os autores também mostraram que a toxina, quando

induzida nas células, promove estado fisiológico de células viáveis mas não cultiváveis, o que sugere que possa ser o estado de persistência. Este efeito é neutralizado na presença da antitoxina, caracterizando um sistema TA. Além disso, foi demonstrado que este sistema TA é um híbrido, sendo a toxina StbE membro da superfamília RelE/ParE, que normalmente teria como antitoxinas RelB/ParD, enquanto que a antitoxina StbD é pertencente a superfamília das antitoxinas Phd/YefM, que teria como respectivas toxinas Doc/YoeB. Este estudo demonstrou um atrativo alvo para o combate *E. pyrifoliae*, seja pelo potencial da toxina StbE em inibir o crescimento bacteriano, ou pelo menos para a indução da perda de plasmídeo.

Em outro estudo, Shavit et al. (2016) caracterizaram o sistema TA VapB/C em *Acidovorax citrulli*, agente causal da doença chamada murcha bacteriana, que coloniza a família das cucurbitáceas do mundo todo, como principais representantes a melancia e o melão. Essa bactéria apresenta dois grandes grupos de estirpes de que causam doenças nas plantas, sendo o grupo I principalmente associado com doença em melão e o grupo II associado com doença em melancia. Através de análises de PCR em 15 estirpes do grupo I e 12 estirpes do grupo II para a presença do sistema VapB/C, foi verificada a ausência em todas as estirpes do grupo I e a presença do sistema em todas as estirpes do grupo II, demonstrando que esse sistema é exclusivo para estirpes do grupo II. Através de uma análise de filogenia, foi verificado que tanto a toxina como a antitoxina se agrupavam com membros da família Xanthomonadaceae, sugerindo que esse sistema possa ter sido transferido horizontalmente ao longo da evolução. Os autores também mostraram que a toxina VapC tem atividade de ribonuclease degradando inclusive as unidades ribossomais. Também verificaram a indução da toxina e antitoxina em resposta a estresses como presença de antibiótico e deficiência de aminoácidos, além do fato de esses genes serem altamente induzidos durante a infecção da bactéria na planta, desta forma demonstrando que esse sistema possui ação importante para a colonização da bactéria. Os autores discutem que estudos mais detalhados com anticorpos desses genes e mutantes poderiam elucidar melhor o papel biológico desse sistema para a bactéria.

Em *X. fastidiosa* foi demonstrada a presença do sistema PemK/I associado à manutenção de plasmídeo (LEE, ROGERS, STENGER, 2010). Através de ensaios utilizando as proteínas purificadas foi demonstrada a interação entre as proteínas desse sistema, comprovando que tratava-se de um sistema TA (LEE, ROGERS,

STENGER, 2010). A toxina PemK foi descrita como endoribonuclease com clivagem específica para fita simples de RNA no motivo UAC, sendo que também foi reportado que o motivo RGD (argenina 4A, glicina 5A e ácido aspártico 6A) da toxina PemK é essencial para a sua atividade de ribonuclease, uma vez que com a deleção de aminoácidos pertencentes a esse motivo há a perda de atividade da toxina (LEE, ROGERS, STENGER, 2012).

Para *X. fastidiosa* também foram caracterizados dois sistemas TA distintos: MqsR/A e DinJ/RelE (LEE et al., 2014, MERFA et al., 2016). Para a caracterização foi realizada a expressão heteróloga em *E. coli* e purificação dessas proteínas, as quais foram confirmadas em ensaios de *immunoblot*. Também foi realizado uma análise filogenética desses sistemas, com o qual foi possível verificar que os sistemas não compartilhavam o mesmo táxon, demonstrando que o sistema MqsR/A estava presente apenas nas subespécies *pauca* e *fastidiosa* (LEE et al., 2014). Os autores também mostraram que ambas as toxinas possuem atividade de ribonuclease, sendo que MqsR possui especificidade em clivar motivos GCU, enquanto que RelE não demonstrou especificidade na clivagem do mRNA. Foram realizadas análises fenotípicas quanto a densidade de células planctônicas e em biofilme, utilizando mutantes para toxina e antitoxina sozinhos e o duplo mutante para ambos sistemas. Os resultados sugerem que os sistemas respondem diferentemente a formação de biofilme. Na ausência da antitoxina MqsA há redução na densidade de células planctônicas e aumento para as células em biofilme, demonstrando que este sistema está associado à regulação da formação de biofilme de *X. fastidiosa* (LEE et al., 2014).

Merfa et al. (2016) utilizaram a estirpe de CVC (*pauca*) superexpressando a toxina MqsR, e verificaram que além da formação de biofilme, a superexpressão dessa toxina também induziu persistência em *X. fastidiosa*. Também foi demonstrado que ocorreu perda de patogenicidade da bactéria superexpressando MqsR, uma vez que, dezoito meses após a inoculação em laranja doce os sintomas estavam presentes apenas nas plantas inoculadas com a bactéria não transformada. Desta forma, os autores demonstraram que esse sistema TA além de estar associado à formação de biofilme como reportado por Lee et al. (2014), também está relacionado à indução de persistência e patogenicidade da bactéria *in planta*.

Uma análise comparando a presença de sistemas TA nos genomas de dez espécies/estirpes de *Xanthomonas*, que causam doenças em diferentes culturas como citros, arroz, cana-de-açúcar, tomate, e membros da família das Brassicaceae,

foi realizada por Martins et al. (2016). Neste foi verificado um maior número de sistemas TAs nas estirpes que infectam citros, entretanto, nenhum homólogo ao sistema MqsR/A foi identificado.

O aumento no número de estudos com sistemas TA em fitopatógenos evidencia a importância desse mecanismo genético na adaptação dos microrganismos às diferentes condições de estresse seja ambiental ou pela adição de compostos antimicrobianos. Assim, o estudo desses mecanismos abre novas perspectivas na busca de alvos genéticos visando o controle de fitopatógenos.

## **5. UTILIZAÇÃO DA ESTRATÉGIA DE RESISTÊNCIA DERIVADA DO PATÓGENO (RDP)**

Na agricultura a procura por variedades resistentes/tolerantes a patógenos tem sido alvo de diversos programas de melhoramento genético. A resistência é a capacidade que as plantas têm de restringir o desenvolvimento do patógeno e da doença, enquanto que, tolerância, as plantas suportam a doença sem perdas no fitness da planta (ROY, KIRCHNER, 2000). A tecnologia de transformação genética de plantas surgiu como mais uma tecnologia para busca de plantas resistentes/tolerantes, tornando-se uma ferramenta que visa a inserção direta de genes de interesse na planta alvo.

Existem diferentes abordagens utilizadas atualmente para a transformação genética de plantas, sendo a clássica a transgenia que utiliza de genes ou elementos genéticos de outros organismos que podem ou não ser sexualmente compatíveis com o hospedeiro. Há também outros novos termos como a intragenia que seria a utilização de genes e elementos genéticos da mesma espécie ou de espécies sexualmente compatíveis. Outra abordagem seria a cisgenia, que seria a utilização do gene de um indivíduo exatamente como ele está no genoma (promotor, íntrons, exons e terminador) para transformação em outro indivíduo sexualmente compatível (HOLME, WENDT, HOLM, 2013). Além dessas, mais recentemente há o uso da abordagem de edição gênica utilizando o sistema CRISPR/Cas9 que pode tanto inserir sequências como retirar sequências do genoma do hospedeiro (KHATODIA et al., 2016).

Dentro das possíveis abordagens da transgenia visando resistência a patógenos, a resistência derivada do patógeno demonstra-se muito eficaz. O termo foi proposto inicialmente por Sanford e Johnston (1985), que sugeriram que a

expressão de alguns genes ou sequências de DNA de um patógeno em um hospedeiro causaria alterações no equilíbrio dos componentes do patógeno podendo interferir no ciclo de infecção.

Essa abordagem foi utilizada inicialmente em tabaco, o qual superexpressava a capa proteica do vírus do mosaico do tabaco (TMV), gerando linhagens resistentes ao patógeno (ABEL et al., 1986). A partir desse trabalho, diversos outros foram desenvolvidos utilizando a mesma abordagem. Sendo esta estratégia utilizada para controle de patógenos que causam doenças em citros.

Reyes et al., (2011) reportaram que transformaram plantas de laranja doce conferindo resistência ao vírus da sorose dos citros. Para tal, as plantas foram transformadas com um *hairpin* de uma região de intron do RNA (ihpRNA) de três genes do vírus, sendo estes: capa proteica, 54K e 24K - duas ORFs com função desconhecida. Foi verificado que apenas as plantas cuja ihpRNA foram derivadas da capa proteica apresentam altos níveis de resistência ao vírus, enquanto os outros apresentaram resistência parcial ou não demonstraram resistência. Também foi verificado que tal resistência foi obtida através da ativação da maquinaria de silenciamento de RNA mediada pelos pequenos iRNA produzidos pela planta transgênica, demonstrando a eficiência da abordagem de RDP.

Apesar do termo RDP ser amplamente utilizado para resistência a vírus, o conceito pode ser aplicado à resistência a qualquer patógeno, sendo essas estratégias mais recentemente aplicadas para resistência/tolerância a bactérias.

Apesar de os autores não mencionarem o termo RDP, Yang et al. (2011), transformaram laranja com um sinal de sinalização nuclear (*nls*) do gene *pthA* de *X. citri*, e conferiram resistência contra a mesma. O gene *pthA* é um dos genes essenciais para a patogenicidade de *X. citri*, e possui três regiões nls na região COOH terminal. É presumido que estas sequências se ligam a importinas do hospedeiro direcionando o PthA para o núcleo da célula, onde pode modular genes no hospedeiro. Os autores sugerem que possivelmente, com a superexpressão dessas sequências, há saturação dos sítios das importinas, portanto não direcionando o PthA produzido por *X. citri* para o núcleo da célula hospedeira e, conseqüentemente, levando à resistência a bactéria.

Uma outra abordagem foi utilizada por Caserta et al. (2014), que transformaram laranja doce e citrange com o gene *rpfF* de *X. fastidiosa*, e desafiaram essas plantas com *X. citri*, demonstrando resistência a essa bactéria. A molécula *diffusible signal fator* (DSF) produzido pela *X. fastidiosa* é similar ao de *X. citri*,

entretanto, os genes que são modulados por essa molécula são diferentes entre os patógenos, desta forma o DSF pôde ser reconhecido por *X. citri* e foi capaz de reprimir genes de virulência da bactéria, o que levou à redução dos sintomas.

Desta forma pode-se verificar que resistência derivada do patógeno apresenta-se como uma alternativa na busca de plantas transgênicas resistentes ou tolerantes a fitopatógenos de citros.

## **JUSTIFICATIVA**

Trabalhos prévios demonstraram que *X. fastidiosa* causadora da CVC, quando superexpressando a toxina MqsR, apresentou menor crescimento, diminuiu a capacidade de movimento e não foi patogênica em plantas de laranja doce (MERFA et al., 2016). Dessa forma, o uso desse gene para transformação genética em planta, visando sua superexpressão tem potencial para reduzir a população do patógeno e conseqüentemente a doença. Adicionalmente, como *X. citri* também é um patógeno de citros, plantas superexpressando MqsR também poderão apresentar níveis de resistência a *X. citri* caso a toxina possa interferir no metabolismo das células desse fitopatógeno. Dessa forma o presente trabalho visa o estudo de MqsR em plantas transgênicas para testar seu potencial em conferir resistência a dois importantes fitopatógenos de citros.

## **CAPÍTULO 1. Avaliação da superexpressão da toxina MqsR em plantas transgênicas de tabaco e citros quanto a resistência a *Xylella fastidiosa***

### **RESUMO**

A CVC é uma doença que gera perdas consideráveis na produção de laranja doce, sendo causada pela bactéria *X. fastidiosa*. Por conta disso, busca-se por variedades resistentes/tolerantes este patógeno. A transgenia apresenta-se como mais uma ferramenta na busca por variedades tolerantes/resistentes. A estirpe patogênica superexpressando MqsR foi incapaz de induzir sintomas de CVC em laranja doce, o que demonstra que a toxina possui potencial para transformação genética de plantas visando controle da bactéria, uma vez que quando superexpressa em plantas a *X. fastidiosa* não haveria antitoxina suficiente para inibir a função da toxina, possivelmente inibindo o crescimento bacteriano ou levando à indução de persistência, interferindo assim na colonização bacteriana. Contudo, a obtenção de plantas de citros transgênicas não é trivial, dada à biologia do gênero. Portanto, a utilização de tabaco como planta modelo é uma alternativa para estudos funcionais de genes visando resistência a *X. fastidiosa*. Desta forma, foram obtidas plantas de tabaco superexpressando a toxina MqsR, as quais foram desafiadas com *X. fastidiosa*, foi observada redução da incidência e da severidade de sintomas, assim como da população bacteriana. Com esses resultados foi demonstrado que o gene possui potencial para transformação de citros visando resistência a *X. fastidiosa*. Assim, foram obtidas plantas de citros superexpressando a toxina MqsR. Essas plantas foram desafiadas com *X. fastidiosa*, nas quais foi observada redução da severidade de sintomas, assim como da população da bactéria na planta, sugerindo que esta toxina possa estar interferindo com a colonização e patogenicidade da bactéria. Esses resultados indicam que as plantas superexpressando MqsR apresentaram potencial para testes de desafio com *X. fastidiosa* em condições de campo para resistência a CVC.

## 1. INTRODUÇÃO

A CVC é uma das principais doenças que afetam a produção de laranja doce, assim, há estudos para a obtenção de variedades resistentes a *X. fastidiosa*. Nessa vertente, a transgenia vem como uma ferramenta para a inserção de genes chaves nas plantas para a obtenção de plantas resistentes/tolerantes a fitopatógenos. Um potencial gene para transformação genética de citros visando resistência a *X. fastidiosa* é o *mqsR* do próprio genoma da bactéria. Este que codifica uma toxina de um sistema toxina-antitoxina, trata-se de uma ribonuclease (LEE et al., 2014; MERFA et al., 2016) e foi altamente induzido em células persistentes de *X. fastidiosa* (MURANAKA et al., 2012). Foi reportado que uma estirpe patogênica de *X. fastidiosa* superexpressando MqsR não foi capaz de induzir sintomas em laranja doce 18 meses após a inoculação (MERFA et al., 2016).

As células persistentes apresentam-se em estado de dormência, no qual as mesmas não se multiplicam e não morrem (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014), sendo encontradas em situações de alta densidade populacional ou de estresse. A formação dessas células é dependente da indução de sistemas TA, nos quais, em situações de estresse, há a degradação da antitoxina liberando a toxina para exercer sua atividade, induzindo a persistência ou podendo levar à morte celular (WEN; BEHIELS; DEVREESE, 2014). O gene *mqsR* foi reportado como o mais induzido na formação de células persistentes de *E. coli* (SHAH et al., 2006), assim como em *X. fastidiosa* (MURANAKA et al., 2012), demonstrando que este está diretamente envolvido com a indução de células persistentes. Merfa et al. (2016) verificaram que *X. fastidiosa* superexpressando MqsR apresentou regulação negativa para movimentação celular interferindo na colonização, e conseqüentemente, na patogenicidade, logo, a transformação do gene *mqsR* de *X. fastidiosa* em citros poderia conferir resistência contra a bactéria, uma vez que, mesmo que esta produza a antitoxina cognata, não seria suficiente para inibir a superexpressão da toxina produzida pela planta, gerando desbalanceamento na proporção toxina-antitoxina, o que poderia levar à indução das células persistentes ou mesmo à inibição do crescimento bacteriano.

Contudo, o gênero *Citrus* possui algumas particularidades que dificultam a obtenção de plantas transgênicas, tais como baixa eficiência de transformação genética, períodos juvenis longos e necessidade de propagação vegetativa das plantas transformadas, podendo levar até dois anos para a obtenção de plantas

prontas para desafio com o patógeno. Uma alternativa para o estudo funcional de genes de resistência é o uso de plantas modelo. As plantas modelo têm como características a alta produção de sementes, ciclo de vida curto, protocolo de transformação genética simples e alta eficiência de transformação, atributos que favorecem o estudo funcional de genes de interesse. Nesse contexto, foi reportado que *Nicotiana tabacum*, acesso RP-1 é hospedeiro alternativo para *X. fastidiosa*, sendo a estirpe isolada de citros capaz de induzir sintomas nessa planta (LOPES et al., 2000).

Dessa forma, para estudar o potencial do gene *mqsR* em conferir resistência contra *X. fastidiosa*, foram obtidas plantas de tabaco transformadas, e posteriormente, plantas transgênicas de laranja doce.

## 2. HIPÓTESE

A planta superexpressando a toxina poderia interferir com a colonização da *Xylella fastidiosa* reduzindo os sintomas, uma vez que mesmo bactéria produza antitoxina esta não seria suficiente para inibir a toxina produzida pela planta.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Estudar o potencial do gene *mqsR* em conferir resistência a *X. fastidiosa*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

##### **Tabaco**

- Obter plantas transgênicas superexpressando a toxina e avaliar a funcionalidade do gene quanto a resistência a *X. fastidiosa*.

##### **Citros**

- Obter plantas de laranja doce (Pineapple) superexpressando a toxina.  
- Avaliar a funcionalidade do gene em laranja doce quanto a resistência a *X. fastidiosa*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Tabaco

#### 4.1.1. Construção e transformação genética

O gene *mqsR* foi sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies fusionado a uma sequência de um peptídeo sinal (ATGTTACCTACAAATTGATTTTGGGATTGGTCCTTGTGGTATCCGCTAGTGCC) descrito para secreção da proteína fusionada (BOSCARIOL et al., 2006). A clonagem direcional desse minigene no vetor de construção pRT101, foi realizada utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI*, inserindo esse cassete sob domínio do promotor 35S e terminação com cauda poli-A (Figura 4). A construção foi excisada do vetor pRT101 e clonado no vetor pCambia2301 utilizando a enzima de restrição *PstI*, o qual possui um gene de resistência a canamicina para seleção, e o  $\beta$ -glucuronidase como gene repórter



Figura 4. Construção utilizada para transformação genética das plantas.

O vetor pCambia2301 contendo o cassete foi transformado por choque térmico na estirpe EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, e posteriormente utilizada para transformação genética em discos foliares de tabaco, acesso RP-1. Esta etapa foi realizada em um trabalho de pós-doutorado, anteriormente ao início do mestrado pelo Juarez Pires Tomaz.

#### 4.1.2. Ensaio Histoquímico de gene $\beta$ -glucuronidase

Com a finalidade de verificar se as plantas regeneradas estavam transformadas, foi retirada uma parte do tecido foliar, a qual foi submersa em substrato 5-bromo-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo (X-Gluc), a 37° C por aproximadamente 16 horas. Após este período, as amostras que apresentaram coloração azul foram consideradas eventos de transformação positivos.

Para melhor visualização do material vegetal transformado, as folhas foram descoradas com uma solução de etanol absoluto e ácido acético (1:1). Após esta fase, as amostras foram observadas em lupa, e foram fotografadas. As plantas GUS positivas foram selecionadas para realização de PCR a fim de confirmar a inserção do gene de interesse.

#### **4.1.3. Extração de DNA e PCR para confirmação de transgenia**

Foi realizada a extração de DNA das plantas utilizando o método de CTAB-Sarcosyl. O DNA extraído foi quantificado e padronizado, e utilizado para a reação de PCR.

A reação de PCR foi realizada utilizando 8,5 µL de água milli-Q autoclavada, 12,5 µL do Master Mix 2x TopTaq DNA Polymerase (Qiagen), 10 pmol do *primer 35S forward* (GAATTCAACATGGTGGAGCACGACAC), 10 pmol do *primer mqsR reverse* (GACGTGAGCGCCAAGACAA) e 200ng de DNA da amostra, completando um volume final de reação de 25 µL.

Como controles negativos da reação foram utilizados água e DNA de tabaco não transformado, como controle positivo foi utilizado o vetor com a construção. O produto do PCR foi revelado em gel de agarose 1%, com *amplicon* de 785 pb utilizando o marcador *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas) para comparar o tamanho das bandas e verificar se está de acordo com o tamanho esperado.

#### **4.1.4. Expressão relativa do gene *mqsR* nas plantas transgênicas**

Foi realizada extração de RNA do tecido vegetal das plantas transformadas utilizando o Trireagente (Qiagen), segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Posteriormente, foram utilizados 1000 ng do RNA para síntese de cDNA utilizando a enzima Superscript (Life). O cDNA foi utilizado para avaliar a expressão do transcrito por PCR quantitativo em tempo real utilizando a metodologia do  $\Delta\Delta CT$ , comparando a expressão do transgene (*primers forward* CTGGCAAGGTCAGGGCTACA e *reverse* GACGTGAGCGCCAAGACAA) com gene endógeno ARPC3 (*primers forward* ATTGTGCATCACCCAGCCATT e *reverse* CTGCAGAGGGTGATTTG) em tabaco por não apresentar variação de expressão na condição de estudo.

As amostras foram quantificadas em duplicata, sendo que cada reação foi feita utilizando 8,5 µL de água milli-Q autoclavada, 12,5 µL do Master Mix 2x GoTaq (Promega), 5 pmol de cada *primer* específico para o gene de interesse totalizando 25 µL de reação.

