

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO BACTERICIDA DE PRODUTOS  
NATURAIS SOBRE A BACTÉRIA  
*XYLELLA FASTIDIOSA***

**Danielle Fernandes da Silva**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientador: Dr. Moacir Rossi Forim  
Co-orientador: Carlos Henrique Gomes Martins**

**Dedeagro Comércio e Representação Agrícola Ltda.**

**São Carlos - SP  
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586ia Silva, Danielle Fernandes da.  
Investigação da ação bactericida de produtos naturais sobre a bactéria *Xylella fastidiosa* / Danielle Fernandes da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

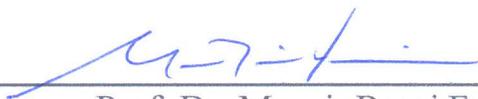
1. Produtos naturais. 2. *Xylella fastidiosa*. 3. Bactericidas. 4. *In vivo*. 5. *In vitro*. 6. Cítricos. I. Título.

CDD: 547.3 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Mestrado Profissional

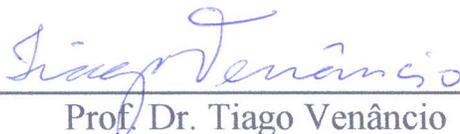
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Profissional da candidata Danielle Fernandes da Silva, realizada em 26 de agosto de 2013:*



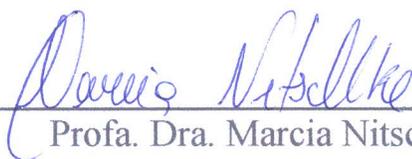
---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



---

Prof. Dr. Tiago Venâncio



---

Profa. Dra. Marcia Nitschke

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Leonel e Fátima, à minha filha Bruna e  
meu marido Eduardo.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por nos dar saúde, proteção, sabedoria e paz, a mim e toda minha família. Por ter uma filha linda, perfeita e com bastante saúde.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, pelos ensinamentos, pela paciência, atenção e pela sua grande educação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, pela sua atenção e simpatia, por ter permitido que realizássemos os experimentos in Vitro em seu laboratório.

À Dra. Alessandra Alves de Souza, que permitiu que fizéssemos os experimentos in Vivo em seu laboratório. E à sua Aluna Thais Giorgiano, por sua atenção e por me auxiliar nos experimentos no IAC.

À Prof. Dra. Rose Carlos, que nos forneceu parte do material em teste.

Às alunas do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins que me deram grande atenção.

À minha mãe, que me incentivou e fez-me acreditar que tudo iria dar certo.

Ao meu pai, pela sua preocupação nos dias em que pegava estrada de noite para vir embora e pelo seu apoio.

Ao meu marido Eduardo, que me ajudou com os conhecimentos da informática quando redigia esta dissertação.

E a todos que, de alguma forma, colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho.

## Lista de Tabelas

TABELA 3.1. Composição para 1L do meio de cultura PW e PCYE .....	32
TABELA 4.1. MIC dos compostos testados in Vitro em µg/MI .....	48
TABELA 4.2. Quantificação do DNA total extraído das plantas em ηg/MI antes da realização dos tratamentos.....	53
TABELA 4.3. Diagnóstico de bactéria Xylella fastidiosa em plantas de citros previamente sadias. As plantas foram enumeradas de 1 a 31. (+) indica a presença da bactéria e (-) ausência da mesma .....	56
TABELA 4.4. Quantificação do DNA extraído das plantas de citros pelo Nanodrop em ηg/µL .....	58
TABELA 4.5. Resultado do PCR quantitativo em Tempo Real para a bactéria Xylella fastidiosa do citros .....	61
TABELA 4.6. Porcentagem de células da bactéria Xylella fastidiosa no pós tratamento, em relação a antes do tratamento ser realizado .....	62
TABELA 4.7. Concentração em moles por litro de cada molécula utilizada nos testes com as plantas de citros infectadas com a bactéria Xylella fastidiosa para matar 99,9% de bactéria .....	63

