

***Xylella fastidiosa* – ADESÃO E COLONIZAÇÃO EM VASOS DO
XILEMA DE LARANJEIRA DOCE, CAFEEIRO, AMEIXEIRA,
FUMO E ESPÉCIES DE CIGARRINHAS VETORAS E FORMAÇÃO
DE BIOFILME SOBRE PELÍCULA DE POLIESTIRENO**

EDUARDO ALVES

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Janeiro - 2003

***Xylella fastidiosa* – ADESÃO E COLONIZAÇÃO EM VASOS DO
XILEMA DE LARANJEIRA DOCE, CAFEEIRO, AMEIXEIRA,
FUMO E ESPÉCIES DE CIGARRINHAS VETORAS; E
FORMAÇÃO DE BIOFILME SOBRE PELÍCULA DE
POLIESTIRENO**

EDUARDO ALVES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Janeiro - 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Alves, Eduardo

Xylella fastidiosa – adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno / Eduardo Alves. - - Piracicaba, 2003.

122 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Cigarrinhas 3. Clorese-variegada-dos-citros 4. Microscopia 5. Microscopia eletrônica de transmissão 6. Microscopia eletrônica de varredura 7. Xilema I. Título

CDD 634.31

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

**Aos meus pais Manoel e Odila,
e a minha tia e madrinha Nicleusa,
pelo carinho, incentivo e apoio, DEDICO**

*“Quando se planta com fé e esperança,
se colhe com graça e em abundância”*

*Com a ajuda do microscópio não há nada tão pequeno que possa escapar as nossas
investigações; portanto há um novo e visível mundo descoberto a ser entendido.*

Robert Hookie (*Micrografia*, 1664)

**À minha esposa Eliana pela atenção, ajuda,
incentivo, dedicação, carinho, amor e companheirismo,
OFEREÇO.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colegas, professores e funcionários do Setor de Fitopatologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, que contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial:

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati, pela orientação, incentivo, paciência, confiança e amizade.

Ao Dr. Breno Leite (*Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, North Florida Research and Education Center -Quincy, FL-USA*), pela co-orientação, treinamento, incentivo, ajuda, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pelas sugestões, incentivo, confiança e disponibilização do NAP/MEPA- ESALQ/USP, para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes do Setor de Entomologia, pela ajuda, orientação e cooperação na realização de vários trabalhos desta tese.

Ao Prof. Dr. Charles Mims e aos técnicos Carmem Rodrigues, Elizabeth Richardson e Glenn Freshour (*The University of Georgia – Athens, GA-USA*), pelo carinho com que me receberam em seus laboratórios para treinamento.

A Doutoranda Rosangela Cristina Marucci do Setor de Entomologia pela ajuda nos isolamentos, preparo das cigarrinhas e inoculação das plantas.

Aos demais professores do Setor de Fitopatologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP pelos ensinamentos e incentivos.

Aos amigos André Andrade Franco, Robson Di-Piero e Marise C. Martins Panisi pela cooperação nesta fase final de elaboração da Tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de Doutorado no Brasil e de Doutorado Sanduíche.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

E finalmente, a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pela minha liberação integral durante estes quatro anos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xviii
RESUMO.....	xx
SUMMARY.....	xxii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O gênero <i>Xylella</i>	4
2.2 Doenças causadas por <i>X. fastidiosa</i>	5
2.3 Sintomatologia das doenças causadas por <i>X. fastidiosa</i>	7
2.4 Como <i>X. fastidiosa</i> causa doença.....	8
2.5 O processo de adesão e colonização por <i>X. fastidiosa</i>	10
2.5.1 Termos relacionados à adesão e colonização de bactérias.....	10
2.5.2 Envolvimento de elementos químicos na adesão e colonização das bactérias	11
2.5.2.1 Influência do zinco na clorose variegada do citros.....	11
2.5.2.2 Importância do cálcio na adesão.....	11
2.5.2.3 Envolvimento do enxofre na adesão.....	12
2.5.3 Papel de exopolissacarídeos e estruturas extracelulares na adesão.....	12
2.5.4 Um modelo para adesão de <i>X. fastidiosa</i>	13
2.5.5 A movimentação sistêmica e vaso a vaso por <i>X. fastidiosa</i>	14
2.6 Vetores.....	15
2.7 Diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i>	18
2.8 Considerações Finais.....	19

3	RELAÇÃO ENTRE A PROPORÇÃO DE VASOS DO XILEMA COLONIZADOS POR <i>Xylella fastidiosa</i> EM AMEIXEIRA, CAFEEIRO E CITROS E A SINTOMATOLOGIA DA FOLHA.....	20
3.1	Resumo.....	20
3.2	Introdução.....	21
3.3	Material e Métodos.....	23
3.3.1	Isolados do patógeno, plantas utilizadas e inoculação.....	23
3.3.2	Coleta das amostras.....	23
3.3.3	Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura.....	24
3.3.4	Isolamento primário em meio de cultura.....	25
3.3.5	Extração de DNA e PCR.....	26
3.3.6	Análise estatística.....	26
3.4	Resultados.....	26
3.4.1	Relação entre o número de vasos do xilema colonizados por <i>X. fastidiosa</i> e a sintomatologia	26
3.4.2	População bacteriana nos pecíolos e relação com a sintomatologia.....	27
3.5	Discussão.....	35
4	ULTRAESTRUTURA DA INTERAÇÃO <i>Xylella fastidiosa</i> -LARANJA PÊRA - ASPECTOS DA ADESÃO, COLONIZAÇÃO VASO A VASO E RESISTÊNCIA DA PLANTA.....	39
4.1	Resumo.....	39
4.2	Introdução.....	40
4.3	Material e Métodos.....	42
4.3.1	Coleta das amostras.....	42
4.3.2	Preparação das amostras para MEV.....	42
4.3.3	Preparação das amostras para MET e ML.....	43
4.3.4	Ultramicrotomia.....	44
4.3.5	Procedimentos para imunomarcação.....	44
4.3.5.1	Anticorpos	44
4.3.5.2	Imunomarcação.....	44

4. 4 Resultados.....	45
4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz da <i>X. fastidiosa</i> em vasos do xilema de citros.....	45
4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão de <i>X. fastidiosa</i> em vasos do xilema de citros com imunomarcacão da parede primária dos vasos do xilema.....	46
4.4.3 MEV e ML da reação de plantas de laranjeira pêra a colonização dos vasos do xilema do pecíolo e das folhas por <i>X. fastidiosa</i>	52
4.5 Discussão.....	53
5 ESTUDO DA INTERAÇÃO DE <i>Xylella fastidiosa</i> COM DIFERENTES VARIEDADES DE FUMO (<i>Nicotiana tabacum</i>): ASPECTOS EXPERIMENTAIS, ULTRAESTRUTURAIIS E SINTOMATOLÓGICOS.....	58
5.1 Resumo.....	58
5.2 Introdução.....	59
5.3 Material e Métodos.....	60
5.3.1 Condições experimentais e inoculação.....	60
5.3.2 Coleta das amostras e preparo para MEV.....	61
5.3.3 Reisolamento da bactéria em meio PWG.....	61
5.4 Resultados.....	62
5.4.1 Quadro sintomatológico apresentado pelas plantas.....	62
5.4.2 Reversão e atraso nos sintomas pela adubação com sulfato de amônio.....	63
5.4.3 Reisolamento das colônias de <i>X. fastidiosa</i> em meio sólido e observação dos pecíolos em MEV.....	63
5.5 Discussão.....	69
6 ESTUDO DA ADESÃO E COLONIZAÇÃO DE INSETOS VETORES POR <i>Xylella fastidiosa</i> ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	72
6.1 Resumo.....	72
6.2 Introdução.....	73

6.3 Material e Métodos.....	74
6.3.1 Criação de insetos vetores sadios.....	74
6.3.2 Aquisição das células de <i>X. fastidiosa</i>	75
6.3.3 Preparação das cigarrinhas para MEV.....	75
6.4 Resultados.....	76
6.4.1 Eficiência de exposição dos possíveis sítios de retenção de <i>X. fastidiosa</i>	76
6.4.2 Localização de <i>X. fastidiosa</i> nos sítios de retenção.....	77
6.5 Discussão.....	89
7 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Xylella fastidiosa</i> SOBRE SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO	91
7.1 Resumo.....	91
7.2 Introdução.....	92
7.3 Material e Métodos.....	93
7.3.1 Condições experimentais e inóculo.....	93
7.3.2 Preparo do material para MEV.....	94
7.4 Resultados.....	94
7.4.1 Fases da formação do biofilme por <i>X. fastidiosa</i> em película de poliestireno.	94
7.4.2 MEV de colônias de <i>X. fastidiosa</i>	95
7.4.3 Emprego da película de poliestireno para o estudo da formação do biofilme por outras bactérias.....	95
7.5 Discussão.....	95
8 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

LISTA DE FIGURAS

	Página
3 RELAÇÃO ENTRE A PROPORÇÃO DE VASOS DO XILEMA COLONIZADOS POR <i>Xylella fastidiosa</i> EM AMEIXEIRA, CAFEEIRO E CITROS E A SINTOMATOLOGIA DA FOLHA.....	20
1 Sintomatologia das amostras coletadas: folha com maior intensidade dos sintomas (SI), folha de ramos doentes com sintomas leves (SL) e folha de planta sadia (da esquerda para a direita). (A) folhas de ameixeira, (B) folhas de cafeeiro e (C) folhas de laranjeira caipira.....	24
2 Eletromicrografia de varredura mostrando a morfologia característica e detalhes do modo de colonização de <i>Xylella fastidiosa</i> em vasos do xilema em pecíolos de ameixeira (A e D), cafeeiro (B e E) e citros (C e F). (D) vaso espiralado em ameixeira; (E) vaso reticulado em cafeeiro e (F) vaso pontuado em laranjeira caipira.....	31
3 Eletromicrografia de varredura mostrando o número de vasos colonizados por <i>Xylella fastidiosa</i> em ameixeira (A e B), cafeeiro (C e D) e citros (E e F) em relação à sintomatologia. As imagens da direita foram obtidas de folhas com sintomas leves e da esquerda com sintomas intensos. (Seta) célula do parênquima do xilema; (V) vaso do xilema; (Vc) vaso do xilema colonizado por <i>X. fastidiosa</i>	32
4 Eficiência de colonização de três plantas hospedeiras (cafeeiro, ameixeira e citros) por <i>Xylella fastidiosa</i> . A proporção da (UFC/g) pela % de vasos colonizados expressa a capacidade do patógeno em colonizar o tecido da planta. (A) Pecíolo de folhas com sintomas leves; (B) Pecíolo de folhas com sintomas intensos.....	33

4 ULTRAESTRUTURA DA INTERAÇÃO <i>Xylella fastidiosa</i>-LARANJA PÊRA - ASPECTOS DA ADESÃO, COLONIZAÇÃO VASO A VASO E RESISTÊNCIA DA PLANTA.....	39
1 A) Fotomicrografia de um corte transversal do pecíolo de laranjeira pêra infectada com <i>Xylella fastidiosa</i> . Nota-se que os vasos colonizados estão posicionados nas partes mais externas (seta ilustra um vaso obstruído). (B-D) Eletromicrografias de varredura do pecíolo de laranjeira pêra com CVC; (B) Corte longitudinal representando a área do quadrado em A, mostrando os tipos de vasos do xilema encontrados no pecíolo de folhas de laranjeira pêra da parte superior para a inferior, observa-se vasos pontuados (P), reticulados (R), escalariformes (Es) e espiralados (E); (C) corte longitudinal mostrando as bactérias no interior das pontuações (seta); (D) corte transversal mostrando detalhe da bactéria no interior da pontuação (seta).....	47
2 Eletromicrografias de varredura de vasos do xilema de laranjeira pêra colonizados por <i>Xylella fastidiosa</i> . (A-B) Colonização de vasos adjacentes e presença de algumas bactérias [b e setas] aderidas à parede das células e algumas no interior de pontuações (cabeça de seta), (A) corte transversal e (B) corte longitudinal; (C-F) fases da colonização.(C) início da formação do biofilme (seta); (D-E) presença de material fibrilar [f e setas] junto às bactérias (b); (F) presença de goma [g] sobre as células bacterianas, vaso ocluído.....	48
3 Eletromicrografias de varredura de vasos do xilema de laranjeira pêra colonizados por <i>Xylella fastidiosa</i> . (A) corte longitudinal mostrando um vaso com as diversas fases da colonização (da esquerda para direita simula as posições dos cortes da Figura 2 C, D, E e F); (B) bactérias (cabeça de seta) envolvidas por uma substância semelhante a mucilagem (seta) Condição em que são também encontradas as bactérias nos vasos do xilema de laranjeira pêra.....	49
4 Eletromicrografias de transmissão do pecíolo de folhas de laranjeira pêra infectadas com <i>Xylella fastidiosa</i> . (A) Corte longitudinal mostrando os vasos obstruídos e em início de colonização. Pode-se notar o acúmulo de bactérias	

- próximas às pontuações (seta). (B) Corte transversal mostrando uma bactéria em divisão no interior da pontuação (seta); (B-D) vasos com células bacterianas e ausência ou alteração na parede primária da pontuação. P = pontuação, Pc = parede celular secundária, cabeça de seta = parede celular primária, seta = bactéria..... 50
- 5 Eletromicrografias de transmissão do pecíolo de folhas de laranjeira pêra infectadas com *Xylella fastidiosa*, com imunomarcção para componentes da parede primária (hemiceluloses) com ouro coloidal (seta). Em A e B nota-se a ausência de marcação na parede primária das pontuações, as quais possivelmente foram degradadas por *X. fastidiosa*. P = pontuação; Pc = parede secundária; B = bactéria..... 51
- 6 Eletromicrografia de varredura do pecíolo de folhas de laranjeira pêra infectada com *Xylella fastidiosa* mostrando a formação de cristais em vasos próximos aos colonizados pela bactéria. (A-C) Corte transversal. Em (C) é possível verificar as bactérias nos vasos à esquerda (seta); (D) corte longitudinal mostrando a formação de cristais ao longo do vaso. C = cristais..... 52
- 7 Fotomicrografia (A-B) e eletromicrografia de transmissão (C-D) da região da folha de plantas de laranjeira pêra infectadas com *Xylella fastidiosa*. (A) corte transversal do limbo foliar mostrando uma maior espessura do limbo na região da bainha, com a presença de hipertrofia (H) e deposição de material nos espaços intercelulares (G); (B) um detalhe da área afetada mostrada em A; (C) eletromicrografia mostrando uma região do parênquima paliçádico próximo à região da bainha. Pode se observar alterações no citoplasma com a degradação dos plastídios, presença de glóbulos osmofílicos (O) e um grande número de vesículas (Ve); (D) eletromicrografia mostrando detalhes da região com hipertrofia das células (H) e deposição de material nos espaços intercelulares, possivelmente goma e compostos fenólicos (G). V = vacúolo, E = epiderme, PP = parênquima paliçádico e Pl = parênquima lacunoso..... 54

5 ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Xylella fastidiosa* COM DIFERENTES

VARIEDADES DE FUMO (<i>Nicotiana tabacum</i>): ASPECTOS EXPERIMENTAIS, ULTRAESTRUTURAIS E SINTOMATOLÓGICOS.....	58
1 Sintomas de <i>Xylella fastidiosa</i> observados em folhas de três variedades de fumo: (A) Havana; (B) RP1; (C)TNN; (D) vista superior de uma planta de Havana infectada; (E) vista superior de uma planta de TNN infectada. Observe os sintomas da infecção nas folhas localizadas na base das plantas.....	64
2 Sintomas em hastes da variedade de fumo Havana infectadas com <i>Xylella fastidiosa</i> . Planta controle a esquerda e sintomática a direita. Foto obtida 120 dias após a inoculação.	65
3 Detalhes da reação de plantas de fumo, variedade Havana, infectadas com <i>Xylella fastidiosa</i> à adubação com sulfato de amônio. (A) Folha de uma planta não adubadas a esquerda e de uma adubada a direita; (B) folha de planta que foi adubada quando os sintomas iniciais já eram visíveis (observe uma reversão dos sintomas e que a folha apresenta-se ainda um pouco encarquilhada); pode se observar a depressão dos pontos onde os sintomas necróticos estão localizados; (C) Planta de fumo variedade Havana antes da adubação e (D) 20 dias após a adubação com sulfato de amônio.....	66
4 Eletromicrografia de varredura de pecíolos de folhas de plantas de fumo infectadas por <i>Xylella fastidiosa</i> . (A) Variedade RP1 (as setas indicam os poucos vasos colonizados pela bactéria). (B) Detalhes mostrando vasos espiralados do xilema de fumo variedade havana (X) e vasos ocluido à direita com agregados da bactéria (seta) e possivelmente material fibrilar (cabeça de seta). Foto obtida de plantas após 120 dias da inoculação.....	67
5 Eletromicrografia de varredura de pecíolo de folhas de plantas de fumo infectados com <i>X. fastidiosa</i> : (A e C) variedade RP1, (B, D e F) variedade Havana e (E) variedade TNN. Em (A) e (B) a seta indica vaso colonizado, em (C-D) a seta indica bactéria. Cabeça de seta em C indica presença de goma junto às bactérias e em (E) material fibrilar; (F) Secção longitudinal (a seta indica a presença da bactéria na pontuação). (A- E) Secção transversal do	

pecíolo.....	68
6 ESTUDO DA ADESÃO E COLONIZAÇÃO DE INSETOS VETORES POR <i>X. fastidiosa</i> ATRAVÉS DA MICROSOCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	72
1 Eletromicrografia de varredura do corte longitudinal da cabeça de cigarrinhas de citros mostrando os prováveis sítios de retenção de <i>Xylella fastidiosa</i> e outras partes da cabeça (partes descritas nas imagens) (A-F). (A e B) <i>Acrogonia citrina</i> ; (C-E) <i>Dilobopterus costalimai</i> , sendo (D) um detalhe do canal alimentar; (F) <i>Oncometopia facialis</i>	78
2 Eletromicrografia de varredura de um corte longitudinal da cabeça de <i>Bucephalagonia xanthophis</i> mostrando os prováveis sítios de retenção de <i>Xylella fastidiosa</i> . Nota-se, entretanto que nenhuma célula de <i>X. fastidiosa</i> foi encontrada, porém, apenas uma bactéria com morfologia diferente. (A) Vista geral da câmara do cibário; (B) detalhes da bactéria encontrada colonizando a superfície interna ventral do cibário. A área em B é um aumento da área do quadrado em A. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de citros infectada com isolado de <i>X. fastidiosa</i> , causador da CVC.....	80
3 Eletromicrografia de varredura de um corte longitudinal da cabeça de <i>Acrogonia citrina</i> mostrando várias partes. (A) vista geral das partes da cabeça; (B) detalhes da área indicada pela seta e quadrado em A com a presença de bactérias semelhantes a <i>Xylella fastidiosa</i> ; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em B. Nota-se, a presença de células de <i>X. fastidiosa</i> envoltas por um material amorfo e fímbrias. B = células bacterianas. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de citros infectada com isolado de <i>X. fastidiosa</i> , causador da CVC.....	81
4 Eletromicrografia de varredura de um corte longitudinal da cabeça de <i>Acrogonia citrina</i> . (A) uma vista dorsal e externa do cibário mostrando orifícios e fissuras na membrana do diafragma; (B) detalhes de uma fissura na membrana mostrando uma agregação interna de bactérias semelhantes a <i>Xylella</i>	

- fastidiosa*; (C) detalhes de um orifício indicado pelo quadrado em A, mostrando uma agregação interna de *X. fastidiosa*; (D) detalhes da área em C mostrando células de *X. fastidiosa* envoltas por um material amorfo. Inseto alimentado previamente durante 48h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC..... 82
- 5 Eletromicrografia de varredura mostrando uma parte interna da membrana do diafragma, canal apodemal de *Acrogonia citrina* (A). (B) detalhe da área indicada pelo quadrado em A, onde se observa a presença de agregados de bactéria semelhante a *Xylella fastidiosa*; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em D, mostrando células de *X. fastidiosa* aderidas polar e lateralmente na membrana do diafragma. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC. B = *X. fastidiosa*..... 83
- 6 Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da câmara do cibário de *Acrogonia citrina* (A). (B-D) detalhes das respectivas áreas indicadas pelo quadrado em A, onde se observa a presença de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa*; (E) detalhes da área indicada pelo quadrado em D. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC..... 84
- 7 Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da câmara do cibário de *Oncometopia facialis* com indicação dos sítios de ligação de *Xylella fastidiosa* (A). (B) detalhes da área indicada pelo quadrado em A, onde se observa a presença da *X. fastidiosa* no canal do pré-cibário; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em B, mostrando a presença das células de *X. fastidiosa* aderidas polarmente a parede do canal e de goma fastidiana. B = células bacterianas e G = goma fastidiana. Inseto alimentado previamente durante 48h em planta de ameixeira infectada com o isolado PLS de *X. fastidiosa*..... 85
- 8 Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da região próxima ao pré-cibário de *Oncometopia facialis* com indicação da presença de *Xylella*

- fastidiosa* na parede do cibário e no sulco longitudinal (A). (B) detalhes da área indicada pelo quadrado em A, onde se observa a presença de bactérias semelhantes a *X. fastidiosa* aderida polarmente a parede do cibário; (C) detalhes da área da válvula do pré-cibário (região localizada no final do canal do cibário) mostrando a presença de células de *X. fastidiosa*. B = células bacterianas. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de ameixeira infectada com o isolado PLS de *X. fastidiosa*..... 86
- 9 Eletromicrografia de varredura do sulco longitudinal do cibário de *Oncometopia facialis* (região mostrada na Figura 7) indicando uma região com bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa* aderida (A); (B) detalhes das células bacterianas aderidas lateralmente, sem a presença de material amorfo. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de ameixeira infectada com o isolado PLS de *X. fastidiosa*..... 87
- 10 Eletromicrografia de varredura de um corte sagital da cabeça de *Dilobopterus costalimai*. (A) mostrando uma visão geral do cibário, com atenção para a parte interna do canal apodemal (quadrado). (B) detalhe da área indicada pelo quadrado em A, parte interna da membrana do diafragma, onde se observa a presença de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa* nas cavidades dos músculos; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em B, mostrando células de *X. fastidiosa* aderidas lateralmente na cavidade dos músculos. Inseto alimentado previamente durante 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa* causador da CVC..... 88
- 7 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Xylella fastidiosa* SOBRE SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO - METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BACTÉRIAS.... 91**
- 1 Eletromicrografia de varredura das fases de formação do biofilme por *Xylella fastidiosa* sobre película de poliestireno (A-G) e colônia da bactéria em meio de cultivo PW sólido (H), onde se observa célula menor e sem goma. (A) fase inicial com poucas células aderidas á película; (B) com uma camada de

células; (C-D) com mais de uma camada e início da produção de exopolissacarídeos; (E) varias colônias em início de agregação; (F) colônias já unidas e com a deposição de goma; (G) biofilme já formado com várias camadas de células.....	96
2 Eletromicrografias de varredura mostrando o biofilme formado sobre película de poliestireno pelas bactérias (A) <i>Xylella fastidiosa</i> , (C) <i>Bacillus subtilis</i> , (E) <i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i> e (G) <i>Pseudomonas</i> sp. Nota-se a adesão inicial das bactérias a superfície de poliestireno. Detalhes dos respectivos biofilmes bacterianos (B, D, F e H).....	97

LISTA DE TABELAS

	Página
3 RELAÇÃO ENTRE A PROPORÇÃO DE VASOS DO XILEMA COLONIZADOS POR <i>Xylella fastidiosa</i> EM AMEIXEIRA, CAFEEIRO E CITROS E A SINTOMATOLOGIA DA FOLHA.....	20
1 Porcentagem de vasos do xilema colonizados por <i>X. fastidiosa</i> , número de unidades formadoras de colônias por grama de tecido e resultado do teste PCR em função da sintomatologia foliar em ameixeira, cafeeiro e citros.....	29
2 Porcentagem de vasos do pecíolo do xilema colonizados por <i>Xylella fastidiosa</i> e número de UFC/g tecido infectado em folhas de ameixeira, cafeeiro e citros com sintomas leves e sintomas intensos da doença. Dados transformados.....	30
3 Número e porcentagem de vasos colonizados por <i>X. fastidiosa</i> em cinco posições do pecíolo em direção à nervura central de folhas de ameixeira, cafeeiro e de citros com sintomas intensos de infecção.....	31
4 Número de vasos total por imagem, número de vasos colonizados por <i>X. fastidiosa</i> e número de vasos totais, contados nas imagens geradas no microscópio eletrônico de varredura. (SI) sintoma intenso e (SL) sintoma leve.	34
6 ESTUDO DA ADESÃO E COLONIZAÇÃO DE INSETOS VETORES POR <i>X. fastidiosa</i> ATRAVÉS DA MICROSOCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	72
1 Número de cigarrinhas sadias ou infectadas com <i>Xylella fastidiosa</i> dissecadas e preparadas para MEV e frequência de sucesso na dissecação e visualização da bactéria nos insetos.....	79

7 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Xylella fastidiosa</i> SOBRE SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO - METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BACTÉRIAS....	91
1 Comprimento, largura e relação comprimento largura de quatro espécies de bactérias. Medidas realizada em microscópio eletrônico de varredura sob aumento de 10.000X.....	98

***Xylella fastidiosa* – ADESÃO E COLONIZAÇÃO EM VASOS DO XILEMA DE LARANJEIRA DOCE, CAFEIEIRO, AMEIXEIRA, FUMO E ESPÉCIES DE CIGARRINHAS VETORAS E FORMAÇÃO DE BIOFILME SOBRE PELÍCULA DE POLIESTIRENO**

AUTOR: EDUARDO ALVES

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

X. fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica limitada ao xilema, que tem afetado um grande número de plantas no Brasil e no mundo. Muitos trabalhos já foram realizados sobre esta bactéria, mas pouco se conhece a respeito da adesão, colonização e expressão dos sintomas. Os objetivos deste trabalho foram: a) através do uso da microscopia eletrônica e de luz, determinar e relacionar o número de vasos colonizados de citros, cafeeiro e ameixeira com a sintomatologia em folhas; b) estudar a adesão, migração radial e colonização dos vasos do xilema do pecíolo de folhas de citros pela bactéria; c) estudar algumas variáveis experimentais que afetam a expressão dos sintomas em fumo; d) verificar os sítios de ligação da bactéria em cigarrinhas vetores; e) estudar a adesão e a formação do biofilme por *X. fastidiosa* em superfície de poliestireno, como uma nova metodologia. Os resultados mostraram em ameixeira e cafeeiro uma relação entre o número de vasos colonizados e a expressão de sintomas necróticos, relação esta que não pode ser observada para citros, o qual apresentava um número de vasos colonizados do pecíolo bem menor que o das outras duas espécies. No estudo da bactéria nos vasos do

xilema de citros foi possível verificar as diversas fases do processo de colonização do xilema, bem como a capacidade da bactéria em degradar a parede celular primária da pontuação e migrar para os vasos adjacentes. Neste estudo foi também possível verificar respostas da planta à bactérias caracterizadas pela produção de cristais no lúmen dos vasos do xilema e o acúmulo de goma e hiperplasia de células nas folhas. No estudo com variedades de fumo verificou-se que a cultivar Havana apresentou expressão de sintomas mais intensa que as variedades TNN e RP1 e que o aparecimento dos mesmos não foi influenciado pelo volume de inóculo e pelo local de inoculação, mas sim pela adubação com sulfato de amônio, a qual retardou o aparecimento dos sintomas e reverteu os sintomas iniciais em folhas após a aplicação. Em cigarrinhas, células bacterianas com morfologia similar as de *X. fastidiosa*, foram visualizadas aderidas pela parte lateral na câmara do cibário (sulco longitudinal, parede lateral e membrana do diafragma) de *Acrogonia citrina*, e *Oncometopia facialis*, no canal do apodeme de *Dilobopterus costalimai* e pela parte polar no precibário de *O. facialis*. Finalmente, no estudo da adesão de *X. fastidiosa* a película de poliestireno, os resultados revelaram as várias fases da formação do biofilme, aspectos da sua arquitetura, e indicaram que a técnica é uma ferramenta adequada para o estudo da formação do biofilme e também da morfologia das bactérias. Os resultados são discutidos em termos de modelos de adesão e colonização, da bactéria e importância para o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria em plantas e transmissão pelos vetores.

***Xylella fastidiosa* - ADHESION AND COLONIZATION IN XYLEM VESSELS OF SWEET ORANGE, COFFEE, PLUM AND TABACCO, AND INSECT VECTORS AND FORMATION OF BIOFILME ON POLYSTYRENE SURFACE**

AUTHOR: EDUARDO ALVES

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

X. fastidiosa is a xylem-limited bacterium that has been affecting a high number of plants in Brazil and in the world. A lot of researches were already accomplished on this bacterium, but little is known regarding the adhesion, colonization and expression of the symptoms in plants. The objectives of this work were: a) through the use of electron microscopy and of light microscopy determine and to correlate the number of xylem colonized vessels of petiole of sweet orange, coffee and plum with chlorosis and leaf scorching in leaves; b) study the adhesion, radial migration and colonization of the vessels of the petiole xylem of sweet orange by the bacterium; c) study some experimental variables that affect the expression of symptoms in tobacco; d) verify the retention sites of the bacterium in sharpshooters; d) study the adhesion and biofilm formation by *X. fastidiosa* on polystyrene surface. The results showed a relationship between the number of colonized vessels in plum and coffee and the expression of necrotic symptoms. However, that relationship was not observed for

sweet orange, which presented a number of colonized vessels smaller than the other two species. In the study of the bacterium in the xylem vessels of sweet orange it was possible to verify the several phases of the colonization process of the xylem as well as the ability of the bacterium to degrade the primary cell wall of the pit and migrate to adjacent vessels. It was also possible to verify responses of the plant to the bacterium characterized by the production of crystals in the lumen of the xylem vessels and gum accumulation and hyperplasia in the leaf cells. Regarding the tobacco varieties it was verified that the expression of symptoms is more intense in the cultivar Havana than in the cultivars TNN and RP1. It was also seen that symptoms expression was not influenced by the inoculum volume or the inoculation place, but it was altered by fertilization with ammonium sulfate, which delayed the beginning of the symptoms and reverted the symptoms in leaves after the application. In sharpshooters, bacterial cells exhibiting morphology similar to *X. fastidiosa* were visualized attached to the lateral side in the cibarium camera (longitudinal, lateral wall and membrane of the diaphragm) of *Acrogonia citrina*, and *Oncometopia facialis*, in the apodemal channel of *Dilobopterus costalimai*, and in the polar part in the pre-cibarium of *O. facialis*. Finally, in the study of the adhesion of *X. fastidiosa* on polystyrene surface, the results revealed the several phases of biofilm formation; aspects of its architecture, and it also indicated that the technique is an appropriate tool to study of the formation of biofilms and also of the bacterial morphology. The results are discussed regarding adhesion models, colonization, and distribution of the bacterium in the plant and the importance of knowing the pathogenicity mechanisms of *X. fastidiosa* and its transmission by the insect vectors.

1 INTRODUÇÃO

X. fastidiosa é uma bactéria que ocorre limitada aos vasos do xilema de um grande número de plantas cultivadas, árvores, ornamentais e outras plantas silvestres, em várias partes do mundo. Em algumas dessas plantas, a bactéria é considerada agente causal de doença, porém em outras não, devido à ausência de sintomas e/ou danos nos hospedeiros colonizados. Considerada uma bactéria fastidiosa, essa requer meios especiais para seu cultivo *in vitro*, sendo transmitida por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae), que se alimentam da seiva bruta do xilema de plantas infectadas (Hopkins, 1989).

A primeira doença associada a *X. fastidiosa* foi o mal de Pierce, em videira. Essa é uma doença conhecida desde 1892 na Califórnia, e foi estudada pelo fitopatologista Newton B. Pierce. Na época, devido às dificuldades de isolamento do agente etiológico e a outras características, como a transmissão por enxertia de garfagem, colonização sistêmica e transmissão por vetor, essa doença, bem como outras causadas por essa bactéria foram atribuídas a causas viróticas. Entretanto, como nenhuma partícula de vírus ou semelhante a vírus foi encontrada associada aos tecidos doentes, os postulados de Koch não puderam ser completados (Raju & Wells, 1986). Em 1973, dois grupos de fitopatologistas, um na Flórida e outro na Califórnia, trabalhando independentemente (Goheen et al., 1973; Hopkins & Mollenhaver, 1973) conseguiram encontrar uma bactéria no xilema de plantas de videira afetadas pela doença, mas não em plantas saudáveis. Esses autores chamaram-na de bactéria semelhante a rickettsia "rickettsialike", devido à semelhança a nível ultra-estrutural dessa com as rickettsias que causam doenças em animais. Durante o final da década de 70 e início de 80, a bactéria foi então assim denominada.

Após esse período, o termo bactéria limitada ao xilema (BLX) do inglês "xylem-limited bacteria" passou a ser utilizado para referir-se aos organismos procariotos, habitantes do xilema, de difícil isolamento pelos procedimentos bacteriológicos padrões. Hoje, este termo é usado para se referir a três espécies de bactérias: *X. fastidiosa* (Wells et al., 1987), *Pseudomonas syzygii* (Roberts et al., 1990) e *Clavibacter xyli* (Davis et al., 1984).

Em 1978, a *X. fastidiosa* foi isolada em meio de cultivo, e várias portas se abriram para a pesquisa com esse microrganismo (Davis et al., 1978). Vários trabalhos procurando estudar as características dessa bactéria foram realizados e novos hospedeiros foram encontrados. Em 1987 foi criado o gênero *Xylella*, para abrigar esses organismos fastidiosos, habitantes do xilema, associados ou causadores de doenças em plantas, tendo como estirpe típica um isolado de videira (Wells et al., 1987).

No Brasil, essa bactéria tem sido encontrada em várias plantas, porém as culturas de importância econômica mais afetadas são ameixeira, cafeeiro e citros. Destas, apenas em citros tem-se uma estimativa dos prejuízos causados pela bactéria. No Estado de São Paulo, onde a citricultura é constituída por mais de 60 milhões de árvores, o prejuízo pode chegar a mais de um milhão de dólares, sendo que, aproximadamente 30% das plantas apresentam a bactéria (Monteiro et al., 2001 b).

Apesar do grande número de estudos realizado com a *X. fastidiosa* nestes últimos anos, pouco ainda se conhece a respeito de sua adesão, movimentação vaso a vaso, translocação sistêmica e expressão dos sintomas em plantas, além de seu comportamento no inseto-vetor. Segundo Fry et al. (1994), muito ainda tem que ser entendido sobre a adesão e o deslocamento sistêmico de *X. fastidiosa* nos vasos do xilema. Alguns trabalhos foram desenvolvidos, entretanto pouco revelaram sobre os mecanismos utilizados pela bactéria durante o seu deslocamento e a colonização dos vasos. Técnicas de imunodeteção através de ELISA "Enzyme linked Immobabsorbent Assay" e o isolamento da bactéria em meio de cultivo foram utilizadas nos trabalhos anteriormente citados com eficácia discutível, uma vez que os mesmos apresentam alguns inconvenientes. A técnica de ELISA, por exemplo, exige que a população da bactéria esteja acima de 10^5 UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/g ou 10^6 UFC/cm de tecido

das nervuras para que ocorra a detecção. Por outro lado, a técnica de isolamento apresenta baixa confiabilidade, já que o isolamento algumas vezes pode falhar e levar a resultados incorretos, ou seja, a bactéria pode não ser detectada em locais onde na verdade está presente (Fry & Millholland, 1990; Hill & Purcell, 1995).

Técnicas convencionais de microscopia eletrônica e de luz vêm sendo empregadas em estudos com *Xylella* e outros patógenos bacterianos, como microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Chagas et al., 1992), microanálise de raio X (Tyson et al., 1985), fluorescência (Imlau et al., 1999; Lewis & Errington, 1996) e imunofluorescência (Brlansky et al., 1982). Esse conjunto de técnicas pode permitir um monitoramento mais eficiente da trajetória da bactéria durante a evolução da colonização da planta, permitindo a localização do agregado bacteriano em cada fase da doença. Essas técnicas e metodologias podem facilitar também o estudo dos compostos produzidos pelas bactérias “*in situ*”, como por exemplo, enzimas, exopolissacarídeos, e adesinas, além de permitir o estudo de elementos químicos utilizados pela bactéria para colonização dos tecidos. É também extremamente importante o desenvolvimento de metodologia para o estudo da bactéria *in vitro*, bem como em hospedeiros experimentais, na qual o fumo *Nicotiana tabacum* (Lopes et al., 2000) e o *Catharanthus roseus* (Monteiro et al., 2001a) têm se mostrado como boas alternativas.