#### **4.1.5. Desafio de plantas transgênicas com *X. fastidiosa***

As plantas T0 de tabaco que apresentaram PCR positivo e comprovadamente superexpressam por qPCR o gene *mqsR* foram submetidas a um experimento piloto de desafio com *X. fastidiosa*, no qual foram selecionados cinco eventos transgênicos para o próximo experimento, sendo estes denominados: 8; 12; 15; 26 e 32.

Foram obtidas as sementes T1 desses eventos, cultivadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) meia força com canamicina (100mg/L). As plantas que cresceram no meio de cultura foram transferidas para vasos, aclimatadas em sala com condições controladas, posteriormente foi realizada a PCR para confirmação de que essas plantas eram transgênicas.

Selecionadas as plantas PCR positivas, dez de cada progênie foram utilizadas para a inoculação com *X. fastidiosa*. A estirpe 9a5c, isolada de espécies de citros com CVC, mantidas em casa de vegetação, foi cultivada em meio PWG (DAVIS et al., 1981) e uma população de aproximadamente  $10^8$  células/mL foi ressuspensa em tampão fosfato-salino (PBS). Uma alíquota de 10 µL dessa solução foi utilizada para inocular a base dos pecíolos das folhas basais de *N. tabacum* utilizando o método de perfuração por agulhas segundo Almeida et al, (2001), o mesmo processo, porém utilizando PBS, foi realizado com três plantas de cada progênie como controle negativo do experimento.

Trinta dias após a inoculação foi realizada a extração de DNA e PCR das amostras para o diagnóstico da bactéria na planta utilizando *primers* RST 31 e RST 33 (MINSAVAGE et al., 1994). As plantas que foram positivas para a presença da bactéria seguiram para as análises de sintomatologia, com pelo menos quatro plantas de cada progênie.

#### **4.1.6. Avaliação de incidência e severidade de sintomas**

Após o aparecimento dos primeiros sintomas, as plantas foram avaliadas semanalmente quanto a incidência de sintomas, que é calculado como número de

folhas sintomáticas dividido pelo número de folhas totais, e multiplica-se esse valor por cem para visualização dos dados em porcentagem. A incidência de sintomas foi avaliada para todas as réplicas biológicas dos cinco eventos, além da planta não transformada.

Esses dados foram utilizados para o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Quando desenhada a curva de incidência, a área abaixo da curva é dividida em subáreas de trapézios, sendo que cada subárea é uma representação de quanto a incidência avançou naquele espaço de tempo. Com a soma dessas subáreas é dada a AACPD que representa o progresso da doença em função do tempo (SHANER et al., 1977). Para esses dados foi aplicado o teste *t* de Student com a finalidade de verificar se houve diferenças significativas entre os eventos transgênicos e a planta não transformada.

Para a análise de severidade da doença, todas as folhas de todas as plantas foram numeradas e avaliadas 80 dias após a inoculação por três avaliadores diferentes, segundo a escala diagramática proposta por Pereira (2014) (Figura 5). A partir das notas das folhas foi calculada a média por planta e a média das réplicas biológicas, que foram comparadas pelo teste *t* de Student.

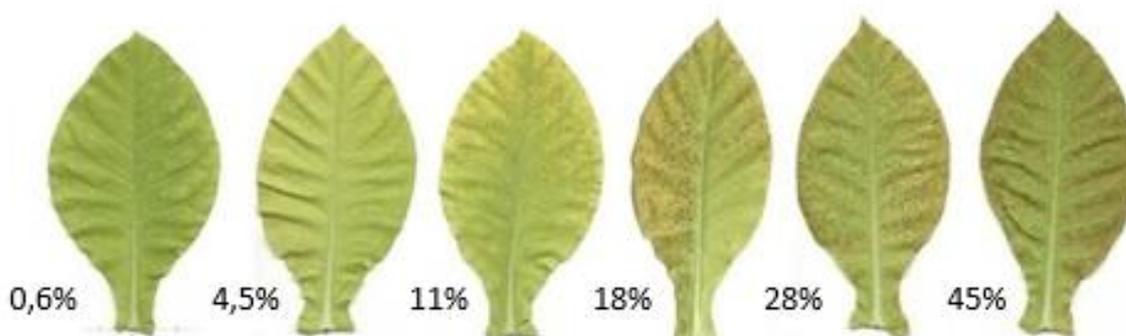


Figura 5. Escala diagramática de notas para tabaco infectado com *X. fastidiosa*, representado pela porcentagem ao lado esquerdo da respectiva folha (Adaptado de Pereira, 2014).

#### 4.1.7. Análise do coeficiente de correlação entre expressão gênica e a severidade de sintomas

Foi utilizado o coeficiente de Pearson para análise do coeficiente de correlação entre os dados de expressão gênica das plantas transformadas e a severidade dos sintomas, com a finalidade de verificar se há uma relação entre eles. A correlação pode variar de -1 a 1. Sendo -1 uma correlação inversamente

proporcional perfeita e 1 uma correlação direta perfeita. Segundo Callegari-Jacques (2003) o valor do coeficiente pode ser classificado em algumas categorias que são:

De 0,00 a 0,29 – fraca correlação linear;

De 0,30 a 0,59 – moderada correlação linear;

De 0,60 a 0,89 – forte correlação linear;

De 0,90 a 1,00 – muito forte correlação linear.

Sendo essa classificação utilizada para este trabalho.

#### **4.1.8. Quantificação da população de *X. fastidiosa* nas plantas transgênicas por qPCR**

Foram coletadas duas folhas próximas ao ponto de inoculação de cada planta dos dois eventos que apresentaram maior resistência à *X. fastidiosa* para a extração de DNA do pecíolo, região onde há maior concentração de *X. fastidiosa* devido a sua colonização ser exclusivamente no xilema.

O material vegetal foi macerado e pesado, e posteriormente seguiu-se com a extração, quantificação e padronização do DNA. A quantificação foi realizada através de PCR quantitativo em tempo real.

A amplificação foi realizada em um volume de 25  $\mu$ L contendo 12,5 $\mu$ L de TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 500nM da sonda TAQ CVC (5'-(6FAM) AAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TC(TAMRA)-3'), 525 nM dos *primers* CVC-1 e CCSM-1 (Oliveira *et al.*, 2002) e 200 ng da amostra de DNA.

Para todas as corridas experimentais foram utilizados controles negativos (DNA de planta inoculado com PBS) e positivo (DNA genômico de bactéria). Todas as amostras foram processadas em duplicata. A amplificação e captura do sinal foi realizada utilizando ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). A curva padrão para quantificação de *X. fastidiosa* foi produzida utilizando como referência  $2.94 \times 10^{-6}$  ng para um genoma da estirpe 9a5c. Quantidades conhecidas de DNA total bacteriano foram misturadas com DNA de plantas saudáveis de tabaco para obter uma faixa de  $10^2$  a  $10^8$  células/mg de tecido vegetal. A curva padrão obtida [ $y = -3.0153x$  (número de cópias de DNA) + 36.38] mostrou variação linear correlacionando DNA (número de cópias) com a medida de fluorescência (valores de CT - *Cycle Threshold* – intersecção entre a curva de amplificação da sequência alvo com um limiar), além de um coeficiente  $R^2$  de 0,9901.

Utilizando dessa curva para plotar os dados gerados pelo aparelho foi possível estimar a população bacteriana em cada amostra. E desta forma, padronizar os resultados para células de *X. fastidiosa* divididas por mg de tecido vegetal.

Foi estimada a média dos dois eventos transgênicos e comparados à média das não plantas transformadas, seguido da análise comparação de médias pelo teste *t* de Student para verificar se houve diferenças significativas entre os tratamentos.

## **4.2. Citros**

### **4.2.1. Construção e transformação genética**

A construção foi a mesma utilizada para tabaco como descrito no item 3.1.1. Para transformação genética foi utilizado o cultivar “Pineapple” de laranja doce. Contudo, foi utilizada a estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*, para transformação de epicótilo de citros. Essas plantas foram obtidas em um trabalho de pós doutorado anteriormente ao início do mestrado.

### **4.2.2. Ensaio Histoquímico de GUS**

Como uma primeira triagem para as plantas transgênicas foi realizado o ensaio histoquímico de GUS, que procedeu da mesma forma descrita no item 3.1.2. utilizando o controle negativo apropriado: pedaços de folhas de laranja doce ‘Pineapple’ não transformada.

### **4.2.3. PCR para confirmação de transgenia**

A fim de verificar se o gene inseriu no genoma de laranja doce foi realizado o PCR das amostras utilizando os mesmos parâmetros que em tabaco como descrito no item 3.1.3., contudo utilizando como controle negativo DNA de laranja doce não transformado.

Os eventos PCR positivos de Pineapple foram submetidas a um experimento piloto de infecção com *X. fastidiosa*, sendo eventos mais resistentes: 7A; 14; 39A e 46A selecionados para outros experimentos.

#### **4.2.4. Expressão relativa do gene *mqsR* nas plantas transgênicas**

Com a finalidade de verificar se os eventos selecionados estavam superexpressando o transgene foi avaliada a expressão gênica desses eventos, conforme descrito para tabaco no item 3.1.4, utilizando como controle endógeno a *ciclofilina* (primers forward AGAGTATGCAGAGGAATGG e reverse GTCCTTAACAGAAGTCCGT).

#### **4.2.5. Immunoblot para confirmação da produção da MqsR pela planta**

A fim de verificar se as plantas transgênicas estavam traduzindo a toxina, foram coletadas amostras dos eventos transgênicos macerados e realizada extração de proteínas segundo método de King et al. (1994). Após a extração, as amostras foram quantificadas utilizando a metodologia de Bradford e foram padronizadas para a mesma quantidade de proteínas.

Essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE 15%, sendo posteriormente transferida para uma membrana de nitrocelulose *Hybond-C* (Amersham) utilizando o aparelho *Multiphor II Novablot* (LKB), por uma hora a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> da área da membrama.

O bloqueio da membrana e tratamento com os anticorpos primário e secundário foi realizado utilizando o aparelho SNAP i.d. 2.0. (Millipore), que usa um sistema a vácuo para acelerar o processo. As diluições 1:500 e 1:5000 do anticorpo primário Anti-MqsR (MERFA et al., 2016) e secundário Anti-rabbit conjugado com HRP (Promega), respectivamente, foram utilizados nos ensaios.

A revelação foi realizada utilizando o *blot* em contato com o substrato ECL Reagent (GE Healthcare) o qual foi acoplado a um filme fotográfico por 15 minutos na ausência de luz. Após essa etapa, na ausência de luz, o *blot* foi incubado por 15 segundos em solução reveladora (Sigma-Aldrich), lavado por 15 segundos em água destilada e fixado em solução fixadora por 3 minutos (Sigma-Aldrich). Os protocolos utilizados foram ajustados para melhorar as condições da revelação.

#### **4.2.6. Desafio de plantas transgênicas com *X. fastidiosa***

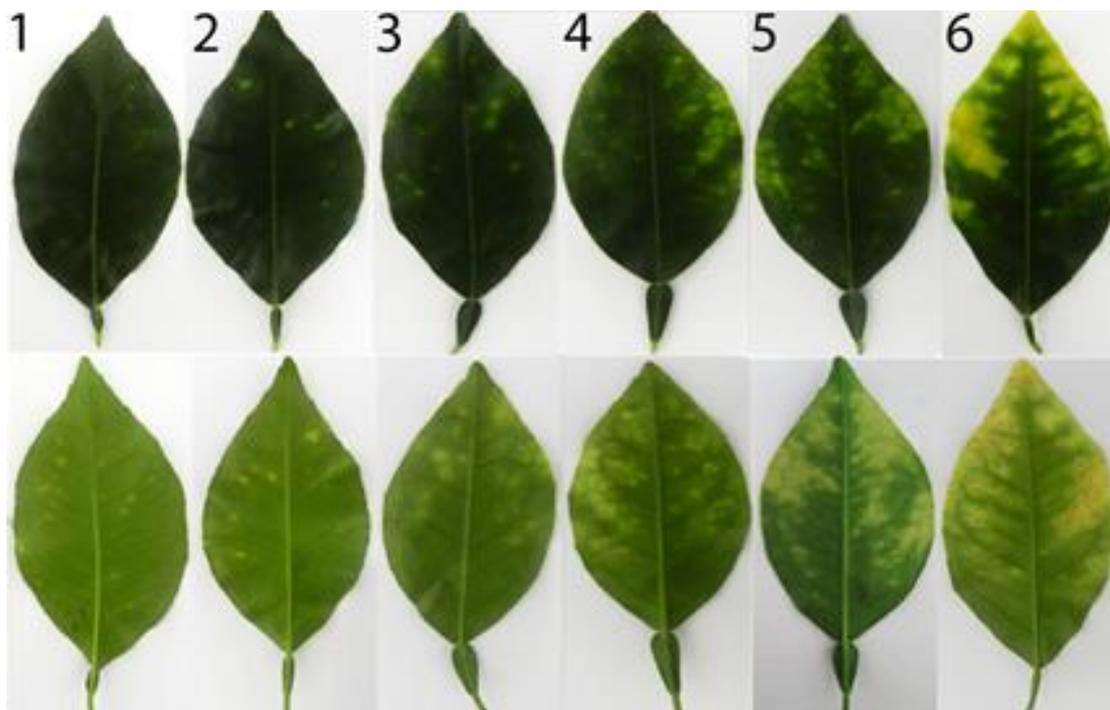
Após confirmação de transgenia e expressão gênica das plantas selecionadas, foram propagadas vegetativamente dez plantas de cada matriz transgênica de laranja doce além do controle não transformado.

Foi realizado o PCR das plantas propagadas para verificar se elas realmente eram transgênicas, e as inoculações seguiram as mesmas condições que em tabaco, descrito no item 3.2.6.

Foram coletadas amostras para diagnóstico da bactéria por PCR 45 dias após a inoculação. Apenas as plantas PCR positivas para a presença do patógeno foram utilizadas para as avaliações de sintomatologia e isolamento, com pelo menos quatro plantas por evento.

#### **4.2.7. Avaliação de incidência e severidade de sintomas**

Para verificar se as plantas transgênicas apresentavam resistência a *X. fastidiosa*, foi realizada a avaliação de incidência e severidade de sintomas. A incidência é a presença ou ausência de sintomas nas plantas, sendo o cálculo descrito no item 3.1.6. A severidade de sintomas é o quão agressivo o patógeno está sendo para a planta, sendo calculada da mesma forma que no item 3.1.6., contudo, utilizou-se a escala diagramática adequada para laranja doce (Figura 6) (AMORIM et al., 1993; MURANAKA et al., 2013) e as avaliações foram realizadas mensalmente para ambas incidência e severidade de sintomas.



**Figura 6.** Escala diagramática de CVC para avaliação de severidade de doença. Os números no canto esquerdo superior representam as notas de severidade respectivas de cada folha (Muranaka et al., 2013; adaptado de Amorim et al., 1993). As folhas na parte superior da imagem demonstram os sintomas na região adaxial, enquanto que na parte inferior são referentes as mesmas folhas apresentando sintomas na região abaxial.

Tanto para incidência quanto para a severidade de sintomas foram aplicados os cálculos da AACPD para verificar o quanto a incidência e severidade progrediram em função do tempo. Além disso, utilizando da AACPD foi calculada a porcentagem de redução de severidade dos eventos transgênicos comparados ao tipo selvagem. Para todas as análises o teste *t* de Student foi aplicado para verificar se houve diferenças significativas entre os tratamentos.

#### **4.2.8. Análise de correlação**

A análise foi realizada como descrito no item 3.1.7.

#### **4.2.9. Quantificação da população de *X. fastidiosa* por isolamento**

Para verificar se a toxina poderia estar controlando o avanço de *X. fastidiosa* nas plantas de laranja doce transformadas, foi realizado o isolamento quantitativo da bactéria 7 meses após a inoculação (COLETTA-FILHO et al., 2007). Foram coletados pecíolos das plantas infectadas, lavados com detergente em água

corrente, pesados, e triturados em tampão PBS. A partir dessa amostra triturada foi realizada a diluição seriada até  $10^{-6}$  e plaqueadas em meio PWG.

As placas foram incubadas por 3 semanas a 28 °C e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e padronizadas de acordo com a massa de tecido vegetal utilizada para o isolamento. Foi realizado o teste *t* de Student para verificar se houve diferenças significativas entre a quantidade de UFC isoladas das plantas transgênicas e do tipo selvagem.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Tabaco

#### 5.1.1. Ensaio Histoquímico de GUS

O gene repórter  *$\beta$ -glucuronidase*, presente no vetor pCambia2301, foi utilizado para pré-seleção para confirmação dos eventos transgênicos. Os dez eventos transgênicos inicialmente obtidos foram submetidos ao ensaio histoquímico de GUS, dos quais sete apresentaram coloração azul, demonstrando que o gene repórter foi inserido e possivelmente o transgene de interesse também. A Figura 7 representa uma planta GUS positiva.

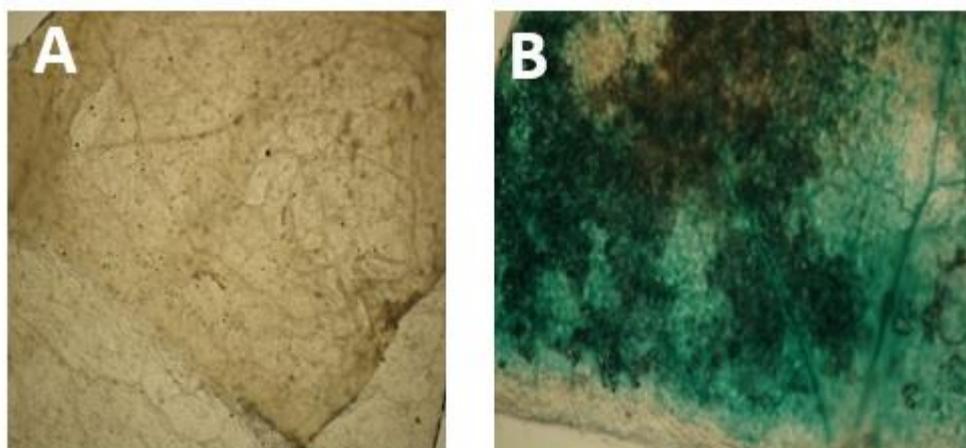


Figura 7. Ensaio histoquímico de GUS em folhas de tabaco transformadas com *MqsR*. A - planta não transformada descorada sem coloração azul. B - planta transgênica descorada com coloração azul.

#### 5.1.2. PCR para confirmação de transgenia

Com a finalidade de confirmar a transgenia, foi realizada a PCR de todos os eventos para garantir que o cassete de interesse foi inserido (Figura 8). Foi demonstrado que das dez plantas iniciais, sete foram positivas para a inserção do gene *mqsR*.

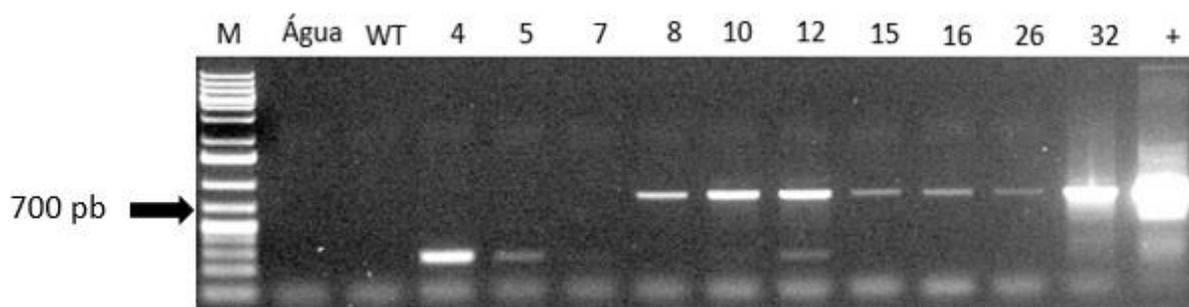


Figura 8. Perfil da eletroforese do PCR de plantas de tabaco regeneradas após transformação com o gene *mqsR* utilizando os *primers* 35S F e *mqsR* R. Cada evento transgênico é representado pelo respectivo número acima do gel. M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas). WT - tipo selvagem. + - vetor pCambia2301 contendo a construção.

### 5.1.3. Expressão relativa do gene *mqsR* nas plantas transgênicas

Para verificar se as plantas transgênicas confirmadas por PCR e GUS estavam superexpressando o transgene foi realizado o PCR quantitativo em tempo real das amostras e calculado o nível de expressão (Figura 9). Foi verificado que todos os eventos estavam superexpressando o transgene. Esses eventos foram utilizados em um experimento piloto em desafio com *X. fastidiosa* e com base nos resultados foram escolhidos os eventos que apresentaram maior resistência contra a bactéria (dados não apresentados). Os eventos selecionados foram: 8; 12; 15; 26 e 32, que foram utilizados nos experimentos seguintes.

