



**UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MODELO COMO FERRAMENTA PARA VALIDAÇÃO DE GENES DE *Xylella fastidiosa* CANDIDATOS PARA RESISTÊNCIA DERIVADA DO PATÓGENO.**

Reinaldo Rodrigues de **Souza-Neto**<sup>1,2a</sup>; Juarez Pires **Tomaz**<sup>4c</sup>; Raquel **Caserta** Salviato<sup>2,3c</sup>; Willian Eduardo Lino **Pereira**<sup>2,3c</sup>; Alessandra Alves **de Souza**<sup>2b</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias – Araras, SP; <sup>2</sup>Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC – Cordeirópolis, SP; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Campinas – Campinas, SP; <sup>4</sup>Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina, PR.

**Nº 13131**

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi a utilização de plantas modelo super expressando genes que sintetizam toxinas do módulo toxina-antitoxina de *Xylella fastidiosa* visando resistência contra o patógeno. Foram utilizados tanto *Arabidopsis thaliana* super expressando a toxina A, e *Nicotiana tabacum* super expressando a toxina B. Para o experimento de *A. thaliana* foram obtidos três eventos transgênicos homocigotos, o qual foi escolhido um para ser desafiado contra o patógeno. As plantas foram inoculadas com Xf e após 2 semanas coletou-se o experimento, o qual foi feita extração de DNA e posteriormente PCR em tempo real para quantificar a população bacteriana in planta. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre o tipo selvagem e a planta transformada. No experimento com *N. tabacum* super expressando a toxina B foi inoculada a estirpe 9a5c de Xf em todos os eventos de transformação e foi feita uma seleção das plantas promissoras com base no fenótipo apresentado. Estas plantas tiveram a sintomatologia acompanhada durante nove semanas, sendo que todos os eventos apresentaram menos sintomas comparados ao tipo selvagem. Cada uma destas plantas selecionadas foi dividida em várias regiões onde foram coletadas folhas para extração de DNA e posteriormente quantificação bacteriana in planta através de PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que os eventos que apresentaram menos ou nenhum sintoma, foram aqueles que apresentaram população inferior do patógeno em relação a planta tipo selvagem, sugerindo que este gene é um bom candidato para transformação em citros visando resistência a CVC.

**Palavras-chaves:** Plantas, modelo, *Xylella*, módulo TA, tolerância.

<sup>a</sup> Bolsista CNPq; Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, reinaldu\_rs@hotmail.com, <sup>b</sup>Orientador, <sup>c</sup> Colaborador.



**ABSTRACT-** *The objective of this work is the use of model plants overexpressing genes that encode toxins from the toxin-antitoxin module of Xylella fastidiosa aiming resistance against the pathogen. We used both Arabidopsis thaliana overexpressing the toxin A and tobacco overexpressing the toxin B. For the experiment of A. Thaliana, three homozygous transgenic events were obtained, which we chose one to be challenged against the pathogen. Plants were inoculated with Xf and after 2 weeks the experiment were collected, from which DNA were extracted and real-time PCR was performed to quantify the bacterial population in planta. However, no significant differences were observed between the wild type and the transformed plant. In the experiment with tobacco overexpressing the toxin B, the 9a5c strain of Xf was inoculated in all transformation events and a selection of promising plants was made based on phenotypes. These plants had their symptomatology analyzed for nine weeks, and all events had fewer symptoms compared to wild type. Each of these selected plants was divided into several regions where leaves were collected for DNA extraction and subsequent bacterial quantification in planta through real-time PCR. The results showed that the events had fewer or no symptoms, and had less bacterial population than the wild type, suggesting that this gene is a good candidate for transformation in citrus aiming resistance to CVC.*

**Key-words: Plants, model, Xyella, TA module, tolerance.**

### **Introdução**

Plantas modelo são amplamente utilizadas para análise funcional de genes. Vários estudos são feitos utilizando diferentes tipos de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (Ganesan, 2012) e *Catharanthus roseus* (Jaggi, 2012).

O emprego de plantas modelo na citricultura vem crescendo, visto a dificuldade em obter plantas resistentes a doenças. A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma das principais doenças da citricultura brasileira, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Xf).