Dentro deste contexto, esse trabalho teve por objetivo avaliar alguns aspectos da patogenicidade relacionados com a adesão, o deslocamento e a colonização de *X. fastidiosa* no interior dos vasos do xilema de citros, cafeeiro, ameixeira e fumo e no interior dos insetos vetores, bem como relacionar estes fatores à sintomatologia, à eficiência de transmissão pelo vetor, a resistência das plantas ao patógeno e também desenvolver uma metodologia para se estudar a formação de biofilme *in vitro* pela bactéria. No Estado de São Paulo, o presente estudo está enquadrado no programa GENOMA FUNCIONAL da *Xylella*/FAPESP uma vez que o projeto “*Xylella fastidiosa* - role of exoenzymes and adhesins in pathogenicity” (FAPESP 98/16311-3) está implementado (Genoma Funcional, 2000).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Xylella*

O gênero *Xylella*, criado por Wells et al. (1987), é composto por uma única espécie, *X. fastidiosa*. Essas são bactérias que apresentam as seguintes características: forma de bastonete reto a ligeiramente curvo, com 3-5 µm de comprimento por 0,3 - 0,5 µm de diâmetro, não móvel (atríquio), coloração gram-negativa, estritamente aeróbio e que somente crescem em meios especiais, pois exigem vários aminoácidos, micronutrientes e macronutrientes para garantir o desenvolvimento pleno (Chang & Donaldson, 2000; Holt, 1994; Wells et al., 1987). As colônias em meios artificiais, a 26-28 °C e pH entre 6,5 - 6,9, podem ser lisas ou rugosas, opalescentes e circulares. Estas são capazes de hidrolisar gelatina e utilizar hipurato, não fermentam glicose, apresentam reação negativa para os testes de indol, H₂S, β-galactosidase, lipase, amilase, coagulase e fosfatase. A maioria das estirpes produz β-lactamase (Holt, 1994). São habitantes dos vasos do xilema de várias espécies de plantas, como videira, pessegueiro, amendoeira, ameixeira japonesa, carvalho, amoreira, citros, cafeeiro entre outras (Hartung et al., 1994). Wells et al. (1987), ao criarem o gênero *Xylella*, relacionar-no ao gênero *Xanthomonas*. Esta relação vem sendo confirmada por vários outros resultados de trabalhos, dentre estes o de Mehta & Rosato (2000), que utilizaram as sequências do gene 16S de rDNA e a região espaçadora 16S-23S para inferir as relações filogenéticas entre linhagens de *X. fastidiosa* e espécies relacionadas. Dow & Daniels (2000) e Simpson et al. (2000) também encontraram alta similaridade entre muitos genes de *X. fastidiosa* e *Xanthomonas campestris*. Embora todos os microrganismos gram-negativos limitados ao

xilema sejam incluídos na espécie *X. fastidiosa*, há bastante variabilidade dentro da espécie (Chen et al., 1992; Purcell & Hopkins, 1996), o que justifica uma separação taxonômica ao nível de subespécies ou patovar (Machado, 1997), porém até o momento, nenhum estudo neste sentido foi realizado. Além dessas características, *X. fastidiosa* apresenta ainda dois plasmídios, um com 51.158 pb. e outro com 1.285 pb. (Chen & Chang, 1992; Simpson et al., 2000)

2.2 Doenças causadas por *X. fastidiosa*

A bactéria *X. fastidiosa* possui uma ampla gama de hospedeiros, que inclui espécies de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (Freitag, 1951; Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996; Raju & Wells, 1986; Wells et al., 1987). Freitag (1951) conseguiu a transmissão de *X. fastidiosa*, causadora do mal de Pierce em videira, para 75 das 100 espécies hospedeiras testadas. Mais de 22 espécies de gramíneas são relatadas como hospedeiras dessa estirpe da bactéria (Hopkins, 1989). A estirpe que causa a "phony" do pessegueiro também tem extensa gama de hospedeiros, dentro do gênero *Prunus* e algumas invasoras perenes, como o capim-maçambará (*Sorghum halapense*) (Raju & Wells, 1986). Porém, tem sido verificada a presença de sintomas apenas em algumas espécies do gênero *Prunus*. Leite et al. (1997), utilizando a técnica ELISA, conseguiram encontrar a estirpe causadora da escaldadura da ameixeira em 19 espécies de plantas daninhas, entre estas assa-peixe (*Vernonia* sp), serralha (*Sonchus oleraceus*) e capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*). O gênero *Citrus* é também bastante afetado por essa bactéria, já que laranjas-doces, tangerinas, tangores, tangelos e lima ácida, podem apresentar sintomas (Laranjeira et al., 1996). Porém, apesar da ampla gama de hospedeiros, em grande parte desses, os sintomas de doença não se manifestam. No entanto, mesmo com a ausência de sintomas, essas plantas podem se constituir em hospedeiros alternativos e funcionar como fonte de inóculo para as plantas de importância econômica (Hopkins, 1989).

As principais doenças já descritas como sendo causadas por *X. fastidiosa* e que vêm causando perdas são encontradas entre as ornamentais, frutíferas e em algumas outras plantas de importância econômica. Entre estas estão videira, carvalho, amendoeira,

ameixeira japonesa, pessegueiro, pereira, citros, cafeeiro, amoreira, olmo, sicamore, pecan e espierradeira. A primeira a ser descrita e, talvez, uma das mais pesquisadas até hoje é o mal de Pierce da videira (Goheen et al., 1973; Hopkins & Mollenhaver, 1973). São também causadas pela mesma estirpe da bactéria, as doenças nanismo da alfafa (Goheen et al., 1973) e escaldadura da amendoeira (*Prunus amygdalus*) (Mircetich et al., 1976). A "phony" do pessegueiro (*Prunus persica*) é outra importante doença causada por essa bactéria. Trabalhos mostram que a estirpe responsável por esta doença é a mesma responsável pela escaldadura da ameixeira japonesa (*Prunus salicina*) (Wells et al., 1981), doença que causa sérios danos a essa cultura no Sul do Brasil, Argentina e Paraguai. Entretanto, curiosamente apesar da estirpe da bactéria causadora da escaldadura da ameixeira ser a mesma da "phony" do pessegueiro, até o momento a segunda doença ainda não foi confirmada no Brasil. Nos Estados Unidos, a *X. fastidiosa* é responsável por importantes doenças em árvores ornamentais como a queima das folhas do carvalho (*Quercus rubra*), escaldadura da folha do olmo (*Ulmus americana*), queima das folhas em pecan (*Carya illinoensis*) (Sanderlin, 1998) e em sicamore (*Plantanus occidentalis*) (Hearon et al., 1980).

A queima das folhas da pereira (*Pyrus pyrifolia*) foi inicialmente relatada em Taiwan em 1990. Plantas afetadas podem apresentar morte de ponteiros, de ramos e brotações. Árvores afetadas podem apresentar ainda amarelecimento geral que pode evoluir para seca. A morte da planta pode ocorrer dentro de 3 a 6 anos (Leu & Su, 1993).

A clorose variegada dos citros (CVC) é outra importante doença causada por *X. fastidiosa*, tendo sido relatada pela primeira vez nos Estados de São Paulo e Minas Gerais em 1987, afetando várias espécies do gênero *Citrus* (Lee et al., 1991; Rosseti et al., 1990). Chagas et al. (1992) constataram através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) que a estirpe do citros é morfológica e estruturalmente semelhante à estirpe da videira. Estirpe semelhante dessa bactéria também foi encontrada afetando cafeeiros (*Coffea arabica*) em São Paulo e Minas Gerais (Beretta et al., 1996; Paradela Filho et al., 1997). Uma das últimas plantas em que a bactéria foi relatada causando doença é a espierradeira (*Nerium oleander*) na Califórnia (Purcell, 1999).

2.3 Sintomatologia das doenças causadas por *X. fastidiosa*

Plantas colonizadas por *X. fastidiosa* podem apresentar sintomas variados, sendo que algumas podem até se mostrar assintomáticas, apesar de apresentarem todos os vasos colonizados, enquanto outras plantas apresentam quadro sintomatológico grave com poucos vasos comprometidos com a presença da bactéria (Purcell & Hopkins, 1996).

Os sintomas externos do mal de Pierce, bem como em plantas da família *Rosaceae*, são necrose marginal das folhas, queda de folhas, seca dos ponteiros, murcha e redução do crescimento, maturação irregular e secamento de frutos, atraso de crescimento na primavera e perda de vigor, levando à morte da planta. Em amendoeira, os sintomas são semelhantes, porém, em alfafa não são observadas necroses, mas sim declínio e enfezamento das plantas (Raju & Wells, 1986). Em amendoeiras, pode ocorrer ainda manchas nos bordos das folhas que evoluem para necrose, as quais em conjunto podem ocupar 2/3 da folha. O amarelecimento de um ramo inteiro pode evoluir para toda a planta dentro de quatro a cinco anos. Algumas plantas podem apresentar superbrotamento, e as mais susceptíveis podem morrer (Nome et al., 1992). Em ameixeira, os sintomas de escaldadura são verificados inicialmente nas folhas mais velhas e podem evoluir para toda a planta (Leite et al., 1997).

Em árvores ornamentais, como carvalho e olmo, são observadas necroses marginais com halos cloróticos que evoluem para o interior das folhas. Em sicamore, são observadas descolorações internevais, seguidas por necrose, e avermelhamento das folhas, as quais mostram pontos necróticos irregulares com clorose (Sherald & Kotska, 1992). Nestas três espécies, a doença pode evoluir para o declínio das árvores.

Os sintomas da doença "phony" em pessegueiro inclui redução do tamanho dos frutos, com conseqüente queda na produção. Além disso, as plantas tornam-se enfezadas, com redução das brotações (Ervert & Smittle, 1989).

Em citros, os sintomas da CVC incluem clorose internerval, semelhante à deficiência de zinco, redução do tamanho da folha, frutos duros e com menor tamanho. Em folhas maduras são observados pequenos pontos marrons na face inferior, na região correspondente à área clorótica na face superior. Essa área clorótica pode se tornar marrom escura ou necrótica com a evolução da doença (Rossetti & De Negri, 1990).

Em cafeeiros, a doença é conhecida como requeima ou escaldadura. Os sintomas observados são ramos com tufos de folhas nas pontas. Essas folhas são pequenas, às vezes deformadas, podendo ou não apresentar deficiências minerais, principalmente de zinco. Algumas folhas apresentam queima nos bordos. Com a evolução dos sintomas, as folhas caem e os ramos ficam completamente secos, com aspecto de varetas. Contudo, o sintoma mais característico é a presença de internódios curtos (Paradela Filho et al., 1997).

2.4 Como *X. fastidiosa* causa doença

Há uma considerável divergência e até mesmo falta de conhecimento sobre os prováveis mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa*. O projeto Genoma Funcional da *X. fastidiosa*/FAPESP vem estimulando pesquisas nessa linha desde 1999 (Genoma Funcional, 2000). Com o final do seqüenciamento do genoma total da *X. fastidiosa*, faz-se necessária a investigação das causas da patogenicidade desta bactéria. Segundo Hopkins (1995) existem três diferentes hipóteses sobre os mecanismos de patogênese de *X. fastidiosa*, as quais inclui disfunções do sistema condutor de água, produção de fitotoxinas e alterações na concentração de reguladores de crescimento. O quadro sintomatológico observado em plantas atacadas dá evidências de que a primeira hipótese parece ser a mais provável. Embora outros mecanismos primários de patogênese possam estar envolvidos em parte da síndrome da doença, o principal mecanismo de patogênese é a falta de translocação de água e nutrientes devido a alguns fatores, como: a oclusão de vasos do xilema pelos agregados da bactéria, reações de resistência como deposição de goma, pectina, formação de tiloses pelo hospedeiro (Fry & Milholland, 1990; Mollenhauer & Hopkins, 1976), pela formação de cristais de cálcio em vasos (Tyson, 1985), que resultam em estresse hídrico e possivelmente pela destruição das membranas da pontuação causando cavitação nos vasos com embolia (Schultz & Matthews, 1988). A agregação da bactéria parece estar ligada à liberação de substâncias extracelulares. Estas substâncias assemelham-se quimicamente aos polissacarídeos que constituem o glicocalix, o qual é responsável pela adesão de outras bactérias às superfícies ou a células

vizinhas (Costerton & Irvin, 1981). Por outro lado, a *X. fastidiosa* deve ter um mecanismo especial para concentrar e absorver nutrientes do ambiente. A presença de agregados de bactérias (Tyson et al., 1985) pode funcionar como uma rede atraindo íons de nutrientes para a colônia, o que resulta em otimização da atividade de enzimas digestivas relacionadas à ação da bactéria contra o tecido hospedeiro, levando a ocorrência das deficiências nutricionais observadas em plantas afetadas, mesmo tendo poucos vasos obstruídos. Essa hipótese foi considerada possível por Leite et al. (2002).

Goodwin et al. (1988) e Machado et al. (1994) observaram em videira e citros, respectivamente, infectados com *X. fastidiosa*, que além da queda da taxa de fotossíntese, a presença da bactéria também está associada a outras alterações fisiológicas, tais como a redução na transpiração, altas concentrações de ácido abscísico, frutose, glicose, Ca^{2+} e Mg^{2+} e baixas concentrações de Zn^{2+} e K^{2+} . Além disso, a clorose, os altos níveis de prolina e ácido abscísico e o aumento na resistência estomática verificados estão associados à senescência foliar.

Os sintomas de clorose, seguidos de escaldadura marginal das folhas, observados em amendoeira (Mircetich et al., 1976), ameixeira japonesa (French & Kitajima, 1978), entre outras plantas, sugere o envolvimento de toxinas. No entanto, com base na relação da população bacteriana e sintomas da doença e na ausência do isolamento de uma substância da bactéria com efeito tóxico sobre a planta, Purcell & Hopkins (1996) consideraram essa hipótese pouco provável. Porém, agora com a finalização do sequenciamento do genoma de *X. fastidiosa*, foi possível verificar similaridades de genes da bactéria com genes para produção de toxinas em outras bactérias (Simpson et al., 2000)

Na doença de "phony" do pessegueiro, causada por *X. fastidiosa*, os sintomas são possivelmente causados pelo conjunto de dois fatores que envolvem estresse hídrico e desequilíbrio hormonal (Hopkins, 1995; Purcell e Hopkins, 1996). Em videira, reversão parcial dos sintomas foi obtida com aplicações de ácido giberélico que estimularam o crescimento de quase todas as gemas terminais, embora a população bacteriana na planta não fosse afetada (French et al., 1978).

2.5 O processo de adesão e colonização por *X. fastidiosa*

2.5.1 Termos relacionados à adesão e colonização de bactérias

O termo adesão, sob o ponto de vista físico, define a capacidade de uma partícula ou molécula manifestar a atração por outros corpos. Em fitopatologia, analogamente, estamos falando da atração de propágulos pela superfície da planta-alvo ou tecido do hospedeiro (Leite et al., 2001). No caso de *X. fastidiosa*, a atração é pelas paredes do vaso do xilema. Outro termo importante, no caso de bactérias, é a agregação celular que se refere à capacidade de células bacterianas de uma mesma espécie formarem massas celulares que possam proporcionar vantagens na luta pela sobrevivência. Segundo Watnick & Kolter (2000) esse processo ocorre em cinco etapas, a saber: aproximação das células, ligação (adesão), formação de microcolônias, formação do biofilme (descrito como uma comunidade bacteriana que vive aderida uma às outras e a uma superfície (Costerton & Irvin, 1981)) e desagregação das células para colonização de outros sítios. Em todo este processo, também utilizado por *X. fastidiosa* estarão envolvidos elementos químicos e as adesinas (macromoléculas de superfície responsáveis pela adesão célula a célula e a superfície), que podem ser de natureza fimbriar e não fimbriar. As adesinas de natureza fibrilar são chamadas fímbrias, que são definidas como filamentos extracelulares produzidos por uma ampla variedade de bactérias gram-negativas, sendo constituídas de subunidades protéicas e que além da adesão estão envolvidas na transmissão de sinais (Klemm et al. 1998). As de natureza não fimbriar são denominadas gomas (polissacarídeos extracelulares produzidos pelas bactérias e que são importantes para a arquitetura do biofilme (Watnick & Kolter, 2000)) e outros polissacarídeos das paredes das bactérias. O modo de atuação de cada um destes fatores, que podem estar envolvidos na adesão e colonização de *X. fastidiosa* nos vasos do xilema será apresentado a seguir, sendo que no final um modelo proposto por Leite et al. (2002) para o processo de adesão e colonização de *X. fastidiosa* será comentado.

2.5.2 Envolvimento de elementos químicos na adesão e colonização das bactérias

2.5.2.1 Influência do zinco na clorose variegada do citros

Uma das características da CVC é a deficiência de zinco nas folhas (Chagas et al. 1992). Wutscher et al. (1977), trabalhando com uma outra doença em citros associada a *X. fastidiosa* denominada “citrus blight” ou declínio (Beretta et al., 1988; Hopkins et al., 1991), que também manifesta sintomas de deficiência de zinco, observou o acúmulo desse elemento nos vasos do tronco colonizados pela bactéria. Esta característica é comum apenas a doenças vasculares associadas a *X. fastidiosa* em citros (Brlansky et al., 1985). Na época da condução do trabalho, a análise de zinco nos tecidos era feita com base na presença do elemento nas cinzas. Hoje, através da microanálise de raios-X com microscopia de varredura, é possível analisar o elemento *in situ* e até mesmo localizar por mapeamento o elemento desejado. O que permite, portanto, determinar a importância do zinco na colonização dos vasos pela bactéria.

2.5.2.2 Importância do cálcio na adesão

Alguns trabalhos têm mostrado a importância do cálcio no processo de adesão de zoósporos de *Phytophthora cinnamomi* a superfícies vegetais. A explicação proposta admite que as glicoproteínas presentes nos zoósporos tornam-se adesivas quando interagem com cálcio (Gubler et al., 1989). Tyson et al. (1985) verificaram a presença de cristais de cálcio associados a uma rede fibrilar no lúmen de elementos dos vasos do xilema da nervura de folhas de videira. Os autores observaram ainda que esses cristais estavam sempre presentes em vasos colonizados pelas bactérias. Ao mesmo tempo, estas formações nunca foram observadas em vasos de plantas saudáveis. Com base nesses dados, foi sugerido que a referida rede fibrilar estava envolvida na adesão de uma bactéria a outra e/ou da bactéria à parede dos vasos do xilema. Alves et al. (2000) encontraram a presença de cristais de cálcio na superfície de colônias de *X. fastidiosa*, estirpe causadora da CVC, cultivadas em meio PW sólido.

2.5.2.3 Envolvimento do enxofre na adesão

O enxofre faz parte de um grande número de proteínas transmembranas de bactérias. Estas proteínas podem apresentar radicais tiól (SH) que estão envolvidos na capacidade adesiva de um grande número de bactérias patógenos de seres humanos (Brot & Weissbach, 2000). O estudo do genoma de *X. fastidiosa* revelou a presença de genes com similaridade a proteínas envolvidas na adesão (Simpson et al., 2000). Dentre estas proteínas foi encontrada a metionina sulfoxido redutase (MsrA), uma enzima que auxilia na manutenção da adesividade de um grande número de patógenos (Brot & Weissbach, 2000).

2.5.3 Papel de exopolissacarídeos e estruturas extracelulares na adesão

A ligação a outras células ou ao substrato (hospedeiro) é particularmente crítica na vida de muitos microrganismos. A evolução vem provendo esses microrganismos com vários tipos de proteínas de superfície, que permitem a ligação e/ou adesão. A função adesiva tem sido atribuída a diferentes moléculas em diferentes estágios de desenvolvimento de vários organismos, tais como: a) formação de órgãos e diferenciação durante a embriogênese; b) comunicação célula a célula; c) adesão de microrganismos a matrix extracelular (glicocalix) (Costerton & Irvin, 1981). Em termos de composição e organização, a maior parte das adesinas conhecidas tem constituição glicoproteica (Kwon & Epstein, 1993; Kwon & Epstein, 1997). O sistema de adesão animal, o mais estudado, envolve moléculas separadas em quatro diferentes famílias: 1) caderinas, dependente de cálcio para a adesão e encontrada em desmosomas e junções aderentes; 2) moléculas de adesão semelhantes a imunoglobulinas, incluindo a adesão das células dos neurônios; 3) selectinas, também dependentes de cálcio para a adesão e importantes no mecanismo de defesa animal; 4) integrinas, as quais podem existir em estado ativo e não ativo, participando da adesão de célula a célula e de grande importância nas ligações e interações, especialmente na ligação da célula a componentes da matrix extracelular.

Em microrganismos fitopatogênicos, recentemente, uma adesina de 200 KDa produzida pelo agente causal da antracnose em milho, *Colletotrichum graminicola*, foi isolada e caracterizada como sendo uma glicoproteína (Sugui et al., 1998).

Glicoproteínas foram também coletadas da matriz extracelular de outros patógenos, como *Discula umbriella*, *Nectria haematococca*, *Puccinia sorghi* e *Magnaporthe grisea*, confirmando que as moléculas de adesão em patógenos de plantas podem ser similares as de animais, descritas acima. Em bactérias, proteínas extracelulares relacionadas à adesão foram encontradas em *Azospirillum brasilense*, uma bactéria envolvida na fixação biológica de nitrogênio (Dufrêne et al., 1996). Verificando a seqüência de genes no genoma de *X. fastidiosa*, Simpson et al. (2000) encontraram genes com algum grau de homologia àqueles de adesinas encontrados em outros microrganismos. Evidências da presença de adesinas em *X. fastidiosa* também já foram encontradas por Tyson et al. (1985).

2.5.4 Um modelo para adesão de *X. fastidiosa*

Com base nos dados disponíveis na literatura e experimentos realizados, Leite et al. (2002) desenvolveram um modelo para a adesão de *X. fastidiosa*. O modelo parte do princípio de que a adesão de *X. fastidiosa* possa estar sendo mediada por radicais tióis (SH), discutidos acima e presentes em proteínas transmembranas de superfície (fímbrias) e em pontos da superfície celular. Além destes, cargas hidrofóbicas de superfície mediarão a adesão inicial da bactéria. Após esta adesão inicial, a bactéria iniciará a produção de goma fastidiana, a qual estaria envolvida na arquitetura do biofilme formado pela bactéria no interior dos vasos do xilema. O biofilme poderia ganhar consistência através da ligação de íons de cálcio, tornando o agregado rígido e ocluindo os vasos. O modelo também considera que as bactérias poderiam produzir substâncias que permitiriam a desagregação de células para a colonização de outros sítios no mesmo vaso ou em vasos adjacentes e que o agregado formado no lúmen do xilema poderia funcionar como um filtro, seqüestrando nutrientes que estivessem sendo translocados pelo xilema, o que explicaria os sintomas de deficiência de zinco verificados nas folhas de citros. Este modelo estaria de acordo com as etapas descritas por Watnick & Kolter (2000), para o processo de agregação de bactérias.

2.5.5 A movimentação sistêmica e vaso a vaso por *X. fastidiosa*

Sendo *X. fastidiosa* uma bactéria limitada ao xilema, a translocação pelo sistema vascular da planta hospedeira é um fator essencial para sua sobrevivência, e pode estar relacionado com a sua virulência (Hopkins, 1996). O mecanismo pelo qual *X. fastidiosa* se movimenta dentro dos vasos do xilema não é bem entendido. A velocidade de translocação parece ser influenciada pela estirpe da bactéria e pela resistência e idade da planta. Fry & Milholland (1990), estudando a translocação da bactéria em pecíolos e caules de videira, verificaram que a estirpe virulenta colonizou o 17º internódio acima do local de inoculação em apenas oito semanas. Já a estirpe avirulenta após cinco semanas permaneceu estacionada no 10º internódio. Hill & Purcell (1995) verificaram que era necessária uma população aproximada de 10^7 UFC/g de tecido ou superior para que a translocação ocorresse e que em plantas mais velhas a bactéria se movimentava mais rapidamente que em planta mais novas. Estes autores atribuíram esta diferença a alterações na transpiração das plantas com a idade, mas é também provável que diferenças anatômicas e na constituição do xilema possam influenciar na movimentação (Leperen et al., 2000).

O uso de gene repórter pode ajudar na detecção e localização da bactéria viva dentro dos vasos facilitando o estudo de sua movimentação na planta (Errampalli et al., 1999; Sheen et al., 1995). Esta é uma estratégia que está sendo explorada dentro do projeto Genoma Funcional da *X. fastidiosa*/FAPESP (Genoma Funcional, 2000). Entretanto, até o momento o que se sabe a respeito da movimentação foi obtido através de informações geradas por várias eletromicrografias do sistema vascular de algumas plantas colonizadas que mostram que o movimento da bactéria de célula a célula do xilema é retido pela parede primária das pontuações, que permite a comunicação entre um vaso do xilema a outro, a qual é constituída de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas. (Brlansky et al., 1982). Hopkins (1989) propôs que a bactéria poderia dissolver essa membrana da pontuação utilizando algumas enzimas. A produção de algumas proteases já foi verificada por Fry et al. (1994). Simpson et al. (2000) identificaram genes precursores de poligaracturonases e um de celulase no genoma da *X. fastidiosa* de citros e sugeriram que estes genes poderiam estar envolvidos na migração inter-vasos através da

membrana da pontuação. Este gene de celulase junto com mais dois outros, encontrados posteriormente, foram expressos em *E. coli* (Wulff, 2002), porém até o momento nenhuma confirmação do processo de migração é conhecida.

Quanto à distribuição da bactéria na planta, Lima et al. (1996) verificaram que em cafeeiro, a bactéria encontrava-se distribuída por toda a planta confirmando a sua translocação descendente. Leite et al. (1997) observaram que em plantas de ameixeira altas concentrações ocorrem na parte aérea. Almeida et al. (2001) e He et al. (2000) também verificaram que a bactéria apresentava translocação ascendente e descendente, sendo encontrada nas raízes das plantas de citros inoculadas na parte aérea.

2.6 Vetores

X. fastidiosa é transmitida naturalmente para as plantas por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae), que se alimentam da seiva bruta do xilema de plantas infectadas (Hopkins, 1989). A ordem Hemiptera representa um vasto grupo de insetos, com um grande número de estratégias de alimentação e habilidade para transmitir fitopatógenos (vírus, bactérias, fitoplasmas e espiroplasmas). Esses organismos apresentam a capacidade de discriminar vários compostos químicos dentro das plantas hospedeiras. Essas características definem os diversos hábitos alimentares desses insetos, ou seja, alguns se alimentam de compostos presentes no floema, outros no xilema e outros dos compostos presentes no mesófilo foliar (Backus & McLean, 1983). As cigarrinhas transmissoras de *X. fastidiosa* alimentam-se principalmente da seiva dos vasos do xilema de onde retiram aminoácidos e minerais. A população de cigarrinhas em pessegueiro foi correlacionada com a composição de aminoácidos no xilema, a qual foi definida pelo porta-enxerto (Gould et al., 1991). Desta forma, os aminoácidos presentes no fluído do xilema parecem ter grande influência na população de cigarrinhas na planta.

Em plantas como pessegueiro e videira, a *X. fastidiosa* é transmitida principalmente pelas cigarrinhas da subfamília Cicadellinae, que se alimentam nos vasos do xilema das plantas, entre as quais se destacam *Draeculacephala Minerva* (Ball), *Corneocephala fulgida* (Nott.), *Graphocephala atropunctata* (Signoret), *Homalodisca coagulata* (Say) e *Oncometopia nigricans* (Walker) (Raju & Wells, 1986) sendo *G.*

atropunctata a principal transmissora em videira (Purcell & Hopkins, 1996). Em citros, as cigarrinhas *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Acrogonia terminalis* (re-identificada atualmente como uma nova espécie: *Acrogonia citrina* (Marucci et al., 2002)) *Oncometopia* sp., *Plesiommata corniculata* (Young), *Homalodisca ignorata* (Melichar) e *Acrogonia virescens* (Metcalf) são descritas como transmissoras da bactéria (Krügner et al., 2000; Roberto et al., 1996; Yamamoto et al., 2002), sendo a primeira a mais eficiente, segundo Krügner et al. (2000). Recentemente, outras cigarrinhas foram comprovadas como sendo transmissoras em citros, completando um total de 11 espécies vetoras, sendo essas pertencentes a duas tribos dentro da subfamília Cicadellinae, ou seja, Cicadellini com sete espécies e Proconiini com quatro espécies. Os vetores mais frequentes em pomares são *Oncometopia facialis* (Signoret), *D. costalimai* e *Acrogonia* sp. (= *A. citrina*), e em viveiros *B. xanthophis* (Fundecitrus, 2000; Roberto et al., 2000). Assim como a frequência, o hábito alimentar também varia entre as espécies. Segundo Paiva et al. (1996), *Acrogonia* sp. alimenta-se geralmente sobre as folhas novas, *D. costalimai* prefere ramos jovens, enquanto que *Oncometopia* sp. prefere ramos maduros de citros.

Uma grande diferença na eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* é observada entre as cigarrinhas de citros (patossistema da CVC) e as cigarrinhas de videira (patossistema da doença de Pierce - PD). Os vetores de *X. fastidiosa* em videira apresentam até 90% de eficiência, enquanto que em citros, a eficiência máxima verificada foi de 12%, sendo que a maioria das cigarrinhas apresentou valores próximos de 1% (Krügner et al., 2000; Lopes, 1999; Yamamoto et al., 2002).

Em citros, ameixeira e cafeeiro, não existem informações publicadas a respeito do comportamento de *X. fastidiosa* no interior das cigarrinhas vetoras e dos mecanismos de transmissão envolvidos. A maior parte do conhecimento sobre a interação entre esta bactéria e seus vetores foi adquirida em estudos realizados com a estirpe de *X. fastidiosa* que causa o mal de Pierce em videira. Os trabalhos foram iniciados com Purcell et al. (1979) usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), os quais encontraram agregados de bactéria sobre o forro cuticular de várias porções do tubo digestivo anterior (estomodéu) da cigarrinha vetora *G. atropunctata*, incluindo o cibário (ou câmara de

sucção), o pré-cibário e a abertura do esôfago. Purcell & Finlay (1979) verificaram que os insetos imaturos perdem a capacidade de transmitir a bactéria após a ecdise, o que foi atribuído à troca da cutícula interna do estomodéu que ocorre durante este processo. Interpretou-se este fato como um indicativo de que o inóculo transmissível de *X. fastidiosa* restringe-se, portanto, à parte anterior do tubo digestivo do vetor. Além disso, uma característica importante distingue a transmissão de *X. fastidiosa* de outros procariotos fitopatogênicos, ou seja, o fato de que os adultos das cigarrinhas podem transmitir *X. fastidiosa* logo após a aquisição, sem a ocorrência de um período latente. Uma vez infectivos, esses adultos são capazes de transmitir a bactéria eficientemente pelo resto de suas vidas, que podem durar vários meses. Estas observações sobre período latente, retenção de infectividade e distribuição da bactéria no vetor permitiram concluir que a transmissão de *X. fastidiosa* é do tipo propagativa, mas não circulativa (Purcell & Finlay, 1979).

Brlansky et al. (1983) observaram através de MEV a presença de bactérias no canal do pré-cibário na região anterior e posterior a válvula do pré-cibário e através da MET que as células bacterianas presentes no canal do pré-cibário de *O. nigricans* estavam envolvidas por uma matriz extracelular com eletrodensidade e aparência similar a matriz extracelular que envolve *X. fastidiosa* em vasos do xilema da planta. O pré-cibário é um canal estreito que vai do ponto onde os estiletos se separam até a parte anterior do cibário. Este, como também o cibário, é formado pela junção da epi e hipofaringes. Assim, para chegar ao cibário e esôfago, o fluido ingerido deve atravessar o pré-cibário (Backus & McLean, 1982). Brlansky et al. (1982, 1983) e Timmer et al. (1983) observaram ainda através de MEV a adesão de células de *X. fastidiosa* à câmara do cibário e diafragma (membrana dorsal do cibário) de *O. nigricans* e *H. coagulata*. Esta adesão parece ocorrer através de ligações polares das mesmas às paredes internas do cibário do vetor (Brlansky et al., 1983). Quanto à importância para a eficiência da transmissão, os autores concluíram que as bactérias presentes no canal do pré-cibário na região anterior e posterior à válvula são extremamente importantes na transmissão. Nestes estudos para o reconhecimento do local onde as bactérias estavam presentes foi necessário antes estudar a morfologia de cada órgão do inseto vetor.

Hill & Purcell (1995), estudando a interação de *G. atropunctata* com *X. fastidiosa*, verificaram que as agregações da bactéria neste inseto vetor eram similares às observadas em outros dois vetores, *O. nigricans* e *H. coagulata* (Brlansky et al., 1983), mesmo tratando-se de espécies vetoras com diferentes tamanhos, distribuição geográfica e plantas hospedeiras. Algumas vezes, observaram-se densas agregações de células da bactéria no pré-cibário, cibário, e na entrada do esôfago. Assim, um grande número de bactéria pode acumular-se em várias partes do estomodéu do vetor durante sua vida. Considerando-se a hipótese de que *X. fastidiosa* seja inoculada para a planta a partir do pré-cibário (Brlansky, 1983; Hill & Purcell, 1995), é possível postular que a sua agregação nessa região específica do estomodéu esteja diretamente envolvida na transmissão pelo vetor. Se assim for, um inseto vetor que acumular um maior número de células bacterianas no pré-cibário poderá transmitir com maior eficiência do que outro com um menor número de bactérias nessa região.

2.7 Diagnóstico de *X. fastidiosa*

A diagnose das doenças causadas por *X. fastidiosa*, através do quadro sintomatológico, não é segura, pois todos os sintomas são inespecíficos. Entretanto, para o manejo da doença em pomares afetados e no desenvolvimento de pesquisas científicas é fundamental um diagnóstico correto e simples (Lima et al., 1997). Para a CVC dos citros, estes autores desenvolveram um método diagnóstico utilizando suco do xilema, retirado com o auxílio de uma seringa, e observado em microscópio ótico em lâmina, em aumento de 400 X, verificando a presença de bactérias em forma de bastonetes. No entanto, este teste superestimou em 10% o número de plantas afetadas quando comparado com o teste ELISA. Na prática, os procedimentos mais utilizados para a diagnose dessa bactéria em plantas incluem: a) os testes sorológicos - ELISA o qual foi utilizado por Lima et al. (1996) em cafeeiro e em várias plantas por Leite et al. (1997), o DIBA que foi usado por Beretta et al. (1991) e Machado et al. (1997) em citros e Paradela Filho et al. (1997) em cafeeiro, a imunoflorescência que foi utilizada por French et al. (1978) em pessegueiro e Brlansky et al. (1982) em várias plantas, a qual detecta uma população de aproximadamente 10.000 bactéria mL⁻¹; b) os baseados no DNA,

quais sejam PCR utilizado por Minsavage et al. (1994) em várias plantas, Goodwin & Zhang, (1997) em olmo e Laranjeira et al. (1998) em citros, RAPD empregado por Chen et al. (1995) de *X. fastidiosa* em carvalho e Ferreira et al. (2000) em várias plantas, RFLP usado por Chen et al. (1992); c) a análise de plasmídios, com sensibilidade de 100 bactéria mL⁻¹, usada por Machado (1997).

A técnica ELISA foi também utilizada para se verificar a presença da bactéria em cigarrinhas (Roberto et al., 1996), sendo hoje, este método junto com um protocolo de PCR desenvolvido por Ciapina & Lemos (2001) utilizado rotineiramente para detecção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas.

2.8 Considerações finais

As pesquisas com *X. fastidiosa* exibiram grandes avanços nos últimos anos, principalmente no Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, com o término do seqüenciamento do genoma dessa bactéria (Simpson et al., 2000). Em poucos anos, novos conhecimentos serão obtidos com as informações geradas no Projeto Genoma de *X. fastidiosa*, uma vez que 21 projetos foram iniciados e integram o Genoma Funcional de *X. fastidiosa*. O projeto tem disponíveis informações sobre 2,7 milhões de pares de bases mapeados (Fundecitrus, 2000; Simpson et al., 2000). A maioria destes projetos procura obter informações sobre os mecanismos de patogenicidade da bactéria. Como pode ser observado na revisão, este é o principal ponto de desconhecimento nas interações *X. fastidiosa* - plantas e *X. fastidiosa* - vetores. O conhecimento a ser gerado poderá levar ao desenvolvimento de estratégias de controle da doença, minimizando assim as perdas causadas por esse patógeno em todo o mundo.

3 RELAÇÃO ENTRE A PROPORÇÃO DE VASOS DO XILEMA COLONIZADOS POR *Xylella fastidiosa* EM AMEIXEIRA, CAFEIEIRO E CITROS E A SINTOMATOLOGIA DA FOLHA

3.1 Resumo

Os sintomas causados pela bactéria *X. fastidiosa* em folhas de plantas hospedeiras têm sido muitas vezes atribuídos à obstrução dos vasos do xilema e a um aumento da população bacteriana nas plantas afetadas. Neste estudo, a proporção de vasos nos pecíolos colonizados pela bactéria e o número de bactérias isoladas em meio de cultivo de folhas de ameixeira (*Prunus domestica* cv. Irati), cafeeiro (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo) e laranjeira doce (*Citrus sinensis* cv. Caipira) foram correlacionados com os sintomas. Foram utilizadas amostras de folhas de três plantas de cada espécie inoculadas com a bactéria e de três plantas sadias. As amostras constituíram-se de três folhas com sintomas intensos (SI) e três folhas dos mesmos ramos com sintomas leves (SL). Os pecíolos das folhas foram retirados e preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV), isolamento primário da bactéria em meio de cultura PWG e extração de DNA para confirmação da bactéria através do teste de PCR “Polymerase Chain Reaction”. A partir de imagens de MEV obtidas a 1500x de aumento, de seções dos pecíolos, cortados transversalmente em nitrogênio líquido, foram determinados os números de vasos do xilema presentes e os colonizados pela bactéria na área digitalizada. Os resultados evidenciaram que os sintomas foliares mais intensos (SI) em ameixeira e cafeeiro estão associados às maiores porcentagens de vasos

colonizados no pecíolo, cujas médias foram 38 e 51,6%, respectivamente. Em citros, apesar da porcentagem de vasos colonizados ser maior nas folhas com SI (11,8%), não houve diferença estatística em relação às folhas com SL (8%), como ocorreu com ameixeira e cafeeiro. As folhas de cafeeiro com SI apresentaram maior proporção de vasos colonizados que as de ameixeira e citros, e as com SL tiveram maior proporção que as de ameixeira SL e de citros (SI e SL). Não houve correlação entre a proporção de vasos colonizados por *X. fastidiosa* e a população bacteriana na planta (UFC/g de pecíolo) determinada por isolamento primário. Não se observou qualquer diferença na proporção de vasos colonizados nas diversas posições do pecíolo. O teste de PCR confirmou a presença de *X. fastidiosa* em todas as plantas com vasos colonizados. Conclui-se que a sintomatologia em cafeeiro e ameixeira está diretamente relacionada à proporção de vasos colonizados por *X. fastidiosa*, enquanto que para citros não se observa esta correlação. Estes dados são discutidos em termos de modelos de colonização.

3.2 Introdução

Xylella fastidiosa (Wells et al., 1987) é o agente causal de várias doenças que têm causado perdas em um grande número de plantas economicamente importantes (Purcell, 1997). No Brasil, essa bactéria tem sido encontrada em muitas plantas hospedeiras, porém as culturas de importância econômica mais afetadas são as de ameixeira, cafeeiro e citros. Destas, apenas em citros tem-se uma estimativa dos prejuízos causados pela bactéria. No Estado de São Paulo, onde a citricultura é constituída por mais de 60 milhões de árvores, os prejuízos podem chegar a mais de um milhão de dólares ao ano, sendo que, aproximadamente 30% das plantas estão afetadas pela bactéria (Monteiro et al., 2001 b).

X. fastidiosa é limitada aos vasos do xilema das plantas e transmitida por enxertia ou por insetos-vetores, as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) da subfamília Cicadellinae, que se alimentam nos vasos do xilema (Purcell & Hopkins, 1996).