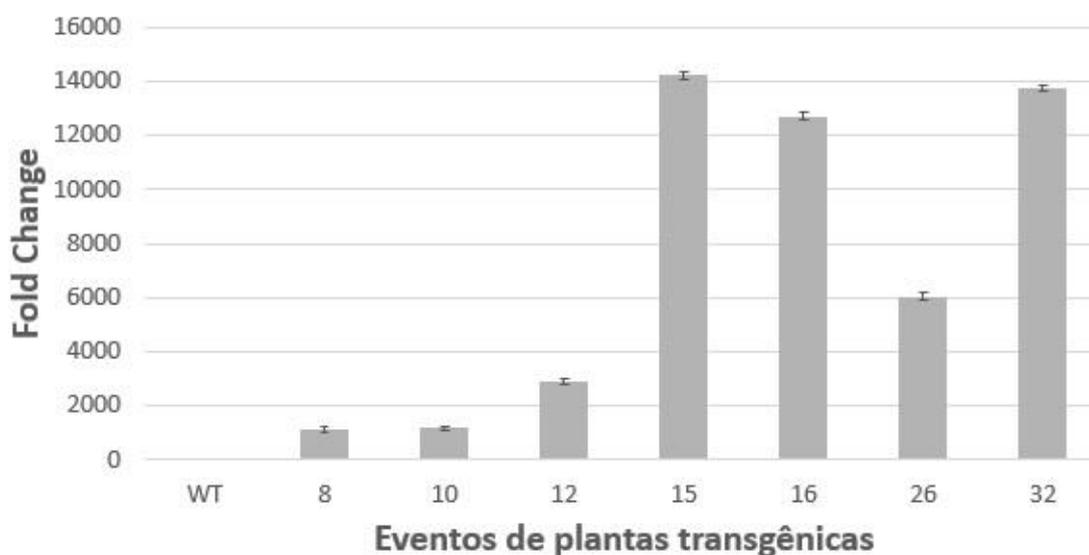


Figura 9. Expressão relativa do gene *mqsR* dos eventos transgênicos comparados ao tipo selvagem (WT).

#### 5.1.4. Avaliação de incidência e severidade de sintomas

Com a finalidade de verificar se as plantas transgênicas possuem resistência a *X. fastidiosa* foi realizado um experimento para avaliar a sintomatologia causada pela bactéria nos eventos transgênicos comparados ao tipo selvagem. Para isso foram avaliadas a incidência e a severidade de sintomas das folhas. A incidência é a avaliação de presença ou ausência de sintomas nas folhas, independentemente da quantidade de sintomas. Os dados foram coletados durante 5 avaliações após o aparecimento de sintomas e foram utilizados para o cálculo da AACPD (Figura 10).

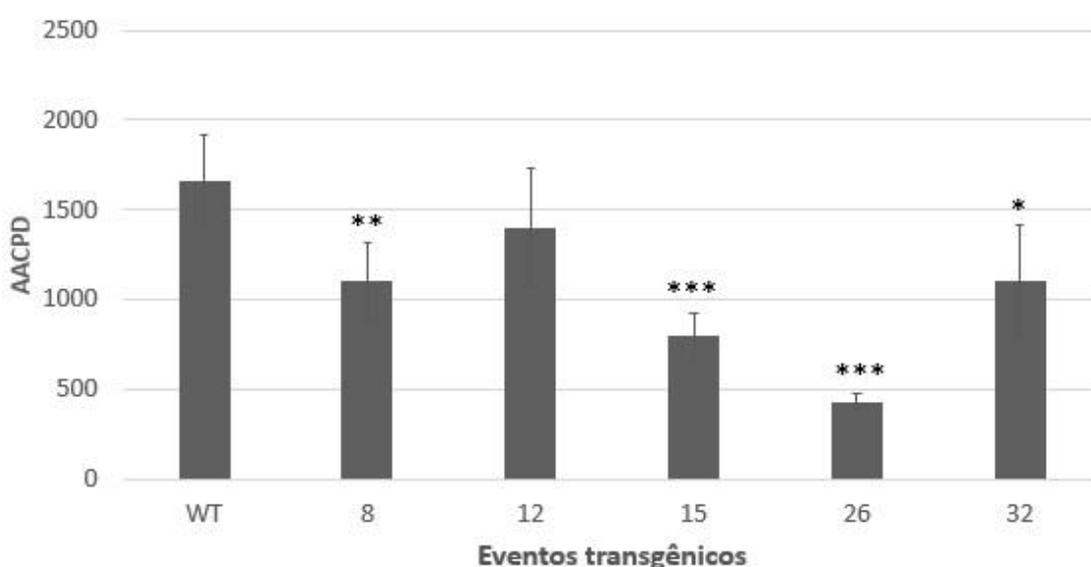


Figura 10. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença da incidência de sintomas dos eventos transgênicos e do tipo selvagem (WT). \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Foi verificado que os eventos transgênicos de forma geral apresentaram menor progressão de incidência de sintomas quando comparados ao tipo selvagem, com exceção do evento 12 que não apresentou diferença significativa em relação ao WT. Dentre os eventos transgênicos, os eventos 15 e 26 apresentaram redução maior da progressão da incidência ( $p < 0,001$ ), demonstrando ser mais resistentes a *X. fastidiosa*.

Também foi avaliada a severidade dos sintomas, que é a quantidade de área foliar com sintomas ocasionados pela bactéria. Para tal, foi utilizada uma escala diagramática para avaliação dos sintomas e com base nela foi calculada a severidade dos sintomas nas plantas transgênicas e no tipo selvagem (Figura 11). Foi verificado que, assim como para incidência de sintomas, os eventos transgênicos de forma geral

apresentaram-se mais resistentes a *X. fastidiosa* quando comparados ao tipo selvagem, com exceção do evento 12, que não apresentou diferença significativa em relação à planta não transformada. Assim como também observado nos resultados de incidência de sintomas, os eventos que apresentaram menor severidade foram os eventos 15 e 26, demonstrando que tanto para incidência, quanto para a severidade de sintomas esses eventos foram mais resistentes a *X. fastidiosa*. Esses resultados sugerem que a toxina pode interferir na população de *X. fastidiosa*, e conseqüentemente reduzindo os sintomas.

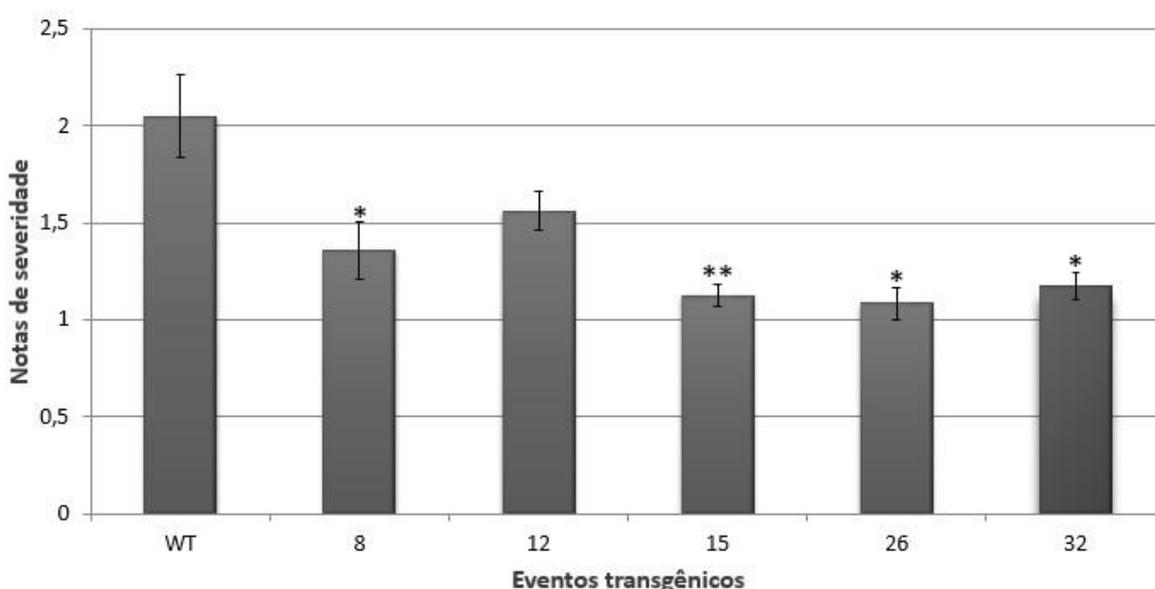


Figura 11. Severidade dos sintomas nos eventos transgênicos e tipo selvagem (WT). \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

### 5.1.5. Análise de correlação

A fim de verificar se há relação entre os dados de expressão gênica e de severidade foi realizada análise de correlação entre os dados, que revelou forte correlação inversamente proporcional de 0,6647 (CALLEGARI-JACQUES, 2003) entre os mesmos, ou seja, quanto maior expressão do gene *mqsR*, menor severidade dos sintomas da doença é observada nas folhas.

### 5.1.6. Quantificação da população de *X. fastidiosa* nas plantas transgênicas por qPCR

Como foi verificado que a sintomatologia nas plantas transgênicas reduziu quando comparadas as plantas não transformadas, sugere que a toxina possa estar

interferindo com a população de *X. fastidiosa* na planta. Para confirmar essa hipótese foi realizada qPCR para detecção de *X. fastidiosa* e titulação bacteriana na planta, sendo essas amostras padronizadas pela quantidade de material vegetal utilizado (Figura 12). Foi verificado que a população de *X. fastidiosa* nas plantas não transformadas foi mais que o dobro da população nas plantas transgênicas. Com base nesses dados sugere-se que a toxina superexpressa pelas plantas está, de alguma forma, interferindo com o aumento da população de *X. fastidiosa* e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas nas plantas.

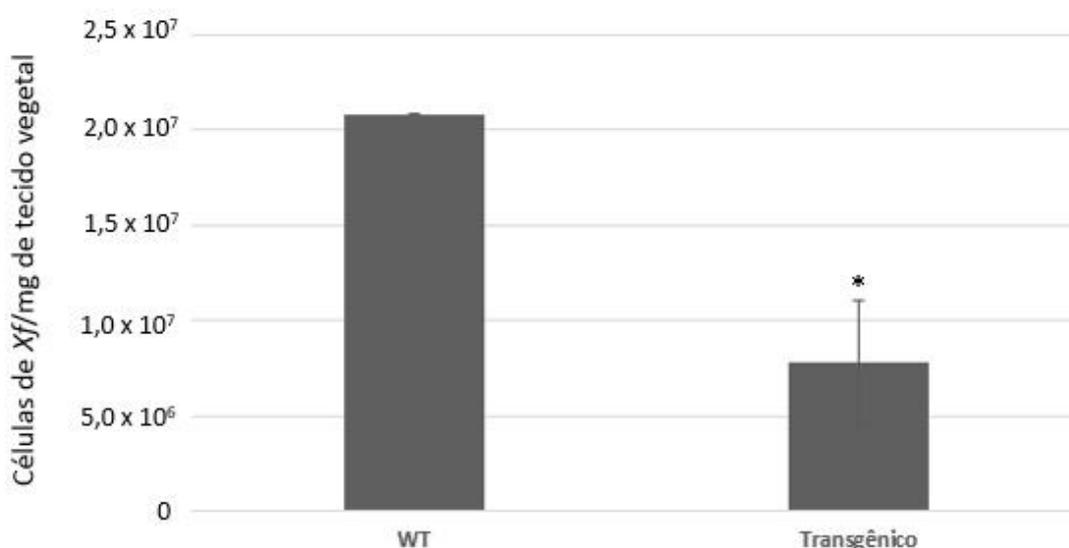


Figura 12. População de *X. fastidiosa* em planta transgênica e tipo selvagem (WT) quantificada por qPCR e padronizada por mg de tecido vegetal. \* -  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos demonstram que esse gene tem potencial para conferir algum nível de resistência a *X. fastidiosa* e que a aplicação dessa estratégia em laranja doce pode ser promissora para reduzir os sintomas de CVC.

## 5.2. Citros

### 5.2.1. Ensaio Histoquímico de GUS

Para pré-seleção dos eventos transgênicos foi realizado o ensaio histoquímico de GUS, uma vez que se o gene repórter  $\beta$ -glucuronidase está presente no vetor pCambia 2301, ele também foi inserido durante a transformação. Foram obtidas 17 plantas iniciais do cultivar Pineapple, das quais 11 eventos apresentaram

coloração azul, ou seja, foram GUS positivas. A Figura 13-B apresenta um evento GUS positivo.

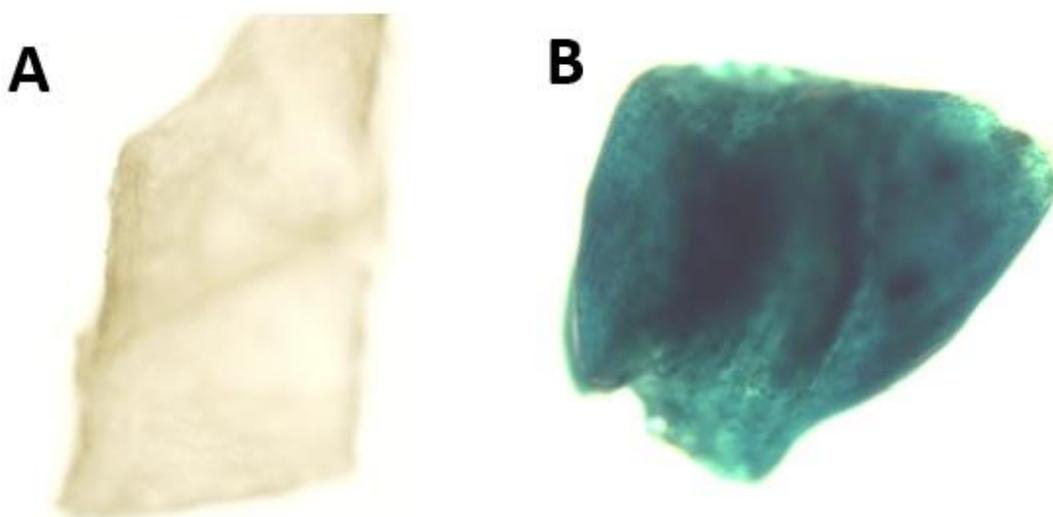


Figura 13. Ensaio histoquímico de GUS em pedaços de folhas de laranja doce cultivar Pineapple. A - Planta não transformada descorada sem coloração azul. B - planta transformada descorada apresentando coloração azul.

### 5.2.2. PCR para confirmação de transgenia

Para confirmar se as plantas expressando GUS apresentavam o gene de interesse, foi realizada a PCR de todos os eventos transgênicos com os *primers* específicos para o promotor 35S (*forward*) e o gene *mqsR* (*reverse*), conforme descritos no item 3.1.3. Foi verificado que de 17 plantas iniciais de Pineapple, 11 foram positivas para a inserção do promotor e do transgene (Figura 14).

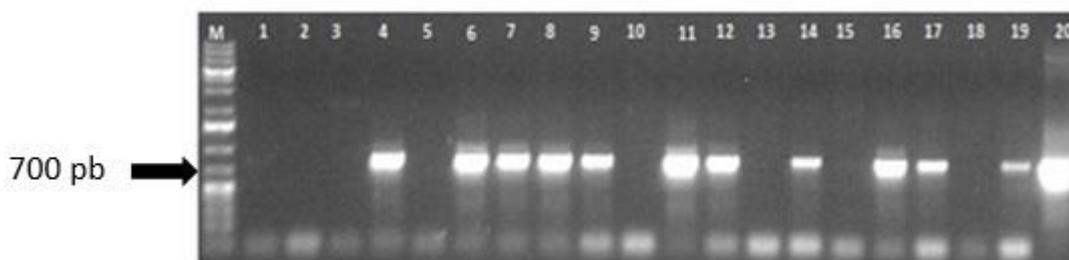


Figura 14. PCR para confirmação das plantas transgênicas de laranja doce (Pineapple). Cada número representa um evento, que são: M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas); 1 - água; 2 - WT; 3 - 1D; 4 - 7A; 5 - 7B; 6 - 14; 7 - 17; 8 - 21; 9 - 39A; 10 - 42D; 11 - 46A; 12 - SN; 13 - 37C; 14 - 31B; 15 - 28B; 16 - 15A; 17 - 02; 18 - 29; 19 - 19; e 20 - vetor pCambia2301 contendo o gene (controle positivo).

Os eventos de laranja doce foram utilizados em um experimento piloto, os quais foram inoculadas com *X. fastidiosa*. Os eventos mais resistentes foram

selecionados para os próximos experimentos, em Pineapple foram 7A, 14, 39A e 46A (dados não apresentados).

### 5.2.3. Expressão relativa do gene *mqsR* nas plantas transgênicas

Uma vez que as plantas selecionadas foram PCR positivas para a presença do transgene, foi avaliada a expressão de MqsR nesses eventos. Todos os eventos transgênicos estavam superexpressando a toxina (Figura 15).

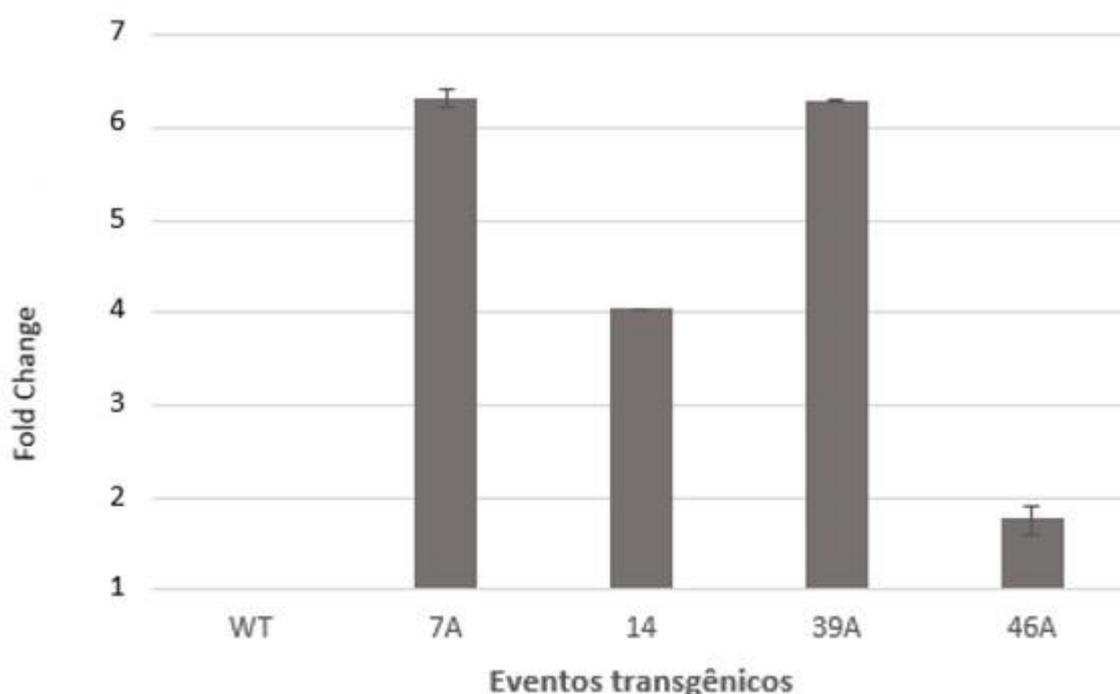


Figura 15. Expressão gênica (log) das plantas transformadas com o gene *mqsR* e comparadas com o tipo selvagem (WT).

### 5.2.4. *Immunoblot* para confirmação da produção da MqsR pela planta

Foi realizada a análise de *immunoblot* para averiguar se as plantas transgênicas estavam traduzindo a toxina, e foi confirmado que todas estavam expressando MqsR. A Figura 16 demonstra a expressão da toxina, sendo possível observar a banda de 14 KDa apenas na planta transgênica.

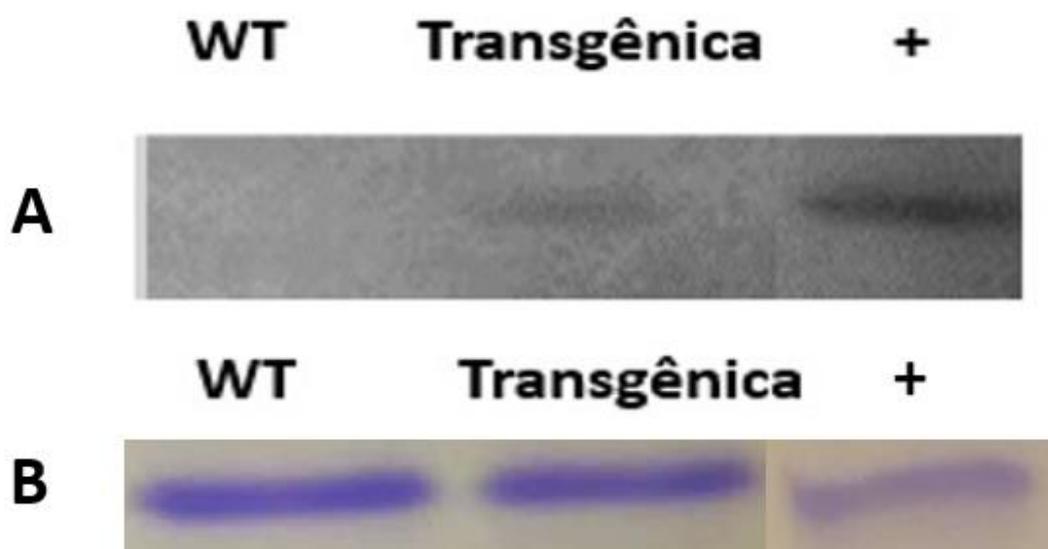


Figura 16. Immunoblot da toxina MqsR em laranja doce cultivar Pineapple. A – Detecção da toxina comparando tipo selvagem (WT) e planta transgênica. B - controle de padronização da concentração das amostras. WT – Controle negativo. Transgênica - planta PCR positivo superexpressando o transgene. + - MqsR purificada.