Foi reportado que tanto *A. thaliana* (Rogers, 2012) como *N. tabacum* (Lopez et al., 2000) tem a capacidade de hospedar a bactéria Xf, logo a utilização destas plantas modelos como ferramenta para validar genes de resistência ao patógeno se tornou uma alternativa viável.

As bactérias possuem a capacidade de sobreviver a estresses ambientais. Um dos mecanismos que levam a sobrevivência são os módulos toxina-antitoxina (TA), que são encontrados na maioria das bactérias, inclusive em Xf. Os sistemas TA são compostos de genes estreitamente ligados, codificando uma toxina estável que pode prejudicar a célula hospedeira e sua antitoxina cognata instável a qual protege o hospedeiro do efeito letal da toxina (Van Melderren,



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

2009). Em condições de estresse devido a sua instabilidade a antitoxina é degradada e a toxina é liberada para exercer sua ação letal sobre a população bacteriana.

Diante do exposto acima o objetivo deste trabalho foi avaliar as plantas modelo de *N. tabacum* e *A. thaliana* super expressando genes que codificam toxinas do módulo TA de Xf, visando resistência contra esse patógeno.

### Material e Métodos

Em *Arabidopsis thaliana* foi realizada a transformação genética de *A. thaliana* utilizando o gene que codifica a toxina A de *Xylella fastidiosa* (Xf). O gene de seleção utilizado foi o que codifica a proteína verde fluorescente (GFP). Das plantas transformadas foram selecionadas apenas as sementes verde fluorescentes utilizando lupa de fluorescência com filtro para GFP. As sementes foram então semeadas em meio MS meia força e foram colocadas em câmara de crescimento a 22° C com fotoperíodo de 16 horas para germinação. Durante duas semanas as plantas foram cultivadas no meio de cultura. Após este período elas foram transferidas e individualizadas em vasos, sendo irrigadas uma vez a cada dois dias. Coletou-se as sementes e este procedimento foi repetido até obter linhagens homozigotas, ou seja, quando todas as sementes apresentaram fluorescência quando comparadas ao tipo selvagem.

Foram obtidas 3 linhagens homozigotas de plantas transformadas com o gene que codifica a toxina A confirmadas por PCR, dessas três linhagens uma foi escolhida para ser desafiada contra Xf. Para isso o evento selecionado foi cultivado em câmara de crescimento nas mesmas condições anteriores, porém com fotoperíodo de 12 horas. Após três semanas de cultivo em câmara de crescimento inoculou-se a estirpe 11399 com OD de 0,2. Duas semanas após a inoculação coletou-se a região entre as folhas e a raiz, e foi realizada a extração de DNA pelo método de CTAB adaptado (Murray & Thompson, 1980). Posteriormente realizou-se PCR quantitativo em tempo real para quantificar a população bacteriana *in planta*. Através dos dados fornecidos pelo programa foi possível estimar a população bacteriana através de uma curva padrão pré estabelecida, e comparar ao tipo selvagem para verificar se houve uma menor população da bactéria.

*Nicotiana tabacum* foi realizada a transformação do acesso RP-1 utilizando o vetor pCambia2301, com o gene derivado de Xf que codifica a toxina B. Foram obtidos 22 eventos de transformação, que foram confirmados por PCR. Foi realizada a extração de RNA das amostras utilizando o método do Trireagente(Qiagen). Foram sintetizados os cDNAs das amostras. Em seguida foi feita a expressão gênica através de PCR em tempo real utilizando como gene endógeno NTActin.



A estirpe 9a5c foi inoculada nas plantas transgênicas. Após o aparecimento de sintomas nos tabacos, foi realizada, semanalmente, a contagem de folhas sintomáticas e saudáveis para analisar a incidência da doença. Após 9 semanas depois do surgimento dos sintomas foi realizada uma seleção através do fenótipo das plantas. Foram selecionados 5 eventos mais promissores, que não apresentaram nenhuma anomalia, e com baixa ou nenhuma incidência da doença.