A sintomatologia das doenças causadas por *X. fastidiosa* caracteriza-se, na maioria dos hospedeiros, pela escaldadura das folhas, nanismo, enfezamento e clorose variegada

(Purcell, & Hopkins 1996). Em ameixeira, os sintomas de escaldadura são verificados inicialmente nas folhas mais velhas (Kitajima et al., 1975), enquanto que no cafeeiro ocorre a requeima dos bordos e o menor desenvolvimento das folhas (Beretta et al., 1996). Por sua vez, em citros, os sintomas de clorose internerval (Rossetti et al., 1990) podem ser acompanhados por necrose de parte da área do limbo foliar das folhas mais velhas (Machado et al., 1994), mas dificilmente ocorre a morte destes, de ramos ou da planta (Feichtenberger et al., 1997). Os sintomas acima têm sido atribuídos a obstrução de vasos, devido à invasão sistêmica da bactéria (Sherald & Lei, 1991) e a agregação da bactéria com massiva produção de goma fastidiana no lúmen dos vasos do xilema (Silva et al., 2001), o que além de dificultar a passagem de água funciona como um filtro para os nutrientes conduzidos pelo xilema (Leite et al., 2002). No caso de citros, outras hipóteses para explicar o desenvolvimento dos sintomas têm sido levantadas, como a atuação de fitotoxinas ou o desbalanço hormonal produzido pela bactéria (Hopkins, 1989; Simpson et al., 2000), porém nenhuma destas hipóteses foi confirmada para ameixeira, cafeeiro ou citros.

O pecíolo das folhas tem sido à parte da planta mais utilizada em trabalhos de levantamento e diagnose de *X. fastidiosa*, por ser considerada a região com maior sucesso no isolamento da bactéria da planta, que contém a porção vascular mais diretamente associada às folhas. São exemplos da utilização de pecíolos, os trabalhos de Mollenhauer & Hopkins (1976) e Hopkins (1981) em videira, Raju et al. (1982) em ameixeira, Beretta et al. (1997) em citros, Lima et al. (1998) em cafeeiro e Monteiro et al. (2001 a) em *Catharanthus roseus*.

Observações preliminares envolvendo MEV mostraram que no pecíolo das folhas de ameixeira, cafeeiro e citrus colonizadas por *X. fastidiosa* ocorre o acúmulo de bactérias, que muitas vezes levam a obstrução dos vasos do xilema. Porém, em folhas de cafeeiro e ameixeira o número de vasos colonizados e a severidade dos sintomas de necrose foram verificados com maior intensidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o modelo de distribuição e a população bacteriana de *X. fastidiosa* em vasos do pecíolo de plantas de ameixeira, cafeeiro e citros e correlacionar os dados com uma maior ou menor intensidade dos sintomas foliares verificados nas plantas.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Isolados do patógeno, plantas utilizadas e inoculação

Foram utilizadas plantas de ameixeira (*Prunus domestica* cv. Irati), cafeeiro (*Coffea arabica* L., cv. Mundo Novo) e laranjeira doce (*Citrus sinensis* cv. Caipira). As plantas foram mantidas em vasos com volume de substrato (três partes de solo, uma parte de areia e uma parte de esterco) de 5 L e inoculadas através do método da agulha (Hopkins, 1980). Os isolados da bactéria utilizados foram PLS1 para ameixeira, CCT 6756 para o cafeeiro e CCT 6570 para citros (mantidos em congelador a -80°C , no Laboratório de Insetos Vetores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola). Cada planta foi inoculada em três pontos na haste com 5 μl de uma suspensão de células em tampão fosfato salino (PBS), 0,5 M, pH 7,2. Após a inoculação, as plantas foram devidamente numeradas, transplantadas e mantidas em casa de vegetação do Setor de Entomologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP, onde foram adubadas, irrigadas e submetidas aos devidos tratamentos fitossanitários durante cerca de dois anos.

3.3.2 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de quatro plantas de cada espécie, sendo três infectadas e uma sadia, no período de janeiro a março de 2002. Cada amostra constituiu-se de três folhas com sintomas intensos (SI) da doença e três folhas dos mesmos ramos com sintomas leves (SL) característicos, além de três folhas da planta sadia (Figura 1). Essas amostras foram preparadas para MEV, isolamento da bactéria em meio de cultivo PWG e PCR para confirmação da identidade da bactéria. Durante a realização do trabalho procurou-se também determinar a proporção de vasos colonizados ao longo do pecíolo e verificar se ocorria uma possível variação no número de vasos obstruídos ao longo do pecíolo através da observação de cortes sequenciais dos mesmos em MEV.

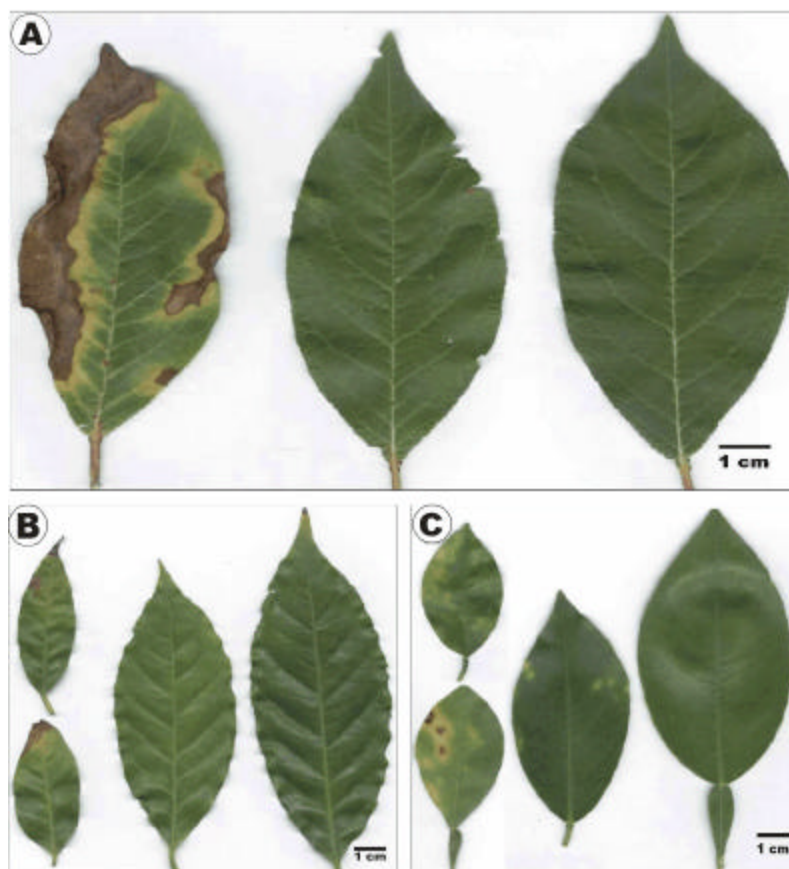


Figura 1- Sintomatologia das amostras coletadas: folha com maior intensidade dos sintomas (SI), folha de ramos doentes com sintomas leves (SL) e folha de planta sadia (da esquerda para a direita). (A) folhas de ameixeira, (B) folhas de cafeeiro e (C) folhas de laranjeira caipira.

3.3.3 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura

A preparação e observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP. Pecíolos das três folhas de cada amostra das espécies, depois de coletados, foram imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 24h. Em seguida, foram transferidos para líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 min e cortados transversalmente em nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e subsequentemente desidratadas

em uma série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em *stubs* cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP. Foram geradas e registradas digitalmente, ao acaso, quatro imagens a 1500 vezes de aumento, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm, num total de 84 imagens. Cada imagem correspondeu a uma área de 0,22 mm X 0,146 mm (0,032 mm²). Ao mesmo tempo, foram geradas imagens em maiores aumentos para confirmação das características morfológicas das bactérias presentes (Figura 2 A,B, C).

As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9, onde foi selecionada a opção de visualização de tela cheia utilizando um monitor de 17", sendo que para cada imagem foram contados o número de vasos do xilema presentes na área e o número de vasos colonizados pela bactéria, independentemente dos mesmos estarem obstruídos ou não.

Para análise da diferença do número de vasos colonizados ao longo do comprimento do pecíolo, os mesmos foram retirados e cortados em cinco secções, as quais foram separadas, preparadas e analisadas uma a uma de modo semelhante no microscópio eletrônico de varredura para se verificar uma possível variação. O procedimento foi repetido duas vezes.

3.3.4 Isolamento primário em meio de cultura

Para o isolamento da bactéria das folhas utilizou-se o método de Hill & Purcell (1995a), adaptado por Almeida et al. (2001). O pecíolo e parte da nervura central das folhas amostradas foram separados e a superfície esterilizada em Clorox 5% no interior de câmara de fluxo laminar, cortados em pequenos pedaços, sendo 0,1g transferidos para tubos de vidro (16 cm de diâmetro) contendo 2 mL de PBS, pH 7,2. As amostras foram homogeneizadas a 25.000 rpm em um homogeneizador de tecidos (modelo Turrax, Marconi S.A., Piracicaba, SP). A suspensão homogeneizada foi diluída 10 vezes e então plaqueada em meio sólido *Periwinkle Wilt Gelrite* (PWG) (Hill & Purcell, 1995a). As placas foram colocadas em incubadora a 28 °C, na ausência de luz, por duas semanas, quando, então as colônias da bactéria foram contadas. O número de UFC/g de tecido

foliar foi estimado baseado no peso inicial das amostras e diluição. Colônias de cada isolado foram submetidas ao teste PCR para confirmar a identidade da bactéria.

3.3.5 Extração de DNA e PCR

A extração de DNA das plantas foi realizada de acordo com o protocolo de Minsavage et al. (1994), modificado por Pinto & Leite (comunicação pessoal), utilizando uma maior concentração de ascorbato de sódio (0,1M). A amplificação do DNA foi realizada com oligonucleotídeos específicos (CVC-1 /272-2-int.) para detecção de *X. fastidiosa* de citros (Pooler & Hartung, 1995) e café (Colleta Filho & Machado, 2001). Para se detectar a bactéria em ameixeira, os oligonucleotídeos utilizados foram RST31 e RST33 (Minsavage et al., 1994).

3.3.6 Análise estatística

A percentagem de vasos colonizados e o número de UFC/g de tecido do pecíolo foram submetidos à análise fatorial usando o software SAS, tendo os níveis de sintomas (SI ou SL) e os hospedeiros (ameixa, café e laranjeira doce), como fatores. Previamente a análise estatística, a porcentagem de vasos colonizados foi transformada pela raiz quadrada e o número de UFC/g foi transformado pelo log. Além disso, os dados SL e SI nas folhas foram separados pela análise de variância e pelo teste de médias de Duncan, com nível de 5% de probabilidade ($P < 0.05$) e são apresentados na tabela 2.

3.4 Resultados

3.4.1 Relação entre o número de vasos do xilema colonizados por *X. fastidiosa* e a sintomatologia

A percentagem de vasos colonizados em pecíolos de folhas de ameixeira com SI variou de 35,5% a 40,3%, enquanto que em folhas do mesmo ramo com SL a variação foi de 8,6% a 13,4%. Em cafeeiro, os percentuais encontrados foram de 46,5% a 55,7% nas folhas com SI e de 21,6% a 28,7% nas com SL. Já em citros, as porcentagens verificadas foram bem menores e variaram de 10,4% a 13,5% para as folhas com SI e de 6,4% a

9,7% para as folhas com SL (Tabela 1). A presença de *X. fastidiosa* foi confirmada em todas as amostras de plantas sintomáticas utilizadas no estudo através do PCR. A análise fatorial ANOVA mostrou um significativo efeito do nível de sintomas (SL e SI) na taxa de vasos do xilema colonizados por *X. fastidiosa* (Tabela 2). Os resultados evidenciaram que os sintomas foliares mais intensos em ameixeira e cafeeiro estão associados a maiores porcentagens de vasos colonizados no pecíolo, cujas médias foram 38,2% e 51,6%, respectivamente (Tabela 01). Em citros, apesar da porcentagem de vasos colonizados ser maior nas folhas com SI (11,8%), não houve diferença estatística em relação a folhas com SL (8%) como ocorreu com ameixeira e cafeeiro (Tabela 1). As folhas de cafeeiro com SI apresentaram maior proporção de vasos colonizados que as de ameixeira e citros, e as com SL tiveram maior proporção que as de ameixeira SL e de citros (SI e SL). A visualização dessas diferenças pode ser observada na Figura 3, a qual inclui uma amostra das fotos utilizadas para a análise do número de vasos colonizados. Como as folhas com SL estavam posicionadas na parte mais apical do ramo, os dados observados também permitiram verificar que há um gradiente decrescente na proporção de vasos colonizados em pecíolo das folhas, no sentido da base para o ápice dos ramos.

3.4.2 População bacteriana nos pecíolos e relação com a sintomatologia

Não se observou correlação significativa entre a proporção de vasos colonizados e a população da bactéria no pecíolo das folhas de ameixeira, cafeeiro e citros com SI e SL da infecção por *X. fastidiosa*. O isolamento primário também não revelou diferenças estatísticas na população viável da bactéria entre as folhas com SI e SL em ameixeira e cafeeiro e SI de citros (10^6 UFC/g), embora a população bacteriana em ameixeira com SI tenha sido maior do que nos outros dois hospedeiros. Apenas a população de *X. fastidiosa* nas folhas de citros com SL diferiu das demais, correspondendo a uma menor população bacteriana (10^4 UFC/g) (Tabela 02).

Os resultados apresentados na Tabela 03 mostram que a bactéria *X. fastidiosa* apresenta uma distribuição que pode ser considerada regular ao longo do pecíolo da folha dos três hospedeiros. Observou-se também que ocorre uma redução no número de vasos do pecíolo no sentido da base para o limbo foliar, porém a porcentagem de vasos

colonizados não difere estatisticamente entre as posições, já que o número de vasos colonizados também é reduzido. Diferenças no número e na característica dos vasos dos três hospedeiros pôde ser observada. Os vasos de ameixeira são predominantemente espiralados, enquanto que em cafeeiro são reticulados e em citros pontuados (Figura 2 D, E e F). Além deste fato, em citros e ameixeira é comum a presença de um maior número de células do parênquima do xilema entre os vasos do que em cafeeiro (Figura 3).

Quando se analisou a eficiência de *X. fastidiosa* para colonizar os três hospedeiros, através da divisão do número de unidades formadoras de colônia por grama de pecíolo (UFC/G) pelo número de vasos colonizados, verificou-se uma maior eficiência em cafeeiro, depois ameixeira e finalmente citros, independente do nível de sintomas SI ou SL (Figura 4).

Observou-se ainda uma variação no número de vasos encontrados dentro da área da eletromicrografia analisada, como pode ser observado na Tabela 04. Sendo que para o cafeeiro, os números de vasos nos pecíolos de folhas com sintomas intensos eram praticamente o dobro do número de vasos dos pecíolos de folhas com sintomas leves.

Tabela 1. Porcentagem de vasos do xilema colonizados por *X. fastidiosa*, número de unidades formadoras de colônias por grama de tecido e resultado do teste PCR em função da sintomatologia foliar em ameixeira, cafeeiro e citros.

Hospedeiro	Sintoma*	% de Vasos colonizados	% Média de vasos	n ^o UFC/g**	PCR***
		40,3		1,32X10 ⁷	(+)
	SI	35,5	38,2 b#	2,5X10 ⁶	(+)
		38,8		1,5X10 ⁷	(+)
Ameixeira		10,6		1,16X10 ⁶	(+)
	SL	8,6	10,9 d	2,5X10 ⁶	(+)
		13,4		9,85X10⁶	(+)
		55,7		1,78X10 ⁶	(+)
	SI	52,5	51,6 a	9,5X10 ⁵	(+)
		46,5		9,5X10 ⁵	(+)
Cafeeiro		27,7		3,24X10 ⁶	(+)
	SL	21,6	26,8 c	2,39X10 ⁶	(+)
		28,7		1,54X10⁶	(+)
		11,5		1,0X10 ⁶	(+)
	SI	10,4	10,7 d	1,45X10 ⁶	(+)
		13,5		1,9X10 ⁶	(+)
Citros		9,7		5,5X10 ⁴	(+)
	SL	8,0	8,0 d	3,5X10 ⁴	(+)
		6,4		3,8X10 ⁵	(+)

Medias exibindo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade ($P < 0.05$).

* SL = sintomas leves; SI = sintomas intensos;

** UFC/g = Unidades formadoras de colônias;

*** PCR = + indica a presença de *X. fastidiosa* na planta.

Tabela 2. Porcentagem de vasos do pecíolo do xilema colonizados por *Xylella fastidiosa* e número de UFC/g tecido infectado em folhas de ameixeira, cafeeiro e citros com sintomas leves e sintomas intensos da doença. Dados transformados.

Nível de sintomas/ planta hospedeira	Valores médios ^x	
	% Vasos Colonizados ^y	UFC/g tecido infectado ^z
Sintomas leves		
Pecíolo de ameixeira	10.9±1.4 b	4.5 X 10 ⁶ ± 2.7 X 10 ⁶ a
Pecíolo de cafeeiro	26.0±2.2 a	2.4 X 10 ⁶ ± 4.9 X 10 ⁶ a
Pecíolo de citros	8.0±0.9 b	1.5 X 10 ⁵ ± 1.1 X 10 ⁵ b
Sintomas intensos		
Pecíolo de ameixeira	38.0±1.4 b	6.3 X 10 ⁶ ± 4.3 X 10 ⁶ a
Pecíolo de cafeeiro	51.6±2.7 a	1.23 X 10 ⁷ ± 2.7 X 10 ⁵ a
Pecíolo de citros	11.8±0.9 c	1.5 X 10 ⁶ ± 2.5 X 10 ⁵ a

^x Médias exibindo a mesma letra não diferem entre si com base no teste de Duncan, a 5% de probabilidade (P < 0.05).

^y A porcentagem de vasos colonizados foi transformada pela raiz quadrada, previamente a análise estatística.

^z O número de unidades formadoras de colônia por gramas de tecido (UFC/g) foi transformado por log de X, prévio a análise estatística.

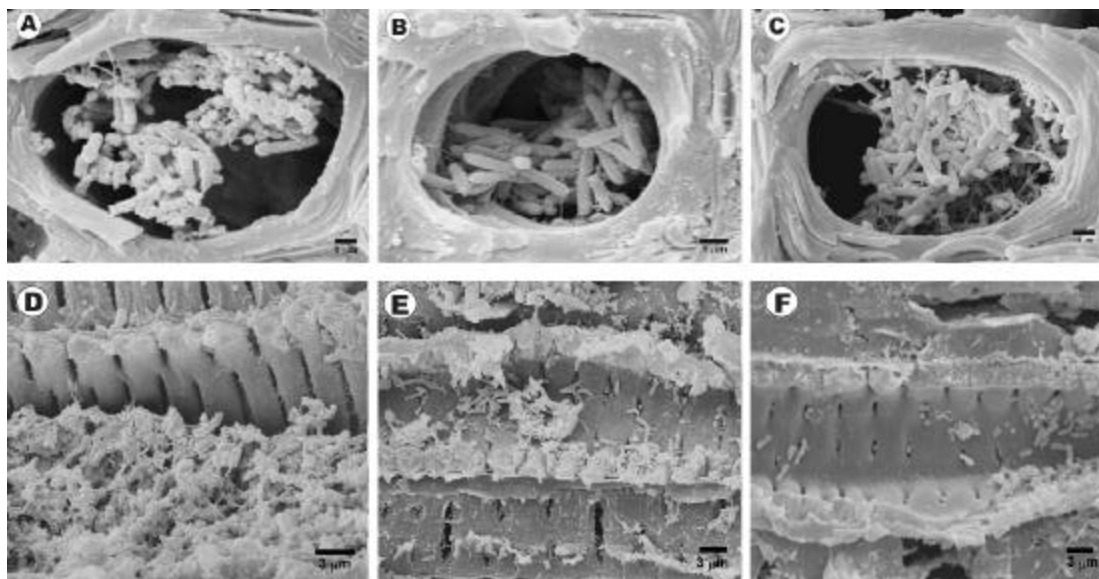


Figura 2- Eletromicrografia de varredura mostrando a morfologia característica e detalhes do modo de colonização de *X. fastidiosa* em vasos do xilema em pecíolos de ameixeira (A e D), cafeeiro (B e E) e citros (C e F). (D) vaso espiralado em ameixeira; (E) vaso reticulado em cafeeiro e (F) vaso pontuado em laranja caipira.

Tabela 3. Número e porcentagem de vasos colonizados por *X. fastidiosa* em cinco posições do pecíolo em direção à nervura central de folhas de ameixeira, cafeeiro e de citros com sintomas intensos de infecção.

Posições*	Ameixeira		Cafeeiro		Citros	
	Vasos	%	Vasos	%	Vasos	%
1	38/210**	18,09	115/239	48,12	8/215	3,72
2	42/188	22,34	95/235	40,42	7/200	3,50
3	36/180	20,00	102/212	48,11	10/196	5,10
4	29/172	16,86	87/188	46,27	9/194	4,64
5	33/153	21,56	50/150	33,33	6/159	3,77

*Posição 1 próximo à base do pecíolo e 5 próximo à nervura central da folha;

** Esquerda número de vasos colonizados por *X. fastidiosa*; direita número total de vasos na secção.

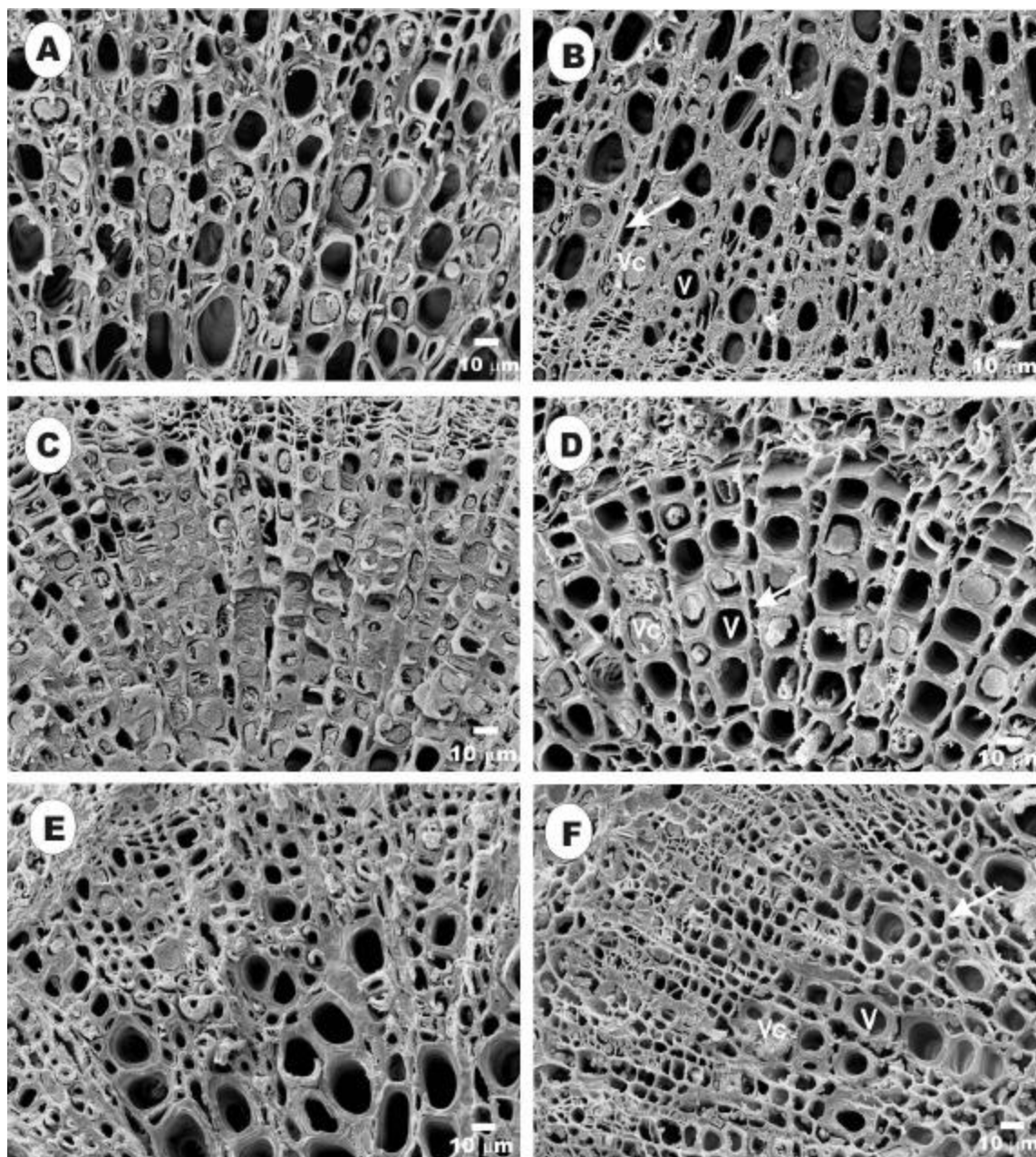


Figura 3- Eletromicrografia de varredura mostrando o número de vasos colonizados por *X. fastidiosa* em ameixeira (A e B), cafeeiro (C e D) e citros (E e F) em relação à sintomatologia. As imagens da direita foram obtidas de folhas com sintomas leves e da esquerda com sintomas intensos. (seta) célula do parênquima do xilema; (V) vaso do xilema; (Vc) vaso do xilema colonizado por *X. fastidiosa*.

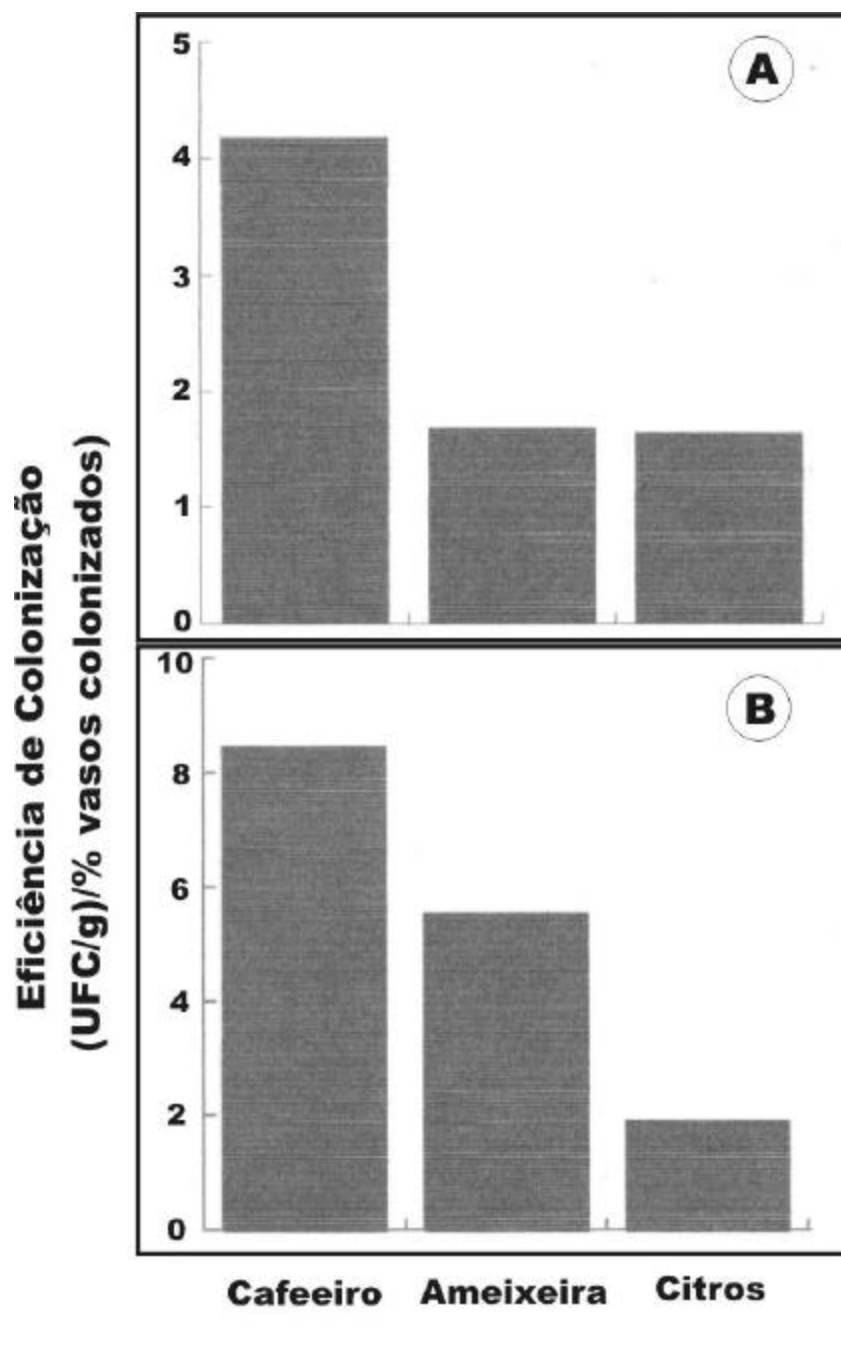


Figura 4- Eficiência de colonização por *X. fastidiosa* em três plantas hospedeiras (cafeiro, ameixeira e citros). A proporção da (UFC/g) pela % de vasos colonizados expressa a capacidade do patógeno colonizar o tecido da planta. (A) Pecíolo de folhas com sintomas leves; (B) Pecíolo de folhas com sintomas intensos.

Tabela 4. Número de vasos total por imagem, número de vasos colonizados por *X. fastidiosa* e número de vasos totais, contados nas imagens geradas no microscópio eletrônico de varredura. (SI) sintoma intenso e (SL) sintoma leve.

PLANTAS	AMOSTRA	REPETIÇÕES				TOTAL***
		A	B	C	D	
1	CAFEEIRO SI*	115/49**	258/161	239/120	240/162	852/486
2	CAFEEIRO SI	249/102	228/130	260/127	264/167	1001/526
3	CAFEEIRO SI	91/38	169/56	242/124	240/144	742/362
4	CAFEEIRO SL	95/24	119/32	73/28	98/20	385/104
5	CAFEEIRO SL	74/17	93/18	76/13	104/28	347/76
6	CAFEEIRO SL	99/33	104/25	96/25	77/24	376/107
7	CITROS SI	73/05	145/13	76/11	132/11	426/40
8	CITROS SI	133/12	98/08	76/06	99/07	406/33
9	CITROS SI	96/04	138/11	68/04	81/06	383/25
10	CITROS SL	87/14	109/16	114/15	90/09	400/54
11	CITROS SL	95/10	202/21	178/12	150/21	625/64
12	CITROS SL	122/08	121/07	168/29	173/28	576/72
13	AMEIXEIRA SI	145/61	82/31	153/62	105/43	485/197
14	AMEIXEIRA SI	134/38	110/34	89/33	101/46	434/151
15	AMEIXEIRA SI	89/42	131/60	114/36	111/34	445/169
16	AMEIXEIRA SL	133/16	148/10	130/18	91/9	502/53
17	AMEIXEIRA SL	120/12	82/08	107/07	135/11	444/38
18	AMEIXEIRA SL	122/08	105/18	102/24	112/07	441/57

* Os números de vasos contados podem variar em função do diâmetro dos vasos e da presença de células do parênquima na área, como pode ser observado nas Figura 3A – F;

** Esquerda = número total de vasos na imagem; direita = número de vasos colonizados;

*** Total = número total de vasos nas quatro repetições.

3.5 Discussão

O conhecimento sobre o modo como o patógeno distribui-se no tecido de uma planta é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de controle e para o estudo da influência da distribuição do patógeno no aparecimento dos sintomas. No caso de *X. fastidiosa* nos três hospedeiros estudados, informações sobre a distribuição da bactéria nos vasos são praticamente inexistentes (Purcell, 1997). Portanto, este trabalho pode ser considerado pioneiro na área, o que auxilia no desenvolvimento de trabalhos futuros, além de ser de extrema importância para a compreensão da relação patógeno-hospedeiro-inseto vetor.

Inicialmente, os resultados confirmam a hipótese da relação entre a proporção de vasos colonizados e a sintomatologia em folhas de ameixeira e cafeeiro, o que não ocorreu para o citros. Trabalho anterior procurando determinar a porcentagem de vasos colonizados por *X. fastidiosa* em videira foi realizado por Mollenhaver & Hopkins (1976), os quais utilizaram a microscopia eletrônica de transmissão para estudar pecíolos e nervuras de folhas de videira com necrose. Os autores verificaram que no pecíolo das folhas com sintomas intensos, 40% dos vasos estavam colonizados pela bactéria e que metade destes estavam ocluídos, embora os mesmos tenham considerado o número de vasos colonizados insuficientes para serem os únicos responsáveis pelos sintomas nas folhas. Andersen & French (1987), trabalhando com *Phony peach disease*, notaram que a concentração de *X. fastidiosa* não estava correlacionada com a redução da condutância hidráulica nas hastes. Os autores relataram que alguns sintomas associados à doença não podiam ser somente explicados pelo estresse de água. Entretanto, o estresse de água pode ser diretamente correlacionado com a oclusão de vasos em videiras com mal de Pierce (Goodwin et al., 1988). Estes autores mostraram que em pecíolo de folhas com necrose, a resistência ao fluxo de água foi 60-200 vezes maior que em folhas saudáveis. Os autores argumentaram que não se deve considerar apenas a porcentagem de vasos em um corte para avaliar o efeito sobre o fluxo de água, pois em outra posição do pecíolo diferentes vasos podem estar obstruídos o que na prática se somaria aos já obstruídos, em posições anteriores. Neste trabalho esta afirmação pode ser constatada na Tabela 3, a qual mostra o resultado da observação da porcentagem de vasos colonizados ao longo do pecíolo, em

que se verifica um número variável de vasos total e colonizado, sendo que os vasos colonizados não são os mesmos ao longo do pecíolo. Entretanto, deve-se considerar que outros fatores podem estar envolvidos na sintomatologia, como a redução no fluxo de nutrientes (Leite et al., 2002) e a produção de toxinas (Simpson et al. 2000). Se tivermos um maior número de vasos ocluídos, isso pode resultar em maior número de bactérias que podem levar ao acúmulo de toxinas e a uma maior retenção de nutrientes na massa de bactérias. Queiroz-Voltan et al. (1998) encontraram porcentagens variáveis de vasos obstruídos por *X. fastidiosa* no caule de cultivares de cafeeiro. Não se observaram diferenças no ‘Catuaí Vermelho’ entre plantas enxertadas (8,1%) e não enxertadas (8,4%), porém esse cultivar apresentou uma porcentagem menor de obstrução dos vasos do que ‘Mundo Novo’ enxertado em *Coffea canephora* (20%). No entanto, as porcentagens de vasos ocluídos foram bem inferiores às observadas neste trabalho (28,8 a 51,6%). Este fato deve estar associado à procedência das folhas de cafeeiro com sintomas, que no primeiro caso (Queiroz-Voltan et al.,1998), foram obtidas de plantas com incidência natural da bactéria e em nosso caso através da inoculação artificial de *X. fastidiosa* e também porque neste trabalho utilizou-se do pecíolo para se avaliar o número de vasos colonizados, enquanto que no outro, os autores trabalharam com partes da haste que parece ter uma menor concentração de bactérias.

A expressão dos sintomas em resposta a infecção por *X. fastidiosa* é influenciada pelo tempo de acúmulo da bactéria e pelo limiar da população bacteriana (Fry & Milholland, 1990). Nós acreditamos que o processo de invasão dos vasos do xilema da planta hospedeira por *X. fastidiosa* envolve a fase planctônica (células livres) e a fase sésil (biofilme). Deste modo, é natural assumir que a característica química do xilema pode influenciar a capacidade das células bacterianas de formar grandes agregados, pequenos agregados e células livres. Como consequência, o acúmulo de goma fastidiana pode ser também afetado. A ausência de goma fastidiana foi verificada nos estádios iniciais do desenvolvimento da colônia (Leite et al., 2002). Em citros, em que o número de vasos colonizados foi menor poderíamos considerar que outros fatores podem ter maior importância na expressão dos sintomas que em ameixeira e cafeeiro. Entretanto, verifica-se que as folhas das plantas de citros com sintomas intensos de CVC apresentam

alta resistência ao fluxo de água nos vasos do xilema (Machado et al., 1994). Considerando o fato de haver variação entre os vasos colonizados nas diferentes posições do pecíolo, acredita-se que mesmo em citros o número de vasos colonizados é um determinante dos sintomas. Queiroz-Voltan et al. (1998) e Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) verificaram em café e citros, que a obstrução dos vasos das plantas infectadas diminuía da folha em direção ao caule.

Uma outra explicação para a menor colonização dos vasos do xilema em plantas de citros pode ser o fato das plantas de citros apresentarem uma maior proporção de vasos pontuados em relação à ameixeira e cafeeiro, nos quais existe uma maior proporção de vasos espiralados e reticulados, respectivamente como verificado na Figura 2. Considerando também que *X. fastidiosa* é uma bactéria limitada ao xilema (Well et al., 1987), essa somente pode migrar de um vaso para outro do xilema, se estes estão juntos, através das pontuações ou por meio dos raios xilemáticos. A movimentação pelos raios teoricamente é menos eficiente, por ser uma rota mais longa para *X. fastidiosa*. Desta forma, a migração vaso a vaso torna-se mais difícil em citros, porque, como pode ser observado na Figura 3, a presença de células do parênquima do xilema entre um grupo de vasos e outro é muito mais intensa do que em cafeeiro e ameixeira. Este fato poderia ajudar a explicar a diferença no número de vasos colonizados entre os três hospedeiros.

O fato de que folhas de cafeeiro e ameixeira com sintomas intensos mostram taxas superiores de colonização dos vasos em relação aos citros, sugere que a eficiência do vetor pode ser maior nestes dois hospedeiros. Entretanto, nenhum dado sobre a eficiência nestes hospedeiros é disponível. Porém, os valores que tem sido verificados para citros, são baixos e variam de 0,3 a 11%, dependendo do vetor estudado (Lopes, 1999; Yamamoto et al., 2002), quando comparados aos da cigarrinha da videira, que com taxas de 40% de vasos colonizados a eficiência de transmissão gira entre 90 e 100% (Hill & Purcell, 1995 b). Hill & Purcell (1997) observaram que a taxa de transmissão aumenta quando a população da bactéria na planta também aumenta. Isto significa que plantas com maior população bacteriana e infecção sistêmica são, provavelmente, mais importantes como fonte de inóculo para a dispersão do patógeno. O presente estudo não mostrou nenhuma variação significativa na população bacteriana em citros, ameixeira e

cafeeiro, apesar da grande diferença na taxa de colonização dos vasos do xilema observada entre os hospedeiros estudados. Isto significa que uma maior expressão de sintomas não implica necessariamente numa maior população bacteriana, já que os sintomas podem resultar da obstrução dos vasos do xilema provocados pela deposição de células bacterianas não viáveis. O fato de que a proporção de vasos colonizados em cafeeiro é superior aos das outras duas espécies é um indicativo de que o cafeeiro pode ser um melhor hospedeiro para *X. fastidiosa* do que ameixeira ou citros. Seguindo semelhante raciocínio, citros pode ser o hospedeiro mais resistente ao patógeno das três espécies, o que conseqüentemente proporciona uma menor eficiência na aquisição e na taxa de transmissão pelos vetores (Figura 4).