### 5.2.5. Avaliação de incidência e severidade de sintomas

Visto que os eventos de laranja doce foram PCR positivos, confirmados por expressão gênica e proteica, então foram avaliados quanto a resistência à *X. fastidiosa*. Para isso, as plantas foram inoculadas com a estirpe 9a5c e avaliadas a incidência e a severidade de sintomas.

Tanto para a incidência, quanto para a severidade, avaliações mensais foram realizadas após o aparecimento dos primeiros sintomas. Para a incidência foi utilizado o cálculo AACPD para demonstrar o quanto a incidência progrediu em função do tempo (Figura 17). A média de incidência dos eventos transgênicos não apresentou diferenças significativas comparados ao tipo selvagem.

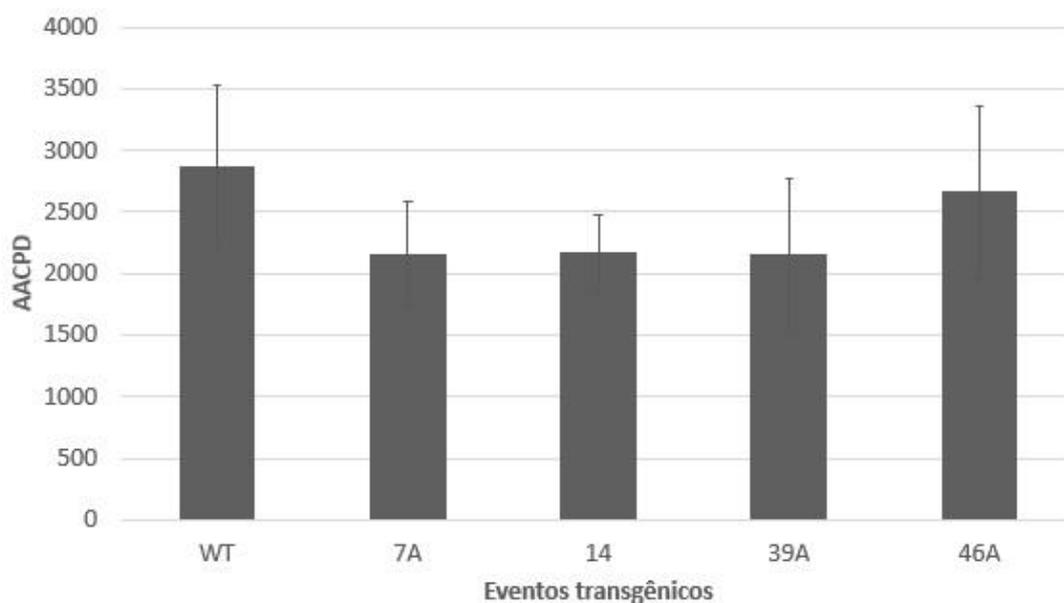


Figura 17. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença da incidência de sintomas nas plantas transgênicas comparadas à planta selvagem (WT).

Entretanto, quando observa-se a severidade (Figura 18) e o seu progresso em função do tempo (Figura 19) é observado que todos os eventos transgênicos apresentaram severidade de sintomas menor que da planta não transformada, demonstrando que possivelmente a toxina produzida pela planta possa estar interferindo na multiplicação da bactéria, e conseqüentemente, reduzindo os sintomas.

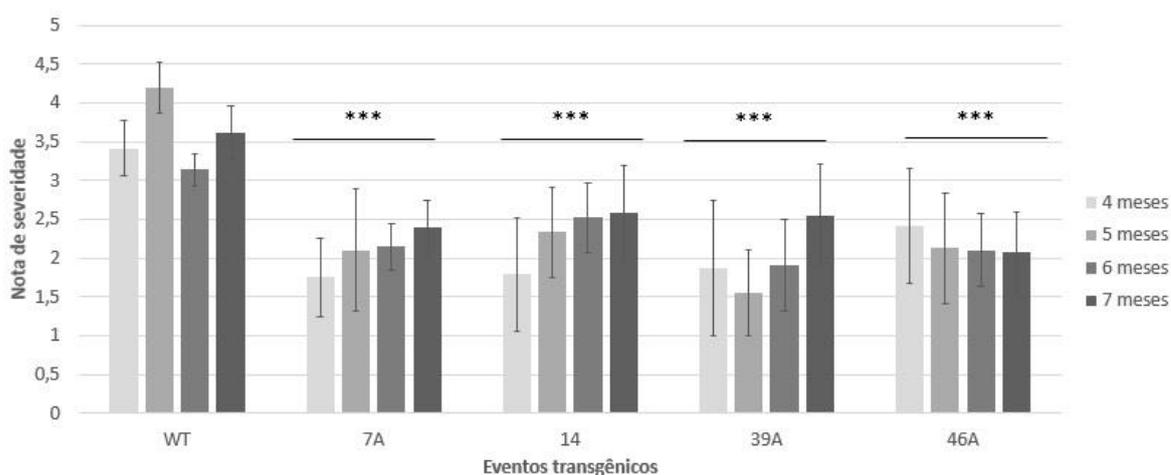


Figura 18. Severidade de sintomas das plantas transgênicas comparadas ao tipo selvagem WT ao longo de 4 meses de avaliação. \*\*\* -  $p < 0,001$ .

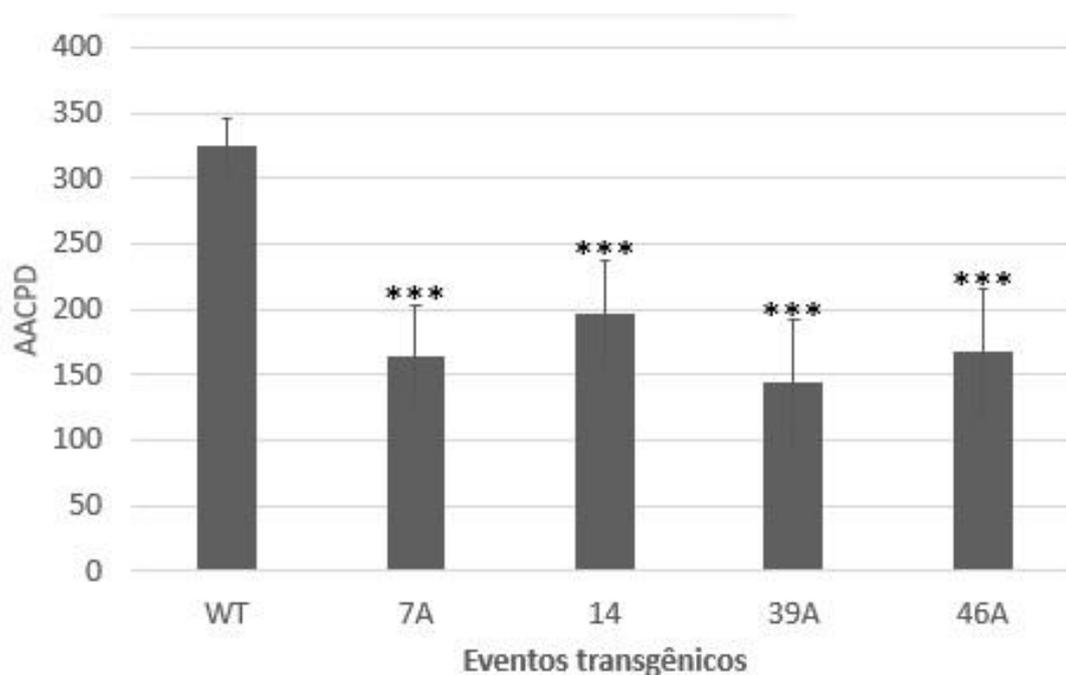


Figura 19. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença da severidade dos eventos transgênicos e comparados ao tipo selvagem (WT). \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Com base nesses dados, foi realizada em plantas superexpressando MqsR análise que mostra a porcentagem de redução de severidade de sintomas quando comparado ao tipo selvagem (Figura 20), na qual foi observada redução de 40 a quase 60% da severidade dos sintomas nos eventos transgênicos. Dentre os eventos, 7A e 39A apresentaram maior resistência à *X. fastidiosa*. Uma planta representativa das plantas com sintomas pode ser observada na figura 21.

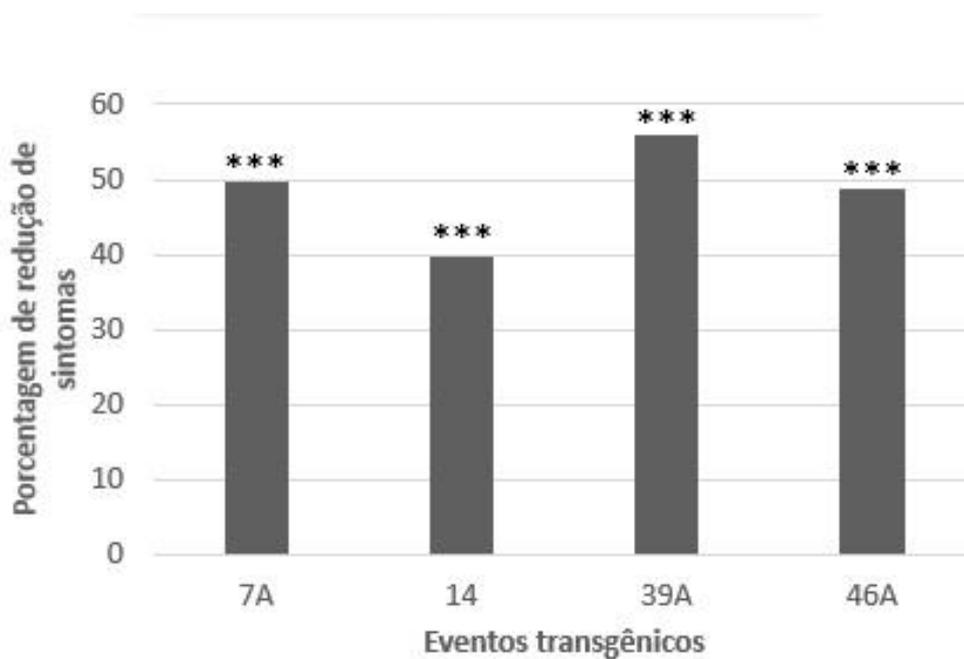


Figura 20. Porcentagem de redução da severidade de sintomas dos eventos transgênicos em relação ao tipo selvagem. \*\*\* -  $p < 0,001$ .

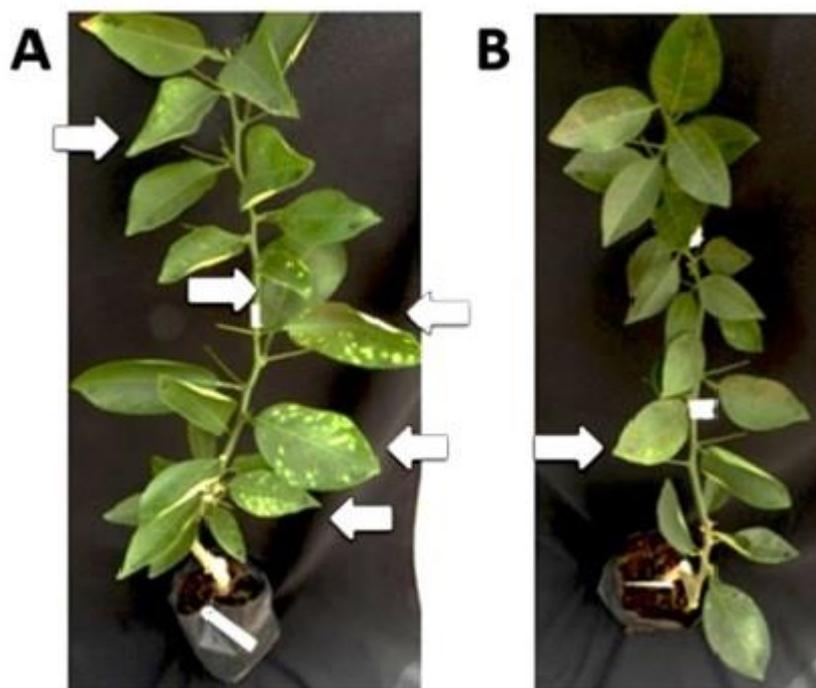


Figura 21. Sintomatologia de CVC. A - Planta do tipo selvagem com sintomas severos de CVC. B - Planta transgênica com sintomas menos severos de CVC. As setas indicam os sintomas.

Como a severidade de sintomas está associada à população de *X. fastidiosa* nas plantas, os resultados de severidade dos eventos transgênicos sugerem

que a toxina superexpressa pelas plantas possa estar interferindo com a multiplicação da bactéria, levando à redução de sintomas.

### 5.2.6. Análise de correlação

A análise de correlação entre os dados foi realizada utilizando as observações de severidade e de expressão gênica. Houve uma correlação inversamente proporcional de 0,70571, correlação forte entre os dados (CALLEGARI-JACQUES, 2003), ou seja, com alta expressão do transgene há menor severidade.

### 5.2.7. Quantificação da população de *X. fastidiosa* por isolamento

Para verificar se a toxina está interferindo na população de *X. fastidiosa*, foi realizado o isolamento da bactéria das plantas avaliadas no experimento de sintomatologia (Figura 22).

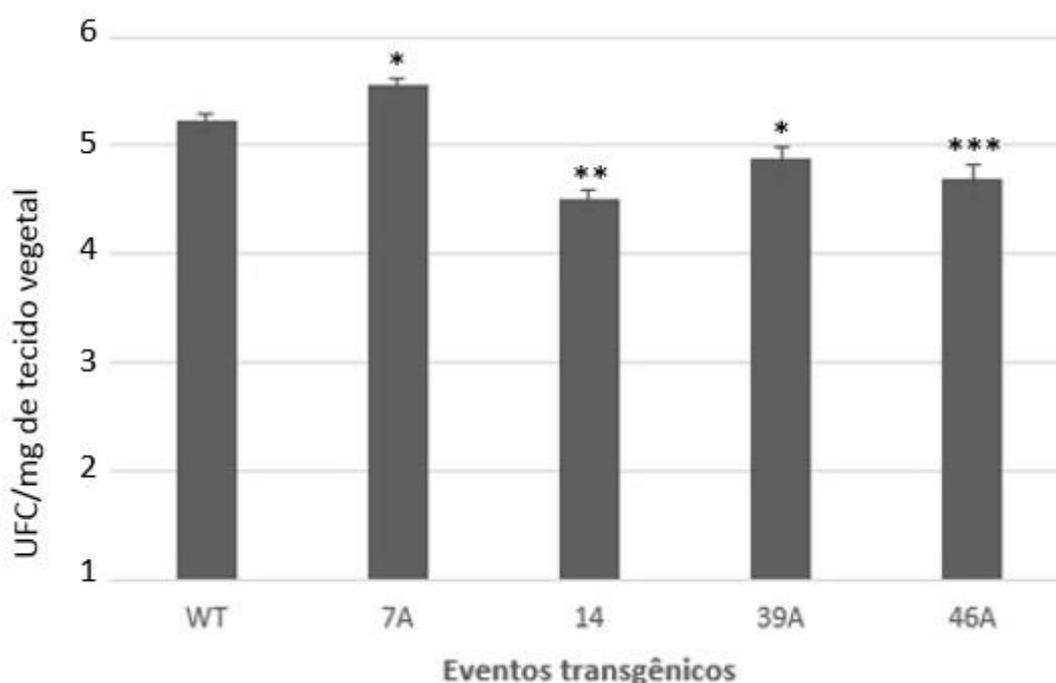


Figura 22. População de *X. fastidiosa* isolada das plantas avaliadas no experimento de sintomatologia, padronizada pela quantidade de tecido vegetal utilizada para o isolamento (log). \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Foi verificado que a população de *X. fastidiosa*, de forma geral, foi menor nas plantas transgênicas variando de 2 a 5 vezes menos bactérias comparadas ao tipo selvagem. A única exceção foi o evento 7A, que apesar de ter apresentado menor

severidade de sintomas quando comparado ao tipo selvagem, apresentou uma maior população da bactéria.

## 6. DISCUSSÃO

A CVC é uma das principais doenças que afetam a produção de laranja doce no Brasil. O manejo da doença é dado pelo controle do inseto vetor, podas das plantas com sintomas iniciais da doença, e erradicação da planta com sintomas severos (COLETTA-FILHO, DE SOUZA, 2014). Assim, a busca por tecnologias que proporcionem maior resistência das plantas é objeto de vários estudos (COLETTA-FILHO et al., 2007; GMITTER et al., 2012; MARANAKA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013). Como demonstrado por Merfa et al. (2016), a bactéria superexpressando constitutivamente a toxina MqsR não foi capaz de colonizar eficientemente a planta e não induziu sintomas, enquanto que a tipo selvagem foi capaz de gerar sintomas em laranja doce. Isso demonstra que a superexpressão desse gene pela planta suscetível poderia também interferir com a colonização da bactéria, e conseqüentemente, atenuar os sintomas.

Estudos de genes com potencial para conferir resistência a *X. fastidiosa* utilizando plantas de citros para transformação genética podem demandar vários anos, visto o tempo para obtenção das plantas transgênicas, propagação das mesmas e desafio com a bactéria. Portanto, a utilização de plantas modelo em estudos de interação com *X. fastidiosa* pode fornecer respostas mais rápidas que em citros.

Lopes et al. (2000) reportaram que tabaco é hospedeiro para *X. fastidiosa*, possibilitando esses estudos em um menor intervalo de tempo. Desta forma, diferentes estudos de interação com a bactéria foram conduzidos, como comparação de cultivares de tabaco quanto à susceptibilidade a *X. fastidiosa* (ALVES, KITAJIMA, LEITE, 2003), estudos de ionoma em diferentes condições (DE LA FUENTE et al., 2013; OLIVER et al., 2014) e transgenia visando resistência a bactéria (DANDEKAR et al., 2012; CASERTA, 2014; PEREIRA, 2014; GÓMEZ-KRAPP, 2016).

Para verificar a funcionalidade do gene *mqsR* em conferir resistência a *X. fastidiosa*, foram obtidos 7 eventos de tabaco superexpressando o transgene. Um experimento piloto de desafio com *X. fastidiosa* foi realizado e cinco eventos foram selecionados como mais resistentes à bactéria, sendo estes submetidos aos próximos experimentos. Com exceção do evento 12, todos os eventos apresentaram menor incidência e severidade de sintomas, demonstrando correlação inversamente proporcional de 0,66 entre a severidade de sintomas e a expressão do transgene. Verificada a redução de sintomas nas plantas, foi realizada a quantificação de *X. fastidiosa* por qPCR na qual foi demonstrada menor população da bactéria nas plantas

transgênicas comparadas ao tipo selvagem. Esses resultados sugerem que a toxina poderia induzir persistência nas células de *X. fastidiosa* e, por conta disso, reduzindo a sua multiplicação e capacidade de colonizar a planta, uma vez que já foi reportado que o gene *mqsR* é altamente induzido em células persistentes de *X. fastidiosa* (MURANAKA et al., 2012; MERFA et al., 2016). Uma outra possibilidade seria a toxina estar modulando a expressão de genes da bactéria, visto sua atividade de endoribonuclease (LEE et al., 2014; MERFA et al., 2016), e através dessa atividade reprimir genes que são associados ao movimento da bactéria e por consequência interferir na colonização da bactéria na planta, desta forma atenuando os sintomas, assim como verificado por Merfa et al. (2016).

Devido aos resultados promissores obtidos utilizando as plantas de tabaco, foi realizada a transformação genética de laranja doce para a superexpressão de MqsR. Foram obtidos 11 eventos transgênicos e selecionados 4 que apresentaram maior resistência à bactéria. Embora diferenças significativas na incidência da doença nas plantas transgênicas não tenham sido detectadas, os eventos transgênicos mostraram menor severidade de sintomas quando comparados ao tipo selvagem, demonstrando correlação inversamente proporcional de 0,70 entre os resultados de severidade e níveis de expressão do transgene.

Para verificar se a toxina produzida pelas plantas estava interferindo com a multiplicação da bactéria foi realizado o isolamento de *X. fastidiosa*, com o qual foi observado que, com exceção do evento 7A, todos os eventos apresentaram menor população de bactéria quando comparados com as plantas selvagens, o que demonstra que a toxina está inibindo o crescimento de *X. fastidiosa*. Foi reportado por Merfa et al. (2016) que a bactéria superexpressando a toxina não foi capaz de induzir sintomas em laranja doce. Assim, embora o evento 7A tenha apresentado população bacteriana superior a do tipo selvagem, e também ter apresentado menor severidade de sintomas, sugere-se que a toxina possa estar modulando não apenas genes relacionados a movimento celular, mas também genes associados à patogenicidade dessa bactéria.