## Figuras

FIGURA 1.1. Agressividade, especificidade, e evolução da interação patógeno-hospedeiro em função do tipo de doença .....	3
FIGURA 1.2. Imagens ilustrativas para os principais sintomas de doenças dos citros dos tipos I, II, III, IV e V .....	4
FIGURA 1.3. Imagens da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> . (1) Aumento de 18500x, (2) aumento de 40.000x .....	6
FIGURA 1.4. Modelo dos estádios de desenvolvimento de biofilme bacteriano .....	9
FIGURA 1.5. Modelo de interação e formação de biofilme das células de <i>X. fastidiosa</i> com a superfície do hospedeiro. Feixe vascular contendo endófitos e seiva do xilema .....	11
FIGURA 1.6. Sintomas da clorose variegada dos citros .....	13
FIGURA 1.7. Cigarrinhas transmissoras de <i>X. fastidiosa</i> para citros .....	15
FIGURA 1.8. Poda de ramos doentes em plantas com mais de 2 anos .....	18
FIGURA 1.9. Estruturas químicas de compostos fenólicos que foram avaliados neste estudo.....	21
FIGURA 1.10. Moléculas com princípio bactericida natural. ....	25
FIGURA 1.11. Primeiro ciclo da PCR.....	27
FIGURA 3.1. Esquematização para a realização da técnica de microdiluição em caldo usado para a determinação do MIC .....	34
FIGURA 3.2. Inoculação da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> em mudas de laranja .....	36
FIGURA 3.3. Esquema mostrando como funciona uma Eletroforese em Gel	
Agarose .....	39
FIGURA 3.4. Imagem ilustrativa de como as plantas eram alimentadas pelos compostos em teste .....	40
FIGURA 3.5. Esquema de diluição seriada para construção de curva de calibração de análise quantitativa do DNA de <i>X. fastidios</i> .....	41

FIGURA 4.1. Placa Eliza® onde foi realizado o MIC com as amostras contaminadas.....	46
FIGURA 4.2. Placas com meio de cultura agar-sangue contaminadas com bactérias provenientes das amostras que foram testadas .....	46
FIGURA 4.3. Aplicação de resazurina nos poços para a identificação da presença da bactéria.....	47
FIGURA 4.4. MIC das moléculas que mostraram atividade nas concentrações avaliadas.....	49
FIGURA 4.5. Concentração inibitória mínima dos compostos testados in Vitro, através de microdiluição em microplaca .....	50
FIGURA 4.6. Padrão eletroforético das reações de amplificação para a detecção da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> a partir do DNA extraído de plantas de citros anteriormente sadias e que foram submetidas à inoculação de uma solução da bactéria.....	54
FIGURA 4.7. Comparação da estabilidade de armazenamento para amostras de DNA de citros logo após a extração e depois de ser armazenado a $-80^{\circ}\text{C}$ por 60 dias.....	59
FIGURA 4.8. Foto Eletroforese Gel Agarose do DNA extraído das plantas de citros antes e depois dos tratamentos com os produtos bactericidas .....	60
FIGURA 4.9. Resultado dos compostos testados como bactericidas para a bactéria <i>X. fastidiosa</i> do citros .....	64
FIGURA 4.10. Comparação dos resultados In Vitro e In Vivo.....	65
FIGURA 4.11. Fotos das folhas de citros coletadas após o termino do tratamento com os bactericidas em teste.....	66
FIGURA 4.12. Xilema do pecíolo das plantas do experimento visualizado através de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	67

## Resumo

INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO BACTERICIDA DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE A BACTÉRIA *XYLELLA FASTIDIOSA*. O presente trabalho descreve o estudo de compostos naturais como agentes bactericidas para o controle da bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da doença Clorose Variegada Do Citros (CVC), “amarelinho”. A CVC é uma doença causadora de grandes prejuízos na citricultura brasileira e que ainda não possui um produto bactericida específico no mercado para combatê-la. O projeto foi desenvolvido em duas etapas. A primeira fase do projeto foi desenvolvido com ensaios *in Vitro*, onde os compostos naringenina complexada com rutênio e magnésio, separadamente, hesperidina complexada com magnésio, azadirachtina, hesperidina e naringenina, foram testados como inibidores de crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa*, utilizando o sistema de microdiluição em caldo para detectar a concentração inibitória mínima destes compostos perante a bactéria *Xylella fastidiosa*. Estes compostos apresentaram, respectivamente, concentrações inibitórias mínimas de 0,19  $\mu\text{M}$ , 0,34  $\mu\text{M}$ , 1,01  $\mu\text{M}$ , 2,1  $\mu\text{M}$ , 3,27  $\mu\text{M}$  e 7,3  $\mu\text{M}$ . Numa segunda etapa, os melhores resultados obtidos *in vitro* foram validados em experimentos *in Vivo*, onde a bactéria foi inoculada em plantas de citros sadias. Após um período de manifestação da doença nas plantas, estas foram diagnosticadas através de análises de PCR para identificar qual das plantas havia sido efetivamente contaminada pela bactéria. Após detectar as plantas doentes, através da presença do DNA da bactéria *Xylella fastidiosa*, estas foram tratadas com os compostos naturais e seus derivados que foram testados *in Vitro*. Após um período de tratamento, para que as plantas absorvessem os metabólitos e estes atuassem sobre a bactéria, realizou-se uma análise por PCR quantitativo (qPCR) comparando a quantidade de bactéria nas plantas antes e após o tratamento com os bactericidas, avaliando a ocorrência ou não, da inibição da bactéria. Obteve-se os seguintes resultados: para naringenina complexada com Mg, 0,8  $\mu\text{M}$ ; naringenina complexada com Ru, 1,2  $\mu\text{M}$ ; azadirachtina, 1,4  $\mu\text{M}$ ; hesperidina, 1,8  $\mu\text{M}$ ; naringenina 3,9  $\mu\text{M}$  e cobre (controle positivo), 6,3  $\mu\text{M}$ , isto para 0,1 % de bactéria viva. Os resultados obtidos *in vitro* foram coerentes com os resultados *in vivo*