Outro fato a ser discutido é quanto ao número de vasos presentes na área da imagem de MEV analisada. Como pode ser visto na Tabela 4, o número de vasos contados na área apresentam-se semelhantes para quase todas as folhas analisadas, com exceção para o cafeeiro com sintomas intensos. Neste é interessante salientar que *X. fastidiosa* induziu um menor tamanho nas folhas (Figura 1), mas ao contrario do que seria de se esperar o número de vasos na área foi bem maior (Tabela 4). A explicação para este fato pode ser encontrada nas Figuras 3C e D, onde pode ser verificado, que o diâmetro dos vasos em folhas com SI é menor que nas folhas com SL.

A principal contribuição do presente estudo diz respeito à eficiência de colonização, a qual pode variar nos hospedeiros. Nossos resultados sugerem que, em adição à habilidade do vetor para infectar a planta, o modelo diferencial de colonização em citros é altamente sugestivo da existência de fatores que podem facilitar ou inibir o espalhamento de *X. fastidiosa*. Estes fatores estão presentes dentro do tecido da planta e podem ser de natureza química e/ou físico-morfológica. A abundância de vasos pontuados em pecíolos de citros, além do maior número de células do parênquima sugerem que a resposta das plantas pode ser uma combinação de ambos fatores, visto que vasos com maior proporção de parede secundária são anatomicamente e quimicamente distintos (Leperen et al., 2000), quando comparados a vasos com menor proporção de parede secundária como os espiralados em ameixeira e reticulados em cafeeiro.

4 ULTRAESTRUTURA DA INTERAÇÃO *Xylella fastidiosa* - LARANJEIRA PÊRA - ASPECTOS DA ADESÃO, COLONIZAÇÃO VASO A VASO E RESISTÊNCIA DA PLANTA

4.1 Resumo

O conhecimento do modo como o patógeno distribui-se no tecido vegetal e como a planta reage ao ataque do patógeno são de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de controle. No caso de *Xylella fastidiosa* em citros, pouco se sabe sobre os mecanismos de colonização do xilema e da resistência da planta. O objetivo deste trabalho foi estudar como *X. fastidiosa* invade vasos adjacentes do xilema, o padrão de colonização dos vasos pela bactéria e alguns aspectos da resistência expressa por plantas de laranja pêra. Foram utilizados quinze amostras de folhas de plantas com sintomas característicos da doença, provenientes de três municípios do Estado de São Paulo (Neves Paulista, Gavião Peixoto e Santa Rita do Passa Quatro). Os pecíolos de cinco folhas de cada amostra foram retirados, fixados e preparados para microscopia eletrônica de varredura e transmissão, microscopia de luz e imunomarcção de polissacarídeos da parede primária. Os resultados mostraram que a colonização ocorre preferencialmente nos vasos pontuados do xilema secundário. O grande número de bactérias localizadas nas imediações e no interior das pontuações, alterações na integridade da parede primária e a ausência de marcação com anticorpo contra hemicelulose nas pontuações de vasos colonizados por *X. fastidiosa* indicam que a

bactéria utiliza as pontuações como caminho para a migração inter-vasos, semelhante ao mecanismo já proposto para bactérias do gênero *Pseudomonas*. Foi também possível verificar as diversas fases do processo de colonização dos vasos do xilema, desde a adesão inicial até a completa oclusão do lúmen, com a produção de material fibrilar e goma. Possíveis reações da planta à colonização do xilema foram verificadas, com o acúmulo de hesperidina nos vasos. Também nas folhas, verificou-se a deposição de goma, compostos fenólicos, hiperplasia e alterações no citoplasma das células da bainha e dos parênquimas paliçádico e lacunoso.

4.2 Introdução

X. fastidiosa (Wells et al., 1987) é o agente causal de várias doenças que têm causado perdas em um grande número de plantas economicamente importantes (Purcell, 1997). No Brasil, essa bactéria tem sido encontrada em muitas plantas, porém uma das culturas de importância econômica mais afetada é a do citros. Nesta cultura, *X. fastidiosa* causa a doença chamada clorose variegada dos citros (CVC) (Chang et al., 1993a), que nos últimos quinze anos tem causado grandes perdas a citricultura paulista e brasileira. A estimativa de prejuízos causados pela bactéria, no Estado de São Paulo, onde a citricultura é constituída por mais de 60 milhões de árvores, pode chegar a mais de um milhão de dólares ao ano, sendo que, aproximadamente 30% das plantas estão afetadas pela bactéria (Monteiro et al., 2001 b). Esta bactéria está limitada aos vasos do xilema das plantas e é transmitida por enxertia ou por insetos vetores, as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) da subfamília Cicadellinae, que se alimentam nos vasos do xilema (Purcell & Hopkins, 1996).

Os sintomas da doença se caracterizam por deficiências de zinco, clorose internerval (Rossetti et al., 1990), variegação, queima na face superior e lesões na face inferior das folhas mais velhas (Machado et al., 1994). Com o tempo, ocorre a queima das pontas de ramos, com menor desenvolvimento desses. Áreas cloróticas surgem na face superior em locais correspondentes às lesões. Estas áreas cloróticas podem tornar-se necróticas, puntiformes ou alongadas, ocorrendo em grupos ou linhas. São comuns exsudações de goma nos locais com elevação do tecido da epiderme da folha. Os frutos

também podem ser afetados tornando-se duros e pequenos. Com o avanço da doença, pode ocorrer a morte de ramos, mas dificilmente a morte da planta (Feichtenberger et al., 1997). Os sintomas provocados por *X. fastidiosa* têm sido atribuídos à obstrução de vasos, devido à invasão sistêmica da bactéria (Sherald & Lei, 1991) e à agregação da bactéria no lúmen dos vasos do xilema (Silva et al., 2001), o que além de dificultar a passagem de água funciona como um filtro para os nutrientes conduzidos pelo xilema (Leite et al., 2002). No caso de citros, outras hipóteses para explicar o desenvolvimento dos sintomas têm sido levantadas, como a atuação de fitotoxinas, o desbalanço hormonal produzido pela bactéria e a produção de enzimas (Simpson et al., 2000), porém nenhuma destas hipóteses foi confirmada.

Reações de resistência das plantas à presença de *X. fastidiosa* são comuns e podem também estar envolvidas com o aparecimento dos sintomas. Mollenhauer & Hopkins (1976) e Fry & Milholland (1990) estudando plantas de videira infectadas por *X. fastidiosa*, observaram reações de resistência como deposição de goma, pectina e formação de tiloses por esse hospedeiro. Já Tyson et al. (1985), usando a MEV, verificaram a formação de cristais de cálcio e de um material fibrilar no lúmen de vasos colonizados. Em citros, Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) verificaram a deposição de goma, bem como a presença de cristais de hesperidina no lúmen dos vasos do xilema de plantas infectadas.

De qualquer forma, a expressão dos sintomas depende da colonização de vários vasos do xilema, como demonstrado por Alves et al. (2003). Entretanto, o mecanismo pelo qual *X. fastidiosa* consegue passar de um vaso do xilema colonizado para outro vaso é ainda desconhecido. Hopkins (1989) propôs que a bactéria poderia dissolver a membrana da pontuação, a qual é uma parede celular primária constituída de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas. Simpson et al. (2000) identificaram um gene precursor de uma poligaracturonase e um de uma celulase no genoma da *X. fastidiosa* de citros, tendo este último junto com mais dois genes de celulases encontrados posteriormente no genoma de *X. fastidiosa*, sido expressos em *E. coli* (Wulff, 2002), propondo que estes genes poderiam estar envolvidos na migração inter-vasos de *X.*

fastidiosa, através da membrana da pontuação. Porém, pouco do processo é conhecido até o momento.

Da mesma forma que a movimentação vaso a vaso, o modo como *X. fastidiosa* adere às paredes dos vasos do xilema e inicia a colonização carece de informações (Purcell & Hopkins, 1996). Leite et al. (2002) propuseram um modelo de adesão e agregação de *X. fastidiosa* baseado em cargas eletrostáticas, presença de adesinas, fimbrias e goma fastidiana. Este modelo descreve uma seqüência de eventos desde o momento em que a bactéria adere a superfície dos vasos até a liberação de células bacterianas para a colonização de outros vasos do xilema da planta.

Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever, através da microscopia de luz (ML), eletrônica de transmissão (MET) com imunomarcção e eletrônica de varredura (MEV), o processo de adesão, migração vaso a vaso, e colonização dos vasos do xilema do pecíolo de plantas de citros cultivar pêra por *X. fastidiosa*, bem como uma possível reação de resistência expressa pela planta à presença da bactéria em pecíolos e folhas.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Coleta das amostras

Quinze amostras de folhas de laranjeira doce, cultivar pêra, com sintomas característicos de CVC, foram coletadas em três diferentes municípios do Estado de São Paulo (Neves Paulista, Gavião Peixoto e Santa Rita do Passa Quatro) em dois períodos, abril e maio de 2001. Os pecíolos e áreas com sintomas de mancha de goma das cinco folhas de cada amostra foram retirados e preparados para ML, MEV, MET e imunomarcção com ouro coloidal de um dos componentes da parede celular primária.

4.3.2 Preparação das amostras para MEV

A preparação e observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP. Pecíolos das cinco folhas de cada amostra, depois de coletados, foram imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 24 h. Em seguida, foram transferidos para

líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 min e cortados transversalmente e longitudinalmente em nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e subseqüentemente desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com a ajuda de uma fita de carbono colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP. Foram geradas e registradas digitalmente, a aumentos variáveis, diversas imagens para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9, onde foram selecionadas e preparadas as pranchas apresentadas neste trabalho.

Os espécimes também foram levados a um microscópio de varredura acoplado a um sistema de microanálise de raio X para a observação e análise de cristais presentes no lúmen do xilema.

4.3.3 Preparação das amostras para MET e ML

As preparações das amostras para a MET e ML foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP e as observações no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade da Geórgia, em Athens-EUA. Os pecíolos e as áreas com sintomas de mancha de goma das cinco folhas, de cada amostra, depois de coletados, foram retirados e imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 24 h, lavados em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados por duas vezes de 15 min em água destilada, transferidos para solução a 0,5 % de acetato de uranila durante 12h a 4°C e em seguida, lavados novamente em água destilada e desidratados em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes). Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30 % (8h), 70 % 12 h e 100 % duas vezes por 24 h cada, sendo os espécimes montados em moldes e colocado para polimerizar em estufa a 70 °C por 48 h.

4.3.4 Ultramicrotomia

Os blocos obtidos foram levados a um aparelho de “Trimming” para a retirada dos excessos. Em seguida, secções semifinas (0,85 μ m) e ultrafinas (<100 nm) foram cortadas usando-se um ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut E), com o auxílio de navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro, colocados em lâminas de vidro, coloridos com azul de toluidina (1g azul de toluidina, 1 g borato de sódio e 100 mL água), filtrados em filtro Millipore (0,2 μ m) e montados permanentemente em meio Permalt. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro (golden slot grids), secos em raques de alumínio cobertos com formvar (Rowley & Moran 1975). As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 min cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 902A a 80 kv. Esta parte do trabalho e as do item 4.3.5 foram realizadas no Laboratório de Micologia e no Setor de Microscopia Eletrônica da Universidade da Geórgia, Athens-EUA.

4.3.5 Procedimentos para imunomarcação

4.3.5.1 Anticorpos

Para a imunomarcação foram utilizados dois anticorpos. O anticorpo primário CCRCM1 foi desenvolvido e descrito por Puhlmann et al. (1994). Este anticorpo apresenta como característica o isotipo IgG₁, reconhece os polissacarídeos xiloglucana e raminogalacturonana I (componentes da parede celular primária - hemiceluloses) e seu característico epitopo é o resíduo de α -fucosil (1 \rightarrow 2)-ligado a resíduo de galactosil. O anticorpo secundário é um anti-rato IgG-gold conjugado (10nm) adquirido da Sigma (Catalog No. G-7652).

4.3.5.2 Imunomarcação

Secções ultra-finas foram montadas em telinhas de ouro e hidratadas por 10 min em gota (10- μ L) de KPBS (tampão fosfato salino de potássio), 25 mM, contendo 0,02%

(w/v) PEG (Carbowax PEG 20M, Fisher Scientific; catalog N° P162-1). Sítios de ligação não específicos foram bloqueados através da incubação dos cortes em 3% de leite em pó sem gordura (w/v) em KPBS por 45 min. Os cortes foram incubados por 60 min em uma pequena gota do anticorpo CCRCM1 (10- μ L) diluído em KPBS, seguido por 3 lavagens em gotas de KPBS. Em seguida, os cortes foram incubados por 60 min em gotas de 2- μ L de anticorpo de cabra anti-rato IgG conjugado com partículas de ouro coloidal 10 nm (Sigma), diluído como indicado. A seguir, os cortes foram lavados por 5 min em 3 gotas de água destilada e as telinhas secas com papel de filtro. Todas as incubações foram conduzidas a temperatura ambiente. Para controle em algumas amostras o anticorpo primário foi omitido.

4. 4 Resultados

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz da *X. fastidiosa* em vasos do xilema de citros

Cortes transversais semi-finos do pecíolo em ML mostraram que a *X. fastidiosa* se encontrava principalmente nos vasos mais externos do xilema. Verificou-se ainda que os vasos colonizados eram encontrados em grupos, ou seja, um vaso colonizado era geralmente acompanhado por vasos vizinhos colonizados (Figuras 1A e 2B). Os resultados da MEV mostraram que nos pecíolos de citros são encontrados quatro tipos de vasos do xilema: espiralados, reticulados, pontuados e geralmente entre estes últimos e em pequena quantidade, os escalariformes. Os vasos espiralados estão localizados mais internamente, próximos ao parênquima medular e são os primeiros a se formarem, enquanto os pontuados se posicionam mais externamente e estão em maior números. Já os reticulados são encontrados mais no centro (Figura 1B). A bactéria foi encontrada principalmente nos vasos pontuados, mais externos (Figura 1A, C e D), sendo que muitas vezes as bactérias eram encontradas dentro das pontuações (Figuras 1C-D,2B-C).

Um considerável número de bactérias aderidas às paredes de vasos adjacentes pôde ser observado (Figura 2A-B), muitas delas aderidas pela parte polar (Figura 2A). A partir destas bactérias acredita-se que se tenha iniciado a colonização do vaso em várias

etapas, como pode ser visto na Figura 2 C-F. Na Figura 2C, pode-se observar que as bactérias começam a se reproduzir e a aderir umas as outras sem qualquer indicativo da presença de material extracelular. Com o desenvolvimento da colônia, a produção de material fibrilar pôde ser observada (Figura 2 D). Este material fibrilar tornou-se mais volumoso à medida que a colônia foi aumentando e o vaso foi sendo ocluído (Figura 2E). Após esta etapa, verifica-se a deposição de goma, tornando o vaso praticamente todo obstruído (Figura 2 F). Um corte longitudinal do vaso do xilema mostra que este processo parece ocorrer ao longo do vaso, a partir do ponto de início da colonização (Figura 3 A), onde é possível verificar todas as fases de colonização do vaso mostrada na Figura 2 C-F, desde a presença de algumas poucas bactérias na parede do vaso até a presença de regiões com a deposição de goma. Algumas vezes foi possível observar a presença de bactérias envolvidas em uma mucilagem que se espalhou sobre a região do corte (Figura 3B), o que sugere que este material não apresentava consistência após fixação em aldeídos e antes do corte em nitrogênio líquido, sendo esta uma forma também muito comum de se encontrar a bactéria nos vasos do xilema de laranjeira pêra.

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão de *X. fastidiosa* em vasos do xilema de citros com imunomarcacão da parede primária dos vasos do xilema

As imagens de MET trouxeram mais evidências de que *X. fastidiosa* utiliza as pontuações como caminho para a colonização de vasos adjacentes. Em cortes longitudinais de vaso ocluídos e em início de colonização, pode-se observar um certo acúmulo de bactérias próximo à região das pontuações (Figura 4A). Em cortes transversais observa-se também a presença de bactérias no interior das pontuações, inclusive com células bacterianas em divisão (Figura 4 B). Neste tipo de corte foi também possível observar a ausência da lamela média e parede primária na região da pontuação (Figura 4B-D), indicando que a bactéria estava causando alguma alteração nesta região.

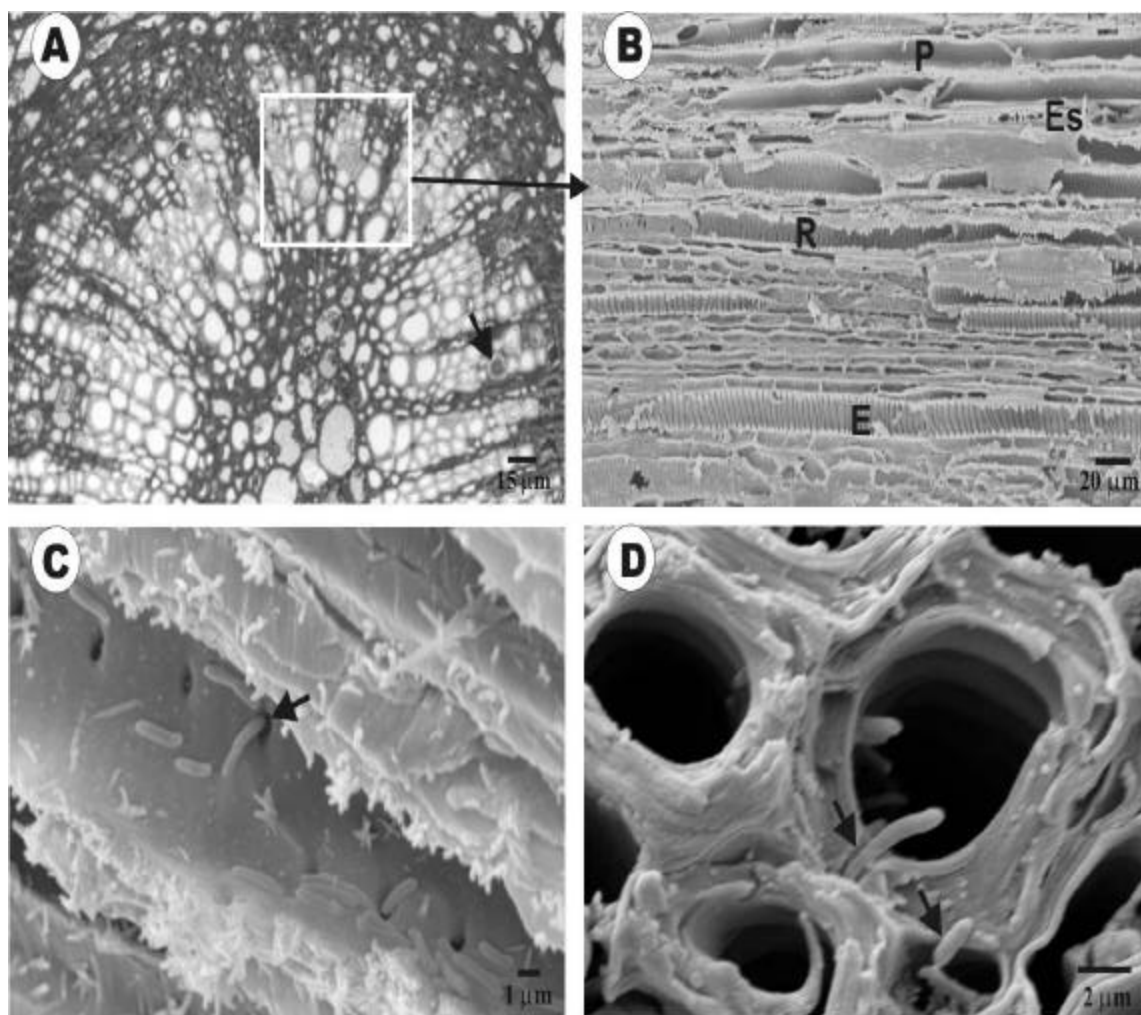


Figura 1- A) Fotomicrografia de um corte transversal do pecíolo de laranja pêra infectada com *Xylella fastidiosa*. Nota-se que os vasos colonizados estão posicionados nas partes mais externas (seta ilustra um vaso obstruído). (B-D) Eletromicrografias de varredura do pecíolo de laranja pêra com CVC; (B) Corte longitudinal representando a área do quadrado em A, mostrando os tipos de vasos do xilema encontrados no pecíolo de folhas de laranja pêra da parte superior para a inferior observa-se vasos pontuados (P), reticulados (R), escalariformes (Es) e espiralados (E); (C) corte longitudinal mostrando as bactérias no interior das pontuações (seta); (D) corte transversal mostrando detalhe da bactéria no interior da pontuação (seta).

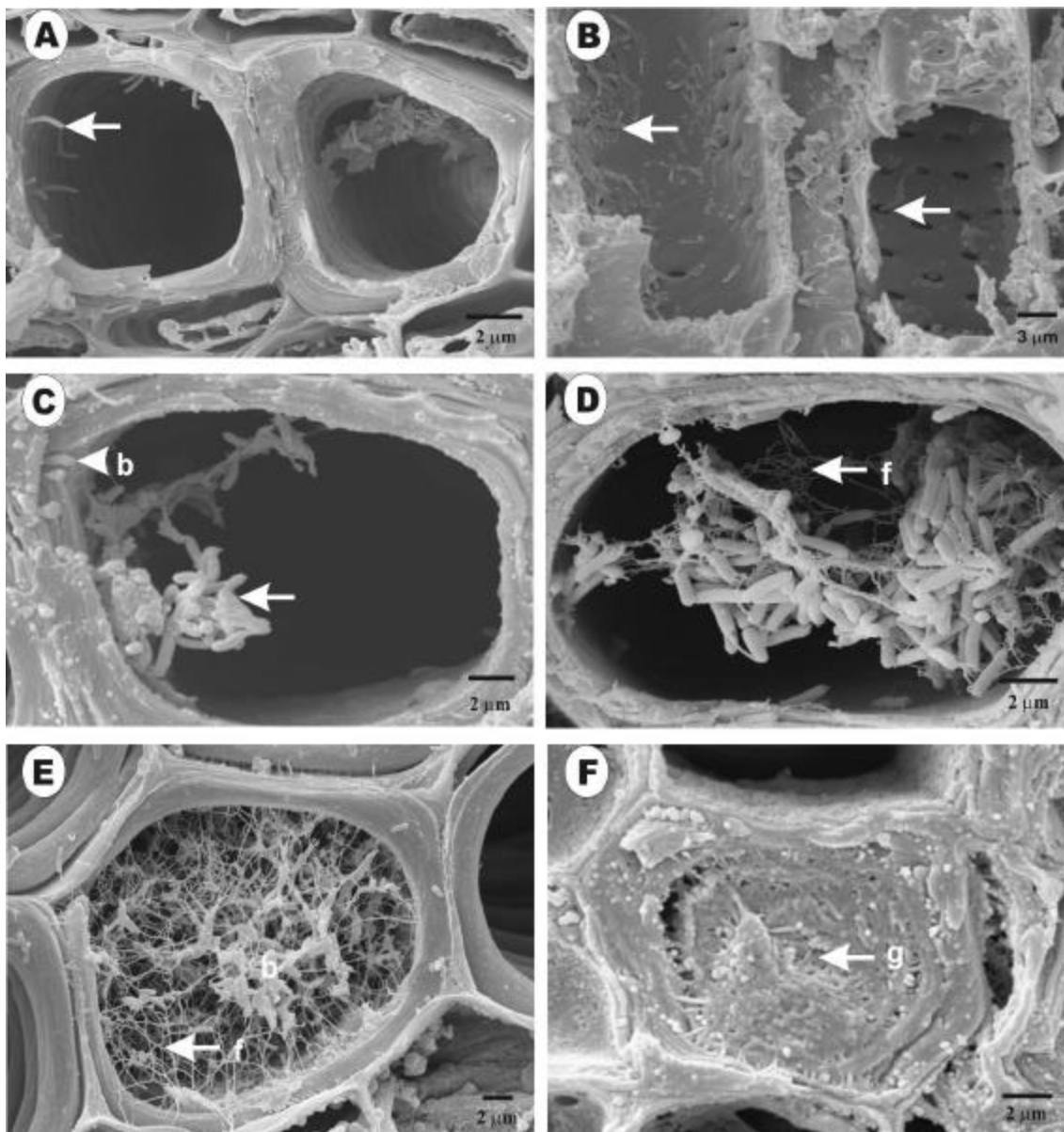


Figura 2- Eletromicrografias de varredura de vasos do xilema de laranjeira pêra colonizados por *Xylella fastidiosa*. (A-B) Colonização de vasos adjacentes e presença de algumas bactérias [b e setas] aderidas à parede das células e algumas no interior de pontuações (cabeça de seta), (A) corte transversal e (B) corte longitudinal; (C-F) fases da colonização.(C) início da formação do biofilme (seta); (D-E) presença de material fibrilar [f e setas] junto às bactérias (b); (F) presença de goma [g] sobre as células bacterianas, vaso ocluído.

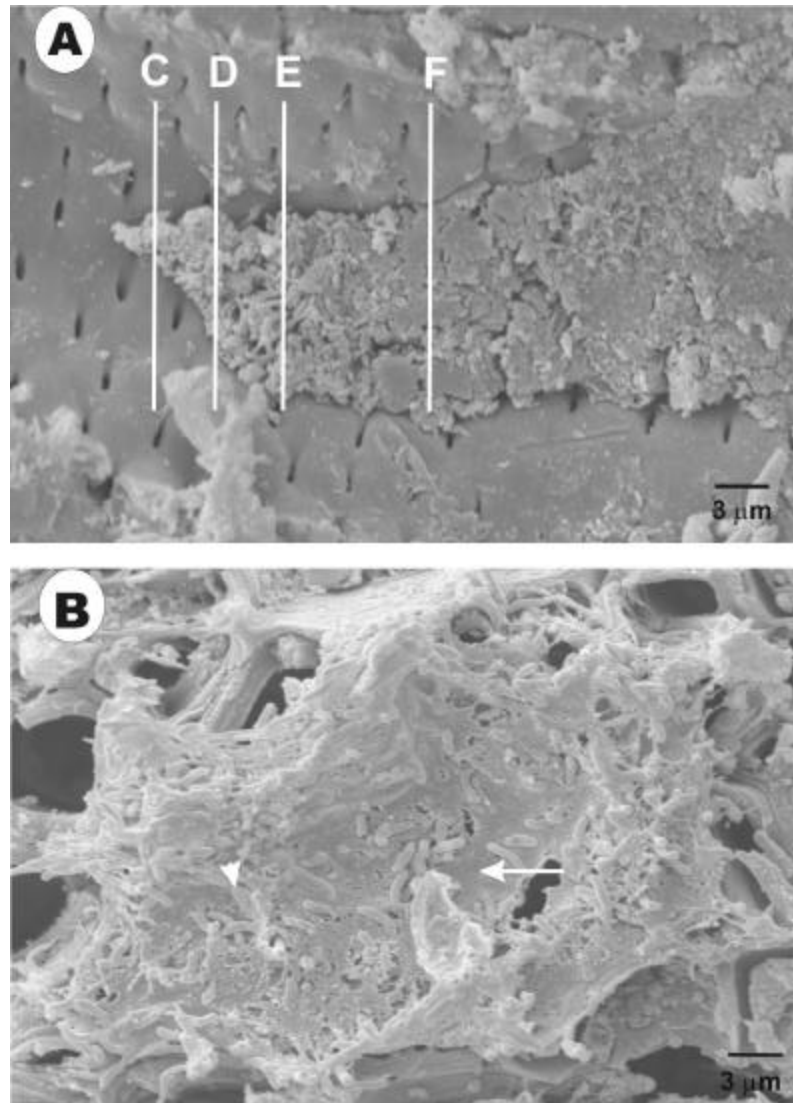


Figura 3- Eletromicrografias de varredura de vasos do xilema de laranjeira pêra colonizados por *Xylella fastidiosa*. (A) corte longitudinal mostrando um vaso com as diversas fases da colonização (da esquerda para direita simula as posições dos cortes da Figura 2 C, D, E e F); (B) bactérias (cabeça de seta) envolvidas por uma substância semelhante a mucilagem (seta). Condição em que são também encontradas as bactérias nos vasos do xilema de laranjeira pêra.

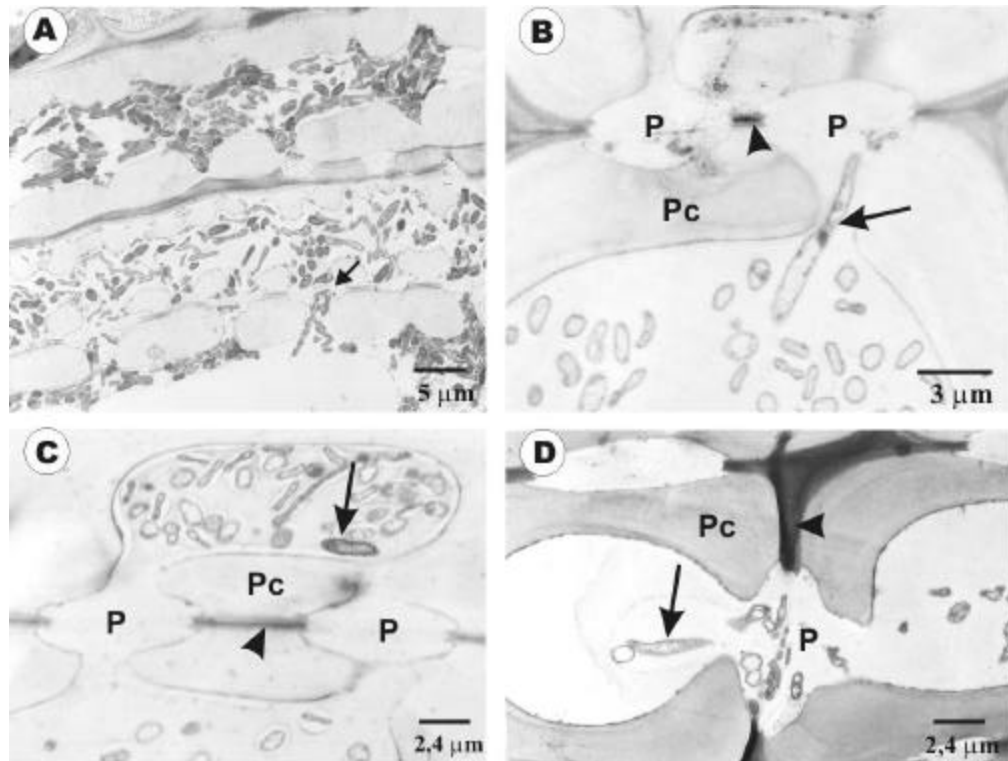


Figura 4- Eletromicrografias de transmissão do pecíolo de folhas de laranjeira pêra infectadas com *Xylella fastidiosa*. (A) Corte longitudinal mostrando os vasos obstruídos e em início de colonização. Pode-se notar o acúmulo de bactérias próximas às pontuações (seta). (B) Corte transversal mostrando uma bactéria em divisão no interior da pontuação (seta); (B-D) vasos com células bacterianas e ausência ou alteração na parede primária da pontuação. P = pontuação, Pc = parede celular secundária, cabeça de seta = parede celular primária, seta = bactéria.

Os resultados da imunomarcção com um anticorpo contra componentes da parede primária, (hemicelulose), revelaram uma forte marcação da parede nas regiões fora da membrana de pontuação, mas nenhuma marcação na pontuação quando os vasos apresentavam bactérias (Figura 5 A-B). Nos cortes de plantas sadias ou em regiões longe dos vasos colonizados, a imunomarcção da parede primária foi observada (foto não mostrada).

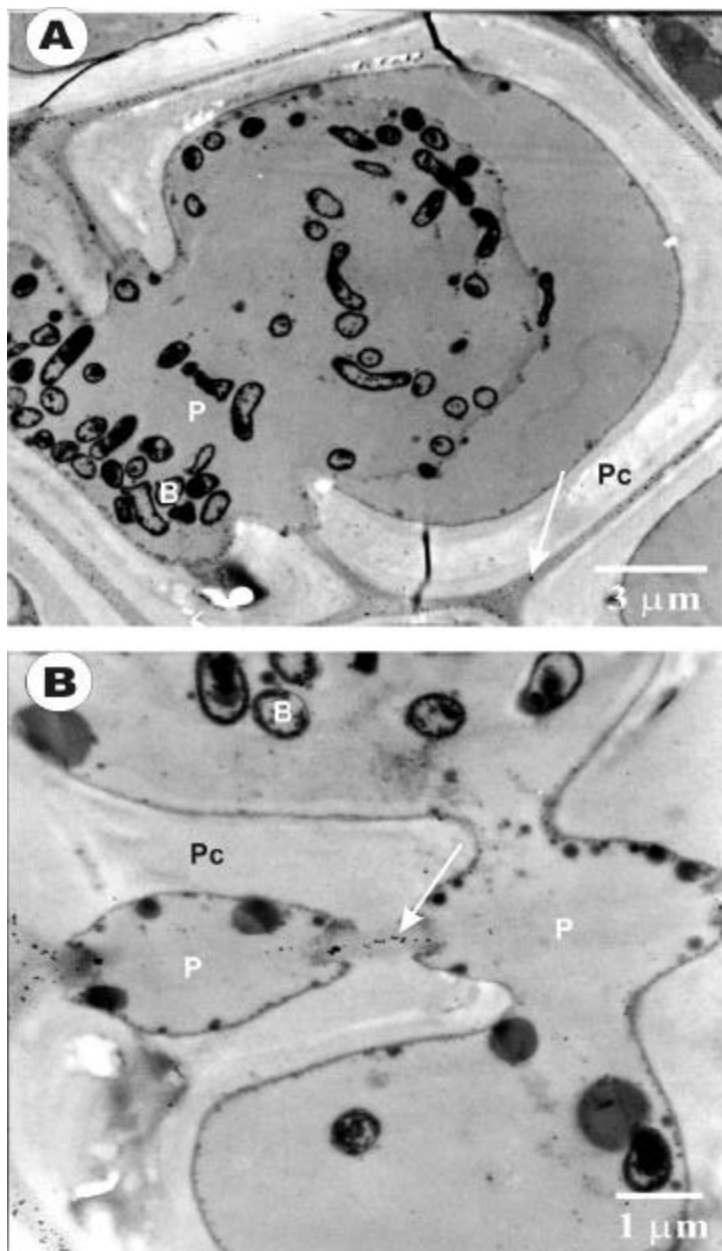


Figura 5- Eletromicrografias de transmissão do pecíolo de folhas de laranjeira pêra infectadas com *Xylella fastidiosa*, com imunomarcacão para componentes da parede primária (hemiceluloses) com ouro coloidal (seta). Em A e B nota-se a ausência de marcação na parede primária das pontuações, as quais possivelmente foram degradadas por *X. fastidiosa*. P = pontuação; Pc = parede secundária; B = bactéria.

4.4.3 MEV e ML da reação de plantas de laranjeira pêra a colonização dos vasos do xilema do pecíolo e das folhas por *X. fastidiosa*

Foi possível observar em MEV a presença de cristais no interior de alguns vasos do pecíolo de folhas infectadas com *X. fastidiosa* (Figura 6). Muitas vezes estes cristais estavam presentes nas regiões próximas aos vasos colonizados pela bactéria e às vezes nos vasos anexos (Figura 6 C). Os cristais chegavam a obstruir todo o vaso (Figura 6 A-B) e se formavam ao longo dos vasos (Figura 6 D). O pecíolo de folhas de plantas de laranjeira pêra sadia não apresentavam os cristais. A microanálise de raio X dos cristais revelou a presença de cálcio, carbono, cobre e ouro, porém em níveis semelhantes aos observados em outras áreas do xilema. Quando foi feito o mapeamento da área dos cristais para carbono, observou-se um forte sinal (dados não mostrados), dando um indicativo de que os cristais apresentavam principalmente natureza orgânica. Foi também possível observar que estes cristais são originados das células do parênquima e alcançam o lúmen dos vasos através das pontuações.

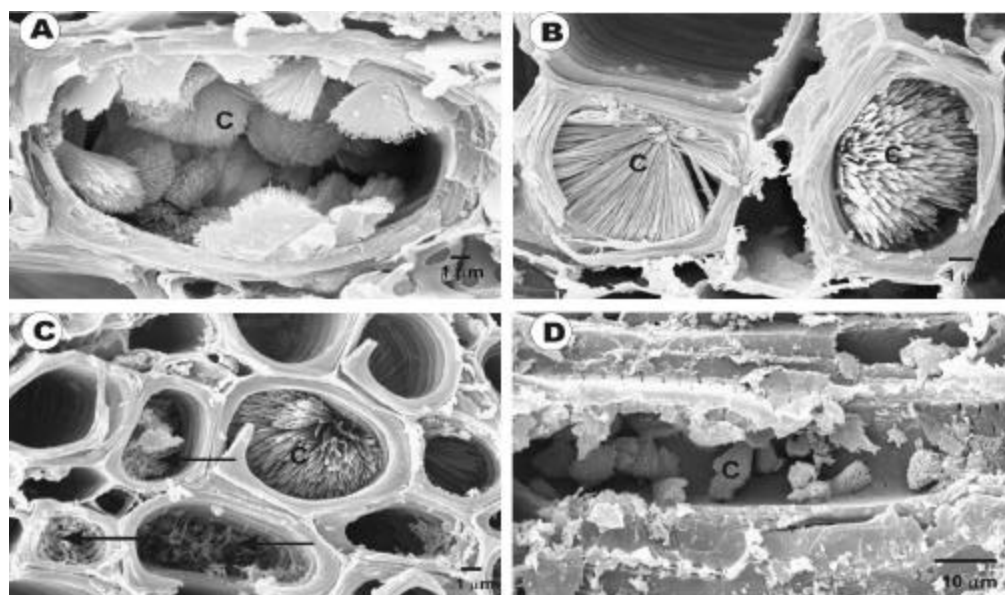


Figura 6- Eletromicrografia de varredura do pecíolo de folhas de laranjeira pêra infectada com *Xylella fastidiosa* mostrando a formação de cristais em vasos próximos aos colonizados pela bactéria. (A-C) Corte transversal. Em (C) é possível verificar as bactérias nos vasos à esquerda (seta); (D) corte longitudinal mostrando a formação de cristais ao longo do vaso. C = Cristais.