Resultados similares foram reportados por Caserta (2014), que relata que tabaco e laranja doce transformados com o gene *rpfF* de *X. fastidiosa* apresentaram menor incidência e severidade de sintomas nas plantas inoculadas com *X. fastidiosa*. O gene *rpfF* é responsável por sintetizar uma “diffusible signal factor” (DSF) sintase, ou seja, uma enzima responsável por produzir moléculas de DSF. O DSF é uma molécula

utilizada para comunicação intercelular, chamada de *Quorum Sensing* (QS), que permite a modulação de genes de *X. fastidiosa* para melhor adaptação ao ambiente, podendo induzir a formação de biofilme. Desta forma, o autor concluiu que o gene conferiu redução do movimento da bactéria e, conseqüentemente, diminuição dos sintomas. Embora os genes *mqsR* e *rpfF* possuam funções muito distintas, já foi reportado que a toxina MqsR em *E. coli* está associada à regulação do QS podendo alternar o estilo de vida da bactéria entre movimentação ou formação de biofilme (BARRIOS et al., 2006). Em *X. fastidiosa*, já foi reportado o gene *mqsR* também associado à indução de biofilme (LEE et al., 2014; MERFA et al., 2016). Desta forma, os resultados encontrados, similares ao de Caserta (2014), poderiam ser explicados devido ao fato de ambos os genes *mqsR* e *rpfF* estarem associados à indução de biofilme, o que poderia interferir com a colonização da bactéria na planta, entretanto, essa hipótese deve ser futuramente investigada.

Independentemente do modo de ação da toxina na bactéria, foi observado que os eventos transgênicos apresentaram sintomas menos severos comparados ao tipo selvagem, desta forma demonstrando que essas plantas possuem potencial para experimentação em campo visando resistência a CVC. Vale ressaltar que as plantas utilizadas nesses experimentos foram podadas para que permanecessem com uma única haste, favorecendo o aparecimento de sintomas. Em plantas no campo, onde há muitos ramos e sempre há o surgimento de novas brotações, a bactéria não ficaria concentrada em um único ramo, e possivelmente essas plantas transgênicas poderiam apresentar redução ainda maior dos sintomas, devido à colonização ineficiente da bactéria.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

A superexpressão da toxina MqsR em plantas de tabaco conferiu, na maioria dos eventos, redução da incidência e severidade dos sintomas, assim como da população de *X. fastidiosa*.

Similar ao observado nas plantas de tabaco, plantas de laranja doce superexpressando a toxina MqsR apresentaram redução de severidade de sintomas e da população bacteriana, conferindo, na maioria dos eventos, maior resistência a CVC.

## **CAPÍTULO 2. Avaliação da superexpressão da toxina MqsR em plantas transgênicas de citros quanto a resistência a *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

### **RESUMO**

O cancro cítrico, causado pela bactéria *X. citri* é uma doença que causa grandes perdas econômicas para a citricultura brasileira e mundial. Todas espécies de citros são suscetíveis ao cancro cítrico, por esse motivo, a utilização de plantas transgênicas resistentes ou tolerantes à doença é uma estratégia que vem sendo amplamente utilizada. Nesse trabalho foi utilizada a toxina MqsR do sistema TA MqsR/A de *X. fastidiosa* para transformação genética de citros visando resistência a *X. citri*, visto que a mesma não possui a antitoxina cognata para inibir a função de ribonuclease da toxina. Foi verificado que MqsR penetra no interior das células de *X. citri* e inibe o crescimento celular. Com base nisso, plantas transgênicas superexpressando a toxina foram desafiadas com *X. citri* em ensaio utilizando folhas destacadas, nas quais foram observadas diminuição significativa de sintomas e da colonização bacteriana 14 dias após a inoculação. Em ensaios *in vivo* foi comprovado que a toxina produzida pelas plantas transgênicas entra nas células de *X. citri*, sugerindo que os resultados de menor colonização e sintomatologia foram decorrentes da ação da toxina nas células de *X. citri*. Essa hipótese foi confirmada através da expressão de genes regulados por MqsR, com o qual foi verificado que o gene *rpoD* (fator sigma associado ao crescimento bacteriano) e *fliC* (associado a síntese de flagelo) foram significativamente reprimidos em *X. citri* que colonizando plantas transgênicas quando comparados as bactérias que colonizaram plantas selvagens. Posteriormente, as plantas transgênicas foram inoculadas por pulverização com a bactéria e mantidas em casa de vegetação. Similar aos resultados obtidos em folhas destacadas, foi observada redução significativa na severidade dos sintomas na maioria dos eventos transgênicos, sugerindo que essas plantas possuem potencial para testes em campo visando resistência a *X. citri*.

## 1. INTRODUÇÃO

Cancro cítrico é uma das principais doenças de citros, sendo encontrada em todo mundo, e infecta não apenas laranja doce, mas todas as espécies de citros com importância comercial (DE CARVALHO et al., 2015). O agente causal do cancro cítrico, *X. citri*, pode ser disseminado naturalmente através do vento e da chuva, sendo capaz de infectar as plantas penetrando os tecidos por aberturas naturais como os estômatos ou ferimentos (GOTTWALD, GRAHAM, SCHUBERT, 2002).

Na folha, os sintomas de cancro cítrico surgem inicialmente na região abaxial, entre 7 a 10 dias após infecção, formando pequenas pústulas de coloração amarronzada clara (hiperplasia), normalmente circundada com halo amarelo, devido à multiplicação da bactéria (Figura 23A e B), o que resulta no encharcamento do tecido vegetal (<[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)>; GOTTWALD, 2000). Nos ramos, as lesões podem continuar viáveis por um longo período (Figura 23C), e nos frutos, embora os sintomas não afetem a qualidade do mesmo, pode ocorrer a ruptura da casca e queda prematura (Figura 23D) (GOTTWALD, GRAHAM, SCHUBERT, 2002).

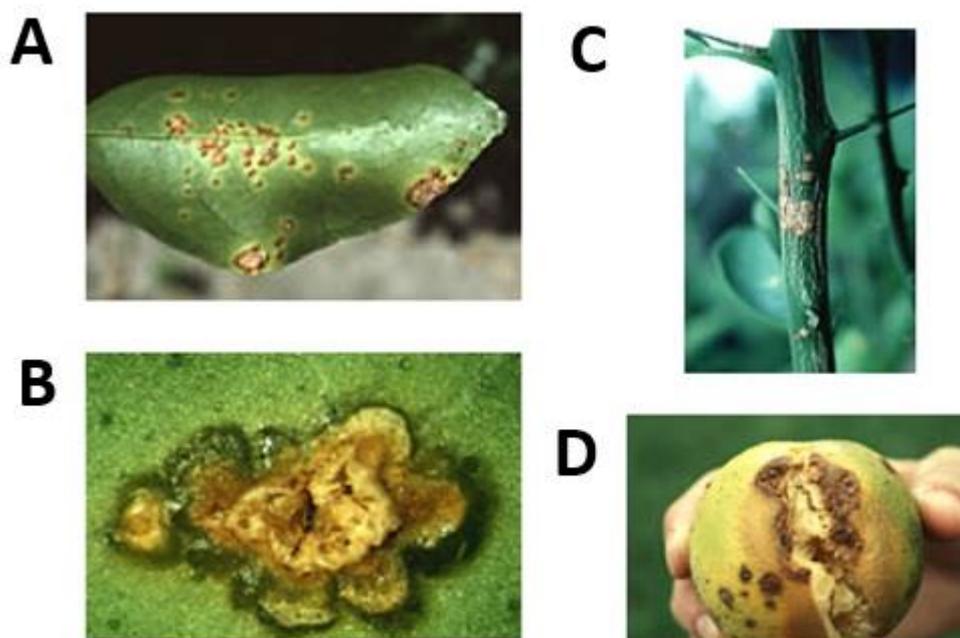


Figura 23. Sintomatologia de cancro cítrico. A - sintomas nas folhas com a formação de pústulas na região abaxial. B – sintoma de encharcamento ao redor da lesão. C – sintomas de formação de pústulas no ramo. D – Sintomas de ruptura da casca do fruto (Adaptado de GOTTWALD, 2000).

O controle do cancro cítrico no estado de São Paulo era realizado a partir da erradicação da planta sintomática e das plantas em torno desta em um raio de 30 metros, segundo a Resolução SAA 43 de 25/06/2009. Contudo, essa resolução foi

revogada com a publicação da Resolução SAA – 147 em 1º de novembro de 2013, que determina a erradicação apenas da planta contaminada e aplicação de cobre em um raio de 30 metros ao redor da planta erradicada, e também a aplicação a cada nova brotação, o que tem levado ao aumento da incidência da doença nos pomares.

Por conta das perdas econômicas geradas por essa doença, há busca por variedades resistentes/tolerantes a *X. citri*, sendo a transgenia uma alternativa para esse propósito. Dentro desta abordagem, a utilização de genes derivados de patógeno já foi demonstrada como promissora para conferir resistência a *X. citri* (YANG et al., 2011; CASERTA et al., 2014).

Desta forma, o uso de toxinas de sistemas TA para transformação genética de plantas poderia inibir o crescimento de *X. citri*. A toxina MqsR, já descrita como altamente induzida em células persistentes de *X. fastidiosa* e *E. coli* (MERFA et al., 2016; MURANAKA et al., 2012; SHAH et al., 2006) e que, quando superexpressa em *X. fastidiosa* não foi capaz de induzir sintomas em laranja doce (MERFA et al., 2016) não foi encontrada no genoma de *X. citri*, assim como sua antitoxina cognata (MARTINS et al., 2016). Por esta razão, foi utilizada a toxina MqsR de *X. fastidiosa* para transformação genética de citros visando resistência a *X. citri*.

## 2. HIPÓTESE

*X. citri* não possui o sistema TA MqsR/A em seu genoma, logo, não há a antitoxina cognata para inibir a função da toxina MqsR produzida pela planta transgênica, desta forma podendo inibir o crescimento bacteriano, e conseqüentemente os sintomas da doença.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar as plantas superexpressando o transgene quanto a resistência a *X. citri*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Verificar por immunoblot se a toxina produzida pela planta transgênica consegue penetrar na célula de *X. citri*.
- Avaliar através da curva de crescimento se a toxina interfere na multiplicação de *X. citri*.
- Avaliar a colonização e a população de *X. citri* por infiltração em folha destacada.
- Detecção por *immunoblot* da toxina presente em *X. citri* após infiltração em folha destacada.
- Avaliação da sintomatologia nas plantas transgênicas em casa de vegetação através da inoculação por pulverização.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. *Immunoblot para a detecção da toxina dentro da X. citri*

Com a finalidade de verificar se a toxina era capaz de penetrar na célula de *X. citri*, um experimento foi conduzido, na qual a bactéria foi cultivada em 5mL de meio NBY com OD inicial de 0,5 e 1 na presença de 100µg/mL toxina purificada previamente obtida (MERFA et al., 2016). O controle foi a *X. citri* com a mesma OD, mas sem a presença da toxina, para cada tratamento foram utilizadas 5 réplicas biológicas. As células foram cultivadas durante 72 horas a 28 °C com agitação de 120 rpm. Passado este período, cada amostra foi dividida em dois volumes, sendo que ambos foram centrifugados e obtidos *pellets* bacterianos, descartando-se o sobrenadante de todas as amostras. Todas as amostras foram ressuspensas em água milli-Q autoclavada, contudo, o primeiro volume das amostras foi armazenado, não passando por lavagem (*pellet* não lavado), enquanto que o segundo volume das amostras passou por mais uma centrifugação, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet*, logo, passando por uma lavagem (*pellet* lavado), deixando este *pellet* livre de excessos de goma e material extracelular, no qual a toxina poderia estar aderida, seguido da armazenagem da amostra.

Posteriormente as amostras foram lisadas e aplicadas em gel SDS-PAGE 15%. O *immunoblot* foi realizado conforme descrito no item 3.2.5 do capítulo 1.

### 4.2. *Curva de crescimento da X. citri na presença da toxina MqsR*

Para verificar se a toxina inibe o crescimento de *X. citri*, a bactéria foi cultivada em placa (96 Well Cell Culture Cluster- Costar 3595) cuja população inicial foi de  $10^7$  células/mL. A toxina foi adicionada nas concentrações de 100 e 200 µg/mL ao meio com a bactéria no tempo 0h. Foram utilizadas 4 réplicas para cada tratamento, sendo o controle cultivado na ausência de toxina. A curva de crescimento foi realizada por 72h no equipamento Varioskan (Thermo Fisher Scientific), com incubação a 28°C, agitação a 120 rpm com diâmetro de 5 mm, durante 10 segundos intercalados com 10 segundos sem agitação, com leituras de densidade ótica (600nm) a cada 1h.

### **4.3. Obtenção e confirmação de plantas transgênicas visando resistência a *X. citri***

Uma vez que as plantas transgênicas de laranja doce foram obtidas anteriormente (Capítulo 1), foram transformadas plantas do porta-enxerto citrange “Carrizo” com a construção previamente obtida visando resistência a *X. citri*. Para a transformação genética foi utilizada a metodologia descrita no item 3.2.1. do Capítulo 1 e confirmada a transgenia por GUS e PCR seguindo metodologia descrita, respectivamente, nos itens 3.2.2. e 3.2.3 do Capítulo 1. As plantas obtidas foram utilizadas em um experimento piloto de desafio com *X. citri*, sendo o evento 9 de Carrizo, e os eventos 7A, 14, 39A e 46A, anteriormente selecionados da cultivar Pineapple como resistentes a *X. fastidiosa*, selecionados para os próximos experimentos. Estas plantas foram obtidas anteriormente ao início do mestrado em um projeto de pós-doutorado pelo Juarez Pires Tomaz.

### **4.4. Expressão relativa do gene *mqsR* em planta transgênica de Carrizo**

Para verificar o nível de expressão do transgene nas plantas de Carrizo, foi realizada a expressão relativa do gene *mqsR* conforme descrito no item 3.2.4. do Capítulo 1.

### **4.5. Avaliação da sintomatologia e a população de *X. citri* em folha destacada**

Com a finalidade de verificar se as plantas transgênicas de laranja doce e citrange poderiam conferir resistência a *X. citri*, 3 folhas destacadas de cada evento transgênico e plantas não transformadas foram infiltradas com uma população de  $10^5$  células/mL de *X. citri* expressando constitutivamente GFP, gentilmente cedida pelo Dr. Adrian Vojnov (Fundación Pablo Cassará - Argentina). Essas folhas foram incubadas em tubos Falcon de 50 mL, contendo 7,5 mL de água de torneia autoclavada por um período de 14 dias.

Os sintomas gerados pela bactéria foram avaliados por registros fotográficos aos 7 e 14 dias após a inoculação. Também foi avaliada a colonização da *X. citri* na folha utilizando lupa com filtro para GFP nos mesmos períodos.

Aos 14 dias após a inoculação foi realizado o isolamento de discos foliares do ponto de inoculação com diâmetro de 1 cm, sendo esses discos macerados em

PBS e realizada a diluição seriada de  $10^{-1}$  até a  $10^{-8}$  e plaqueadas as amostras em meio NBY para contagem de UFC. Foi estimada a média do UFC dos eventos transgênicos e comparada ao tipo selvagem, utilizando do teste *t* de Student para comparação de médias.

#### **4.6. Detecção da toxina em *X. citri* infiltrada em folha destacada**

Para confirmar se a toxina produzida pela planta foi capaz de penetrar em *X. citri*, foi realizado o mesmo processo de infiltração descrito no item 4.3 desse capítulo para as plantas transgênicas e plantas não transformadas, e como controle as mesmas plantas foram inoculadas com PBS. Quatorze dias após a inoculação, a área do ponto de inoculação foi retirada da folha e incubada em PBS por 30 minutos para exsudação da bactéria. Essa solução de PBS e bactéria foi recolhida, centrifugada e lisada.

As amostras lisadas foram aplicadas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e seguido o processo de *immunoblot* conforme descrito no item 3.2.5 do capítulo 1, com os anticorpos anti-MqsR 1:1000 para detecção da toxina, e anti-GFP 1:2000 como um controle de que a bactéria estava presente na folha.

#### **4.7. Expressão relativa de genes de *X. citri* infiltrada em folha destacada**

Para verificar se a toxina poderia estar modulando a expressão gênica de *X. citri*, uma vez que ela possui atividade de endoribonuclease, folhas destacadas de plantas não transformadas e plantas transgênicas foram infiltradas com *X. citri* conforme descrito no item 3.3.

Quatorze dias após a inoculação foi realizada a coleta do disco foliar da região onde *X. citri* foi infiltrada, e foi realizada a extração de RNA das amostras seguindo a metodologia do Tri Reagent (Qiagen), segundo descrito pelo fabricante. O cDNA das amostras como foi sintetizado como descrito no item 3.1.4. Foi avaliada a expressão dos genes *fliC* de *X. citri* (primers *forward* TCAAGCAGTTGACCTCTGAAATC e *reverse* GCGCCGACCTGGAACAG), que sintetiza a flagelina, componente essencial do flagelo, e também do gene *rpoD* (primers *forward* GGATCCGTCAGGCCATCAC e *reverse* GCGCCGACCTGGAACAG), fator sigma associado expressão de genes na fase

exponencial de crescimento. A escolha desses genes foi baseada no fenótipo observado, uma vez que *X. citri* não colonizava eficientemente a folha inoculada da planta transgênica.

Para a normalização dos resultados foi utilizado o gene *16S* de *X. citri* *forward* (CCGGATTGGAGTCTGCAACT) e *reverse* (ACGTATTCACCGCAGCAAT), sendo a metodologia descrita conforme item 3.1.4, e a expressão relativa desses genes foi feita comparando o nível de expressão nas plantas transgênicas e tipo selvagem.

#### **4.8. Avaliação dos sintomas através de inoculação por pulverização nas plantas transgênicas em casa de vegetação**

A fim de verificar como seria o comportamento dos eventos transgênicos quando inoculados por pulverização, cinco réplicas de cada evento e do tipo selvagem foram propagadas e levadas para casa de vegetação, onde foram inoculadas com uma concentração de  $10^8$  células/mL. Após o aparecimento de sintomas as plantas foram avaliadas semanalmente durante 7 semanas.

Foram avaliadas a incidência e a severidade de sintomas. A incidência é a presença ou ausência de sintomas, independente da área lesionada. Para a severidade é levado em conta a área de lesão baseada na escala diagramática proposta por Belasque-Junior et al. (2005). A avaliação foi realizada por três avaliadores independentes. Foi calculada a AACPD, como descrito no item 3.1.6. do Capítulo 1, para a severidade e porcentagem de redução da mesma.

#### **4.9. Análise de correlação dos dados**

A análise foi realizada como descrito no item 3.1.7. do Capítulo 1.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Immunoblot* para a detecção da toxina dentro de *X. citri*

Com o propósito de verificar se a toxina MqsR penetra na célula de *X. citri*, um experimento *in vitro* foi realizado, no qual foram analisados 4 tratamentos nas ODs iniciais de 0,5 e 1, sendo essas amostras utilizadas para *immunoblot* (Figura 24). Foi verificado que a toxina penetra nas células de *X. citri*, uma vez que tanto no tratamento lavado como não lavado foi possível detectar a toxina. Também foi verificado que não houve diferença na penetração da toxina nas células bacterianas com densidades óticas diferentes. Desta forma, foi demonstrado que a toxina é capaz de penetrar na célula de *X. citri*. Esta parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com aluna de mestrado Isis Gabriela Barbosa Carvalho e a pós doutoranda Paula Martins.

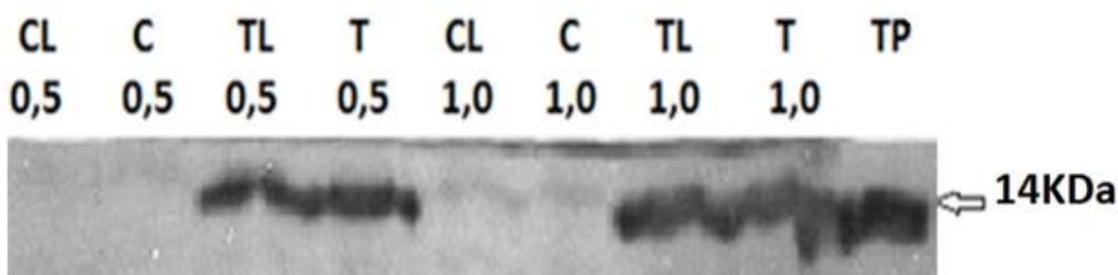


Figura 24. *Immunoblot* para detecção da toxina MqsR. CL - controle lavado. C - controle não lavado. TL – tratamento com toxina lavado. T – tratamento com toxina não lavado. TP - toxina purificada. 0,5 e 1,0 são as diferentes ODs que foram utilizadas.

### 5.2. Curva de crescimento de *X. citri* na presença da toxina MqsR

Uma vez que a toxina penetra na célula de *X. citri*, foi realizada a curva de crescimento de *X. citri* na presença da toxina para verificar se essa inibe o crescimento da bactéria. Para isso, foram testadas as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de toxina e como controle a bactéria foi cultivada sem a toxina. Foi observado que a toxina foi capaz de inibir o crescimento de *X. citri* após aproximadamente 10 horas de crescimento em ambas concentrações da toxina, embora maior inibição de crescimento foi observada na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 25). Esta parte do trabalho foi desenvolvida em colaboração com a aluna de mestrado Isis Gabriela Barbosa Carvalho e a pós doutoranda Paula Martins.