Em cada evento foram coletadas folhas em diferentes alturas na planta, mantendo um comprimento similar entre os pontos de coleta. Após coletadas estas folhas, foram macerados os pecíolos e nervuras centrais delas, posteriormente foi realizada a extração de DNA utilizando o método de CTAB (Murray & Thompson, 1980). Através do PCR quantitativo em tempo real, foi possível estimar a população bacteriana *in planta* utilizando primers específicos (Oliveira et al., 2002). Essa quantificação foi feita a partir da média dos dados fornecidos pelo programa, estes são plotados numa curva padrão pré estabelecida. Através da análise desses dados na curva foi possível determinar a população bacteriana em cada amostra.

## Resultados e Discussão

### *Arabidopsis thaliana*

Foram obtidas três linhagens homocigotas por seleção com GFP dos eventos transformados com a toxina A, que foram confirmadas por PCR (Figuras 1 e 2).

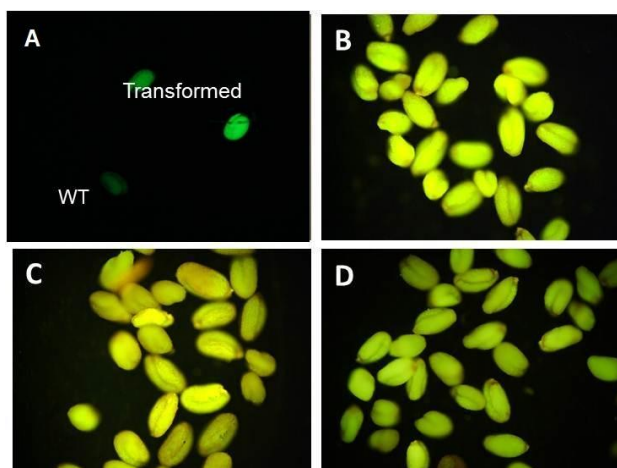


Figura 1. Sementes de linhagens homocigotas de *A. thaliana* transformadas com o gene da toxina A com seleção pra GFP. A: Tipo selvagem comparado a uma semente transformada; B: Linhagem 3.1; C: Linhagem 6.2; D: Linhagem 7.1.

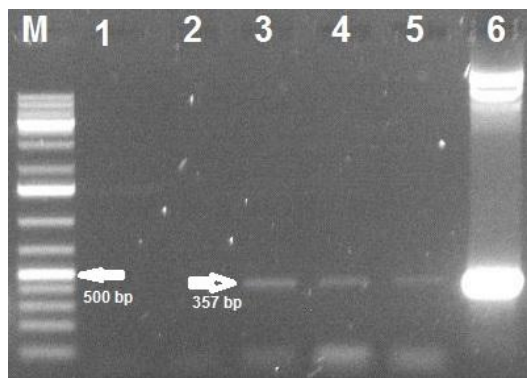


Figura 2. PCR com primers 35S. M: Marcador GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Fermentas); 1: Água; 2: Controle negativo; 3: Linhagem 3.1; 4: Linhagem 6.2; 5: Linhagem 7.1; 6: Controle positivo.

Foi realizado PCR quantitativo em tempo real e com os resultados foi possível verificar a população bacteriana *in planta* da linhagem 3.1 (Figura 3).

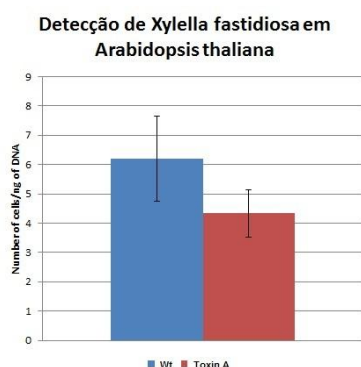


Figura 3. Número de células de Xf em Wt: Tipo selvagem; Toxin A: *A. thaliana* transformada com a toxina A - linhagem 3.1.

Analisando a figura 3 foi verificado que não houve diferença significativa entre o tipo selvagem e a planta transgênica, demonstrando que este gene não é um bom candidato para gerar tolerância a Xf. Contudo como apenas um evento foi desafiado contra o patógeno, pode ser que este inserto tenha sido localizado em alguma região do genoma que inibiu sua função. Para concluir que este gene possa gerar tolerância ou não, haveria a necessidade de desafiar mais eventos contra o patógeno e verificar se algum desses apresenta tolerância.