Em folhas nas áreas com amarelecimento e o sintoma chamado de mancha de goma, quando preparadas para ML, observou-se à elevação do tecido do limbo foliar, com a deposição da substância semelhante a goma junto à deposição de um material escuro nos espaços intercelulares e a hipertrofia das células da bainha (Figura 7 A-B). A mesma região quando preparada para MET revelou uma degradação dos cloroplastos nas células do parênquima paliçádico, com a presença de um grande número de vesículas e de um material osmofílico no interior das células (Figura 7 C). Na região da bainha, verificou-se a presença de células com hipertrofia e a deposição de material nos espaços intercelulares, possivelmente goma e compostos fenólicos (Figura 7 D).

4.5 Discussão

O conhecimento do modo como o patógeno coloniza a planta e como a planta reage a essa colonização é de extrema importância para o desenvolvimento de medidas de controle das doenças. No caso, de *X. fastidiosa* em citros pouco conhecimento se tem a respeito da colonização da planta (Simpson et al., 2000). Este estudo trouxe importantes informações sobre o mecanismo pelo qual a bactéria coloniza o pecíolo das folhas de plantas de laranjeira pêra. Inicialmente, foi observado que a bactéria coloniza principalmente, os vasos mais externos do xilema do pecíolo (Figura 1A), e que estes são, em sua maioria, vasos pontuados. Este fato pode ter duas explicações, sendo que no caso da primeira, como os vasos pontuados estão mais externos, estes são de mais fácil acesso às cigarrinhas responsáveis pela transmissão da bactéria. Nós temos realizado medidas em estiletes de cigarrinha transmissoras da bactéria para citros e temos constatado que estes apresentam em torno de 500 μm de comprimento (dados não mostrados). Considerando 15 μm o diâmetro médio dos vasos do xilema de citros o comprimento do estilete seria suficiente para inocular a bactéria em qualquer tipo de vaso do pecíolo, porém torna-se mais fácil para o inseto alimentar-se dos vasos localizados mais externamente. Como as plantas utilizadas neste trabalho são de inoculação natural esta é uma hipótese provável. Na segunda explicação, a bactéria poderia ter uma preferência por vasos pontuados. Estes vasos apresentam uma

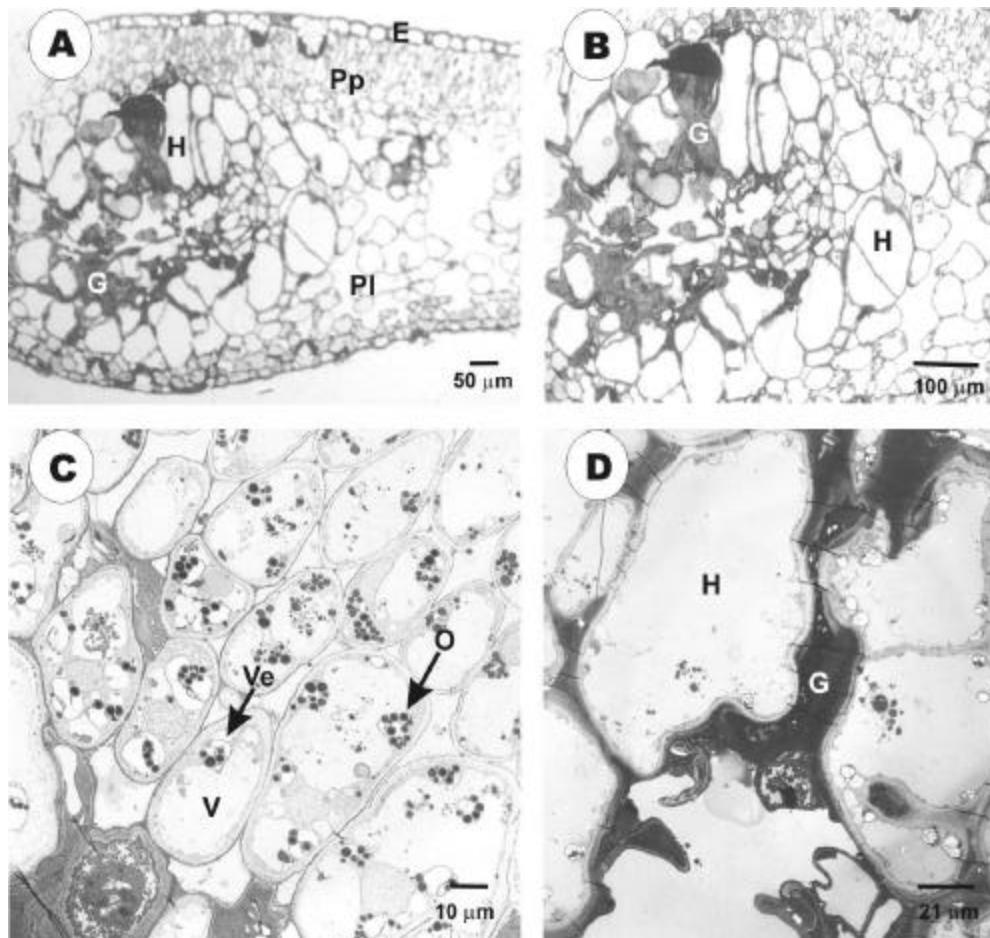


Figura 7- Fotomicrografia (A-B) e eletromicrografia de transmissão (C-D) da região da folha de plantas de laranja pêra infectadas com *X. fastidiosa*. (A) corte transversal do limbo foliar mostrando uma maior espessura do limbo na região da bainha, com a presença de hipertrofia (H) e deposição de material nos espaços intercelulares (G); (B) um detalhe da área afetada mostrada em A; (C) eletromicrografia mostrando uma região do parênquima paliçádico próximo à região da bainha. Pode se observar alterações no citoplasma com a degradação dos plastídios, presença de glóbulos osmofílicos (O) e um grande número de vesículas (Ve); (D) eletromicrografia mostrando detalhes da região com hipertrofia das células (H) e deposição de material nos espaços intercelulares, possivelmente goma e compostos fenólicos (G). V = vacúolo, E = epiderme, PP = parênquima paliçádico e Pl = parênquima lacunoso.

constituição química da parede, com maior quantidade de lignina e uma condutância hidráulica diferente dos demais vasos do xilema, como constatado por Leperen et al. (2000), o que poderia explicar uma certa preferência de *X. fastidiosa* por vasos pontuados em citros.

Outra importante contribuição do trabalho foi trazer novas e fortes evidências de que *X. fastidiosa* é capaz de degradar a parede primária das pontuações e migrar para vasos adjacentes, o que explicaria a migração radial da bactéria na planta, o que é suportado pelos resultados da: a) MEV, mostrando a bactéria no interior das pontuações (Figura 1C, D e 2C); b) MET, que também mostra a bactéria no interior das pontuações (Figura 4B), o acúmulo de bactérias próximo às pontuações (Figura 1A) e a degradação da parede primária nas pontuações (Figura 4B, C e D) e c) imunomarcação, onde se observa a ausência de marcação com ouro coloidal, contendo anticorpo contra componentes da parede primária (Figura 5A e B). Essas observações associadas aos resultados de Fry et al. (1994) que verificaram a produção de algumas proteases, aos de Simpson et al. (2000) que identificaram genes precursores de poligaracturonases e um de celulase no genoma da *X. fastidiosa* e aos de Wulff (2002) que expressou alguns destes genes em *E. coli* tornam quase certo que *X. fastidiosa* utiliza as pontuações para a migração inter-vasos. Este modelo de colonização já foi descrito para bactérias do gênero *Pseudomonas*, dentre estas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* que causa cancro em ameixeira (Roos & Hattingh, 1987)

Foi também mostrado neste estudo, através da MEV as diversas fases de colonização dos vasos. Pelo que pôde ser constatado, a colonização de vasos adjacentes inicia-se com a migração de uma célula da bactéria para o vaso adjacente através das pontuações. Esta migração parece ocorrer da seguinte forma: uma ou mais bactérias presentes no interior das pontuações, após degradarem a parede primária (membrana da pontuação) que separa um vaso de outro, produzem células filhas que passam para o vaso adjacente, nas Figuras 1D e 4 B (podem ser vistas bactérias em divisão no interior das pontuações). A partir destas células, inicia-se a formação do biofilme no lúmen do novo vaso colonizado. Como pode ser observado, as primeiras células aderidas não apresentam material fibrilar e nem goma ao seu redor (Figura 2A e B), porém a medida

que a colônia vai aumentando verifica-se a presença de material fibrilar que vai envolvendo toda a colônia (Figura 2C, D e E), sendo que em seguida vem a produção e a deposição de goma, tornando o agregado complexo. Essas observações estão de acordo com o verificado por Watnick & Kolter (2000), onde os polissacarídeos extracelulares produzidos pelas bactérias são importantes para a arquitetura do biofilme, mas não para o início da adesão. A presença de material fibrilar associado a *X. fastidiosa* em vasos do xilema de videira também foi constatada por Tyson, et al. (1985). Quando a bactéria necessita colonizar outros sítios dentro do mesmo vaso, parece ocorrer a produção de enzimas que tornam o agregado mais flexível (Figura 3B), permitindo a migração sistêmica da bactéria possivelmente por influência do fluxo do xilema. Esta descrição do processo está de acordo com o modelo desenvolvido por Leite et al. (2002).

O último ponto a ser comentado com relação a este trabalho diz respeito a uma possível reação da planta de laranjeira pêra a colonização por *X. fastidiosa*. Como pode ser observado na Figura 6, ocorreu a formação de cristais com forma de ráfides no lúmen de vasos do xilema do pecíolo infectados com a bactéria. Estes cristais se formam em vasos próximos aos colonizados pela bactéria (Figura 6C) e ao longo do vaso (Figura 6 D). Observações mostraram que estes cristais se formavam no lúmen a partir das pontuações, indicando que os mesmos originavam-se de células do parênquima do xilema. A princípio acreditava-se que estes cristais eram de oxalato de cálcio, porém a microanálise de raio X mostrou que os mesmos não apresentavam alta concentração de cálcio e que apresentavam constituição principalmente carbônica (dados não mostrados). Possivelmente, tais cristais sejam de hesperidina, um glicosídeo comum em plantas de laranjeira descoberto por Lebreton em 1828 e reconhecido como glicosídeo por A. Hilger & E. Hoffmann em 1876. Esta substância contém vitamina P e está relacionada ao mecanismo de defesa de plantas de citros (Swingle & Reece, 1967). Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) observaram, através da ML, a presença de cristais desta substância, em vasos do xilema de nervuras de folhas de laranjeira infectadas com *X. fastidiosa*. Segundo Erickson (1968), a hesperidina pode precipitar formando ráfides (cristais em forma de agulha) quando os tecidos de citros são expostos à secagem, congelamento ou contato com algum tipo de álcool. Devido à grande quantidade destes

cristais nos vasos, o que provavelmente ocorreu foi à precipitação de hesperidinas que se tinham acumulado nas células do parênquima do xilema, anexas aos vasos colonizados por *X. fastidiosa*. Quando da preparação para a microscopia de varredura estas substâncias se precipitaram e através das pontuações formaram cristais no interior do lúmen do xilema. Na folha, foi também observado sintomas, como a hipertrofia de células dos parênquimas, presença de material nos espaços intercelulares e degradação do citoplasma (Figura 7 C). Estes sintomas também foram observados por Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999). Os sintomas de hipertrofia podem estar relacionados a um desequilíbrio hormonal, como já verificado para a *X. fastidiosa* em videira (Goodwin et al., 1988; Purcell e Hopkins, 1996) e pessegueiro (French et al., 1978). Quanto ao material depositado nos espaços intercelulares, uma possível constituição pode ser de goma (composta de polissacarídeos) e também de compostos fenólicos, já que o material apresenta característica osmiofílica. A degradação dos cloroplastos, o grande número de vesículas e a desorganização do citoplasma, verificados na Figura 7 C, podem explicar a redução da taxa de fotossíntese, fato que foi verificado em videira e citros infectados por *X. fastidiosa* por Goodwin et al. (1988) e Machado et al. (1994), respectivamente.

5 ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Xylella fastidiosa* COM DIFERENTES VARIEDADES DE FUMO (*Nicotiana tabacum*): ASPECTOS EXPERIMENTAIS, ULTRAESTRUTURAIS E SINTOMATOLÓGICOS

5.1 Resumo

Desde a indicação do potencial do fumo (*Nicotiana* spp) como hospedeiro experimental para a *Xylella fastidiosa*, trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de se estabelecer as melhores condições experimentais para este patossistema. No presente trabalho, o objetivo foi avaliar as variedades TNN, Havana e RP1 e alguns fatores ultraestruturais e experimentais que podem interferir na expressão dos sintomas. Dezesesseis plantas de cada variedade foram mantidas em substrato Plantimax sob telado. Aos 30 dias de idade receberam 200 µL e 500 µL de uma suspensão de células bacterianas (1×10^6 UFC/mL) obtidas a partir do cultivo em meio PW por 15 dias, a qual foi injetada na base das hastes ou dos pecíolos, com o auxílio de seringa de insulina. Após 45 dias da inoculação foram observados sintomas gerais de murcha, amarelecimento e necrose das folhas baixas em todas as variedades, porém sintomas típicos da doença não foram observados até 75 dias. As plantas foram então podadas a 15 cm do substrato e após 30 dias, foram observados os sintomas típicos nas folhas mais baixas, caracterizados por pequenas lesões no bordo das folhas, manchas translúcidas, depois necróticas com um halo amarelado. A confirmação da presença da bactéria foi efetuada através da observação dos vasos do xilema do pecíolo por microscopia eletrônica de varredura e do re-isolamento da bactéria em meio PWG.

Não foram observadas diferenças entre as variedades com relação ao aparecimento dos sintomas e o número de vasos colonizados, cuja as porcentagens foram de 4,9, 4,6 e 6,2% para TNN, Havana e RP1, respectivamente. Os locais de inoculação, os volumes do inóculo testados também levaram a quadro sintomatológico semelhantes. Entretanto, a variedade Havana foi a que apresentou os sintomas mais intensos. Observou-se ainda uma reversão dos sintomas após adubação das plantas com sulfato de amônio e que a poda pode ser uma boa técnica para aumentar a longevidade de plantas, que se deseja manter em casa de vegetação como fonte de inóculo bacteriano.

5.2 Introdução

A clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *X. fastidiosa*, tornou-se uma importante doença dessa cultura nos últimos 15 anos. No Estado de São Paulo, responsável por 83% da produção nacional de citros, a bactéria tem sido encontrada em praticamente todas as áreas produtoras (Amaro et al., 1998), sendo que os prejuízos podem chegar a mais de um milhão de dólares ao ano, com aproximadamente 30% das plantas afetadas pela bactéria (Monteiro et al., 2001b).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados procurando entender o processo de colonização das plantas de citros por *X. fastidiosa*. Porém, o desenvolvimento de muitos destes trabalhos tem sido dificultado devido à falta de um hospedeiro experimental adequado, com rápida expressão de sintomas, já que as plantas de citros normalmente necessitam de um período de seis meses a um ano para apresentar os sintomas de CVC (Chang et al., 1993; Hartung et al., 1994). Esta necessidade tornou-se ainda maior depois do completo seqüenciamento do genoma da *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000) e da implementação do projeto “Genoma Funcional de *X. fastidiosa*” financiado pela FAPESP, o qual objetiva o estudo dos prováveis genes de patogenicidade da bactéria.

Lopes et al. (2000) mostraram o potencial do fumo (*Nicotiana* spp) como hospedeiro experimental para a *X. fastidiosa* e verificaram que a variedade RP1 desta planta quando infectada pela bactéria apresenta sintomas típicos caracterizados por pequenas manchas escuras, necróticas e com halo amarelado nas margens das folhas.

Desde então, trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de se estabelecer as melhores condições experimentais para este patossistema. Nesse sentido, no presente estudo procurou-se avaliar as variedades TNN, Havana e RP1 de fumo, tentando determinar as melhores condições experimentais para utilização dessa hospedeira, as variações na sintomatologia e estudar através da MEV a maneira pela qual a bactéria coloniza as plantas.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Condições experimentais e inoculação

O experimento foi realizado na área experimental do Setor de Fitopatologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ, no período de setembro de 2000 a outubro de 2001. Sementes de fumo das variedades TNN, Havana e RP1 foram colocadas em bandeja de plástico contendo o substrato Plantimax. Quando as plântulas apresentavam duas folhas definitivas 16 mudas de cada uma das variedades foram transferidas para sacos plásticos contendo 2 L de substrato Plantimax, sendo mantidas em telados. Aos trinta dias de idade, com aproximadamente 5 folhas definitivas, as plantas foram inoculadas nos pecíolos ou na base das hastes, utilizando-se seringa com agulha de insulina (Lopes et al., 2000), com volume de 200 μ L ou 500 μ L, dependendo do tratamento, com uma suspensão de células de *X. fastidiosa* (1×10^6 UFC/mL em meio PW líquido). Na inoculação foi utilizado o isolado 9a5c de *X. fastidiosa* (Chang et al., 1993b), com quinze dias de crescimento em meio PW, nas condições de 28 °C e 150 RPM de agitação.

Após a inoculação, as plantas foram retornadas ao telado e adubadas com 1g de NPK (04-14-08) mais 0,5 g sulfato de amônio por recipiente para a manutenção do vigor. Após trinta dias, as plantas foram novamente adubadas com 1 g de sulfato de amônio. Depois de 75 dias da inoculação, as plantas foram podadas a 15 cm da base e adubadas com 1 g de sulfato de amônio, para recuperação do vigor. Este procedimento foi repetido mais duas vezes para que as plantas alcançassem a idade de um ano em condições de manter a bactéria de forma viável.

A presença da bactéria nos tecidos foi confirmada pela observação direta da *X. fastidiosa* no interior dos vasos do xilema do pecíolo das folhas de fumo usando a MEV e pelo re-isolamento da bactéria em meio PWG. Para o registro dos sintomas nas plantas foram utilizadas câmera comum ou digital, e scanner.

5.3.2 Coleta das amostras e preparo para MEV

As amostras foram coletadas em três períodos sempre 30 dias após a poda quando as plantas já apresentavam folhas sintomáticas. Foi sempre coletada a folha mais na base da brotação com maior intensidade de sintoma e a primeira folha acima que estivesse assintomática.

O preparo das amostras para MEV e observação das mesmas em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP. Pecíolos de três folhas sintomáticas e assintomáticas de cada amostra, depois de coletados, foram imersos em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2, por um período de 24 h. Em seguida, foram transferidos para líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30 min e cortados transversalmente em nitrogênio líquido. As secções obtidas foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e subsequentemente desidratada em uma série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em *stubs* cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP. Foram geradas e registradas digitalmente imagens geradas a 1500 vezes de aumento para contagem do número de vasos colonizados e também a outros aumentos, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20 Kv e distância de trabalho de 9 mm.

As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9 e selecionadas para a elaboração deste capítulo.

5.3.3 Reisolamento da bactéria em meio PWG

Para o isolamento da bactéria das folhas utilizou-se o método de Hill & Purcell (1995a), adaptado por Almeida et al. (2001). O pecíolo e parte da nervura central das

folhas amostradas foram separados, a superfície esterilizada no interior de uma câmara de fluxo laminar utilizando Clorox 5 % , cortados em pequenos pedaços e transferidos para tubos de vidro (16 cm de diâmetro) contendo 2 mL de PBS, pH 7,2. As amostras foram homogeneizadas a 25000 rpm em homogeneizador de tecidos (modelo Turrax, Marconi S.A., Piracicaba, SP, Brasil). A suspensão homogeneizada foi diluída 10 vezes e então plaqueada em meio sólido *Periwinkle Wilt Gelrite* (PWG) Hill & Purcell (1995a). As placas foram colocadas em incubadora a 28 °C por duas semanas, quando o número de unidades formadoras de colônias foi estimado. A quantidade de UFC/g de tecido foliar foi calculada com base no peso inicial das amostras e diluição. Colônias de cada isolado foram submetidas ao teste PCR “polymerase chain reaction” para confirmar a presença da bactéria *X. fastidiosa*.

5.4 Resultados

5.4.1 Quadro sintomatológico apresentado pelas plantas

Após 45 dias da inoculação foram observados sintomas gerais de murcha, amarelecimento, florescimento precoce e necrose das folhas inferiores em todas as variedades, sendo que estes foram mais intensos nas plantas inoculadas. Porém até 75, dias os sintomas típicos da doença em fumo, como descritos por Lopes et al. (2000) e descritos acima, não foram observados. As plantas foram então podadas a 15 cm do substrato e adubadas, o que resultou na recuperação do vigor. Após 30 dias da poda, foram observados os sintomas da doença (Figura 1) em todas as variedades, sendo que o período entre o aparecimento dos sintomas nas primeiras plantas e nas últimas foi de aproximadamente 15 dias. Para variedade RP1, os sintomas verificados foram pequenas lesões no bordo das folhas mais velhas das brotações, que iniciaram como manchas translúcidas, e muitas vezes eram circundadas por um amarelecimento (Figura 1B). Na variedade TNN foram observadas apenas manchas amareladas entre as nervuras (Figura 1 C e E). Entretanto, os sintomas mais intensos e o maior vigor foram verificados na variedade Havana com pequenas manchas necróticas em toda a folha (Figura 01 A e D), que após 20 dias, evoluíram para a coalescência e senescência total das folhas. Nesta

variedade, foram também observadas pequenas manchas translúcidas que se tornavam necróticas nas hastes (Figura 2), o que não foi verificado nas demais variedades e nas plantas-controle desta variedade. As plantas inoculadas das três variedades se mostraram também mais sujeitas ao estresse hídrico. Nas horas mais quentes do dia, enquanto as testemunhas se mostravam túrgidas, as inoculadas apresentavam-se murchas. Finalmente, não foram observadas diferenças entre as variedades com relação ao aparecimento dos sintomas no que se refere aos locais de inoculação ou ao volume do inóculo aplicado.

5.4.2 Reversão e atraso nos sintomas pela adubação com sulfato de amônio

Observou-se uma reversão dos sintomas após adubação das plantas com sulfato de amônio. Essa reversão foi observada todas às vezes, que, as plantas com sintomas foram adubadas. Com respeito a essa reversão, as folhas e as áreas que estavam amareladas se tornavam verdes e na região ao redor dos pontos necróticos, o tecido tornava-se saliente e os pontos necróticos deprimidos e as folhas apresentavam um verde mais intenso e com uma textura mais consistente (Figura 3). Observou-se também que a adubação atrasou a expressão dos sintomas, sendo necessário um período de aproximadamente um mês após a adubação para que o quadro sintomatológico reaparecesse.

5.4.3 Reisolamento das colônias de *X. fastidiosa* em meio sólido e observação dos pecíolos em MEV

O reisolamento de *X. fastidiosa* a partir das folhas de fumo infectadas revelou uma população média de bactérias em torno de 1×10^6 UFC/g de pecíolo nas três variedades. O teste de PCR foi positivo para todas as colônias com morfologia e dimensões similares às de *X. fastidiosa*.

A MEV dos pecíolos das folhas, com sintomas similares aos das utilizadas no isolamento, mostrou a presença de bactérias com morfologia e dimensões semelhantes

às de *X. fastidiosa* (Hartung et al., 1994) aderidas às paredes dos vasos, formando

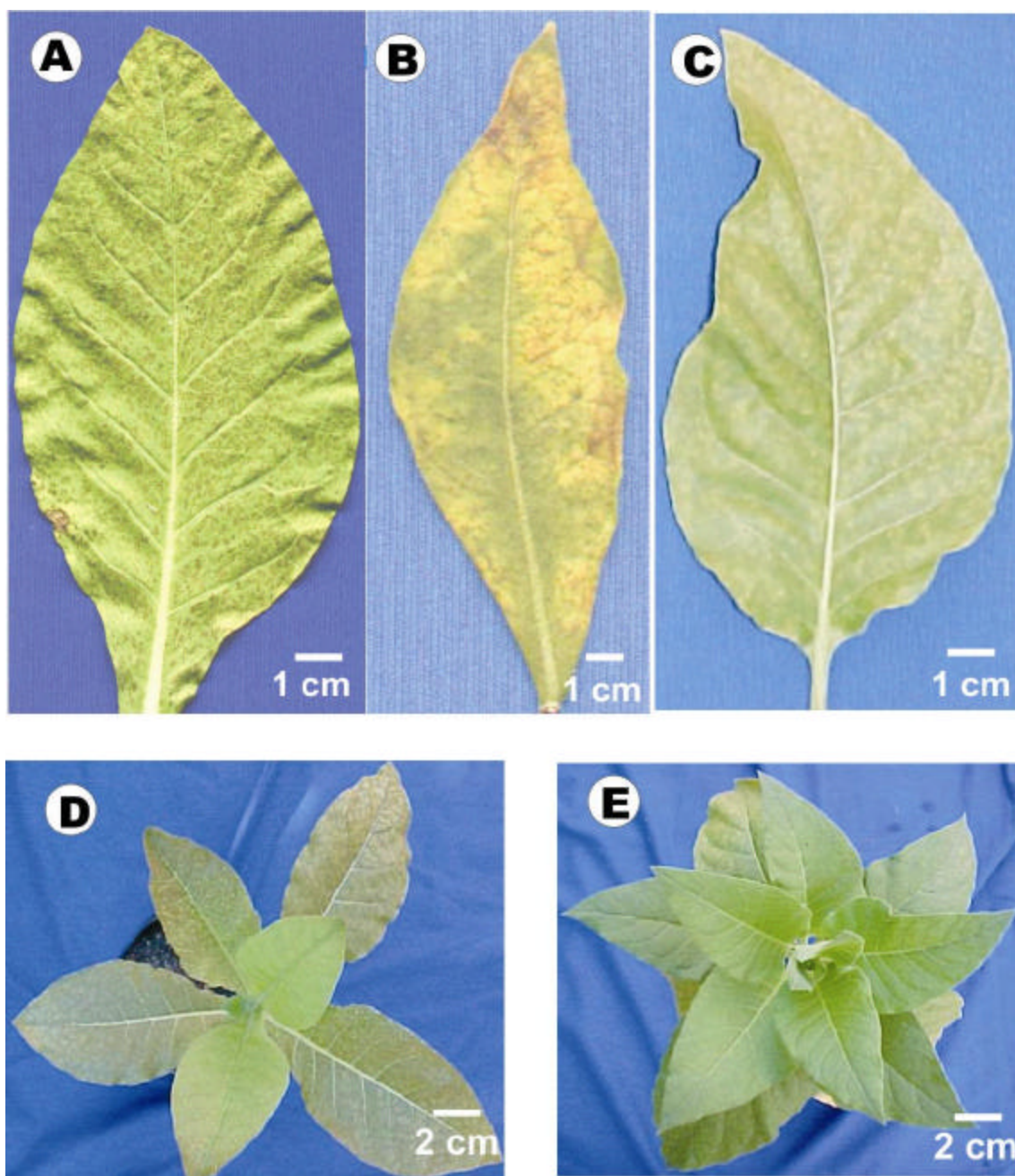


Figura 1- Sintomas de *Xylella fastidiosa* observados em folhas de três variedades de fumo: (A) Havana; (B) RP1; (C) TNN; (D) vista superior de uma planta de Havana infectada; (E) vista superior de uma planta de TNN infectada. Observe os sintomas da infecção nas folhas localizadas na base das plantas.



Figura 2- Sintomas em hastes da variedade de fumo Havana infectadas com *Xylella fastidiosa*. Planta controle a esquerda e sintomática a direita. Foto obtida 120 dias após a inoculação.

agregados e com a presença de material com aparência fibrilar e de goma nos vasos do xilema (Figuras 4B e 5). Apesar das folhas estarem sintomáticas, apenas poucos vasos estavam colonizados por *X. fastidiosa* e estes se apresentavam espalhados pela secção (Figura 4A). A porcentagem média de vasos colonizados encontrada foi de 4,9, 4,6 e

6,2% para TNN, Havana e RP1, respectivamente. Não foi possível encontrar a bactéria nas folhas de plantas infectadas, mas sem sintomas.

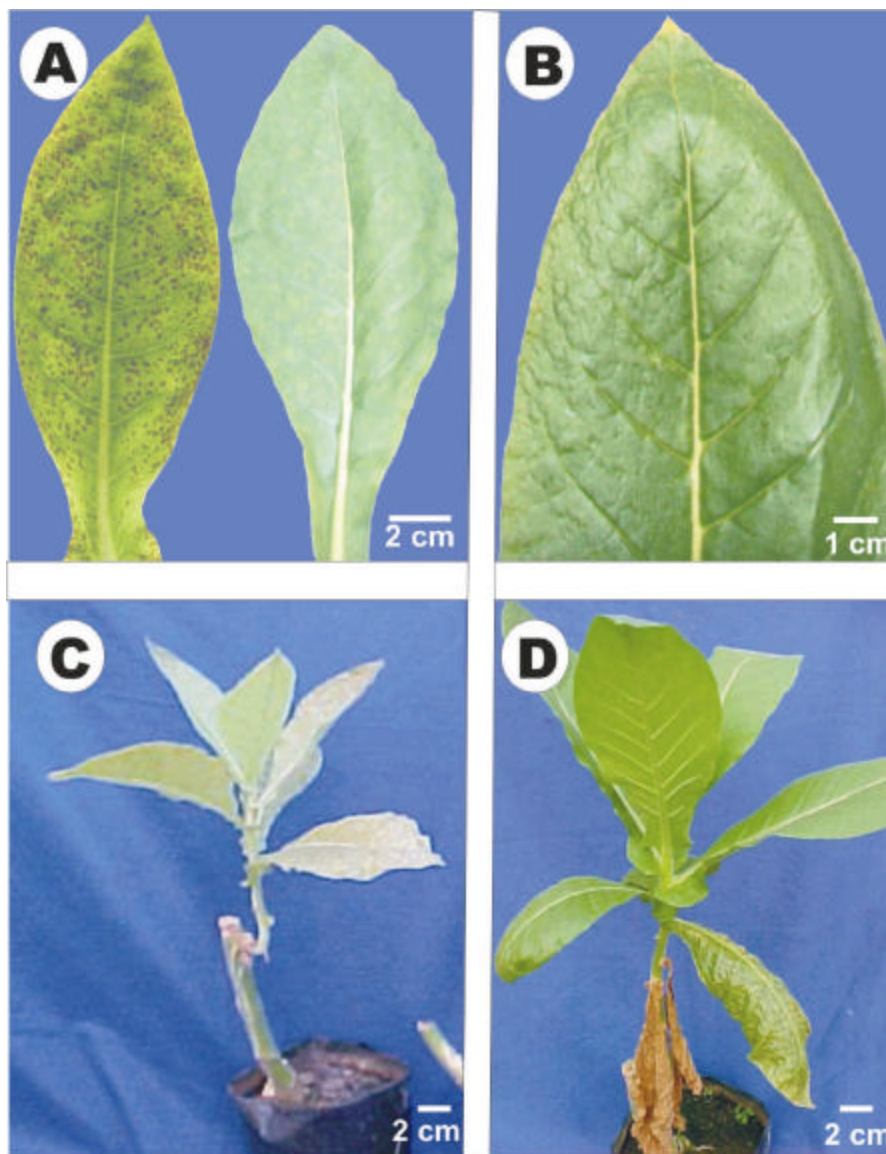


Figura 3- Detalhes da reação de plantas de fumo, variedade Havana, infectada com *Xylella fastidiosa* à adubação com sulfato de amônio. (A) Folha de uma planta não adubada a esquerda e de uma adubada a direita; (B) folha de planta que foi adubada quando os sintomas iniciais já eram visíveis (observe a reversão dos sintomas e que a folha apresenta-se ainda um pouco encurvada); pode-se observar a depressão dos pontos onde os sintomas necróticos estão

localizados; (C) Planta de fumo antes da adubação e (D) 20 dias após a adubação com sulfato de amônio.

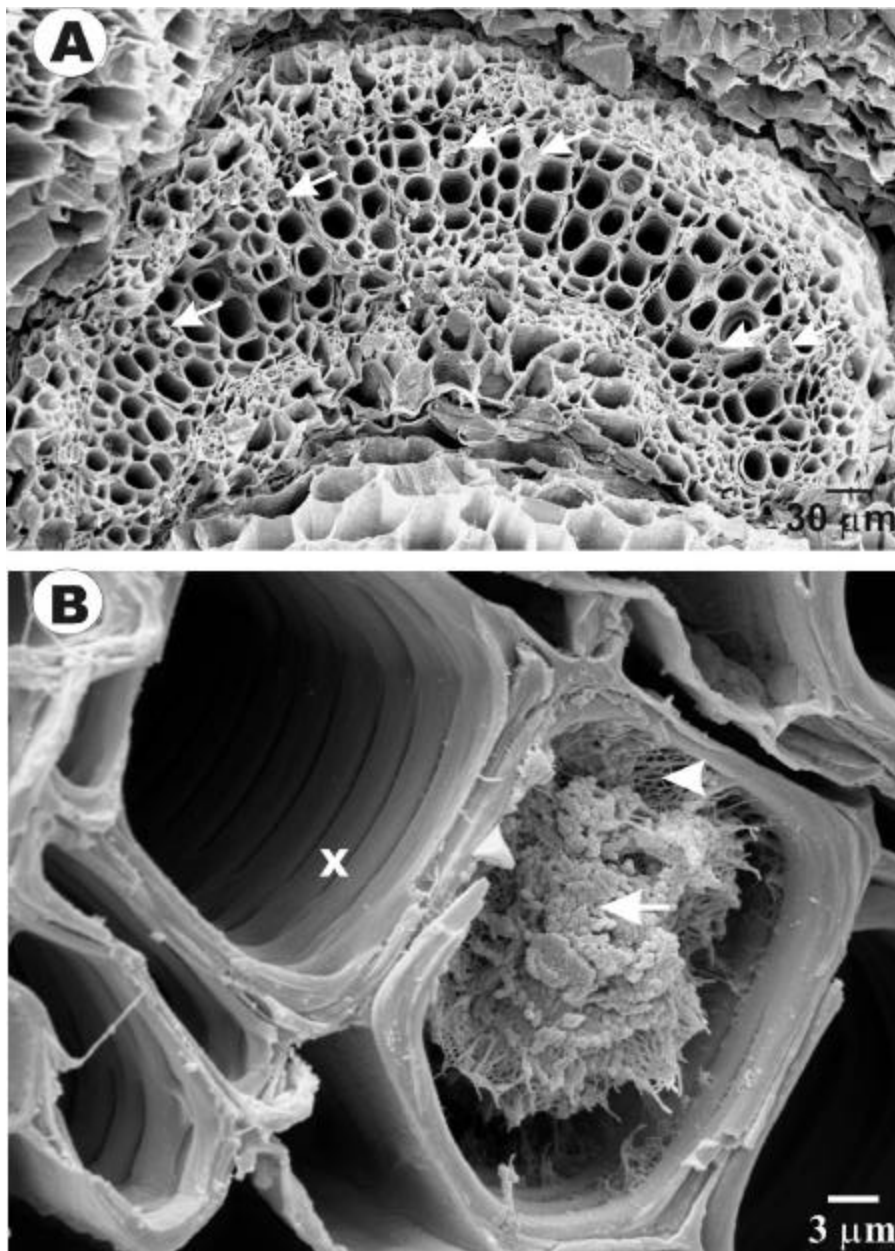


Figura 4- Eletromicrografia de varredura de pecíolos de folhas de plantas de fumo infectada por *Xylella fastidiosa*. (A) Variedade RP1 (as setas indicam os poucos vasos colonizados pela bactéria). (B) Detalhes mostrando vasos espiralados do xilema de fumo da variedade Havana (X) e vasos ocluído à

direita com agregados da bactéria (seta) e possivelmente material fibrilar (cabeça de seta). Foto obtida de plantas após 120 dias da inoculação.