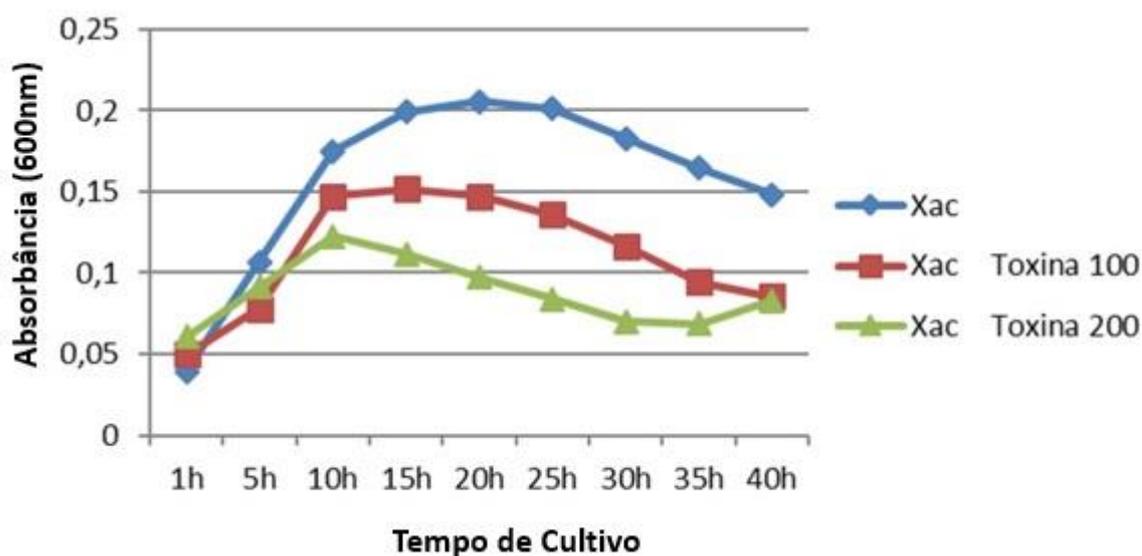


Figura 25. Curva de crescimento de *X. citri*. Em azul apenas a *X. citri*, em vermelho a *X. citri* na presença de 100 µg/mL de toxina e em verde *X. citri* na presença de 200 µg/mL da toxina.

Visto que a toxina foi capaz de penetrar na célula de *X. citri* e inibir seu crescimento *in vitro*, sugere-se que quando superexpressa na planta poderia também penetrar e inibir o crescimento dessa bactéria, desta forma reduzindo os sintomas.

### 5.3. Obtenção e confirmação de plantas transgênicas de Carrizo

Foram obtidos inicialmente 4 eventos de Carrizo, que foram confirmados por GUS (dados não mostrados) e PCR (Figura 26). Essas plantas foram submetidas a um experimento piloto de infecção com *X. citri*, assim como as plantas de laranja doce anteriormente selecionadas como resistentes a *X. fastidiosa*. O evento 9 de Carrizo, assim como os eventos 7A, 14, 39A e 46A de Pineapple foram selecionados como mais resistentes a *X. citri* e foram utilizados para os próximos experimentos.

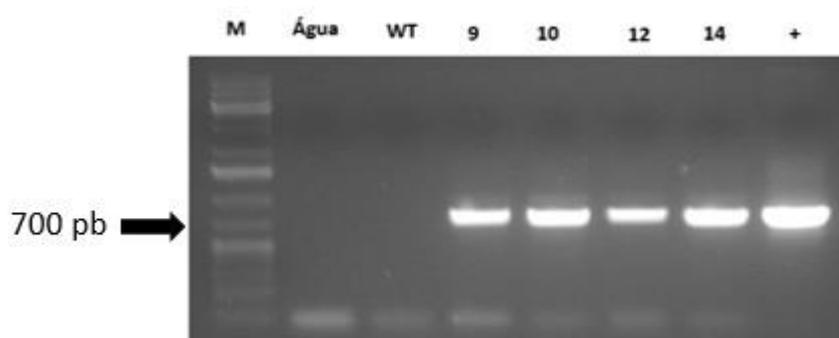


Figura 26. PCR para confirmação das plantas transgênicas (Carrizo). M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas). WT - tipo selvagem. + - controle positivo

#### 5.4. Expressão relativa do gene *mqsR* em Carrizo transgênica

Com a finalidade de quantificar a expressão do transgene na planta foi realizada a expressão relativa e verificado que o evento 9 estava superexpressando *MqsR* (Figura 27), sendo utilizado para os experimentos junto com plantas de laranja selecionadas anteriormente.

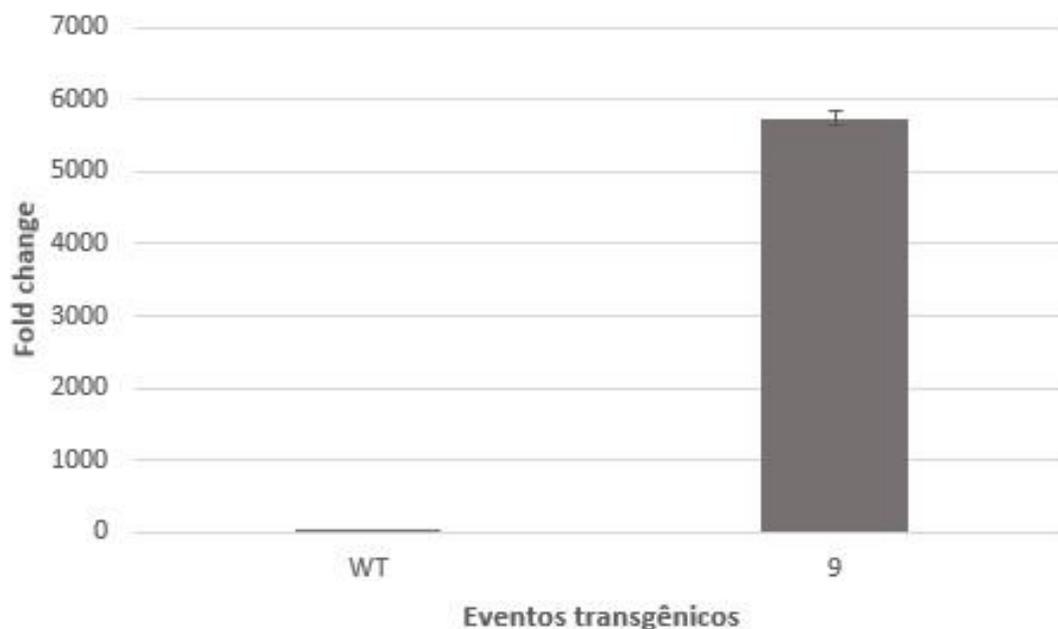


Figura 27. Expressão relativa no gene *mqsR* em planta transgênica de Carrizo (9) comparada ao tipo selvagem (WT).

#### 5.5. Avaliação da sintomatologia e a população de *X. citri* em folha destacada

Para verificar se essas plantas previamente selecionadas apresentavam alguma resistência a *X. citri*, foi realizado um experimento de infiltração de *X. citri* expressando constitutivamente GFP em folhas destacadas dos eventos transgênicos com as quais foram avaliadas a sintomatologia aos 7 e 14 dias (Figuras 28 e 30), a colonização da *X. citri* na folha utilizando lupa em 7 e 14 dias (Figuras 29 e 30) e o isolamento de *X. citri* aos 14 dias (Figura 31).

Na Figura 28 pode ser observado que não houve diferença entre os sintomas em 7 dias após a inoculação, contudo, com 14 dias de infiltração é visualizado claramente que os eventos transgênicos de forma geral apresentaram-se mais resistentes, visto que os sintomas estão mais desenvolvidos na planta não transformada.

O mesmo perfil pode ser observado na Figura 29, na qual com 7 dias evidencia-se que não houve diferenças na colonização de *X. citri*, mas com 14 dias é observado que, de forma geral, a colonização da bactéria foi reduzida nos eventos transgênicos.

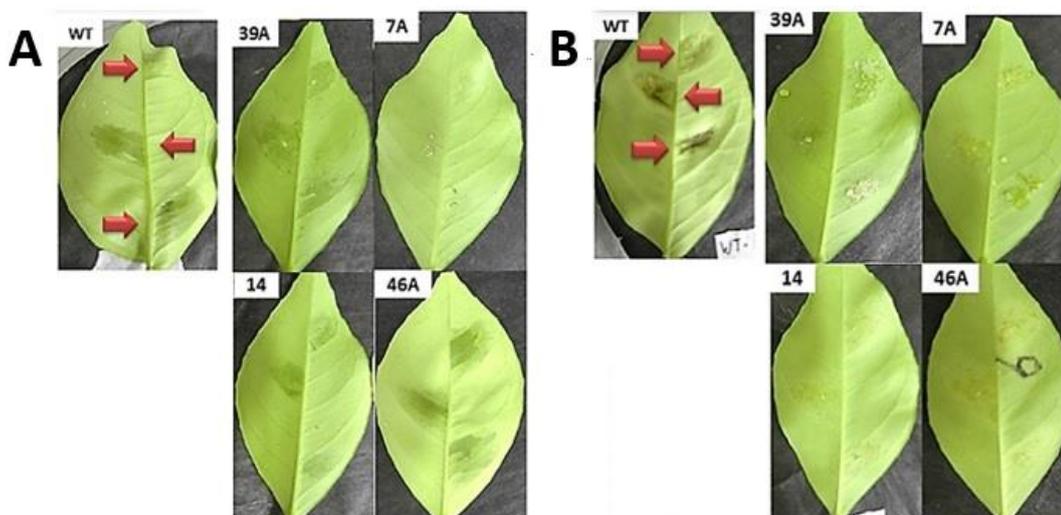


Figura 28. Sintomas em folha destacada de laranja doce infiltrada com *X. citri*. A - 7 dias após a inoculação. B - 14 dias após a inoculação. Cada evento é representado pelo seu nome do canto esquerdo superior. WT - tipo selvagem.

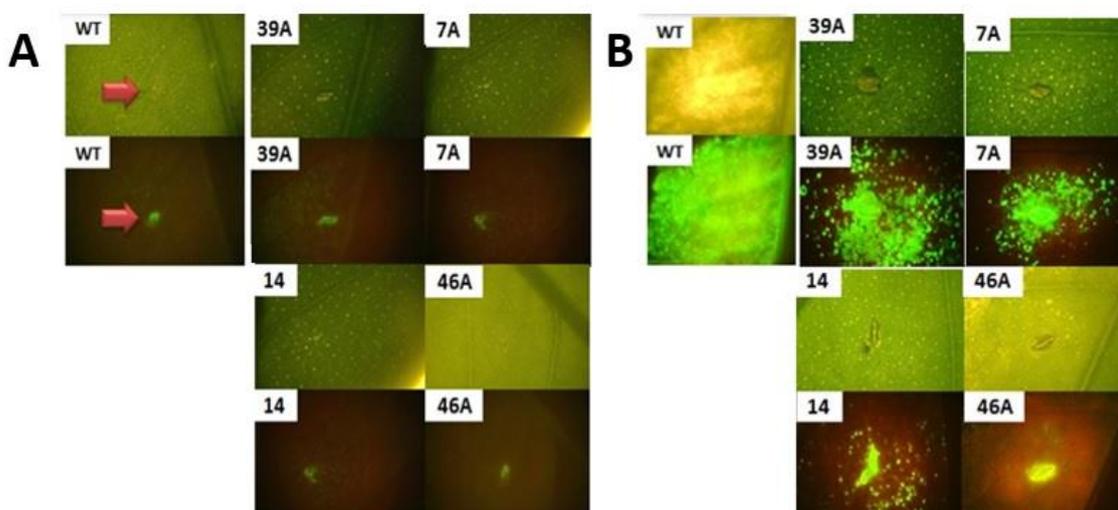


Figura 29. Colonização da *X. citri* infiltrada em folha destacada de laranja doce. A - 7 dias após a inoculação. B - 14 dias após a inoculação. Cada evento está representado pelo seu nome do canto esquerdo superior, a imagem superior foi capturada sob a luz branca e a inferior é com filtro GFP. WT - tipo selvagem.

Assim como em Pineapple, o evento 9 de Carrizo foi mais resistente a *X. citri* que a planta não transformada, o que pode ser verificado nas Figura 28B e 28D

nas quais observa-se que aos 14 dias as diferenças nos sintomas e colonização foram mais expressivas.

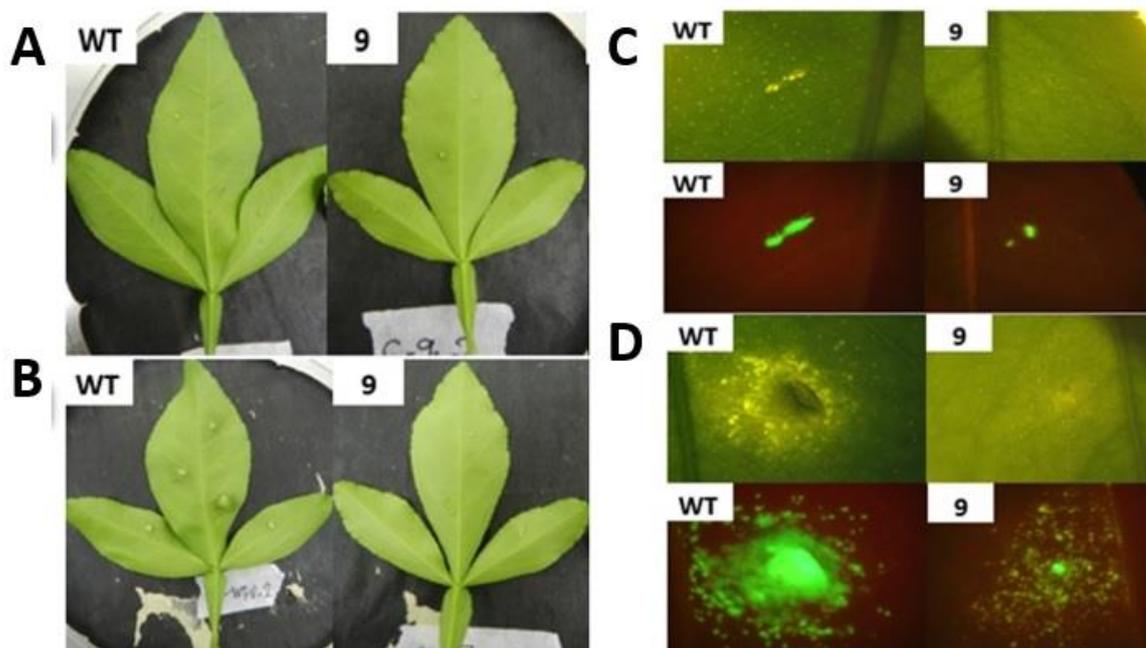


Figura 30. Avaliação de citrange infiltrada com *X. citri*. A – sintomas com 7 dias após inoculação; B – sintomas com 14 dias após a inoculação. C – colonização da bactéria com 7 dias após a inoculação. D – Colonização da bactéria com 14 dias após a inoculação. Cada evento está representado pelo seu nome do canto esquerdo superior nas figuras C e D a imagem superior é na luz branca e a inferior é com filtro GFP. WT - tipo selvagem.

Visto que a toxina conseguiu reduzir o crescimento da *X. citri in vitro*, e que os eventos transgênicos foram mais resistentes à bactéria, foi realizado o isolamento dessa bactéria infiltrada na folha para verificar se a toxina produzida pela planta também poderia inibir o crescimento de *X. citri*. A população de *X. citri* foi aproximadamente 100 vezes menor na planta transgênica comparada à planta não transformada, sugerindo que MqsR possa interferir na multiplicação de *X. citri* (Figura 31).

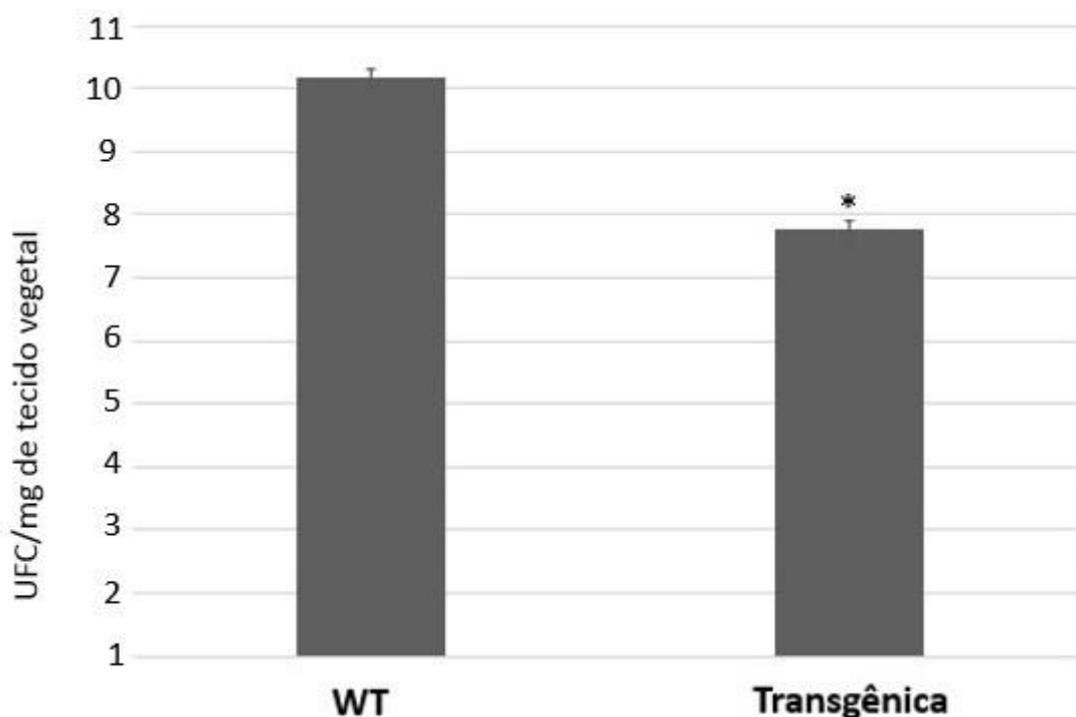


Figura 31. População de *X. citri* isolada da área infiltrada em folha destacada de planta transgênica e tipo selvagem (WT) 14 dias após a inoculação (log). \* -  $p < 0,05$ .

### 5.6. Detecção da toxina em *X. citri* infiltrada em folha destacada

A fim de confirmar que a toxina produzida pela planta estava penetrando nas células de *X. citri*, foi realizada a infiltração em folha destacada e 14 dias após a inoculação procedeu-se a exsudação da bactéria da folha. O resultado do *immunoblot* das amostras demonstrou que a toxina MqsR entrou nas células de *X. citri*, uma vez que a mesma foi detectada apenas nas bactérias que cresceram nas plantas transgênicas (Figura 32).

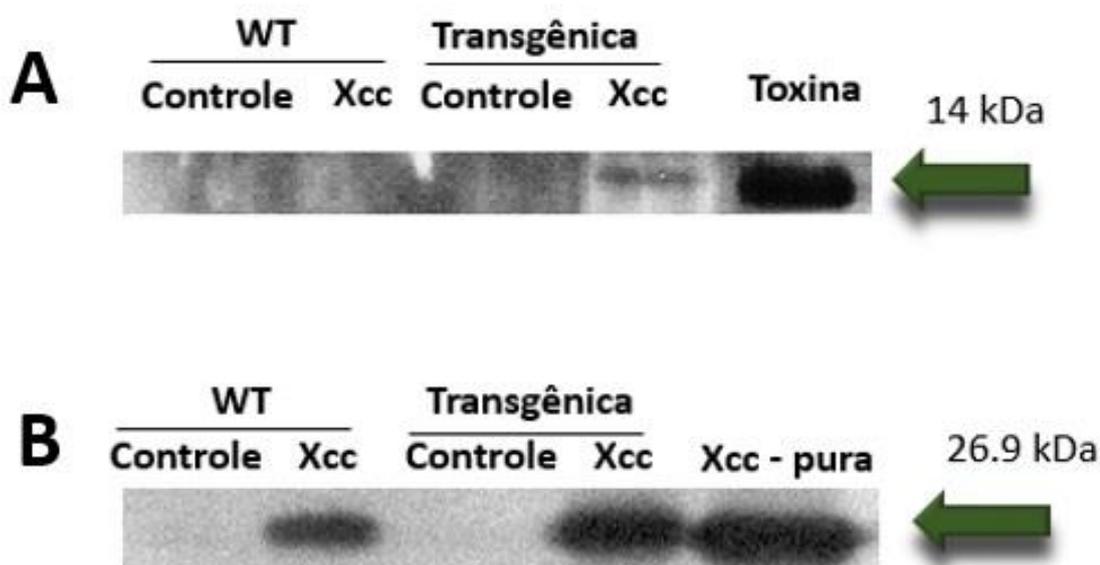


Figura 32. *Immunoblot* das plantas transgênicas e WT. A - Detecção da toxina MqsR. B - Detecção do GFP. WT –tipo selvagem. Controle – folha inoculada com PBS. Xcc – folha inoculada com *X. citri*. Xcc pura – proteínas totais de *X. citri*.