### ***Nicotiana tabacum***

Para certificar que o transgene estava sendo super expresso nas plantas transgênicas, realizou-se o PCR quantitativo em tempo real para avaliar a expressão gênica. Como pode ser observado na figura 4, a maioria das plantas transgênicas estava super expressando a toxina B nas plantas.



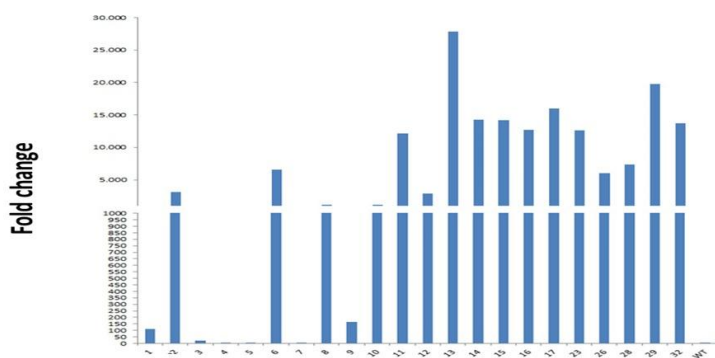


Figura 4. Expressão gênica dos eventos de tabaco transformados com o gene que codifica a toxina B. Sendo o eixo x representado pelos eventos transgênicos e o tipo selvagem (WT), enquanto o eixo y é representado pela quantidade de cópias do transcrito expressos em relação ao tipo selvagem.

Os eventos escolhidos para análise de população bacteriana foram selecionados com base no fenótipo e a expressão do gene. Pois alguns eventos que apresentam alta expressão apresentaram fenótipos alterados. As figura 5 e 6 exemplificam alguns eventos que apresentaram fenótipos alterados e normais.



Figura 5. Fotos de transgênicos com fenótipos alterados. WT: tipo selvagem, sempre ao lado esquerdo das fotos; 28: Evento com fenótipo de nanismo; 13: Evento com manchas brancas nas folhas.



Figura 6. Fotos de transgênicos com fenótipos promissores. Pode-se observar a diferença nas folhas quanto a sintomatologia. WT: Tipo selvagem; As outras são diferentes eventos transgênicos.

Destes eventos selecionados foi feita, semanalmente, uma análise da sintomatologia comparando-os junto ao tipo selvagem que pode ser observado na figura 7.

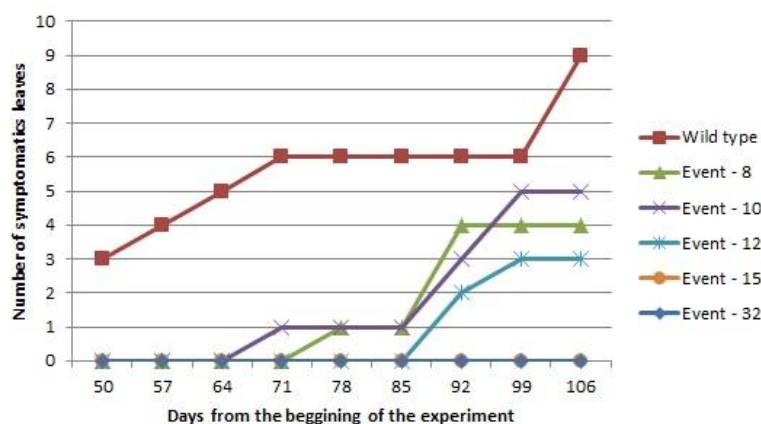


Figura 7. Imagem representando os resultados obtidos da avaliação de sintomas.

Pode-se observar na figura 7 que todos os eventos apresentaram menos sintomas comparados ao tipo selvagem, e dois dos eventos nem apresentaram sintomas nas plantas. Com isso pode-se afirmar que este gene é um bom candidato a tolerância a Xf. Para complementar esses dados e esclarecer como é a interação das plantas com a bactéria foi feito o PCR quantitativo em tempo real para estimar a população bacteriana *in planta* (Figura 8)