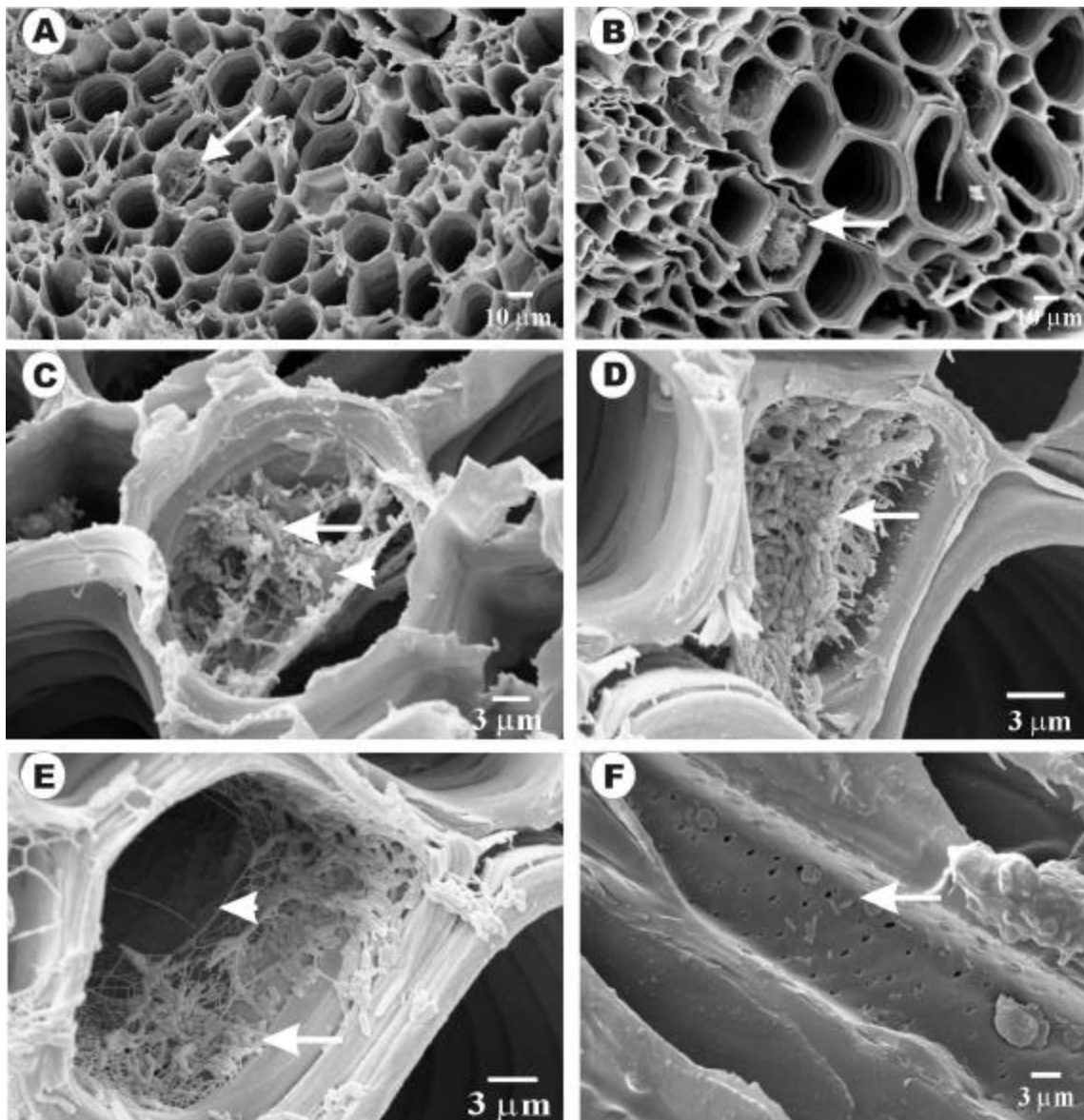


Figura 5- Eletromicrografia de varredura de pecíolo de folhas de plantas de fumo infectados com *X. fastidiosa*: (A e C) variedade RP1, (B, D e F) variedade Havana e (E) variedade TNN. Em (A) e (B) a seta indica vaso colonizado, em (C-D) a seta indica bactéria. Cabeça de seta em C indica presença de goma junto às bactérias e em (E) material fibrilar; (F) Secção longitudinal (a

seta indica a presença da bactéria na pontuação). (A- E) Secção transversal do pecíolo.

5.5 Discussão

Os sintomas gerais de murcha, amarelecimento das folhas inferiores, florescimento precoce e necrose marginal não haviam ainda sido verificados em plantas de fumo. Porém podem estar relacionados à infecção por *X. fastidiosa*, já que se tratam de sintomas envolvidos com as alterações fisiológicas provocadas pela bactéria em plantas, como já verificado em videira e citros por Goodwin et al.(1988) e Machado et al. (1994), respectivamente. Foram também verificados, em duas das variedades estudadas, sintomas similares àqueles observados por Lopes et al. (2000) em folhas de fumo infectadas por *X. fastidiosa*. A primeira, RP1, foi à mesma variedade do referido trabalho, enquanto que a variedade Havana trata-se de uma nova variedade até então não estudada. Entretanto, na variedade TNN, os sintomas observados diferiram das demais, visto que esta variedade apresentou apenas amarelecimento internerval. Na variedade Havana os sintomas foram mais evidentes e a planta manteve as folhas sintomáticas por um período maior de tempo, o que nos leva a pensar que esta variedade apresenta uma melhor resposta que as demais na expressão dos sintomas, e que ao mesmo tempo, apresenta um maior vigor ou capacidade de recuperação, já que a população da bactéria e o número de vasos colonizados nas três variedades não diferiram entre si. Os sintomas verificados em haste da variedade Havana ainda não haviam sido descritos para *X. fastidiosa* em fumo. Em nosso estudo, o tempo para a expressão dos sintomas em torno de 120 dias foi um pouco maior do que o obtido por Lopes et al. (2000), aproximadamente 80 dias para observação dos sintomas iniciais. Como verificado por estes autores, o tempo necessário para o aparecimento dos sintomas em fumo pode variar. Esta variação pode ser devido a fatores como: a variedade da planta utilizada, o volume do inóculo, a temperatura e a condição nutricional. Entretanto, neste estudo a causa mais provável da variação deve ter sido a nutricional, já que adubações foram feitas e visto que a influência do volume do inóculo não foi constatada. Como pôde ser verificado (Figura 3), a adubação com sulfato de amônio, retardou o aparecimento, bem como reverteu os sintomas nas brotações surgidas após a poda. Como este fertilizante

havia sido aplicado, anteriormente, o mesmo pode ter interferido no aparecimento dos sintomas iniciais. A relação entre *X. fastidiosa* e deficiência nutricional é bem conhecida em citros (Rossetti & De Negri, 1990). Leite et al (2002), ao desenvolverem um modelo para explicar a adesão e colonização de *X. fastidiosa* em vasos do xilema, consideraram que os agregados da bactéria poderiam atuar como um filtro atraindo e imobilizando nutrientes transportados pelo xilema, o que impedia que os mesmos chegassem às folhas. Estes autores consideraram ainda que muitos destes nutrientes, como o cálcio e o enxofre, podem ser utilizados pela bactéria no processo de adesão. Considerando este fato, é provável que a adubação possa suprir em parte a deficiência dos nutrientes imobilizados pela bactéria e desta forma retardando a expressão dos sintomas.

A ausência de relação entre o volume do inóculo e o tempo para a expressão dos sintomas pode ter sido devido aos elevados volumes aplicados (200 ou 500 µl), acima do utilizado por Lopes et al. (2000) que foi de 100 µl. É possível que quando da inoculação nem todas as células bacterianas inoculadas encontrem um sítio para a adesão, devido ao fato de que acima de um certo volume estes sítios fiquem saturados. Ainda com relação aos sintomas, a obstrução de vasos não parece ser o responsável pela expressão dos mesmos, já que, um pequeno número de vasos do pecíolo das folhas de fumo apresentava-se colonizados (Figura 4). Os valores verificados nas três variedades estão bem abaixo dos observados para citros, cafeeiro e ameixeira (cap3). No caso, o fumo deve se comportar de maneira análoga a citros, no qual a sintomatologia não está relacionada ao número de vasos colonizados (Alves et al, 2003; Pascholati et al., 2002).

Uma das possíveis utilizações de plantas de fumo infectadas por *X. fastidiosa* envolve os estudos da transmissão da bactéria pelos vetores. No entanto, devido ao baixo número de vasos colonizados e à distribuição irregular da bactéria na planta, é provável que a mesma não seja adequada para esta finalidade, já que devido a esses fatores, a chance do vetor adquirir a bactéria é pequena. Segundo Hill & Purcell (1997), a taxa de transmissão aumenta quando a população da bactéria na planta também aumenta e que a mesma está relacionada ao local na planta onde a cigarrinha vetora se alimenta para adquirir *X. fastidiosa*.

A poda das plantas com baixo vigor e em início de florescimento, a 15 cm do substrato, se mostrou uma boa prática para a manutenção da longevidade das plantas e expressão dos sintomas. Uma maior longevidade é importante para a manutenção dos isolados da bactéria por mais tempo, sem a necessidade de novas inoculações.

Através das imagens de microscopia de varredura (Figura 5), observou-se que *X. fastidiosa* coloniza os vasos do xilema de fumo de maneira semelhante aos observados para videira (Tyson et al., 1985) e citros (cap. 4). A adesão da bactéria às paredes e a agregação, com conseqüente oclusão do lúmen dos vasos do xilema com a formação de agregados compactos, presença de material fibrilar e gomas são aspectos característicos de *X. fastidiosa* (Figuras 4B e 5), indicando que possíveis genes de patogenicidade da bactéria (Tyson et al., 1985; Silva et al, 2001; Leite et al., 2002) foram também ativos em fumo.

Em fumo, diferentemente de citros, a maioria dos vasos é do tipo espiralado (Figura 4 B). Este tipo de vaso pode facilitar a migração da bactéria vaso a vaso, radialmente, (Alves, 2003) o que poderia explicar a maior rapidez na expressão dos sintomas em fumo (aproximadamente 100 dias), quase a metade do tempo requerido por citros.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que: a variedade Havana é a mais indicada das três para o desenvolvimento de trabalhos com *X. fastidiosa*; a adubação das plantas com fontes de nitrogênio deve ser bem planejada quando se deseja uma expressão mais rápida dos sintomas; um volume de inóculo de 200 μ l (10^6 UFC/mL) aplicado na haste ou pecíolo é suficiente para a expressão de sintomas relacionados à colonização pela *X. fastidiosa*, os quais são intensificados pela poda.

6 ESTUDO DA ADESÃO E COLONIZAÇÃO DE INSETOS VETORES POR *Xylella fastidiosa* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

6.1 Resumo

X. fastidiosa é o agente causal de várias doenças de importância econômica no mundo, sendo que no Brasil, as principais culturas afetadas são citros, cafeeiro e ameixeira. Tem sido verificado que *X. fastidiosa* é transmitida para essas plantas principalmente por insetos vetores, as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). Estudos com cigarrinhas em videira têm evidenciado os sítios de retenção da bactéria e que a mesma é transmitida de forma propagativa, mas não circulativa. Para as cigarrinhas de citros, cafeeiro e ameixeira, comumente encontradas no Brasil, até o momento não se tem conhecimento dos sítios de retenção desse patógeno. O presente trabalho teve por objetivo estudar e determinar, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a adesão e os possíveis sítios de retenção de *X. fastidiosa* nas quatro principais espécies de cigarrinhas encontradas em pomares (*Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis*) e viveiros (*Bucephalagonia xanthophis*) de citros brasileiros. As observações mostraram os prováveis sítios de retenção de *X. fastidiosa* em três das quatro espécies estudadas. Células bacterianas com morfologia similar as de *X. fastidiosa* foram visualizadas aderidas pela parte lateral na câmara do cibário (sulco longitudinal, superfície do cibário e membrana do diafragma) de *A. citrina* e *O. facialis* e no sulco apodemal de *D. costalimai*, e pela parte polar

no precibário de *O. facialis*. Nenhuma bactéria com morfologia semelhante a *X. fastidiosa* pôde ser encontrada em *B. xanthophis*. Entretanto, foi possível verificar a presença de bactérias que pareciam estar degradando as paredes internas do cibário desta espécie de cigarrinha. A identificação do modo de adesão, sítio de retenção e como a bactéria coloniza o inseto vetor são aspectos básicos para o estudo dos genes envolvidos na adesão dos isolados brasileiros de *X. fastidiosa* e para o desenvolvimento de estratégias visando interferir no processo de transmissão da bactéria pelo vetor.

6.2 Introdução

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença causada por uma bactéria de crescimento limitado ao xilema, *X. fastidiosa*, que desde 1987 tem afetado a citricultura paulista e brasileira (Chagas et al. 1992; Chang et al., 1993; Rossetti et al., 1990) e nos últimos anos tem causado grandes perdas (Monteiro et al., 2001 b). Esta bactéria tem também afetado varias outras espécies de plantas no Brasil, sendo as principais, cafeeiro (Paradela Filho et al., 1997) e ameixeira (Kitajima et al., 1981)

X. fastidiosa pode ser transmitida para plantas hospedeiras por enxertia ou por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) principalmente as da subfamília Cicadellinae, que se alimentam nos vasos do xilema (Purcell & Hopkins, 1996). Embora um requisito para a transmissão seja a alimentação no xilema, tem-se observado uma eficiência variável de transmissão entre as cigarrinhas vetoras em citros, sendo que as da tribo Cicadellini são mais eficientes que as da Proconiini (Krügner et al., 2000). No Brasil, dentre as cigarrinhas vetoras com maior importância na transmissão da bactéria em condições de campo para citros estão *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* (*A. citrina*) e *Oncometopia facialis* (Roberto et al., 1996) e em viveiros *Bucephalagonia xanthophis* (Fundecitrus, 2000; Roberto et al., 2000). Esses insetos alimentam-se principalmente do suco dos vasos do xilema, de onde retiram aminoácidos e minerais. Em videira, uma característica importante que distingue a transmissão de *X. fastidiosa* de outros procariontos fitopatogênicos é o fato de que os adultos das cigarrinhas podem transmitir a bactéria logo após a aquisição e continuam a transmitir eficientemente pelo resto do ciclo de vida, que pode durar meses (Purcell et al., 1979), devido à capacidade da

bactéria de multiplicar-se no vetor (Purcell & Finlay, 1979). Purcell et al. (1979) também observaram através da microscopia eletrônica de varredura, que a bactéria pode formar densa agregação de células no precibário, na bomba do cibário e na entrada do esôfago do tubo digestivo anterior (estomodéu) dos insetos. A presença da bactéria na parte anterior do inseto, com retenção da infectividade por toda a vida do vetor, sugere que a transmissão é propagativa e não circulativa (Purcell & Finlay, 1979). Para cafeeiro e ameixeira ainda não se conhece a eficiência de transmissão pelas cigarrinhas vetoras. Com relação às espécies de cigarrinhas transmissoras de *X. fastidiosa* no Brasil, nenhum trabalho ultra-estrutural, visando à localização do sítio de retenção do patógeno, o modo de adesão e colonização foi realizado até o momento. O que seria importante já que as estirpes de *X. fastidiosas* em citros apresentam diferenças genéticas em relação às estirpes já estudadas de outros hospedeiros.

Tendo em vista estes fatores, o objetivo deste estudo foi observar os órgãos internos (estomodéu) de quatro das principais espécies de cigarrinhas encontradas em pomares e viveiros cítricos brasileiros, *A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai* e *O. facialis* (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae), associadas à transmissão de *X. fastidiosa* e identificar os sítios de retenção, o modo de adesão e a colonização dos isolados brasileiros de *X. fastidiosa* através da MEV.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Criação de insetos vetores sadios

Esta parte do experimento foi desenvolvida no Setor de Entomologia da ESALQ/USP pelo Prof. João R. S. Lopes e sua equipe. Cigarrinhas sadias foram obtidas através da criação de ninfas em plantas sadias (ou não hospedeiras) de *X. fastidiosa*. Para se obter os ovos de cigarrinhas, adultos de campo foram coletados e confinados para oviposição por 7 a 14 dias sobre plantas de *Vernonia condensata* (“boldo” ou “alumã”) ou citros *Citrus sinensis* (de viveiros certificados). Plantas de *V. condensata* contendo ovos de *B. xanthophis* ou *D. costalimai*, foram transferidas diretamente para gaiolas com formato retangular (50x60x70 cm) de tecido do tipo tule, para o desenvolvimento das

ninfas. Quando citros foi usado como planta para oviposição, as folhas com ovos foram destacadas e colocadas no interior de placas de Petri. Os pecíolos foram cobertos com um algodão úmido para manter as folhas túrgidas. As placas de Petri foram mantidas em incubação a 25 °C e monitoradas diariamente para a eclosão das ninfas. Ninfas recém eclodidas foram transferidas para plantas de boldo (não hospedeira de *X. fastidiosa*) no interior de gaiolas de criação. Para *A. citrina* e *O. facialis*, plantas sadias de citros foram utilizadas para o desenvolvimento das ninfas a partir do 3^o instar até a emergência dos adultos.

6.3.2 Aquisição do inóculo de *X. fastidiosa*

Para a obtenção de cigarrinhas infectivas, adultos de *A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai* e *O. facialis* foram submetidos a um período de acesso à aquisição (PAA) de 48 h em plantas-fonte sintomáticas de citros infectadas com o isolado CCT6570, ou de cafeeiro com o isolado CCT 6756 ou ameixeira com o isolado PLS1 de *X. fastidiosa* e mantidas em telados da área experimental do Setor de Entomologia da ESALQ/USP. Algumas cigarrinhas das espécies *A. citrina* e *D. costalimai* foram mantidas apenas em plantas sadias e utilizadas como controle. Para as espécies *B. xanthophis* e *O. facialis* não se teve insetos-controle com PAA em plantas sadias.

Após a aquisição as cigarrinhas foram mantidas em plantas de *V. condensata* sadias por um período variável de incubação e retenção da bactéria, de uma a quatro semanas, e em seguida preparadas para MEV. Uma parte foi retirada para o teste de PCR “Polymerize Chain Reaction”, conforme metodologia descrita por Ciapina & Lemos (2001) para a confirmação da presença da bactéria nos insetos. O número de insetos preparados de cada espécie e a data da preparação são apresentados na Tabela 01.

6.3.3 Preparação das cigarrinhas para Microscopia Eletrônica de Varredura

A preparação e observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizadas no NAP/MEPA da ESALQ/USP. As partes anteriores das cigarrinhas foram imersas em solução fixativa (Karnovisk`s modificado), pH 7,2 por um período de 24 h. Em seguida, foram transferidas para líquido crio-protetor (glicerol 30%) por 30

min e cortadas em vários planos (transversal, longitudinal; nos lados dorsal e ventral) em nitrogênio líquido, procurando direcionar os cortes para a região do cibário. As secções obtidas foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 h e subseqüentemente desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em *stubs* cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

Algumas vezes, uma variação da metodologia foi utilizada para facilitar a recuperação das partes seccionadas. Previamente a transferência dos espécimes para o glicerol 30 %, foi preparado um meio de ágar/água 5% e as partes do inseto foram imersas neste meio, o qual foi transferido para a geladeira por 1 h para adquirir consistência. Após este procedimento, pedaços do meio contendo as partes do inseto foram transferidos para o glicerol 30% e subseqüentemente seccionados e preparados para observação, conforme a metodologia descrita acima.

6.4 Resultados

6.4.1 Eficiência de exposição dos possíveis sítios de retenção de *X. fastidiosa*

Um total de 108 cigarrinhas foi dissecado, sendo 50 de *A. citrina*, 12 de *B. xanthophis*, 28 de *D. costalimai* e 18 de *O. facialis*. Destas, 91 cigarrinhas tiveram um PAA de 48 h em plantas infectadas com *X. fastidiosa* e 17 com PAA de 48 h em plantas saudáveis, sendo 12 de *A. citrina* e 5 de *D. costalimai* (Tabela 1). Deste total, em 49,1% dos insetos dissecados e preparados para MEV observou-se uma exposição e visualização satisfatória dos prováveis sítios de retenção de *X. fastidiosa*. Foi possível reconhecer em *A. citrina*, *D. costalimai* e *O. facialis* (Figura 1) e em *B. xanthophis* (Figura 2A) a câmara do cibário (ou bomba de sucção), membrana do diafragma, canal do precibário (canal estreito que liga os estiletos ao cibário), abertura do precibário, abertura do esôfago, sulco longitudinal do cibário (estreito canal que liga o canal do precibário a entrada do esôfago) e a membrana do diafragma (a qual forma uma cavidade dorsal,

chamada sulco apodemal). Foi também possível reconhecer outras partes do aparelho bucal do inseto como rostró (estojo anterior que segura os estiletes) e os músculos do diafragma (a musculatura clipeal que opera a bomba de sucção, conectada externamente no sulco apodemal e aos músculos do diafragma).

À medida que se foi adquirindo prática no corte das cigarrinhas utilizando-se nitrogênio líquido, o uso de ágar/água para envolver os espécimes previamente ao corte não foi mais necessário.

6.4.2 Localização de *X. fastidiosa* nos sítios de retenção

Nas cigarrinhas com PAA de 48 h em plantas sadias não foi possível encontrar qualquer bactéria. No entanto, nas cigarrinhas com PAA de 48 h em plantas infectadas foi possível encontrar bactérias com morfologia e dimensões correspondentes às de *X. fastidiosa* em 22 % do total de insetos dissecados ou 43,5% dos insetos dissecados com sucesso em três das espécies estudadas, sendo onze para a espécie *A. citrina*, seis para a espécie *O. facialis* e dois para a espécie *D. costalimai* (Tabela 1). Já para a espécie *B. xanthophis* não foi possível encontrar bactérias com morfologia semelhante a *X. fastidiosa*, porém em um espécime foram verificadas bactérias com forma de bastonetes curtos, aderidas às paredes internas da câmara do cibário. Estas bactérias com comprimento bem menor que os de *X. fastidiosa*, pareciam estar degradando a superfície interna ventral do cibário (Figura 2).

Em *A. citrina*, numerosos agregados de bactéria foram encontrados na face interna da membrana do diafragma, na base do músculo dilatador. Detalhada observação dos agregados mostrou a presença de um material amorfo, possivelmente goma fastidiana e material fibrilar junto às bactérias (Figuras 3 e 4). Ainda na parte interna do diafragma, entre os pontos de inserção dos músculos clipeais, foi possível verificar mais um provável sítio de ligação de *X. fastidiosa* (Figura 5). Em *A. citrina* foi ainda possível encontrar *X. fastidiosa* no sulco apodemal, no sulco longitudinal e no pré-cibário (Figura 6).

Das seis cigarrinhas da espécie *O. facialis* com presença de *X. fastidiosa*, três foram alimentadas em citros com isolado da CVC e três em ameixeira com o isolado

PLS. Nas que se alimentaram em cafeeiro, em nenhuma foi possível encontrar a bactéria. *X. fastidiosa* pôde também ser encontrada nas cigarrinhas alimentadas em citros no sulco longitudinal do cibário (imagem não mostrada). Nas cigarrinhas alimentadas em ameixeira infectadas com um isolado da PLS, *X. fastidiosa* foi encontrada no precíbário (canal e válvula do precíbário), na superfície ventral da câmara do cibário (região próxima ao precíbário) e no sulco longitudinal do cibário (Figuras 7, 8 e 9).

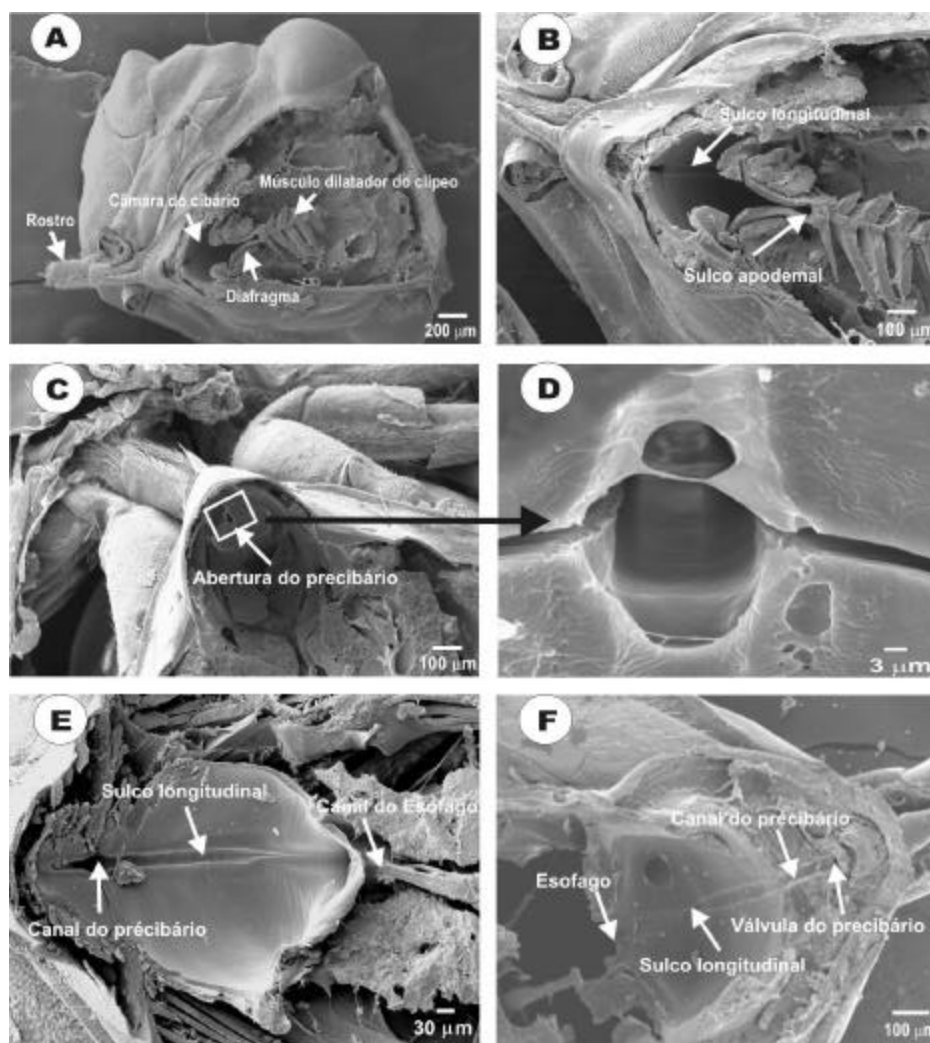


Figura 1- Eletromicrografia de varredura do corte longitudinal da cabeça de cigarrinhas de citros mostrando os prováveis sítios de retenção de *Xylella fastidiosa* e outras partes da cabeça (partes descritas nas imagens) (A-F). (A e B) *Acrogonia citrina*; (C-E) *Dilobopterus costalimai*, sendo (D) um detalhe do canal alimentar; (F) *Oncometopia facialis*.

Tabela 1. Número de cigarrinhas sadias ou infectadas com *Xylella fastidiosa* dissecadas e preparadas para MEV e frequência de sucesso na dissecação e visualização da bactéria nos insetos.

Data de dissecação	Planta fonte p/aquisição	Espécie de cigarrinha	Nº. de insetos dissecados		Nº. de insetos com sucesso ^a		Nº. de insetos com bactérias ^b	
			Inf. ^c	Sad. ^d	Inf.	Sad.	Inf.	Sad.
16/06/01	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Acrogonia citrina</i>	20	8	9	3	7	0
		<i>Dilobopterus costalimai</i>	12	5	7	2	2	0
5/07/01	<i>C. sinensis</i>	<i>A. citrina</i>	12	4	9	2	4	0
16/07/01	<i>C. sinensis</i>	<i>A. citrina</i>	2	-	2	-	0	-
		<i>D. costalimai</i>	4	-	2	-	0	-
5/12/01	<i>C. sinensis</i>	<i>A. citrina</i>	4	-	2	-	0	-
		<i>D. costalimai</i>	7	-	3	-	0	-
07/03/02	<i>C. sinensis</i>	<i>Oncometopia facialis</i>	8	-	5	-	3	-
9/04/02	<i>C. sinensis</i>	<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	12	-	6	-	1 ^e	-
06/05/02	<i>Coffea arábica</i>	<i>O. facialis</i>	5	-	4	-	0	-
	<i>Prunus domestica</i>	<i>O. facialis</i>	5	-	4	-	3	-
Total			91	17	46	7	20	0

^a Número cigarrinhas com exposição da câmara do cibário;

^b Número de cigarrinhas dissecadas no qual agregados de bactéria foram encontrados;

^c Número de cigarrinhas dissecadas com período de acesso à aquisição de 48 h

^d Número de cigarrinhas sem PAA (sadias) dissecadas.

^e Inseto com visualização de bactérias em forma de bastonetes curtos, mas que não eram *X. fastidiosa*;

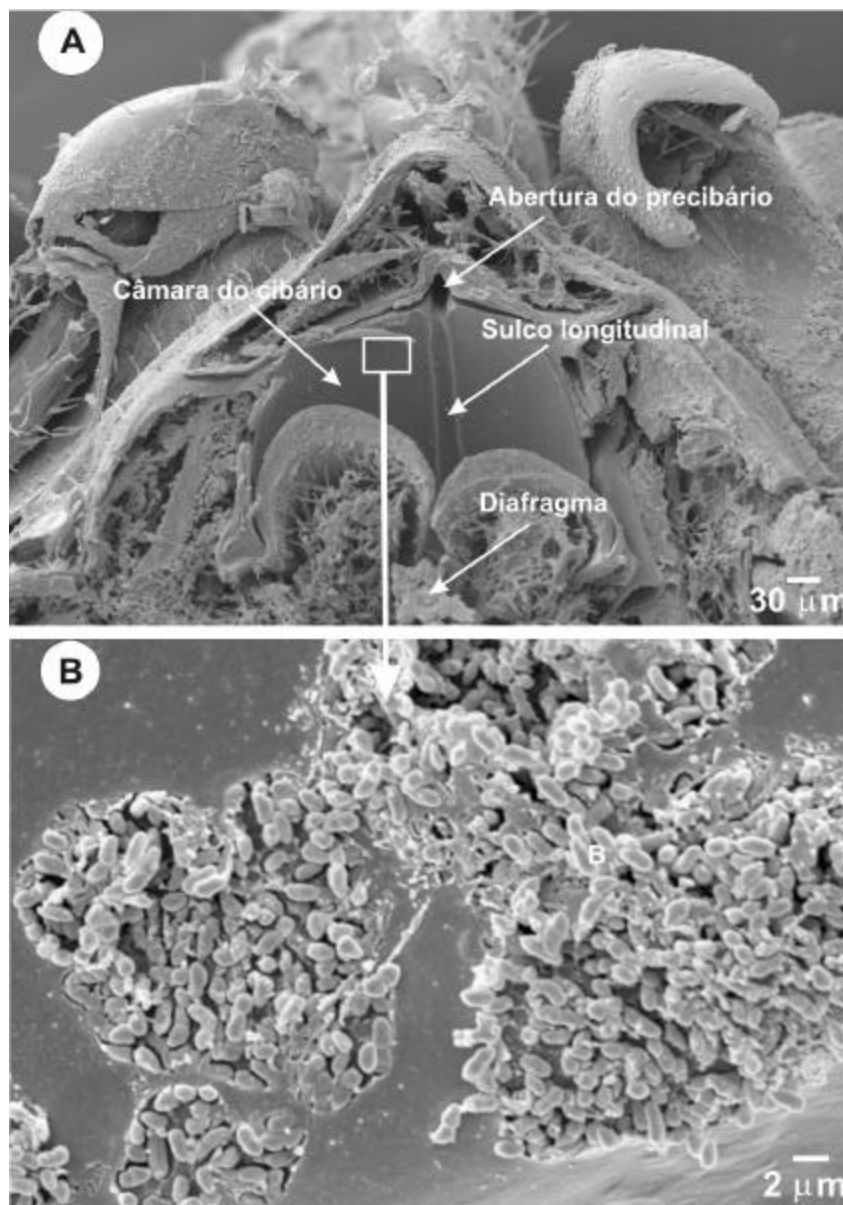


Figura 2- Eletromicrografia de varredura de um corte longitudinal da cabeça de *Bucephalogonia xanthophis* mostrando os prováveis sítios de retenção de *X. fastidiosa*. Nota-se, entretanto, que nenhuma célula de *Xylella fastidiosa* foi encontrada, porém, apenas uma bactéria com morfologia diferente. (A) Vista geral da câmara do cibário; (B) detalhes da bactéria encontrada colonizando a superfície interna ventral do cibário. A área em B é um aumento da área do quadrado em A. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC.

Em *D. costalimai* foi possível encontrar *X. fastidiosa* em dois dos exemplares dissecados. A bactéria pôde ser encontrada no sulco longitudinal do cibário (imagem não mostrada) e na região do diafragma no sulco apodemal (Figura 10). O teste de PCR foi positivo para todos os grupos de cigarrinha testados, mostrando que as mesmas haviam adquirido *X. fastidiosa*.

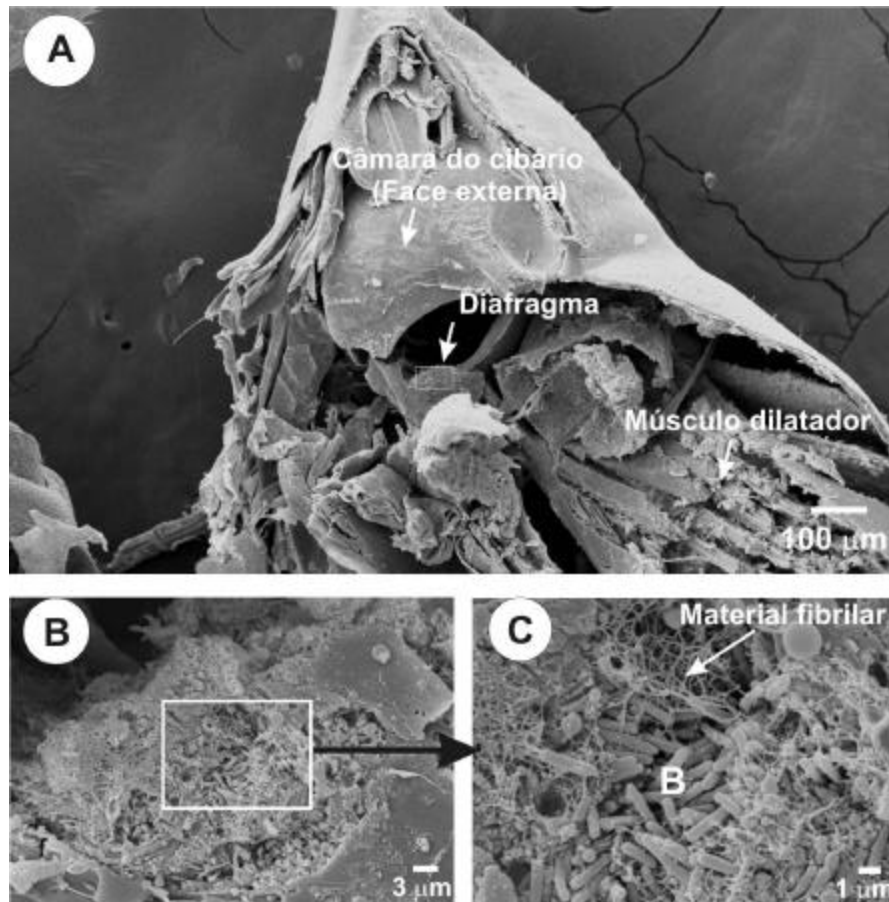


Figura 3- Eletromicrografia de varredura de um corte longitudinal da cabeça de *Acrogonia citrina* mostrando várias partes. (A) vista geral das partes da cabeça; (B) detalhes da área indicada pela seta e quadrado em A com a presença de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa*; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em B. Nota-se, a presença de células de *X. fastidiosa* envoltas por um material fibrilar. B = células bacterianas. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC.

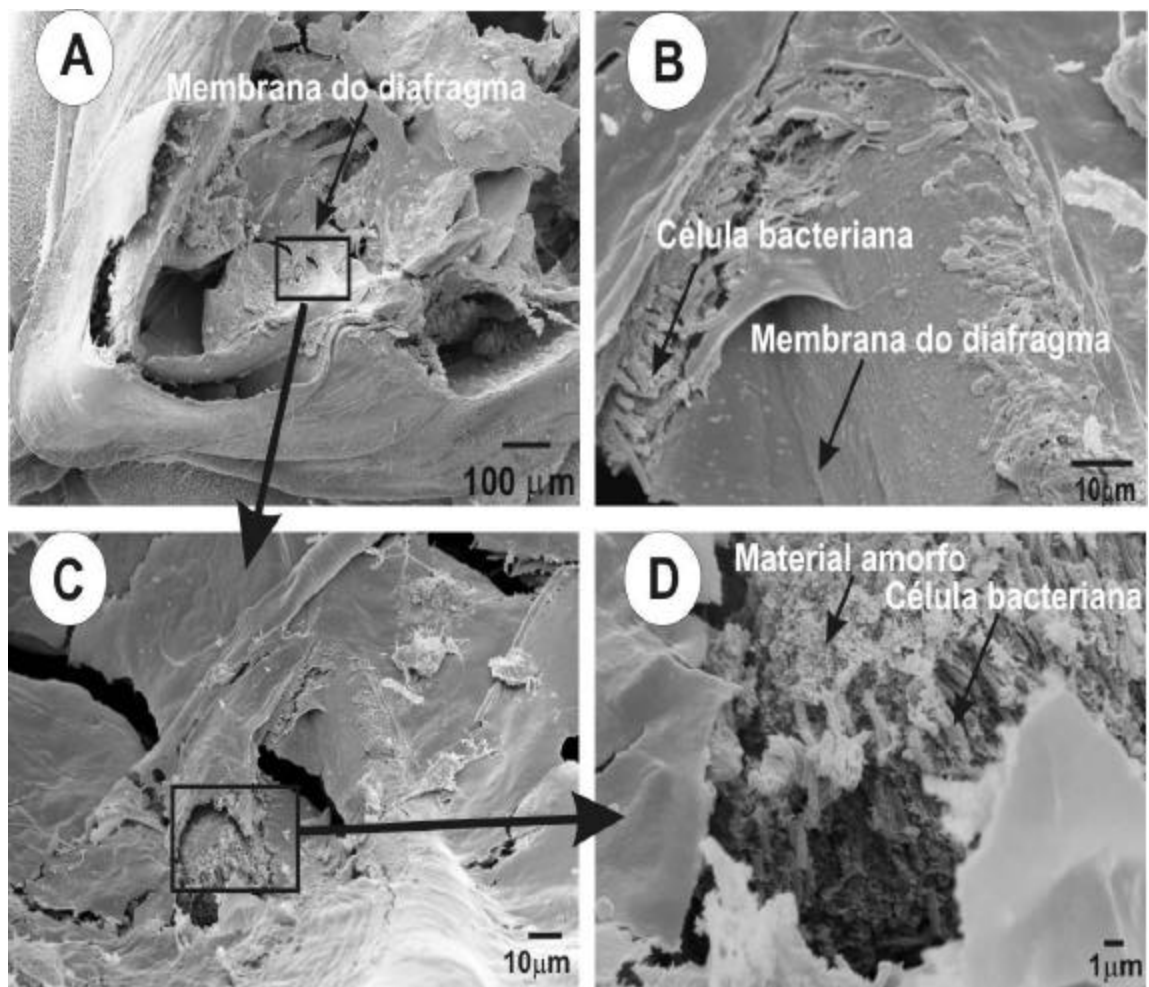


Figura 4- Eletromicrografia de varredura de um corte longitudinal da cabeça de *Acrogonia citrina*. (A) uma vista dorsal e externa do cibário mostrando orifícios e fissuras na membrana do diafragma; (B) detalhes de uma fissura na membrana mostrando uma agregação interna de células semelhantes a *Xylella fastidiosa*; (C) detalhes de um orifício indicado pelo quadrado em A, mostrando uma agregação interna de bactérias; (D) detalhes da área em C mostrando células de *X. fastidiosa* envoltas por um material amorfo. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC.