### 5.7. Expressão relativa de genes de *X. citri* infiltrada em folha destacada

Como foi visto um fenótipo com o qual a bactéria aos 14 dias após inoculação não colonizava eficientemente o mesófilo após infiltração, foi realizada a análise de expressão gênica para verificar se a toxina produzida pela planta poderia modular genes associados a esse fenótipo. Para isso os genes *rpoD*, fator sigma associado à transcrição de genes na fase de crescimento exponencial, e *fliC*, gene responsável pela síntese da flagelina, foram selecionados para a análise. Ambos os genes foram reprimidos tanto em Pineapple como em Carrizo transgênicas, sugerindo que a toxina está modulando a expressão desses genes e, conseqüentemente, afetando a movimentação e a multiplicação, levando à redução dos sintomas causados pela bactéria (Figura 33).

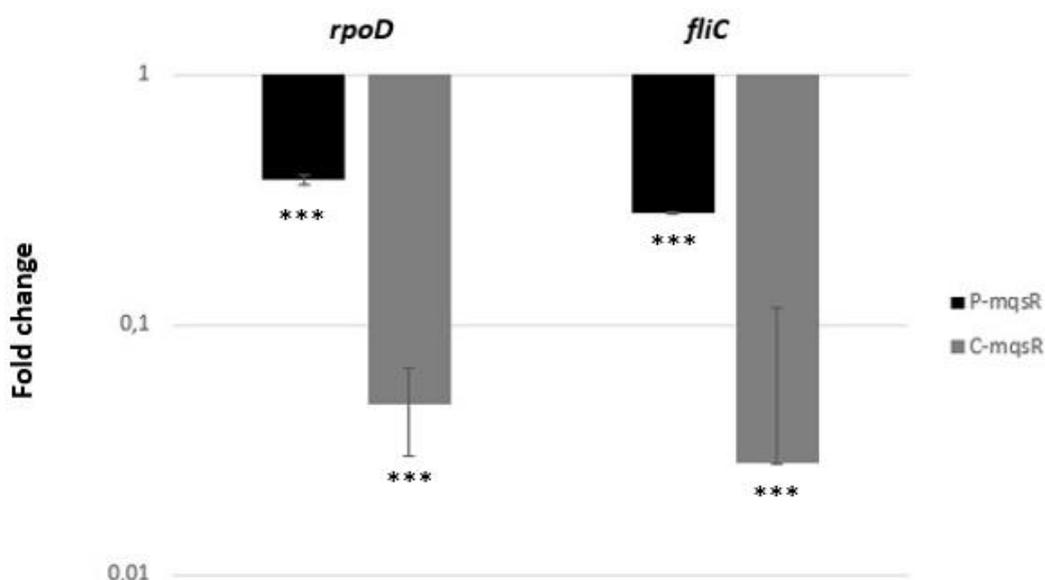


Figura 33. Expressão relativa (log) dos genes *rpoD* e *fliC* de *X. citri* nas plantas transgênicas (comparadas às plantas do tipo selvagem). P-*mqsR* – Pineapple transformada com o gene *mqsR*. C-*mqsR* – Carrizo transformada com o gene *mqsR*.

### 5.8. Avaliação da sintomatologia através de inoculação por pulverização nas plantas transgênicas em casa de vegetação

Com a finalidade de verificar se realmente plantas transgênicas superexpressando a toxina MqsR de *X. fastidiosa* poderiam apresentar resistência a *X. citri*, foi conduzido um experimento de pulverização de *X. citri* em casa de vegetação, no qual foram avaliadas a incidência e severidade de sintomas.

. A incidência foi avaliada com 14 dias após a inoculação, pois foi quando apareceram os primeiros sintomas da doença. Foi verificado que não houve diferenças significativas entre a incidência dos eventos transgênicos quando comparados ao tipo selvagem (Figura 34). No entanto, quando foi avaliada a severidade dos sintomas (Figura 35) e a progressão da severidade em função do tempo (Figura 36), foi verificado que de forma geral os eventos transgênicos apresentaram significativa redução da severidade da doença.

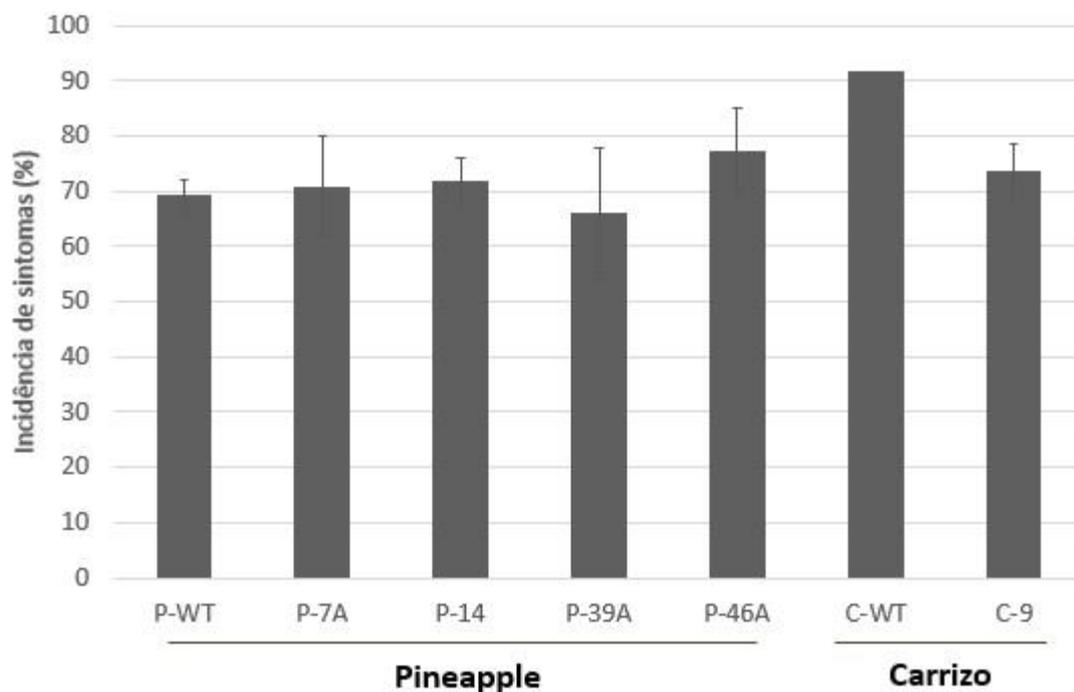


Figura 34. Incidência de sintomas dos eventos transgênicos comparadas ao tipo selvagem (WT). C - Carrizo. P – Pineapple

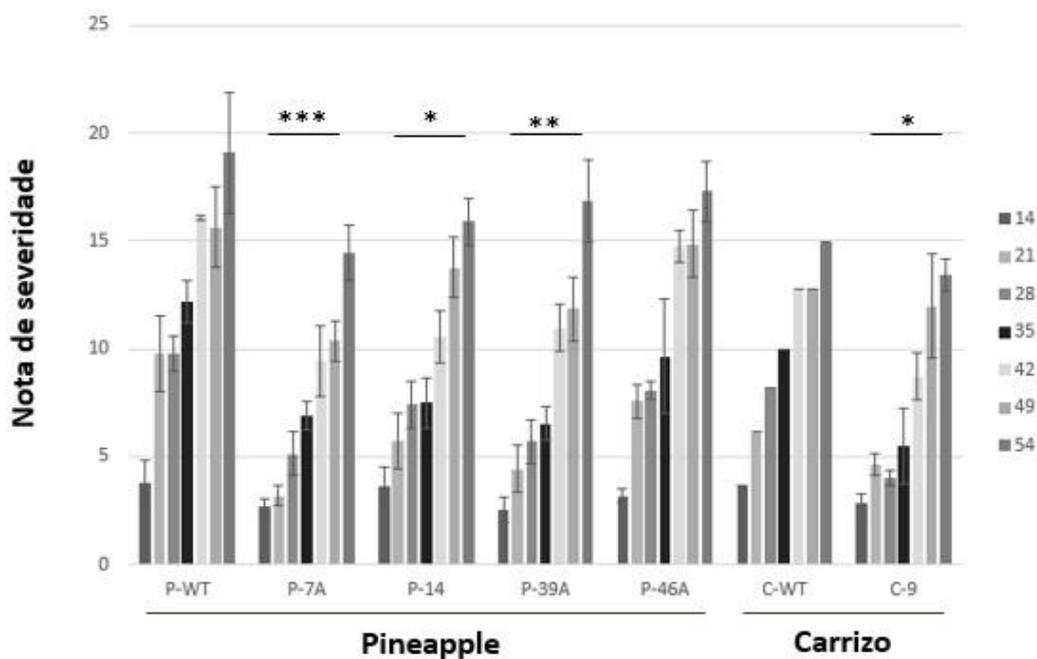


Figura 35. Severidade dos sintomas de *X. citri*. Escala ao lado direito do gráfico representa os dias após a inoculação. P - Pineapple. C - Carrizo. WT- tipo selvagem. \* -  $p < 0,05$ . \*\* -  $p < 0,01$ . \*\*\* -  $p < 0.001$ .

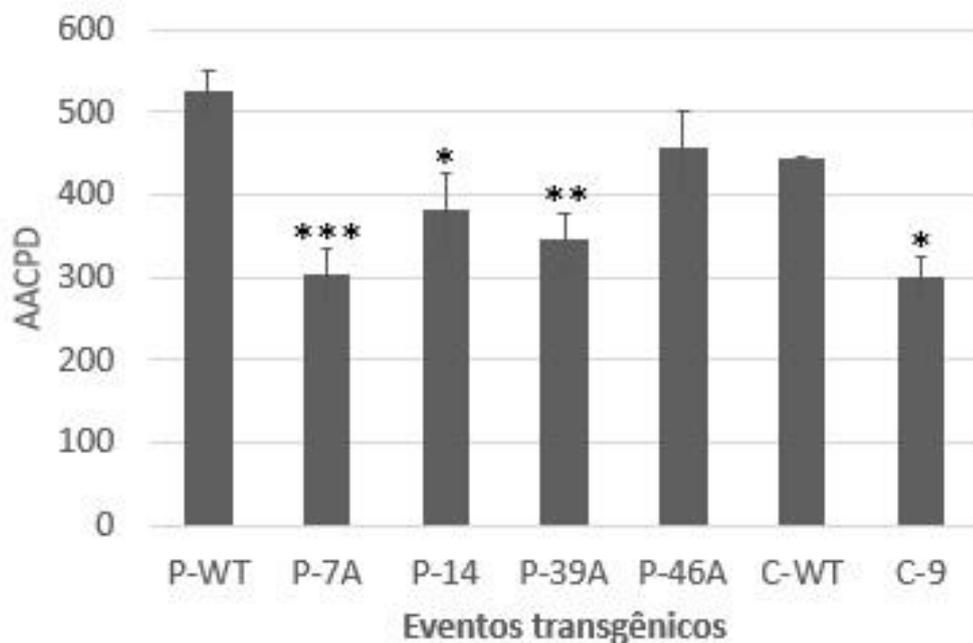


Figura 36. AACPD da severidade de sintomas de *X. citri*. P - Pineapple. C - Carrizo. WT- tipo selvagem. \* -  $p < 0,05$ . \*\* -  $p < 0,01$ . \*\*\* -  $p < 0,001$ .

A severidade mostra o quanto os sintomas foram agressivos nas folhas da planta, e como foi demonstrado, apenas o evento 46A não apresentou diferença significativa quando comparado ao tipo selvagem, sendo que todos os outros eventos demonstraram ser mais resistentes ao cancro cítrico, assim como quando avaliada a AACPD (Figura 36). Além disso, outra análise foi realizada utilizando os dados de AACPD, na qual foi calculada a porcentagem de redução de progresso da severidade. Com isso, foi demonstrado que houve redução do progresso dos sintomas, variando de 25 a mais de 40%, sendo os eventos 7A e 39A os que mais apresentaram redução de sintomas (Figura 37). Os sintomas de cancro em plantas transgênicas em comparação a plantas não transformadas podem ser observadas na Figura 38.

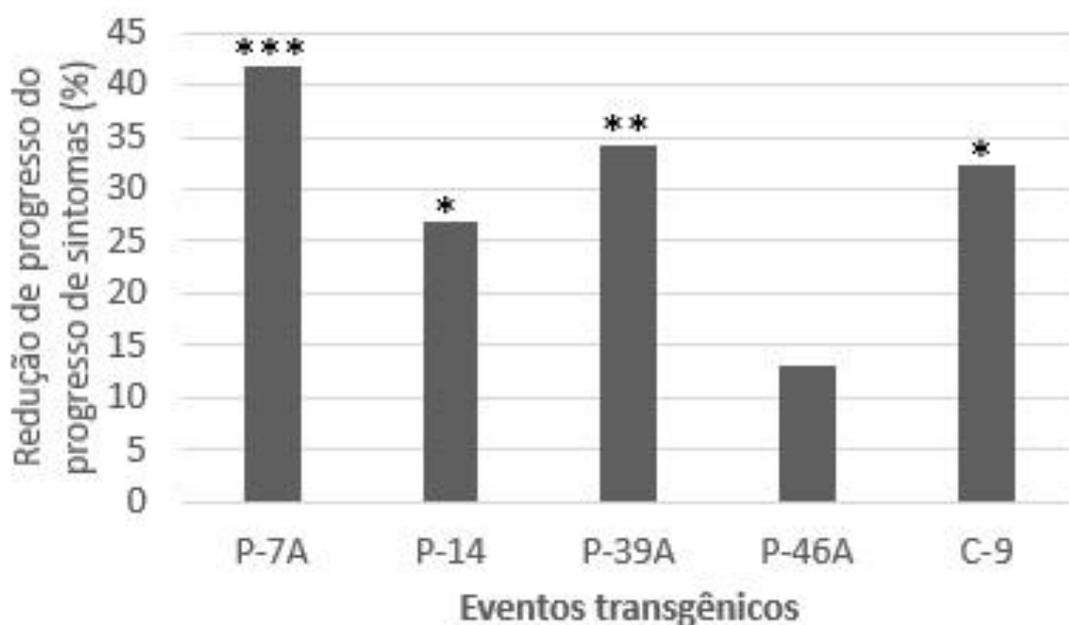


Figura 37. Porcentagem de redução do progresso dos sintomas. P - Pineapple. C - Carrizo. WT- tipo selvagem. \* -  $p < 0,05$ . \*\* -  $p < 0,01$ . \*\*\* -  $p < 0,001$ .

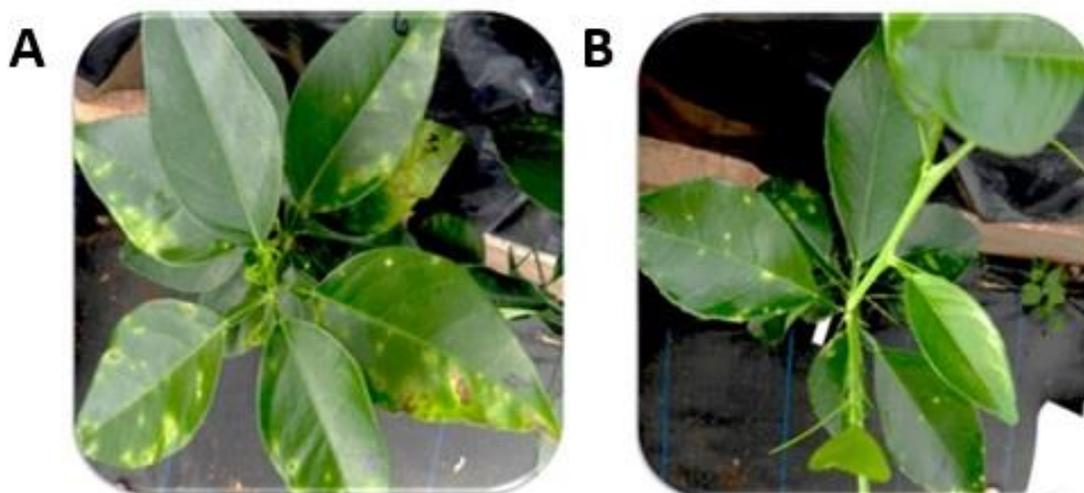


Figura 38. Sintomas causados por *X. citri*. A - planta não transformada. B - planta transgênica.

### 5.9. Análise de correlação de dados

Com a finalidade de verificar se houve alguma relação entre os níveis de expressão gênica e a severidade dos eventos transgênicos, foi realizada análise de correlação entre esses dados. Foi verificado que houve correlação inversamente proporcional forte de 0,87 entre elas (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Ou seja, as plantas que apresentaram maiores níveis de expressão foram as que tiveram menor severidade.

## 6. DISCUSSÃO

O cancro cítrico, atualmente, é uma das principais doenças que acometem a citricultura mundial, uma vez que não existe fonte de resistência natural a *X. citri*, pois todas as espécies de citros são suscetíveis à doença. A transgenia surge como uma ferramenta biotecnológica para a inserção de genes de resistência/tolerância a este patógeno. Nesse sentido, há vários trabalhos demonstrando o potencial dessa tecnologia, como por exemplo, utilizando peptídeos antimicrobianos (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010; FURMAN et al., 2013), genes associados a resposta de imunidade inata da planta, (OLIVEIRA et al., 2013; HAO et al., 2016;) e genes provenientes de patógenos (YANG et al., 2011; CASERTA et al., 2014).

Merfa et al. (2016), reportaram que a toxina MqsR de *X. fastidiosa* interferiu com a capacidade de multiplicação de *X. fastidiosa*, demonstrando que também havia reprimido genes associados ao movimento celular. Curiosamente, *X. citri* não possui o sistema MqsR/A homólogo em seu genoma (MARTINS et al., 2016). Desta forma, levantamos a hipótese que a superexpressão desse gene em plantas de citros poderia conferir resistência a *X. citri*, uma vez que esta não possui antitoxina para bloquear a toxina. Neste trabalho, primeiramente foi verificado que em ensaios *in vitro* a toxina purificada penetrou nas células de *X. citri* possivelmente devido ao tamanho reduzido da proteína, que apresenta 100 aminoácidos em sua composição e 11 kDa de peso molecular. Somando a cauda de histidina fusionada à toxina purificada, totaliza aproximadamente 14 kDa.

Além de a toxina ter penetrado nas células de *X. citri*, foi verificado que duas concentrações diferentes da mesma inibiram o crescimento da bactéria, sendo percebida a inibição de crescimento a partir das 10 horas de cultivo, durante fase de crescimento exponencial, o que sugere que devido à sua atividade de endorribonuclease (LEE et al., 2014; MERFA et al., 2016) a toxina MqsR poderia interferir na expressão de genes relacionados a multiplicação bacteriana.

Baseado nos dados *in vitro*, folhas destacadas de plantas transgênicas de laranja doce previamente obtidas e de porta-enxerto citrange variedade Carrizo superexpressando a toxina MqsR foram infiltradas com *X. citri*. Aos 14 dias após a inoculação, foi observado nas plantas de Pineapple do tipo selvagem o início de necrose e encharcamento, enquanto que nas plantas transgênicas houve menor desenvolvimento dos sintomas. Em Carrizo, 14 dias após a inoculação, foi observado

no tipo selvagem a formação de pústulas e encharcamento na região inoculada, enquanto que na planta transgênica apenas pequenas pontuações puderam ser observadas. Essa diminuição no desenvolvimento dos sintomas demonstra que a toxina está interferindo com a capacidade da bactéria em colonizar a planta, uma vez que, foi verificada população bacteriana 100 vezes menor nas plantas transgênicas comparadas ao tipo selvagem. Esses resultados demonstram que, assim como visto nos dados *in vitro*, a toxina está interferindo no crescimento e colonização de *X. citri*, possivelmente pela repressão de genes associados à multiplicação da bactéria, e isso está levando à atenuação dos sintomas.

Para averiguar essa hipótese, foi avaliada a expressão relativa dos genes *rpoD* e *fliC* de *X. citri* infectadas em plantas transgênica e tipo selvagem, e foi verificado que ambos estavam reprimidos nas plantas transgênicas. O gene *rpoD*, também conhecido como fator sigma 70, é pertinente à classe dos fatores sigma, os quais codificam subunidades necessárias para a ativação da transcrição ligando-se ao complexo de proteínas da RNA polimerase para formar a holoenzima RNA polimerase e iniciar a transcrição (PAGET, HELMANN, 2003). Cada fator sigma é associado à transcrição de genes específicos, sendo o *rpoD* associado a transcrição de genes relacionados ao crescimento celular na fase exponencial (PAGET, HELMANN, 2003; MACIAG et al, 2011). Como foi verificado que esse gene estava reprimido nas bactérias infiltradas nas plantas transgênicas em relação às infiltradas no tipo selvagem, sugere-se que a toxina esteja modulando a expressão desse gene e em consequência disso reduzindo a multiplicação bacteriana, como foi visto *in vitro* e *in planta*.