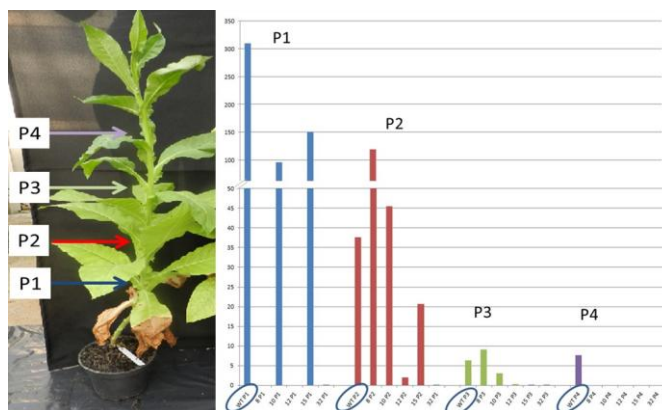


Figura 8. Imagem representando as regiões coletadas na planta, com as respectivas quantificações da população bacteriana.

O aparecimento de sintomas está relacionado a colonização e movimento da bactéria dentro da planta. Os eventos 8 e 10 demonstraram uma menor quantidade de sintomas comparados ao tipo selvagem, porém quando observa-se a figura 8 eles possuem a colonização similar ao tipo selvagem. Com isso sugere-se que a toxina sintetizada está afetando outros fatores de patogenicidade da bactéria, pois ainda que tenha a mesma população apresenta uma quantidade menor de sintomas. Contudo os eventos 12, 15 e 32 demonstraram poucos sintomas ou nenhum, e a população bacteriana nas plantas não cresceu tão bem quanto os eventos 8; 10 e tipo selvagem. Com isso sugere-se que nestes eventos a toxina está afetando o movimento da bactéria assim como outros mecanismos de patogenicidade.

A partir destes resultados pode-se afirmar que a utilização de *N. tabacum* como planta modelo para validação de genes de tolerância a *X. fastidiosa* demonstrou-se mais efetiva que *A.*



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

*thaliana*, pois há a possibilidade de avaliar o movimento dentro da planta, uma vez que, a colonização é um dos fatores de patogenicidade da bactéria, e também para é possível avaliar a sintomatologia da planta, que difere-se de evento para evento, aspectos esses que não são possíveis de serem avaliados em *A. thaliana*.

Estes resultados apresentados em *Nicotiana tabacum* permitem afirmar que o estudo funcional em plantas modelo é muito mais rápido que em citros, e que o gene estudado é um bom candidato para transformação de citros visando como estratégia plantas resistentes a CVC.

### Agradecimentos

A minha orientadora Dra. Alessandra Alves de Souza pela oportunidade cedida e por sempre me ajudar.

Ao Dr. Juarez Pires Tomaz por me ensinar no início toda a parte laboratorial.

Aos meus colegas Raquel Caserta Salviato e Willian Eduardo Lino Pereira que sempre me auxiliaram quando precisei.

Ao CNPq pela bolsa PIBIC fornecida.

### Referências Bibliográficas

Ganesan. G.; Sankararamasubramanian, H.M.; Harikrishnan, M.; Ashwin, G.; Parida, A. A MYB transcription factor from the grey mangrove is induced by stress and confers NaCl tolerance in tobacco. **J Exp Bot.** 2012 Jul;63(12):4549-61.

Jaggi, M.; Kumar, S.; Sinha, A.K. Overexpression of an apoplastic peroxidase gene CrPrx in transgenic hairy root lines of *Catharanthus roseus*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2011 May;90(3):1005-16.

Lopes, S. A.; Ribeiro, D. M.; Roberto, P. G.; França, S. C.; Santos, J. M. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant–*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Dis.** 2000 84:827-830.

Murray, M. G. & Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucl Acids Research.** 1980 8 4321-4325.

Oliveira, A. C.; Vallim, M. A.; Pizetta-Semighini, C.; Araújo, W. L. Goldman, G. H. Machado, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus tree by Real-Time Polymerase Chain Reaction assay. **Phytopathology.** 2002 v. 92, p. 1048-1054.

Rogers, E.E. 2012. Evaluation of *Arabidopsis thaliana* as a model host for 1 *Xylella fastidiosa*. **Molecular Plant Microbe Interection.** 25: 747-754.

Van Melderren, L.; Saavedra. De Bast. M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? **PLoS Genet.** 2009 Mar;5(3):e1000437