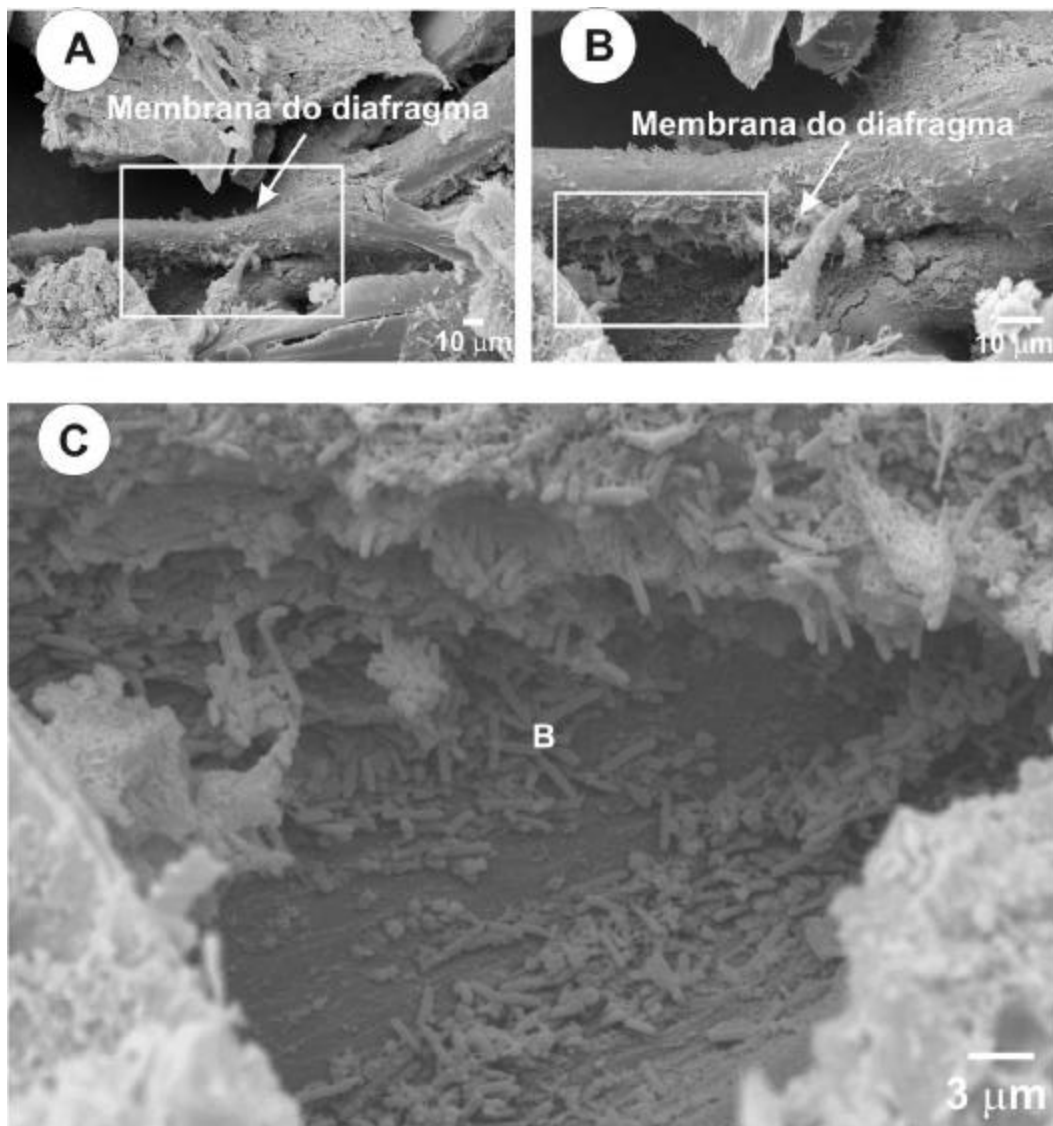


Figura 5- Eletromicrografia de varredura mostrando uma parte interna da membrana do diafragma, canal apodemal de *Acrogonia citrina* (A). (B) detalhe da área indicada pelo quadrado em A, onde se observa a presença de agregados de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa*; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em D, mostrando células de *X. fastidiosa* aderidas polar e lateralmente na membrana do diafragma. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC. B = Células de *X. fastidiosa*.

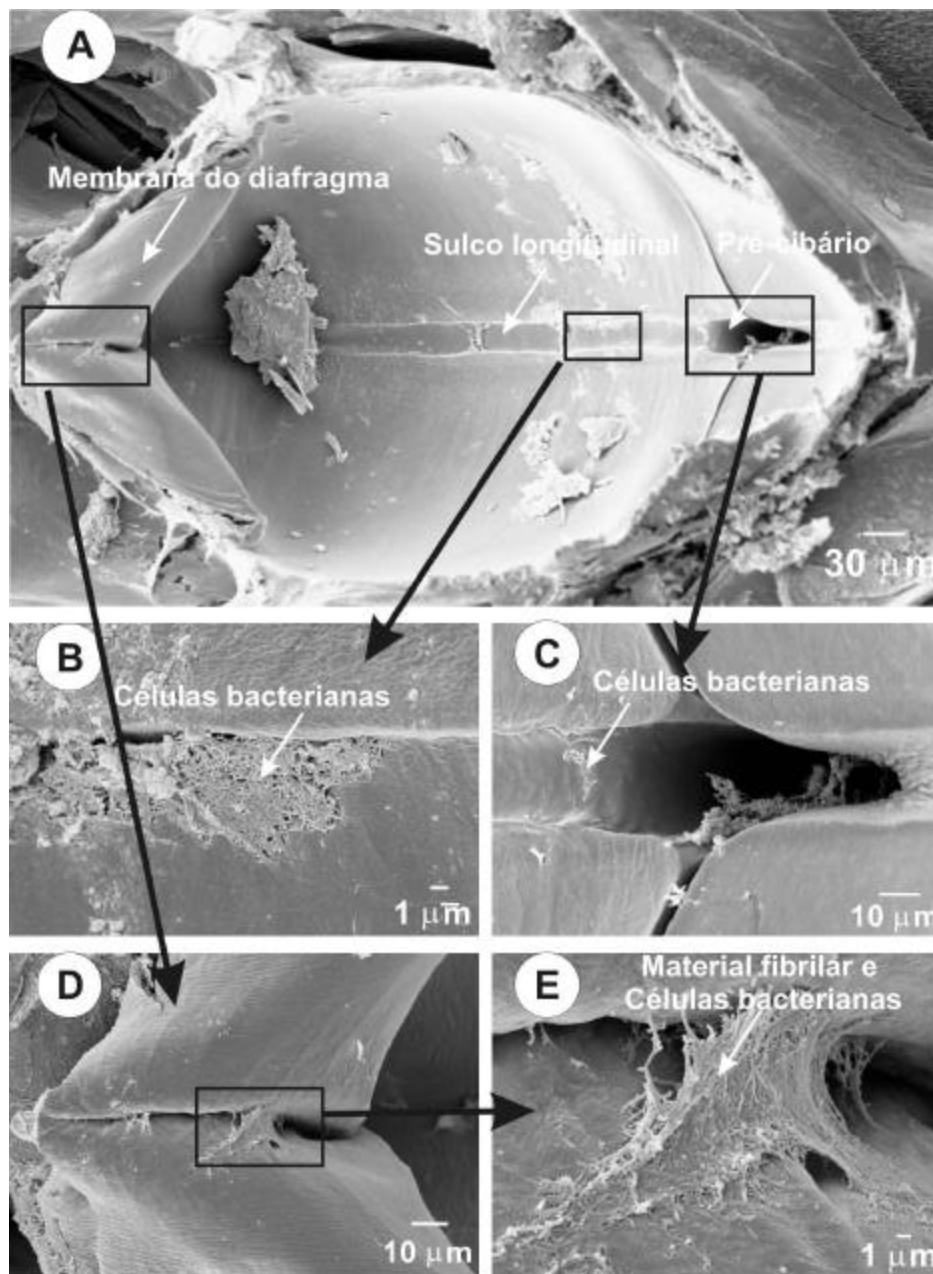


Figura 6- Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da câmara do cibário de *Acrogonia citrina* (A). (B-D) detalhes das respectivas áreas indicadas pelo quadrado em A, onde se observa a presença de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa*; (E) detalhes da área indicada pelo quadrado em D. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa*, causador da CVC.

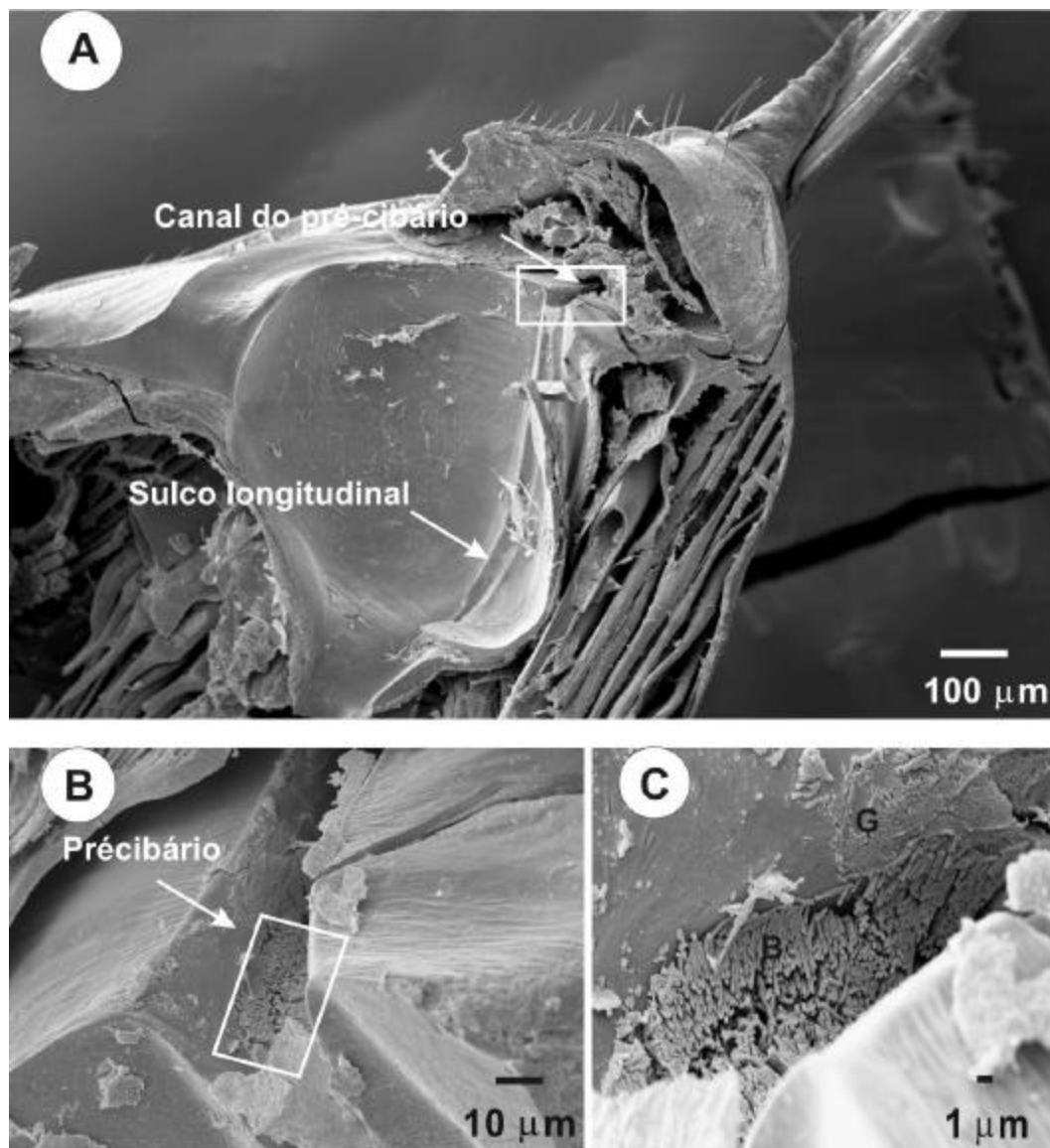


Figura 7- Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da câmara do cibário de *Oncometopia facialis* com indicação dos sítios de ligação de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa* (A). (B) detalhes da área indicada pelo quadrado em A, onde se observa a presença da *X. fastidiosa* no canal do pré-cibário; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em B, mostrando a presença das células de *X. fastidiosa* aderidas polarmente a parede do canal e possivelmente de goma fastidiana. B = células bacterianas e G = goma fastidiana. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de ameixeira infectada com o isolado PLS de *X. fastidiosa*.

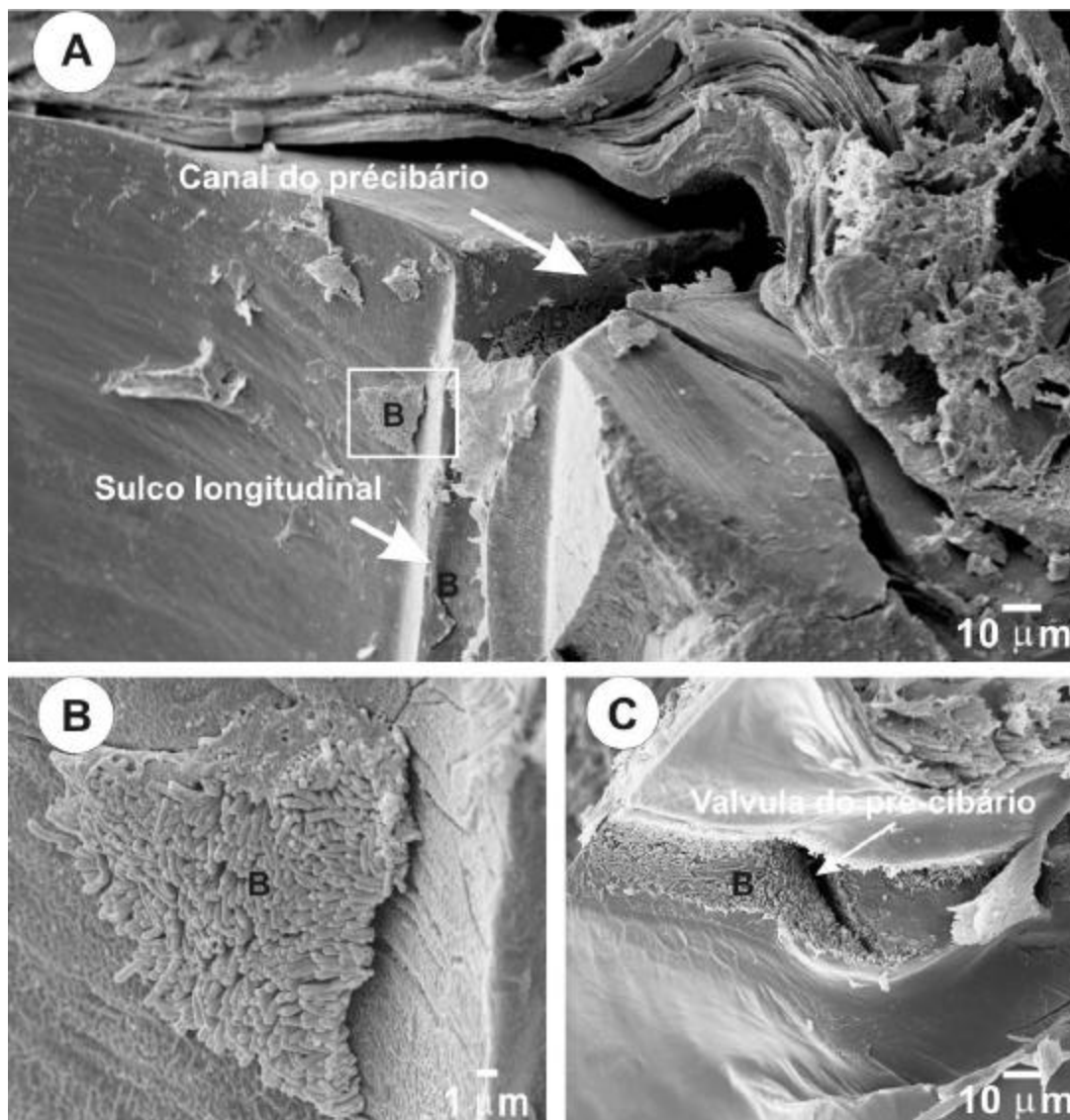


Figura 8- Eletromicrografia de varredura mostrando uma visão geral da região próxima ao pré-cibário de *Oncometopia facialis* com indicação da presença de bactérias semelhantes a *Xylella fastidiosa* na parede do cibário e no sulco longitudinal (A). (B) detalhes da área indicada pelo quadrado em A, onde se observa a presença da *X. fastidiosa* aderida polarmente a parede do cibário; (C) detalhes da área da válvula do pré-cibário (região localizada no final do canal do cibário) mostrando a presença de células de *X. fastidiosa*. B = células bacterianas. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de ameixeira infectada com o isolado PLS de *X. fastidiosa*.

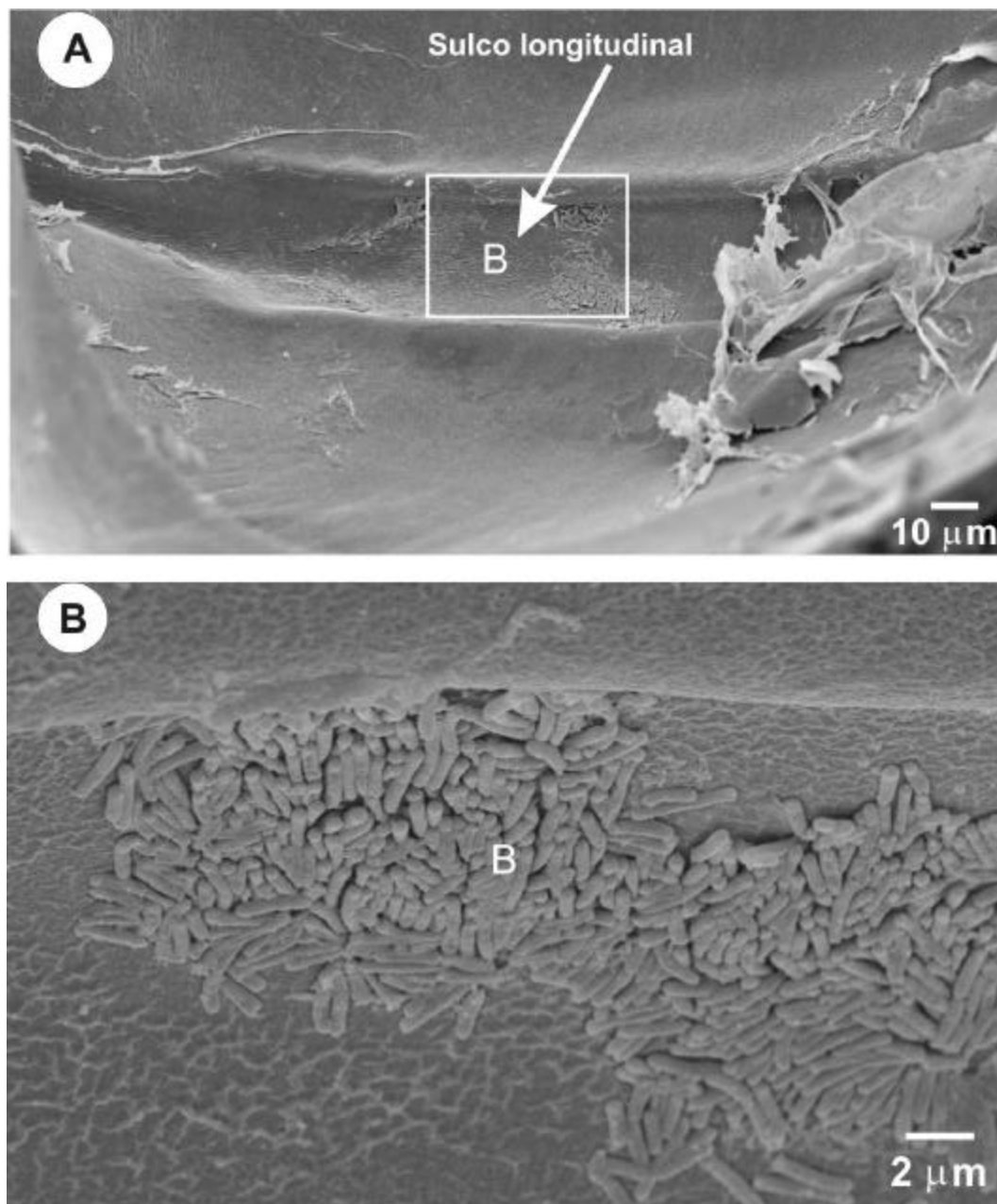


Figura 9- Eletromicrografia de varredura do sulco longitudinal do cibário de *Oncometopia facialis* (região mostrada na Figura 7) indicando uma região com bactéria semelhante a *Xylella fastidiosa* aderida (A); (B) detalhes das células bacterianas aderidas lateralmente, sem a presença de material amorfo. Inseto alimentado previamente por 48h em planta de ameixeira infectada com o isolado PLS de *X. fastidiosa*.

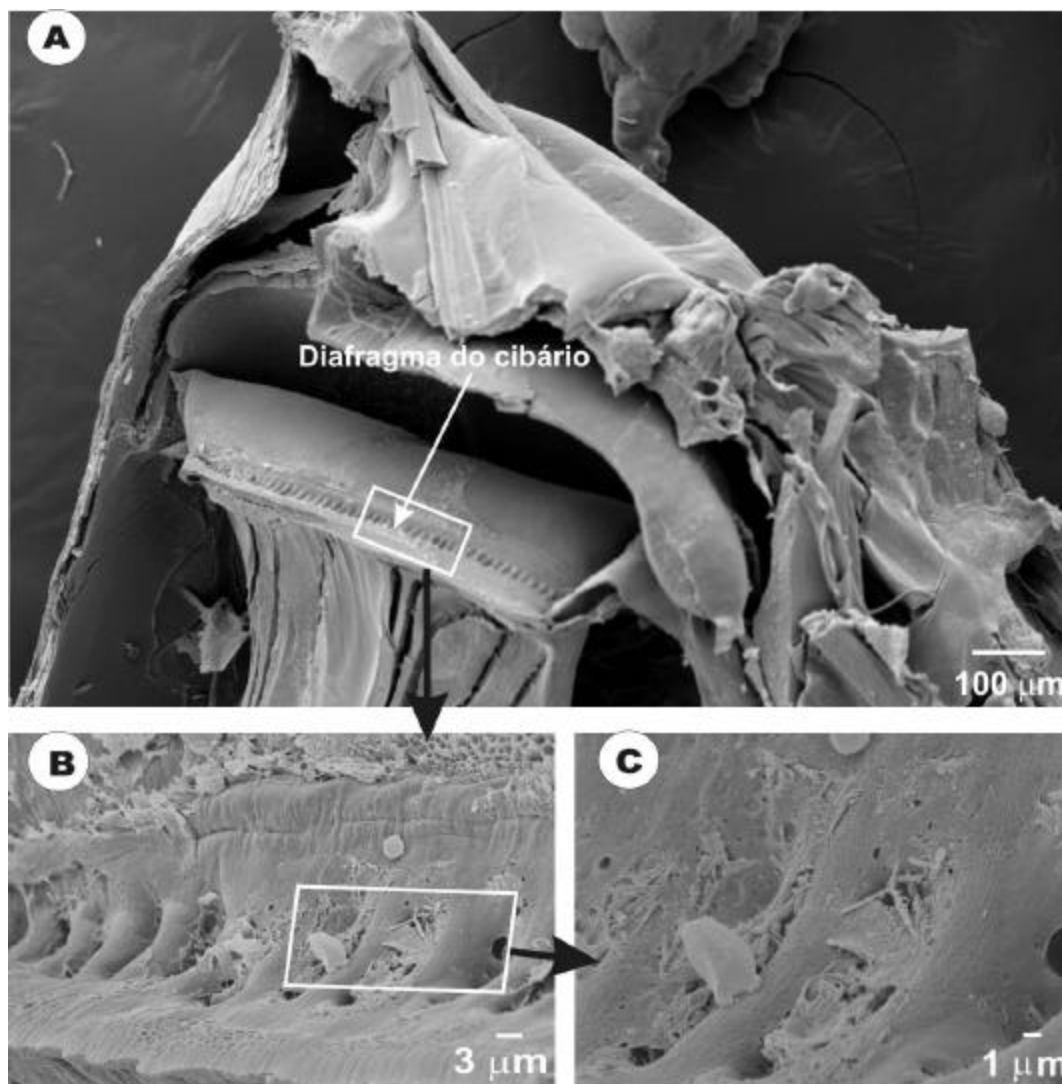


Figura 10- Eletromicrografia de varredura de um corte sagital da cabeça de *Dilobopterus costalimai*. (A) mostrando uma visão geral do cibário, com atenção para a parte interna do sulco apodemal (quadrado). (B) detalhe da área indicada pelo quadrado em A, parte interna da membrana do diafragma, onde se observa a presença de bactéria semelhante a *Xylella fastidiosa* nos pontos de inserção dos músculos na membrana do diafragma; (C) detalhes da área indicada pelo quadrado em B, mostrando células de *X. fastidiosa* aderidas lateralmente na mesma região descrita anteriormente músculos. Inseto alimentado previamente por 48 h em planta de citros infectada com isolado de *X. fastidiosa* causador da CVC.

6.5 Discussão

Este estudo trouxe informações importantes a respeito das cigarrinhas estudadas. Primeiro a metodologia utilizada permitiu reconhecer as partes do estomodéu do inseto, incluindo os prováveis sítios de retenção de *X. fastidiosa*. Estas informações podem ser úteis para o desenvolvimento de trabalhos futuros que procurem estudar a influência dos produtos de genes envolvidos na adesão dos isolados brasileiros de *X. fastidiosa* e para o desenvolvimento de estratégias visando interferir no processo de transmissão da bactéria pelo vetor, um dos objetivos do projeto genoma funcional coordenado pela FAPESP. Segundo, por ter permitido localizar os principais sítios de retenção de *X. fastidiosa* nas cigarrinhas mais comuns em pomares cítricos no Brasil.

Os principais sítios de retenção de *X. fastidiosa* em três das espécies de cigarrinha estudadas foram à câmara do cibário (sulco longitudinal, superfície ventral e membrana do diafragma) de *A. citrina* e *O. facialis*, no sulco apodemal de *D. costalimai* e o precibário, incluindo o canal e a válvula precibarial de *O. facialis* (Figura 1). Estas regiões já são descritas como sítios de retenção de *X. fastidiosa* nas cigarrinhas *Graphocephala atropunctata* (Purcell et al., 1979) *Homalodisca coagulata* (Brlansky et al., 1983), que alimentam em videira e outras frutíferas nos EUA, mas não para as cigarrinhas vetoras da *X. fastidiosa* em citros. Nestes locais a bactéria pôde ser encontrada aderida na posição lateral e polar. Especialmente em *O. facialis* com PAA de 48 h em ameixeira infectada com o isolado PLS (Figuras 7 e 8), a bactéria foi encontrada aderida na posição polar na região próxima ao pré-cibario. Segundo Brlansky et al. (1983) as bactérias presentes nesta região do canal alimentar do inseto vetor podem ser prontamente transmitidas. A presença da bactéria ligada polarmente nesta região sugere que a mesma pode utilizar esta forma de adesão nesta região para facilitar o processo de remoção e inoculação da bactéria. Nos demais sítios de retenção a bactéria foi encontrada ligada lateralmente à superfície; estes locais são considerados por Purcell et al (1979) como prováveis sítios de multiplicação da bactéria (Figuras 3, 4, 5, 6 e 10). Como pode ser observado no Cap 7, *X. fastidiosa* inicia o processo de multiplicação e formação do biofilme aderida lateralmente. O mesmo ocorrendo nos vasos do xilema

como pode ser constatado no Cap. 4. Porém, mesmo nos vasos do xilema, após o início da colonização pode se observar a adesão polar da bactéria às paredes do vaso.

A presença de material amorfo (gomas e material fibrilar) envolvendo as células das bactérias no inseto, como também verificado por Purcell et al. (1979), sugerem que *X. fastidiosa* deve produzir nos insetos as mesmas substâncias extracelulares observadas em plantas (Tyson et al. 1985) e Cap 4.

A principal contribuição deste estudo foi verificar que os sítios de adesão para as cigarrinhas dos citros foram os mesmos já relatados para as cigarrinhas da videira e que a bactéria foi encontrada em altas populações nestas cigarrinhas, o que nos faz pensar que, uma possível explicação para a menor eficiência na transmissão da bactéria pelas cigarrinhas dos citros (Krügner et al., 2000; Lopes, 1999; Yamamoto et al., 2002) possa estar relacionada à distribuição irregular da bactéria em vasos do xilema de citros, que apresenta também uma menor proporção de vasos colonizados, como constatado no Cap. 3., o que pode afetar a taxa de aquisição ou mesmo pela presença de algum fator inibitório em plantas de citros que afete a eficiência da inoculação e infecção.

7 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Xylella fastidiosa* SOBRE SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO - METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BACTÉRIAS

7.1 Resumo

O biofilme bacteriano tem sido descrito como uma comunidade de células vivendo aderidas a uma superfície, sendo que esse está envolvido em várias atividades importantes para a sobrevivência das bactérias em seus nichos. No caso de *X. fastidiosa*, o biofilme tem sido apontado como um importante fator de patogenicidade, sendo considerado um dos elementos chaves na expressão da “Clorose Variegada do Citros” (CVC) e sintomas de outras doenças pela bactéria causada em diferentes hospedeiros. Nesse estudo, o objetivo foi desenvolver uma metodologia para acompanhar, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as fases de formação do biofilme por *X. fastidiosa* sobre uma membrana de poliestireno. Para a validação da metodologia três outras espécies de bactérias também foram utilizadas: *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas* sp. O procedimento proposto foi dividido em quatro etapas: (1) preparação de lâminas cobertas com película de poliestireno (LPP), seguindo a metodologia de Leite & Nicholson (1992); (2) esterilização das LPP no interior de tubos, tipo "Falcon"; (3) adição de meio de cultivo PW e bactérias, com posterior incubação e agitação dos tubos por períodos variáveis, (4) separação das películas da lâmina e preparo das mesmas para MEV. Os resultados obtidos revelaram as várias fases da formação do biofilme, aspectos da sua arquitetura e

mostraram que a técnica é uma ferramenta adequada para o estudo de biofilmes naturalmente formados e também da morfologia das bactérias, sendo que *X. fastidiosa* apresentou uma relação comprimento/largura maior que o dobro das demais bactérias estudadas. No caso de *X. fastidiosa*, verificou-se que a adesão inicial da bactéria ocorre na ausência da produção de exopolissacarídeos e que somente após algum tempo a goma fastidiana começa a ser produzida na colônia.

7.2 Introdução

X. fastidiosa (Well et al., 1987), causadora da clorose variegada dos citros (CVC), é um dos principais patógeno da cultura no Brasil. A perda anual com a doença é estimada em até 1 milhão de dólares ao ano, sendo que mais de 60 milhões de árvores de laranjeiras doce estão afetados (Monteiro et al., 2001b). A oclusão de vasos, causada pela adesão e agregação das células bacterianas no lúmen do xilema, parece ter um papel chave no desenvolvimento dos sintomas causados pela bactéria em citros. A presença da goma fastidiana (Silva et al., 2001) foi indicada como sendo importante para a adesão das bactérias umas às outras e para a formação do biofilme por Simpson et al. (2000). O biofilme bacteriano tem sido descrito como uma comunidade bacteriana que vive aderida uma às outras e a uma superfície. Este apresenta várias funções para as bactérias, tanto para patógenos humanos e vegetais como para saprófitas, as quais podem envolver o acúmulo de nutrientes, proteção contra intempéries, concentração da atividade de enzimas, redução do impacto de compostos tóxicos e antibióticos (Costerton & Irvin, 1981; Watnick & Kolter, 2000). No caso de *X. fastidiosa*, o biofilme também pode estar envolvido na virulência da bactéria (Simpson et al., 2000). Chagas et al. (1992), através do uso da microscopia eletrônica de transmissão, mostraram ser possível a visualização de uma matriz envolvendo *X. fastidiosa* no interior da planta, a qual é hoje referida como goma fastidiana (Silva et al., 2001).

Estudo sobre a formação do biofilme e da importância desse para fitopatógenos são escassos, principalmente para patógenos que colonizam os vasos do xilema. Talvez, a escassez de trabalhos nesta área se deva à falta de metodologia para o estudo da formação de biofilme em condições de laboratório. A superfície de poliestireno é

hidrofóbica, similar às superfícies vegetais e foi utilizada por Leite & Nilholson (1992) para o estudo da germinação de esporos de *Colletotrichum graminicola*, sendo esta também largamente utilizada na área médica para o estudo da adesão de bactérias (Bridgett et al., 1992), como exemplo, Buck & Andrews (1999) mostraram que *Rodosporium toruloides* é capaz de formar biofilme sobre uma superfície de poliestireno.

Considerando estes fatos, o objetivo neste estudo foi o de desenvolver uma metodologia utilizando película de poliestireno e acompanhar, através da microscopia eletrônica de varredura, a formação do biofilme sobre essa superfície artificial por *X. fastidiosa* e mais três espécies de bactérias.

7.3 Material e Métodos

7.3.1 Condições experimentais e inóculo

Lâminas de vidro para microscopia de luz foram revestidas com uma película de poliestireno (LPP), conforme metodologia desenvolvida por Leite & Nilholson (1992). As LPP foram transferidas para o interior de um tubo tipo "Falcon" de 50 mL e autoclavadas por 20 min a 120 °C. Para o interior destes tubos foram transferidos um volume de 25 mL de meio PW líquido (Davis et al., 1981) e 1 mL de uma suspensão bacteriana de *X. fastidiosa* (isolado 9a5c) crescida por 15 dias a 28 °C e agitação constante a 150 rpm, na ausência de luz. O tubo Falcon foi transferido para o interior de um erlenmeyer, o qual foi colocado no interior de uma estufa em condições semelhantes às mencionadas acima para o crescimento da bactéria. O material foi mantido nestas condições por 20 dias e a partir do décimo dia, amostras da região próximas à superfície do meio foram retiradas a cada cinco dias e preparadas para MEV, para acompanhar a formação do biofilme.

Semelhante metodologia foi utilizada para o estudo da formação do biofilme por mais três outras espécies de bactérias: *C. michiganense* subsp. *michiganense*, *B. subtilis* e *Pseudomonas* sp crescidas por 2 dias em meio King B. Entretanto, devido ao rápido

crescimento destas bactérias, o período de manutenção da bactéria em cultivo foi de apenas 3 dias, sendo que a partir do segundo dia as amostras começaram a ser retiradas.

7.3.2 Preparo do material para MEV

Depois de retiradas as LPPs dos tubos, a película foi separada da lâmina e a região do biofilme na película foi cortada e fixada por 24 h em solução de Karnovisk's modificado, lavada em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixada em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, desidratadas em gradiente de etanol (25, 50, 70, 95, e 100% por três vezes) e em seguida levadas para aparelho de ponto crítico (MED010, BALZERS), sendo as amostras montadas em suportes de alumínio (*stubs*) com auxílio de uma fita adesiva de carbono, cobertas com ouro e observados no MEV LEO 435 VP do NAP/MEPA – ESALQ/USP.

Para a comparação das bactérias crescidas no biofilme formado sobre a película com aquelas desenvolvidas em meio sólido, algumas colônias de *X. fastidiosa* em meio PW sólido foram também preparadas para MEV. Para isso pedaços do meio de cultivo contendo colônias da bactéria foram cortados, preparados e observados de maneira similar ao descrito acima, sendo que, apenas a desidratação foi realizada em uma série de acetona.

7.4 Resultados

7.4.1 Fases da formação do biofilme por *X. fastidiosa* em película de poliestireno

Foi possível verificar as diversas fases da formação do biofilme na película. O processo começa com algumas células de *X. fastidiosa* aderidas à película (Figura 1A). Em seguida, observa-se uma simples camada de células sem a presença de qualquer substância semelhante à goma fastidiana (Figura 1B). Na fase seguinte, pode-se observar a presença de algumas células ligadas às outras, a deposição de uma camada adicional de células e o início da produção de um exopolissacarídeo (Figura 1C-D). O processo continua com a expansão da colônia, início da formação de outras e união das mesmas, com intensificação da camada de exopolissacarídeo (Figura 1E). Na última fase, as

colônias já estão unidas, com várias camadas de células e uma fina camada de material semelhante à goma recobrindo quase todas as células bacterianas (Figura 1F-G).

7.4.2 MEV de colônias de *X. fastidiosa*

Estudos envolvendo a MEV mostraram que em meio de cultivo as células de *X. fastidiosa* crescem formando várias camadas de células unidas umas as outras, sem a deposição aparente de exopolissacarídeo (Figura 1H). Foi também possível observar que as células em meio de cultivo PW sólido apresentam uma relação comprimento-largura menor, ou seja, as células são menores do que as observadas sobre a película de poliestireno (Figura 1H).

7.4.3 Emprego da película de poliestireno para o estudo da formação do biofilme por bactérias

Os resultados da formação do biofilme em película de poliestireno para outras bactérias foram comparados com os de *X. fastidiosa*, mostrando que a técnica permitiu o estudo da formação do biofilme para *C. michiganense* subsp. *michiganense*, *B. subtilis* e *Pseudomonas* sp. (Figura 2). Não foi possível verificar a produção de goma por estas bactérias como a observada para *X. fastidiosa*, porém a presença de material extracelular pôde ser observada no biofilme formado por *C. michiganense* subsp. *michiganense* e *Pseudomonas* sp (Figura 2F-H). Além de permitir a observação das diversas fases da formação do biofilme, foi também possível o uso da técnica para o estudo da morfologia das bactérias, que no caso das três espécies mostrou que o valor da relação comprimento sobre a largura é menor do que o observado para *X. fastidiosa* (Tabela 1).