O outro gene avaliado foi o *fliC*, caracterizado em *X. citri* como responsável pela síntese da flagelina (MALAMUD et al., 2011). Quando esse gene foi deletado do genoma de *X. citri*, diferentemente da bactéria tipo selvagem, não houve a formação do flagelo, afetando a sua motilidade “*swimming*”, que é dependente de flagelo (MALAMUD et al, 2011). Também foi reportado que o flagelo está associado à formação de biofilme maduro de *X. citri* (MALAMUD et al., 2011), sendo o biofilme de grande importância para a sobrevivência da bactéria na fase epifítica, antes do desenvolvimento da doença (RIGANO et al., 2007). Baseado no fenótipo observado nas plantas infiltradas com *X. citri* e na repressão do gene *fliC* nas bactérias presentes nas plantas transgênicas, sugere-se que a toxina está reprimindo a expressão desse

gene e conseqüentemente reduzindo sua movimentação e capacidade de colonizar o hospedeiro.

Em casa de vegetação foi verificada menor severidade da doença ao longo do tempo em todos os eventos transgênicos, com exceção do evento 46A, possivelmente por ter menor expressão do transgene quando comparado aos outros eventos, visto que, a severidade apresentou correlação inversamente proporcional forte de 0,87 com nível de expressão do transgene nos eventos. Independente do mecanismo que a toxina atua para interferir na população bacteriana, as plantas transgênicas possuem potencial para experimentação em campo, visto que como apresentaram menor severidade de sintomas em casa de vegetação, também poderiam apresentar maior eficiência de controle sob condições de campo. Enquanto que na casa de vegetação as condições são controladas, favorecendo o desenvolvimento da doença, somado à maior pressão do inóculo, no campo há diversas variáveis, como temperatura, umidade, entre outros que podem interferir com a sobrevivência bacteriana. Além disso, como a menor severidade de sintomas observada nas plantas transgênicas parece ser devido à menor população bacteriana, sugere que haverá uma menor dispersão da bactéria por chuva e vento, e conseqüentemente menor disseminação da doença. Porém essas hipóteses precisam ser futuramente investigadas em experimentos de campo.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

A toxina MqsR quando superexpressa na planta transgênica modula a expressão de genes da *X. citri* interferindo com a capacidade de multiplicação da bactéria, e conseqüentemente reduz a severidade de sintomas no hospedeiro, sugerindo que essas plantas possuem potencial para gerar resistência à bactéria em experimentos de campo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos em tabaco demonstraram que a superexpressão do gene *mqsR* foi capaz de conferir resistência à *X. fastidiosa*, e dessa forma validando a importância do uso de planta modelo para acelerar o conhecimento da função de genes candidatos em conferir resistência ao patógeno.

Em citros, as plantas superexpressando a toxina apresentaram resistência a *X. fastidiosa* e *X. citri*. Além disso, estas plantas não apresentaram alterações fenotípicas, sugerindo que a atividade de endoribonuclease da toxina possa ser específica para genes alvos em procariotos. Dessa forma, a utilização dessas plantas abre perspectivas para estudos de resistência a outras doenças bacterianas em citros como o HLB, numa abordagem *broad-spectrum*.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

### Artigos submetidos:

Ronaldo J.D. Dalio, Diogo M. Magalhães, Carolina M. Rodrigues, Gabriella D. Arena, Tiago Oliveira, **Reinaldo R. Souza-Neto**, Simone C. Picchi, Paula Martins, Paulo Santos, Heros Máximo, Inaiara Pacheco, Alessandra A de Souza and Marcos A. Machado. **PAMPs, PRRs, effectors, and R-genes associated with pathogen-citrus interactions**. *Annals of Botany* (2016).

### Prêmios:

Prêmio Alcides Carvalho referente ao melhor trabalho de pós-graduação na área de Genética, Evolução e Melhoramento de Plantas, concedido pela Sociedade Brasileira de Genética durante 60º Congresso Brasileiro de Genética pelo trabalho intitulado “. A novel approach for pathogen tolerance: resistance mediated by the toxin of a Toxin-Antitoxin system from *Xylella fastidiosa*”.

### Resumos em congressos e apresentações orais:

Souza-Neto, RR ; Tomaz, JP ; Picchi, SC ; Caserta, R ; de Souza, AA. Toxin from *Xylella fastidiosa* exerts tolerance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in transgenic plant. In: 47 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2014, Londrina (oral). Anais 47 Congresso Brasileiro de Fitopatologia 2014.

Souza-Neto, RR ; Tomaz, JP ; Caserta, R ; Pereira, WEL ; de Souza, AA . A novel approach for pathogen tolerance: resistance mediated by the toxin of a Toxin-Antitoxin system from *Xylella fastidiosa*. In: 60 Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá (oral e pôster). Anais 60 Congresso Brasileiro de Genética, 2014

Souza-Neto, RR; Tomaz, JP; Caserta, R; Pereira, WEL; De Souza, AA. Toxin from *Xylella fastidiosa* reduces bacterial population and symptoms in transgenic plants. In 48º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2015. São Pedro (oral). Anais 48º Congresso Brasileiro de Fitopatologia 2015.

Souza-Neto, RR; Picchi, SC; Tomaz, JP; Caserta, R; De Souza, AA. Toxin of Toxin-Antitoxin system from *Xylella fastidiosa* display tolerance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in transgenic sweet orange. Xanthomeeting, 2015. São Paulo (pôster).

Souza-Neto, RR; Picchi, SC; Caserta, R; De Souza, AA. Toxin from *Xylella fastidiosa* interferes with population and gene expression of *Xanthomonas*

*citri* subsp. *citri* in citrus transgenic plants. 11<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology. Foz do Iguaçu (pôster).

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AAKRE, C. D. et al. A Bacterial Toxin Inhibits DNA Replication Elongation through a Direct Interaction with the  $\beta$  Sliding Clamp. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.617-628, 2013. Elsevier BV.

ABEL, P. et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, [s.l.], v. 232, n. 4751, p.738-743, 1986. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

ALMEIDA, R. P. P. et al. Multiplication and movement of citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant disease**, v. 85, p. 382-386, 2001.

ALVES, E.; KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. Interaction of *Xylella fastidiosa* with Different Cultivars of *Nicotiana tabacum*: a Comparison of Colonization Patterns. **J Phytopathol**, [s.l.], v. 151, n. 9, p.500-506, 2003. Wiley-Blackwell.

AMORIN, L. et al. Citrus Variegation Chlorosis: a diagramatic scale for the evaluation of the severity of the disease. **Fitopatol Bras.** v, 18 p. 174-180. 1993.

BARRIOS, A. F. G. et al. Autoinducer 2 Controls Biofilm Formation in *Escherichia coli* through a Novel Motility Quorum-Sensing Regulator (MqsR, B3022). **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 188, n. 1, p.305-316, 2005. American Society for Microbiology.

BELASQUE-JÚNIOR, J. et al. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatol. Bras.**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.387-393, 2005.

BOSCARIOL, R. L. et al. Attacin A Gene from *Tricoplusia ni* Reduces Susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Transgenic *Citrus sinensis* "Hamlin". **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 131, nº 4, p. 530-536. 2006.

BOVÉ, J. M.; AYRES, A. J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: Sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **lubmb Life**, [s.l.], v. 59, n. 4, p.346-354, 2007. Wiley-Blackwell.

BROOUN, A.; LIU, S.; LEWIS, K. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.640-646, 2000. American Society for Microbiology.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 255p. 2003

CARDOSO, S. C. et al. Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp.

*citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.185-192, 2009. Springer Science + Business Media.

CASERTA, R. et al. Expression of *Xylella fastidiosa* *RpfF* in Citrus Disrupts Signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and Thereby Its Virulence. **Mpmi**, [s.l.], v. 27, n. 11, p.1241-1252, 2014. Scientific Societies.

CASERTA, R. Genes derivados de planta e patógeno: diferentes abordagens em transgenia visando resistência a *Xylella fastidiosa* em *Citrus sinensis*. 197f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CHAN, W. T.; ESPINOSA, M.; YEO, C. C. Keeping the Wolves at Bay: Antitoxins of Prokaryotic Type II Toxin-Antitoxin Systems. **Frontiers In Molecular Biosciences**, [s.l.], v. 3, p.1-20, 2016. Frontiers Media SA.

CHANG, C. J. et al. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, [s.l.], v.27, issue 3, p. 137-142, 1993. Springer.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. P; LINDOW, S. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.243-271, set. 2008. Annual Reviews.

COLETTA-FILHO, H. D.; BORGES, K. M.; Machado, M. A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja** v. 21 p. 335-343. 2000.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange × Murcott tangor. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 56, n. 4, p.661-668, 2007. Wiley-Blackwell.

COLETTA-FILHO, H. D.; DE SOUZA, A. A. Advances on knowledge about citrus variegated chlorosis: an overview on different components of this pathosystem. **Citrus Research & Technology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.19-33, 2014. GN1 Genesis Network.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.711-745, 1995. Annual Reviews.

DANDEKAR, A. M. et al. An engineered innate immune defense protects grapevines from Pierce disease. **Proceedings Of The National Academy Of**

**Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 10, p.3721-3725, 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences.

DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v. 6, p. 309-314, 1981.

DE CARVALHO, S. A. et al. Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. **Plant Disease**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.207-218, 2015. Scientific Societies.

DE LA FUENTE, L. et al. The Bacterial Pathogen *Xylella fastidiosa* Affects the Leaf Ionome of Plant Hosts during Infection. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-9, 2013. Public Library of Science (PLoS).

DE SOUZA, A. A. et al. Analysis of Gene Expression in Two Growth States of *Xylella fastidiosa* and Its Relationship with Pathogenicity. **Mpmi**, [s.l.], v. 16, n. 10, p.867-875, out. 2003. Scientific Societies.

ENGELBERG-KULKA, H. et al. Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria. **Plos Genetics**, [s.l.], v. 2, n. 10, p.1518-1526, 2006. Public Library of Science (PLoS).

FUNDECITRUS. Citricultor, nº 31 p. 1-16, 2015.

FURMAN, N. et al. Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 167, n. 4, p.412-419, 2013. Elsevier BV.

GERDES, K.; RASMUSSEN, P. B.; MOLLIN, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. **Pnas**, Copenhagen, p.3116-3120, 1986.

GERDES, K.; MAISONNEUVE, E. Bacterial Persistence and Toxin-Antitoxin Loci. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.103-123, 2012. Annual Reviews.

GMITTER, F. G. et al. Citrus genomics. **Tree Genetics & Genomes**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.611-626, 2012. Springer Science + Business Media.

GÓMEZ-KRAPP, L. M. Avaliação funcional do gene SAMT de Citrus reticulata na resistência a fitopatógenos de citros através da superexpressão em Nicotiana tabacum. 85f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2016.

GONÇALVES, F. P. et al. Role of healthy nursery plants in orange yield during eight years of Citrus Variegated Chlorosis epidemics. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 129, n. 2, p.343-345, 2011. Elsevier BV.

GOTTWALD, T. R. Citrus canker. **Phi**, [s.l.], p.1-10, 2000. Scientific Societies.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Php**, [s.l.], p.1051-1056, 2002. Scientific Societies.

HATHROUBI, S. et al. Biofilms: Microbial Shelters Against Antibiotics. **Microbial Drug Resistance**, [s.l.], p.1-10, 2016. Mary Ann Liebert Inc.

HAO, G. et al. Reduced Susceptibility to *Xanthomonas citri* in Transgenic Citrus Expressing the FLS2 Receptor From *Nicotiana benthamiana*. **Mpmi**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.132-142, 2016. Scientific Societies.

HOLME, I. B.; WENDT, T.; HOLM, P. B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. **Plant Biotechnol J**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.395-407, 2013. Wiley-Blackwell.

KING B. J. et al. Preparation of extracts for electrophoresis from citrus leaves. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 29, p. 295-305, 1994.

KHATODIA, S. et al. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 7, p.1-13, 2016. Frontiers Media SA.

KRÜGNER, R et al. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. Anais 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Campinas, SP, p. 423. 2000.

Laranjeira, F. F.; Bergamin, F. A.; Amorim, L. Dinâmica e estrutura de focos da Clorose Variegada dos Citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v, 23 p. 36-41. 1998.

LEE, M. W.; ROGERS, E. E.; STENGER, D. C. Functional Characterization of Replication and Stability Factors of an Incompatibility Group P-1 Plasmid from *Xylella fastidiosa*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 76, n. 23, p.7734-7740, 2010. American Society for Microbiology.

LEE, M. W.; ROGERS, E. E.; STENGER, D. C. *Xylella fastidiosa* Plasmid-Encoded PemK Toxin Is an Endoribonuclease. **Phytopathology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.32-40, 2012. Scientific Societies.

LEE, M. W. et al. Toxin-antitoxin systems *mqsR/ygiT* and *dinJ/reIE* of *Xylella fastidiosa*. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 87, p.59-68, 2014. Elsevier BV.

LEWIS, K. Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells. In: ROMEO, T. **Bacterial Biofilms**. Berlin: Springer, 2008. p. 107-131.

LOPES, S. A. et al. *Nicotiana tabacum* as an Experimental Host for the Study of Plant-*Xylella fastidiosa* Interactions. **Plant Disease**, [s.l.], v. 84, n. 8, p.827-830, 2000. Scientific Societies.

MACIAG, A. et al. In vitro transcription profiling of the S subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the S regulon and identification of S-specific promoter sequence elements. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 39, n. 13, p.5338-5355, 2011. Oxford University Press (OUP).

MACHADO, M. A. et al. Genome and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. **Mol. Biol. Today** v. 2 p.33-43. 2001.

MAH, T. C.; A O'TOOLE, G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.34-39, 2001. Elsevier BV.

MALAMUD, F. et al. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, [s.l.], v. 157, n. 3, p.819-829, 2010. Microbiology Society.

MARKOVSKI, M.; WICKNER, S. Preventing Bacterial Suicide: A Novel Toxin-Antitoxin Strategy. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.611-612, 2013. Elsevier BV.

MARTINS, P. M. M. et al. Type II Toxin-Antitoxin Distribution and Adaptive Aspects on *Xanthomonas* Genomes: Focus on *Xanthomonas citri*. **Front. Microbiol.**, [s.l.], v. 7, p.1-13, 2016. Frontiers Media SA.

MERFA, M. V. S. Análise do papel funcional do sistema toxina-antitoxina *XF2490/XF2491* de *Xylella fastidiosa* em estresse por cobre. 151f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

MERFA, M. V. et al. The *MqsRA* Toxin-Antitoxin System from *Xylella fastidiosa* Plays a Key Role in Bacterial Fitness, Pathogenicity, and Persister Cell Formation. **Front. Microbiol.**, [s.l.], v. 7, p.1-14, 10 jun. 2016. Frontiers Media SA.

MINSAVAGE, G.V. et al. Development of a polymerase chain reaction

protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, St Paul, n.84, p.456-461, 1994.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **Plos Biology**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.2458-2461, 2007. Public Library of Science (PLoS).

MURANAKA, L. S. et al. Global Expression Profile of Biofilm Resistance to Antimicrobial Compounds in the Plant-Pathogenic Bacterium *Xylella fastidiosa* Reveals Evidence of Persister Cells. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 194, n. 17, p.4561-4569, 2012. American Society for Microbiology.

MURANAKA, L. S. et al. N-Acetylcysteine in Agriculture, a Novel Use for an Old Molecule: Focus on Controlling the Plant-Pathogen *Xylella fastidiosa*. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.1-14, 2013. Public Library of Science (PLoS).

OLIVER, J. E. et al. Ionome Changes in *Xylella fastidiosa* –Infected *Nicotiana tabacum* Correlate With Virulence and Discriminate Between Subspecies of Bacterial Isolates. **Mpmi**, [s.l.], v. 27, n. 10, p.1048-1058, 2014. Scientific Societies.

OLIVEIRA, I. S. et al. Status fitossanitário da Clorose Variegada dos Citros (CVC) na Bahia e perfil dos citricultores. **Pesquisa Agrícola**, v. 9, p. 88–93. 2014.

OLIVEIRA, M. L. P. et al. Increased Resistance Against Citrus Canker Mediated by a Citrus Mitogen-Activated Protein Kinase. **Mpmi**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.1190-1199, 2013. Scientific Societies.

PAGET, M. S. B., HELMANN, J. D. The sigma 70 family of sigma factors. **Genome Biology**, v. 4, n. 1, p. 203-209, 2003.

PEREIRA W. E. L. Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para o estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros. 90f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

REYES, C. A. et al. Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein–RNA silencing. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 151, n. 1, p.151-158, 2011. Elsevier BV.

RIGANO, L. A. et al. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mpmi**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.1222-1230, 2007. Scientific Societies.

ROBERTO, S. R. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira** v. 21, p. 517-518. 1996.

RODRIGUES, C. M. et al. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 77, n. 5, p.1145-1157, 2008. Springer Science + Business Media.

ROPER, M. C. et al. Detection and Visualization of an Exopolysaccharide Produced by *Xylella fastidiosa* In Vitro and In Planta. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 22, p.7252-7258, 2007. American Society for Microbiology.

ROY, B. A., KIRCHNER, J. W. Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. **Evolution**, 54(1), p. 51-63, 2000.

SANFORD, J.; JOHNSTON, S. The concept of parasite-derived resistance—Deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal Of Theoretical Biology**, [s.l.], v. 113, n. 2, p.395-405, 1985. Elsevier BV.

SAPONARI, M. et al. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). **Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.659-668, 2013.

SHAH, D. et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.53-62, 2006. Springer Nature.

SHANER, G.; Finney, R. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopatology**. v. 67 p.1051-1056. 1977. The American Phytopathological Society.

SHAVIT, R. et al. The vapB–vapC Operon of *Acidovorax citrulli* Functions as a Bona-fide Toxin–Antitoxin Module. **Front. Microbiol.**, [s.l.], v. 6, p.1-12, 2016. Frontiers Media SA.

SIMPSON, A. J. G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, [s.l.], v. 406, n. 6792, p.151-157, 2000. Nature Publishing Group.

UNTERHOLZNER, S. J. et al. Characterisation of the stbD/E toxin–antitoxin system of pEP36, a plasmid of the plant pathogen *Erwinia pyrifoliae*. **Plasmid**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.216-225, 2013. Elsevier BV.

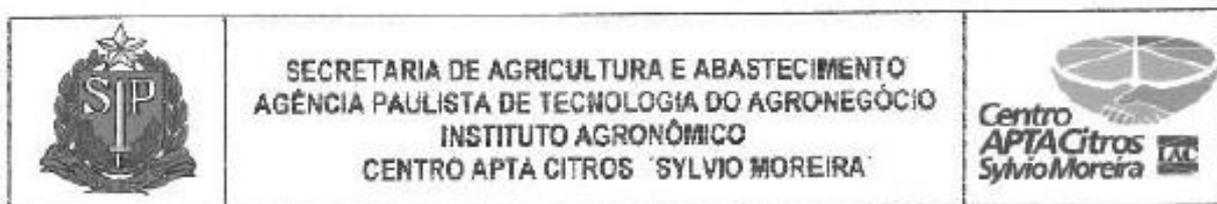
WANG, X.; WOOD, T. K. Toxin-Antitoxin Systems Influence Biofilm and Persister Cell Formation and the General Stress Response. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 16, p.5577-5583, 2011. American Society for Microbiology.

WEN, Y.; BEHIELS, E.; DEVREESE, B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. **Pathogens Disease**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.240-249, 2014. Oxford University Press (OUP).

YAMAMOTO, P. T. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**. v.28, p.178–181. 2002.

YANG, Li. et al. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA*-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Mol Biol**, [s.l.], v. 75, n. 1-2, p.11-23, 2010. Springer Science + Business Media.

## ANEXO I. Declaração de bioética



### DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA

Eu, Raquel Luciana Boscardol Camargo, presidente da CIBio do Instituto Agronômico (IAC), o qual possui CQB nº 0065/98, declaro que o projeto "Resistência derivada do patógeno mediada pela toxina de um sistema toxina-antitoxina de *Xylella fastidiosa*", desenvolvido pelo aluno Reinaldo Rodrigues de Souza Neto, projeto de bolsa Fapesp (2013/21924-6), está sendo desenvolvido dentro das normas de bioética e biossegurança determinadas por essa comissão.

Cordeirópolis, 25 de maio de 2016.

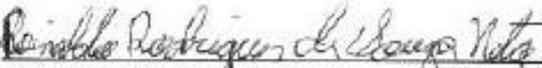
  
**Dra. Raquel Luciana Boscardol Camargo**  
 PqC VI - Instituto Agronômico  
 Presidente da CIBio do IAC

**ANEXO II. Declaração de direitos autorais**

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
*Presidente*  
*Comissão Central de Pós-Graduação*  
**Declaração**

*As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Resistência derivada do patógeno mediada pela toxina de um sistema toxina-antitoxina de X. fastidiosa**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.*

*Campinas, 29 de Junho de 2016.*

Assinatura:   
Nome do(a) autor(a): **Reinaldo Rodrigues de Souza Neto**  
RG n.º 47691049-3

Assinatura:   
Nome do(a) orientador(a): **Alessandra Alves de Souza**  
RG n.º 3533370