7.5 Discussão

Os resultados deste estudo forneceram importantes informações sobre os vários estágios do processo de formação do biofilme por *X. fastidiosa in vitro*, desde as fases de adesão inicial até a fase de agregação final. Foi possível verificar que *X. fastidiosa* é capaz de aderir a uma superfície e iniciar a formação do biofilme sem a necessidade de goma ..fastidiana (Figura 1A-B). A capacidade de aderir à superfície de poliestireno

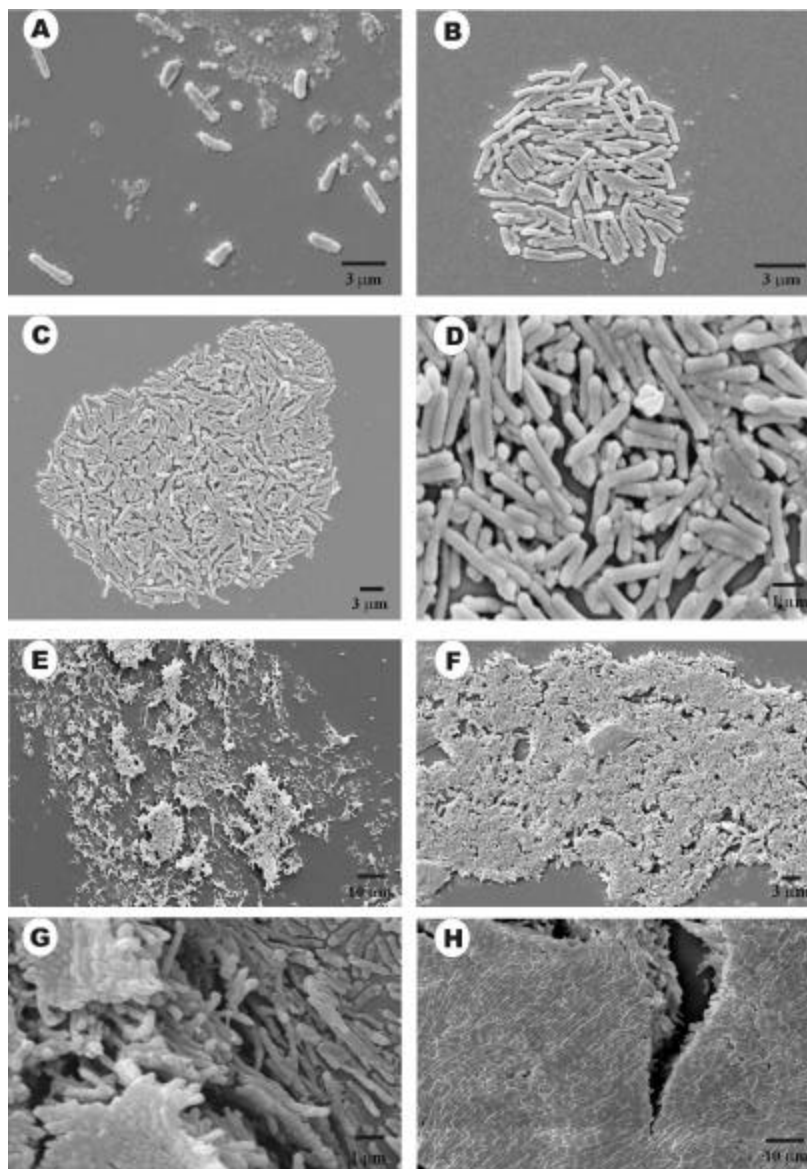


Figura 1- Eletromicrografia de varredura mostrando as fases de formação do biofilme por *Xylella fastidiosa* sobre película de poliestireno (A-G) e a colônia da bactéria em meio de cultivo PW sólido (H), onde se observa a presença de células menores e sem goma. (A) fase inicial com poucas células aderidas á película; (B) com uma camada de células; (C-D) com mais de uma camada e início da produção de exopolissacarídeo; (E) varias colônias e início de agregação; (F) colônias já unidas e com a deposição de goma fastidiana; (G) biofilme já formado com várias camadas de células.

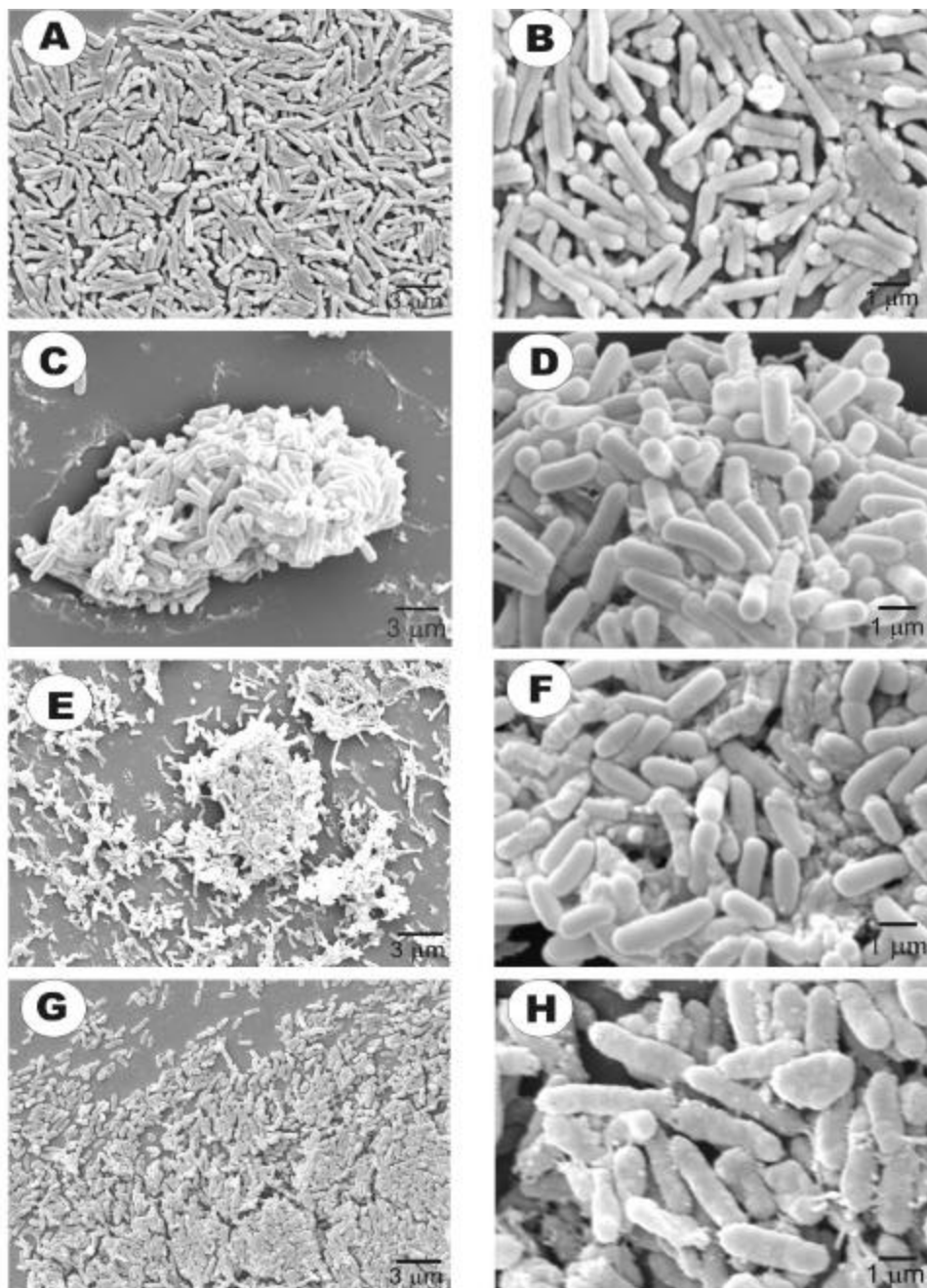


Figura 2- Eletromicrografias de varredura mostrando o biofilme formado sobre película de poliestireno pelas bactérias (A) *Xylella fastidiosa*, (C) *Bacillus subtilis*, (E) *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* e (G) *Pseudomonas* sp. Nota-se a adesão inicial das bactérias à superfície de poliestireno. Detalhes dos respectivos biofilmes bacterianos (B, D, F e H).

Tabela 1. Comprimento, largura e relação comprimento largura de quatro espécies de bactérias. Medidas realizadas em microscópio eletrônico de varredura sob aumento de 10.000X.

R	<i>C. michiganense</i>			<i>X. fastidiosa</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>Pseudomonas sp</i>		
	C	L	C/L	C	L	C/L	C	L	C/L	C	L	C/L
1	2,4	0,8	3,0	2,6	0,4	6,5	3,0	0,8	3,8	1,8	0,7	2,6
2	3,4	0,8	4,2	2,8	0,4	7,0	3,0	0,8	3,8	1,6	0,6	2,7
3	3,6	0,8	4,5	2,6	0,4	6,5	2,8	0,7	4,0	1,6	0,6	2,7
4	2,8	0,9	3,1	3,2	0,4	8,0	2,7	0,7	3,9	1,8	0,7	2,6
5	2,4	0,8	3,0	3,2	0,4	8,0	3,0	0,8	3,7	2,2	0,8	2,8
6	3,4	0,8	4,2	2,6	0,4	6,5	2,9	0,7	4,1	2,4	0,8	3,0
7	3,4	0,9	3,8	3,2	0,4	8,0	2,0	0,6	3,3	2,2	0,6	3,7
8	3,1	0,9	3,4	3,0	0,5	6,0	2,0	0,6	3,3	1,8	0,7	2,6
9	3,7	0,9	4,1	3,0	0,5	6,0	2,4	0,7	3,4	1,8	0,7	2,6
10	3,1	1,0	3,1	3,3	0,5	6,6	2,8	0,7	4,0	1,8	0,6	3,0
M	3,13	0,86	3,64	2,95	0,43	6,91	2,66	0,71	3,73	1,9	0,68	2,83

R = repetições, C = comprimento da bactéria; L = largura da bactéria; C/L = relação comprimento/largura da bactéria; M = média.

sugere que os genes com similaridade aos genes de adesinas, encontrados por Simpson et al. (2000), parecem estar ativos em *X. fastidiosa* e que os mesmos são expressos sobre substratos artificiais, permitindo a adesão inicial da bactéria. Considerando este fato, esta metodologia pode ter aplicação para o estudo de mutantes de *X. fastidiosa* que tiverem seus prováveis genes para produção de adesinas nocauteados, o que é um dos objetivos de alguns projetos enquadrados no Projeto Genoma Funcional de *X. fastidiosa*, coordenado pela FAPESP. Quanto à substância semelhante a goma fastidiana, nossos resultados indicam que essa aparentemente não tem um papel essencial para a adesão inicial da bactéria (Leite et al., 2001), porém exibe importante papel na arquitetura do biofilme, como sugerido por Leite et al. (2002). Isto não quer dizer que a goma não seja

importante na expressão dos sintomas induzidos por *X. fastidiosa* na planta, visto que a mesma é essencial para o processo de oclusão dos vasos, o que tem sido considerado como uma das principais causas dos sintomas expressos pela planta (Silva et al., 2001). Os resultados do experimento estão de acordo com recentes evidências de que a adesão de *Escherichia coli* K 12 não é influenciada pela falta de exopolissacarídeos, mas que a agregação, a qual está ligada à arquitetura do biofilme sim (Danese et al., 2000). Da mesma forma, os dados obtidos em nosso estudo, apesar de serem sobre uma superfície artificial, parecem corresponder aos observados no xilema de citros (Cap 4), onde as diversas fases de formação do biofilme podem ser visualizadas.

Outra informação de grande importância obtida nesse estudo diz respeito à morfologia das células de *X. fastidiosa* em relação à de outras bactérias. Foi possível observar que *X. fastidiosa* apresenta uma relação comprimento largura maior do que as demais bactérias estudadas (Tabela 1). Característica essa que pode permitir a separação da *X. fastidiosa* de outras bactérias fitopatogênicas ou endofíticas, presentes nos vasos do xilema da planta através da MEV. Os resultados mostram mais uma vez a importância da MEV como ferramenta na identificação de *X. fastidiosa* nos vasos do xilema e no interior dos insetos vetores, como discutido no Cap. 6.

Finalmente acreditamos que a técnica aqui apresentada pode ser utilizada para o estudo de outras espécies de bactérias, tanto patógenos vegetais, animais quanto saprófitas, em substituição a outras técnicas rotineiramente utilizadas para o estudo da morfologia das bactérias em MEV. Uma das vantagens da técnica é que a mesma permite a visualização das células das bactérias em condições naturais e com ausência de resíduos de meio de cultivo que normalmente atrapalham a visualização das células. Em relação à microscopia de luz, na qual o uso de películas artificiais já é comum (Bridgett et al., 1992), o uso em microscopia eletrônica permite a visualização com profundidade de campo maior e o uso de maiores aumentos que fornecem melhores resultados nas observações.

8 CONCLUSÕES

1) O número de vasos do xilema colonizados por *X. fastidiosa* apresenta uma relação direta com o aparecimento de sintomas necróticos em folhas de ameixeira e cafeeiro, mas não com os sintomas em folhas de laranjeira caipira.

2) A população de *X. fastidiosa* determinada pelo isolamento em meio de cultivo, não apresenta relação com o número de vasos colonizados e nem com a expressão dos sintomas em laranjeira caipira, ameixeira e cafeeiro.

3) As observações de MEV, MET e MET mais imunomarcção para componentes da parede celular trouxeram fortes evidências de que *X. fastidiosa* é capaz de degradar a parede primária das pontuações dos vasos do xilema de citros e migrar para os vasos adjacentes.

4) Imagens de MEV mostraram que a goma e fímbrias produzidas por *X. fastidiosa* não estão presentes na adesão inicial da bactéria, mas são importantes para a produção do biofilme e oclusão dos vasos.

5) Plantas de citros do cultivar pêra expressam reações de resistência à colonização por *X. fastidiosa*, através do acúmulo de substâncias no lúmen dos vasos do xilema e da deposição de goma e compostos nos espaços intercelulares das folhas.

6) Dentre as cultivares de fumo estudadas, RP1, TNN e Havana, a última é a que expressa os sintomas com maior intensidade quando infectada por *X. fastidiosa*, além de apresentar a maior capacidade de recuperação dos sintomas após adubação com sulfato de amônio.

7) A expressão de sintomas provocados por *X. fastidiosa* em fumo é afetada pela adubação com sulfato de amônio, sendo que estes podem ser retardados e muitas vezes até revertidos, porém não é afetada pelo local de inoculação (pecíolo ou haste).

8) A poda de plantas de fumo aumenta a longevidade das plantas e permite a manutenção dos isolados de *X. fastidiosa* por um período mais longo.

9) A técnica de corte da cabeça de cigarrinhas em nitrogênio líquido e observação em microscópio eletrônico de varredura permitiu uma boa visualização dos principais sítios de agregação de *X. fastidiosa* nesses vetores.

9) Em cigarrinhas alimentadas em citros, a *X. fastidiosa* foi encontrada na câmara do cibário (sulco longitudinal, parede lateral e membrana do diafragma) de *A. citrina*, e *O. facialis* e no canal apodemal de *D. costalimai*. Por sua vez, nas cigarrinhas *O. facialis* que se alimentaram em ameixeira, a bactéria foi encontrada no precibário, incluindo o canal do precibário e a válvula precibarial.

10) O uso de lâminas revestidas com poliestireno, associada à observação em microscópio eletrônico de varredura, mostrou-se como técnica adequada para o estudo da formação do biofilme e da morfologia de *X. fastidiosa* e de outras bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCEL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, n.4 ,p.382-386, 2001.
- ALVES, E.; MARUCCI, R. C.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Microscopia de varredura, com microanálise de raio X, como ferramenta para o estudo de cristais sobre superfícies de colônias de *Xylella fastidiosa*: relação com adesão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p.318, 2000. Suplemento. / Apresentado ao 38 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belém, 2000 – Resumo/
- ALVES, E.; MARUCCI, R. C.; PASCHOLATI, S. F.; LOPES, J. R. S.; LEITE, B. Relationship between leaf symptoms and the proportions of xylem-colonized vessels of plum, coffee and Citrus colonized by *Xylella fastidiosa*. **Plant diseases**, v.87, 2003. /No prelo/
- AMARO, A. A.; MAIA, M. L.; GONZALES, M. A. Economic effects originated from citrus variegated chlorosis. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. (Ed.). **Citrus Variegated Chlorosis**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 1998, cap.2, p.123-139.
- ANDERSEN, P. A.; FRENCH, W. J. Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, n.1, p. 25-40, 1987.

- BACKUS, E. A.; McLEAN, D. L. The sensory systems and feeding behavior of leafhoppers. I. The aster leafhopper, *Macrosteles fascifrons* Stal (Homoptera: Cicadellidae). **Journal of Morphology**, v.172, n.3, p.361-379, 1982.
- BACKUS, E. A.; McLEAN, D. L. The sensory systems and feeding behavior of leafhoppers. II. A comparison of the sensillar morphologies of several species (Homoptera: Cicadellidae). **Journal of Morphology**, v.176, n.1, p.3-14, 1983.
- BALFAS, R. Acquisition of *Pseudomonas syzygii* by *Hindola striata* (Homoptera: Machaerotidae). **Indonesian Journal Crop Science**, v.6, n.1, p.65-72, 1991.
- BERETTA, M. J. G.; BRLANSKY, R. H.; LEE, R. F. A comparison of histochemical staining reactions of the xylem occlusions in trees affected by citrus blight and declinio. **Plant Disease**, v.72, n.9, p.1058 – 1060, 1988.
- BERETTA, M. J. G.; BACH, E. E.; ROSSETTI, V.; LEE, R. F.; DERRICK, K. S. Serological detection of *X. fastidiosa* associate with Citrus Variegated Chlorosis disease in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.1, p.10, 1991. /Apresentado ao 14 Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu, 1991 - Resumo/
- BERETTA, M. J. G.; BARTHE, G.A; CECCARDI, T. L.; LEE, R. F.; DERRICK, K. S. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by Citrus Variegated Chlorosis and Citrus Blight in Brazil. **Plant Disease**, v.81, n.10, p.1196-1198, 1997.
- BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C. M.; DERRICK, K. S.; BARTHE, G. A.; LEE, R. F.; PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A. First report of *X. fastidiosa* in coffee. **Plant Disease**, v.80, n.7, p.821, 1991.

- BRIDGET, M. J.; DAVIES, M. C.; DENYER, S. P. Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants. **Biomaterials**, v.13, n.7, p.411-416, 1992.
- BRLANSKY, R. F.; TIMMER R. H.; LEE L. W. Detection and transmission of a gram-negative, xylem-limited bacterium in sharpshooters from a citrus grove in Florida. **Plant Disease**, v.66, n.7, p.590-592, 1982.
- BRLANSKY, R. H.; LEE, R. F; COLLINS, M. H. Structural comparison of xylem occlusions in the trunks of citrus trees with blight and other decline diseases. **Phytopathology**, v.75, n.2, p.145-150, 1985.
- BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W.; FRENCH, W. J.; MCCOY, R. E. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, n.4, p.530-535, 1983.
- BRLANSKY, R. H.; LEE, R. F.; TIMMER, L. W.; PURCIFULL, D. E.; RAJU, B. C. Immunofluorescent detection of xylem – limited bacteria *in situ*. **Phytopathology**, v.72, n.11, p.1444 –1448, 1982.
- BROT, N.; WEISSBACH, H. Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. **Biopolymers**, v.55, n.3, p.288-296, 2000.
- BUCK, J.W.; ANDREWS, J. H. Localized, positive charge mediates adhesion of *Rhodosporidium toruloides* to barley leaves and polystyrene. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.2179-2183, 1999.
- CHAGAS, C. M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M. J. G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.134, n.4, p.306-312, 1992.

- CHANG, C. J.; DONALDSON, R. C. Nutritional requirements of *Xylella fastidiosa*, which causes Pierce's disease in grapes. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p.291-293, 2000.
- CHANG, C. J; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J. M. Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease. In: CONFERENCE OF THE ORGANIZATION INTERNATIONAL OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., New Delhi, 1993. **Proceedings**. Riverside: OICV, 1993a. p.294-300.
- CHANG, C. J; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J. M. Culture and serological detection of *Xylella fastidiosa*, the xylem-limited bacterium associated with citrus variegated chlorosis disease. **Current Microbiology**, v.27, n.1, p.137-142, 1993b.
- CHEN, J.; CHANG, C. J.; JARRET, R. L. Plasmids from *Xylella fastidiosa* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v.82, n.9, p.993-995, 1992 a.
- CHEN, J.; CHANG, C. J.; JARRET, R. L.; GAWEL, N. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**, v.82, n.9, p.973-977, 1992 b.
- CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C. J.; HOPKINS, D. L. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p.1688-1690, 1995.
- CIAPINA, L. P.; LEMOS, E. G. M. Fast DNA extraction for *Xylella fastidiosa* nested-PCR detection on sharpshooters. In: SIMPÓSIO GENOMA FUNCIONAL DA *Xylella fastidiosa*. 1., Serra Negra, 2001. **Proceedings**. São Paulo: FAPESP, 2001. p.49.

- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M. A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, v.22, n.1, p.121-132, 2001.
- COSTERTON, J. W.; IRWIN, R. T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.299-324, 1981.
- DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for the development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, v.182.p.3593-3596, 2000.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H.; THOMSON, S. V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, n.1, p.75-77, 1978.
- DAVIS, M. J.; FRENCH, W. J.; SCHAAD, N. W. Axenic culture of the causal bacteria associated with phony peach disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, n.3, p.309-314, 1981.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G. JUNIOR; VIDAVER, A. K.; HARRIS, H. W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria. Including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. nov., subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, n.2, p.107-117, 1984.
- DAVIS, M. J.; RAJU, B. C.; BRLANSKY, R. H.; LEE, R. F.; TIMMER, I. W.; NORRIS, R. C.; MCCOY, R. E. Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. **Phytopathology**, v.73, n.12, p.1510-1515, 1983.

- DONALDSON, S. P.; DEACON, J. W. Role of calcium in adhesion and germination of zoospore cysts of *Pythium*: a model to explain infection of host plants. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.2052-2059, 1992.
- DOW, J. M.; DANIELS, M. J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plant. **Yeast**, v.17, p.263-271, 2000.
- DUFRENE, Y. F.; VERMEIREN, H; VANDERLEY, J.; ROUXHET, P. G. Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, v.142, p.885-865, 1996.
- ERICKSON, L. C. The general physiology of citrus. In: REUTHER, W; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. **The Citrus Industry – Anatomy, Physiology, Genetics, and Reproduction**. Riverside: University of California, 1968. cap.2, p.86 – 122.
- ERRAMPALLI, D.; LEUNG, K.; CASSIDY, M. B.; KOSTRZYNSKA, M.; BLEARS, M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.35, n.3, p.187-199. 1999.
- EVERT, D. R.; SMITTLE, D. A. Phony disease influences peach leaf characteristics. **Hortscience**, v.24, n.6, p.1000-1002, 1989.
- FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E.A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. cap. 25, p.261-296.

- FERREIRA, H.; GONÇALVES, E. R.; RODRIGUES NETO, J.; ROSATO, Y. B. Primers specific for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.15-20, 2000.
- FREITAG, J. H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, v.41, n.10, p.920-934, 1951.
- FRENCH, W. J.; KITAJIMA, E. W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Reporter**, v.62, n.12, p.1035-1038, 1978.
- FRENCH, W. J.; STASSI, D. L.; SCHAAD, N. W. The use of immunofluorescence for the identification of phony peach bacterium. **Phytopathology**, v.68, n.7, p.1106-1108, 1978.
- FRY, S. M.; MILHOLLAND, R. D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, v.80, n.1, p.61-65, 1990.
- FRY, S. M.; HUANG, J. S.; MILHOLLAND, R. D. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Phytopathology**, v.84, n.4, p.357-363, 1994.
- FUNDECITRUS. **Manual de CVC - como obter sucesso no manejo da doença**. 4.ed. Araraquara, 2000. 15p.
- GENOMA FUNCIONAL DA XYLELLA - **Genoma Funcional - Títulos e resumos**. <http://watson.fapesp.br/funcional/main.htm>. (15 jun. 2000).

- GOHEEN, A. C.; NYLAND, G.; LOWE, S. K. Association of rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. **Phytopathology**, v.63, n.3, p.341-345, 1973.
- GOODWIN, P. H. Cloning and expression of *Xylella fastidiosa* antigens in *Escherichia coli* and *Erwinia stewartii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.487-491, 1989.
- GOODWIN, P. H.; ZHANG, S. Distribution of *Xylella fastidiosa* in southern Ontario as determined by the polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.19, n.1, p.13-18, 1997.
- GOODWIN, P. H.; DEVAY, J. E.; MEDEDITH, C. P. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.32, n.1, p.1-15, 1988.
- GOULD, A. B.; FRENCH, W. J.; ALDRICH, J. H.; BRODBECK, B. V.; MIZELL, R. F. III; ANDERSEN, P. C. Rootstock influence on occurrence of *Homolodisca coagulata*, peach xylem fluid amino acids, and concentrations of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.75, n.8, p.767-770, 1991
- GUBLER, F. H.; HARDHAM, A. R.; DUNHIEC, J. Characterizing adhesiveness of *Phytophthora cinnamomi* zoospores during encystment. **Protoplasma**, v.149, n.1, p.24-30, 1989.
- HARTUNG, J. S.; BERETTA, J.; BRLANSKY, R. H.; SPISSO, J.; LEE, R. F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, n.6, p.591-597, 1994.

- HEARON, S. S.; SHERALD, J. L.; KOSTKA, S. J. Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore and oak leaf scorch. **Canadian Journal of Botany**, v.58, n.12, p.1986-1993, 1980.
- HIKICHI, Y.; SUZUKI, K.; TOYODA, K.; HORIKOSHI, M.; HIROOKA, T.; OKUNO, T. Successive observation of growth and movement of genetically *lux*-marked *Pseudomonas chichorii* and the response of host tissues in the same lettuce leaf. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.64, n.5, p.519-525, 1998.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**. v. 85, n.2, p. 209-212, 1995a.
- HILL, B. L.; PURCELL, A. H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995b.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. **Phytopathology**., v.87, n. 10, p.1197-1201, 1997.
- HOLT, J. G. Genus *Xylella*. In: HOLT, J. (Ed.) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. London: Wilians & Wilkins, 1994. p.100-115.
- HOPKINS, D.L. Use of the pin-prick inoculation technique to demonstrate variability in virulence of the Pierce`s disease bacterium. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF VIRUSES OF GRAPEVINES, 7., Niagara Falls, 1980. **Proceedings**. Niagara Falls: ICVG, 1980. p. 1170-1180.

- HOPKINS, D. L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, v.71, n.4, p.415-418, 1981.
- HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D. L.; MOLLENHAVER, H. H. Rickettsialike bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v. 179, p.298-300, 1973.
- HOPKINS, D. L.; BISTLINE, F. W.; RUSSO, L. W.; THOMPSON, C. M. Seasonal fluctuation in the occurrence of *Xylella fastidiosa* in root and stem extracts from citrus with blight. **Plant disease**, v.75, n.2, p.145-147, 1991.
- KITAJIMA, E. W.; BARARCIC, M.; FERNANDEZ-VALIELA, M. V. Association of rickettsia-like bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathology**, v.65, n.4, p.476-479, 1975.
- KITAJIMA, E. W.; MOHAN, S. K.; TSUNETTA, M.; BLEICHER, J.; FRENCH, W.; LEITE JUNIOR, R. P. Ocorrência da escaldadura das folhas da ameixeira nos Estados de Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, n.3, p285-292, 1981.
- KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; STENTEBJERG-OLESEN, B.; HASMAN, H.; HASTY, D.L. Frimbriae: detection, purification, and characterization. **Methods in Microbiology**, v.27, p.239-248, 1998.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J. S. et al. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF

- CITRUS VIROLOGISTS, 14., Campinas, 2000. **Proceedings**. Campinas:IOCV, 2000. p.423.
- KWON, Y. H.; EPSTEIN, L. A 90-Kda glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia to substrata. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.5, p. 481-487, 1993.
- KWON, Y. H.; EPSTEIN, L. Isolation and composition of the 90 KDa glycoprotein associated with adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, n.1, p.63-74, 1997.
- LARANJEIRA, F. F.; HARAKAVA, R.; CARVALHO, S. A.; POMPEU, JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O. Avaliação serológica e sintomatológica da ocorrência de *Xylella fastidiosa* e Clorose Variegada dos Citros (CVC) no Banco ativo de Germoplasma do IAC. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p335, 1996. Suplemento. /Apresentado ao 29., Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, 1996-Resumo/
- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A.; COLLETA FILHO, H. D. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n.2, p.147-154, 1998.
- LEE, R. F.; DERRICK, K. S.; BERETTA, M. J. G.; CHAGAS, C. M.; ROSETTI, V. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. **Citrus Industry**, v.72, n.10, p.12-15, 1991.
- LEITE, B.; NICHOLSON, R. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Experimental Mycology**, v.16, n.1, p.76-86, 1992.

- LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.119-157, 2001.
- LEITE, B.; ISHIDA, M. I.; ALVES, E.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W. Genomic and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.35, n.6, p.645-650, 2002.
- LEITE, R. M. V. B. C.; LEITE JUNIOR, R. P.; CERESINI, P. C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.54-57, 1997.
- LEPEREN, W. van. Fluid composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. **Journal of Experimental Botany**. v.51, n.345, p.769-776. 2000.
- LEU, L. S.; SU, C. C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, v.77, n.7, p.642-646, 1993.
- LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.3, p.392-393, 1996.
- LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v.82, n.1, p.94-97, 1998.

- LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; PALMA, R. R.; PIZZOLITTO, A. C. Diagnose da Clorose Variegada dos Citros por microscopia ótica. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.370-374, 1997.
- LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, n.2, p.329-344, 1999.
- LOPES, S. A.; RIBEIRO, P. G.; FRANÇA, S. C.; SANTOS, J. M. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, v.84, n.8, p.827-830, 2000.
- LOPES, J. R. S.; BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R. P. P.; KRUGNER, R.; GARCIA JUNIOR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.343, 1996. Suplemento. /Apresentado ao 29., Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, 1996 - Resumo/
- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A. M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.66, n.1, p.53-57, 1994.
- MACHADO, M. A; TARGON, M. L. P. N.; BERETTA, M. J. G.; LARANJEIRA, F. F.; CARVALHO, S. A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros enxertadas sobre laranjeira pêra com clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.30-33, 1997.
- MARUCCI, R. C.; CAVICHIOLI, R. R.; ZUCCHI, R. A. Espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedouro, SP, com descrição de uma nova espécie de Acrogonia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.46, n.2, p.149-164, 2002.

- MAUNSBACH, A.B.; AFZELIUS, B.A. **Biomedical electron microscopy – illustrated methods and interpretations**. San Diego: Academic Press. 1999. p.548.
- MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. Análise filogenética de *Xylella fastidiosa* baseada no gene 16S de rDNA e na região espaçadora 16S-23S. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.126, 2000. /Apresentado ao 23., Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas, 2000 - Resumo/
- MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE, R. M. V. B. C.; STALL, R. E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, n.4, p.456-461, 1994.
- MIRCETICH, S. M.; LOWE, S. K.; MOLLER, W. J.; NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, v.66, n.1, p.17-24, 1976.
- MITSUHASHI, J. Artificial rearing and aseptic rearing of leafhopper vectors: applications in virus and MLO research. In: MARAMOROSCH, K.; HARRIS, K. (Ed.). **Leafhopper vectors and plant disease agents**. London: Academic Press, 1979. p.369-412,
- MITTLER, T. E. Applications of artificial feeding techniques for aphids. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphis, their biology, natural enemies and control**, Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p.145-170.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas da clorose variegada na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.2, p. 241-244, 1994.

- MOLLENHAUER, H. H.; HOPKINS, D. L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiology Plant Pathology**, v.9, n.1, p.95-100, 1976.
- MONTEIRO, P. B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A. J.; GARNIER, M.; BOVE, J. M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, n.3, p.246-251, 2001 a.
- MONTEIRO, P. B.; TEIXEIRA, D. C.; PALMA, R. R.; GARNIER, M.; BOVE, J. M.; RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2263-2269, 2001 b.
- NOMÉ, S. F.; HAELTERMAN, R. M.; DOCAMPO, D. M.; PRATAVIEIRA, A. G.; DIFEO, L. V. Escaldadura de las hojas del almendro. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.1, p.57-60, 1992.
- PAIVA, P. E. B.; SILVA, J. L. ; GRAVENA, S.; YAMAMOTO, P. T. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do Estado de São Paulo. **Laranja**, v. 17, n.1, p.41-54, 1996.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; GARCIA JÚNIOR, F. F.; RODRIGUES NETO, J. R.; BERIAM, L. O. S. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.1, p.46-49, 1997.
- PINTO, F.G.S.; LEITE JÚNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp através da técnica de PCR. **Fitopatologia brasileira**, v.25, p.254, 1999. Suplemento. /Apresentado ao 22. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, 1999- Resumo/

- POLSON, A.; WECHMAR, M.B. von; REGENMORTELL, M.H.V. van. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications**, v.9, n.5, p.475-493, 1980.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.
- PROJETO GENOMA - *Xylella fastidiosa* Genome Project Home Page. <http://www.ibi.dcc.unicamp.br/genoma/index1.html>. (15 jun. 2000).
- PUHLMANN, J.; BUCHELI, E.; SWAIN, M. J.; DUNNING, N.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; HAHN, M. G. Generation of monoclonal antibodies against plant cell wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal α -(1→2)-linked fucosyl-containing epitope, **Plant Physiology**, v.104, n.7, p.699-710, 1994.
- PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? **Journal of Plant Pathology**. v.79, n.1, p.99-105, 1997.
- PURCELL, A. H.; FINLAY, A. H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, v.69, n.4, p.393-395, 1979.
- PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review Phatopathology**, v. 34, p.131-151, 1996.
- PURCELL, A. H.; FINLAY, A. H.; McCLEAN, D. L. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors. **Science**, v.206, p.839-841, 1979.

- PURCELL, A. H.; SAUNDERS, S. R.; HENDSON, M.; GREBUS, M. E.; HENRY, M. J. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. **Phytopathology**, v.89, n.1, p.53-58, 1999.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, v.20, n.1, p.55-76, 1999.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, v.57, n.1, p.23-33, 1998.
- RAJU, B. C.; WELLS, J. M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. **Plant Disease**, v.70, n.3, p.182-186, 1986.
- RAJU, B. C.; WELLS, J. M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R. H.; LOWE, S. K. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, v.72, n.11, p.1460-1466, 1982.
- ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; LIMA, J. E. O. D.; MIRANDA, V. S.; D CARLOS, E. F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p. 517 – 518, 1996.
- ROBERTO, S. R.; DALLA PRIA JÚNIOR, W.; YAMAMOTO, P. T.; FELLIPE, M. R.; FREITAS, E. P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, em Gavião Peixoto (SP). **Laranja**, v.21, n.1, p.65-79, 2000.

- ROBERTS, S. J.; EDEN-GREEN, S. J.; AMBLER, D. J. *Pseudomonas syzygii*, sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. **Systematic Applied Microbiology**, v.13, n.1, p.34-43, 1990.
- ROOS, I. M. M.; HATTINGH, M. J. Systemic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced into petioles. **Phytopathology**, v.77, n.9, p.1253-1257, 1987.
- ROSSETI, V.; DE NEGRI, J. D. Clorose Variegada dos Citros: revisão. **Laranja**, v.11, n.1, p.1-14, 1990.
- ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R.; QUAGGIO, J. A.; DE NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus de l'Académie des Science des Paris**, v.310, n.3, p.345-349, 1990.
- ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wrinkle-free sections on formvar-coated slot grids. **Ultramicroscopy**, v.1, n.1, p.151-155, 1975.
- SANDERLIN, R. S. Evidence that *Xylella fastidiosa* is associated with pecan fungal leaf scorch. **Plant Disease**, v.82, n.2, p.264, 1998.
- SCHULTZ, H. R.; MATTHEWS, M. A. Resistance to water transport in shoots of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology**, v.88, p.718-724, 1988.
- SHEEN, J.; HWANG, S.; NIWA, Y.; KOBAYASHI, H.; GALBRAITH, D. W. Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cell. **The Plant Journal**, v.8, n.5, p.777-784. 1995.

- SHERALD, J. L.; KOTSKA, S. J. Bacterial leaf scorch of land trees caused by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Arboriculture**, v.18, n.1, p.57-63, 1992.
- SHERALD, J. L.; LEI, J. D. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees. **Plant Disease**, v.75, n.2, p.200-203, 1991.
- SILVA, F. R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, n.1, p.165-171, 2001.
- SIMPSON A. J; REINACH F. C; ARRUDA P.; MEIDANIS J.; SETUBAL J.C. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-57, 2000.
- SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Partial characterization of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germling of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.52, n.5 , p.411 –425, 1998.
- SUGUI, J. A.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B Evidências da existência de cálcio associado ao material adesivo obtido de *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.335, 1999. Suplemento. /Apresentado ao 32. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, 1999 – Resumo/
- SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. **The Citrus Industry – History, World Distribution, Botany, and Varieties**. Riverside: University of California, 1967. cap.3, p.191 – 422.

- TIMMER, I. W.; BRLANSKY, R. H.; LEE, R. F.; RAJU, B. C. A fastidious, xylem-limited bacterium infecting ragweed. **Phytopathology**, v.73, n.7, p.975-979, 1983.
- TSAI, J. H.; PERRIER J. L. Morphology of the digestive and reproductive systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae). **Florida Entomologist**, v.79, p.563-578, 1996.
- TYSON, G. E.; STOJANOVIC, B. J.; KUKLINSKI, R. F.; DIVITTORIA, T. J.; SULLIVAN, M. L. Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. **Phytopathology**, v.75, n.3, p.264-269, 1985.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.2675-2679, 2000.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; THOMPSON, J. M.; LOWE, S. K. Etiology of phony peach and plum leaf scald diseases. **Phytopathology**, v.71, n.11, p.1156-1161, 1981.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H.-Y.; WEISBERG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J., W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.
- WUTSCHER, H. K.; PAVAN M. A.; PERKINS R. E. A survey of mineral elements in the leaves and roots of citrus variegated chlorosis (or amarelinho) affected orange trees and 45 acid extractable elements in the soils of orchards in northern São Paulo and southern Minas Gerais. **Archives of Biology and Tecnology**, v.37, n.1, p.147-156, 1994.

- WIZEMANN, T. M.; MOSCOVITZ, J.; PEARCE, B. J.; et al. Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesions in three major pathogens. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.93, p.7985-7990, Jul. 1996.
- WULFF, N. A. Caracterização enzimática das celulases XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressas em *Escherichia coli*. Piracicaba, 2002. 196p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- WUTSHER, H. K.; COHEN, M.; YOUNG, R. H. Zinc and water-soluble phenolic levels in the wood for the diagnosis of citrus blight. **Plant Disease Reporter**, v.61, n.7, p.572-576, 1977.
- YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S.R.; DALLA PRIA JUNIOR., W. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera:Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.2, p.178-181, 2002.