## Abstract

INVESTIGATION OF BACTERICIDE PRODUCTS ACTION ON *XYLELLA FASTIDIOSA* BACTERIUM. This work describes the study of natural compounds as potential bactericides for control of *Xylella fastidiosa* which causes the Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a disease that causes large losses in Brazilian citrus and still does not have a bactericidal specific in the market to combat it. The project was developed in two stages. The first part of the work was done *in vitro*, where the compounds naringenina complexed with rutênio and magnésio, separately, hesperidina complexed with magnésio, azadirachtina, hesperidina and naringenina were tested as inhibitors of *Xylella fastidiosa* growth using the system of microdilution in culture media to detect the minimal inhibitory concentration of these compounds against the bacterium *Xylella fastidiosa*. These compounds showed, respectively, minimum inhibitory concentrations of 0,19  $\mu\text{M}$ , 0,34  $\mu\text{M}$ , 1,01  $\mu\text{M}$ , 2,1  $\mu\text{M}$ , 3,27  $\mu\text{M}$  e 7,3  $\mu\text{M}$ . In a second phase, the best results obtained *in vitro* were validated *in Vivo* experiments, where the bacterium was inoculated into healthy citrus plants. After a period of manifestation of disease in plants, these were diagnosed by PCR analysis to identify which plants had been contaminated by the bacterial. After detecting diseased plants through the presence of *Xylella fastidiosa*'s DNA, they were treated with those natural compounds and their derivatives that have been tested *in vitro*. After a period of treatment, the plants to absorb the metabolites and acted upon these bacteria, a analysis was performed by quantitative PCR (qPCR) comparing the amount of bacteria in plants before and after treatment with the bactericide, evaluating the occurrence or not, of the bacterium inhibition. The following results were obtained: for naringenina complexed with Mg, 0,8  $\mu\text{M}$ ; naringenina complexed with Ru, 1,2  $\mu\text{M}$ ; azadirachtina, 1,4  $\mu\text{M}$ ; hesperidina, 1,8  $\mu\text{M}$ ; naringenina 3,9  $\mu\text{M}$  and cuprum (positive control), 6,3  $\mu\text{M}$ , this for 0,1% of life bacteria. The *in vitro* results consistent with the results *in vivo*.

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1. Histórico da citricultura no Brasil .....	1
1.2. Futuro da citricultura brasileira .....	2
1.3. Doenças da citricultura.....	2
1.4. A Clorose Variegada dos Citros: <i>Xylella fastidiosa</i> .....	5
1.4.1. Etiologia .....	5
1.4.2. <i>Xylella fastidiosa</i> e a formação do biofilme .....	8
1.4.3. Hospedeiros e sintomas.....	12
1.4.4. Vetores.....	14
1.4.5. Métodos atuais de controle da CVC.....	16
1.4.5.1. Implementação de pomares com mudas sadias.....	16
1.4.5.2. Eliminação de plantas doentes e poda de ramos afetados.....	17
1.4.5.3. Controle químico dos vetores.....	18
1.4.6. Desenvolvimento de novos produtos de controle da CVC .....	19
1.4.6.1. Peptídeos antimicrobiais (AMPs) .....	19
1.4.6.2. Compostos fenólicos .....	20
1.4.6.3. Benzotriazol e silício .....	22
1.4.6.4. Uso de produtos naturais .....	23
1.4.6.5. Hesperidina, Azadiracthina e naringenina, bactericidas naturais .....	24
1.4.7. Métodos de identificação e quantificação da bactéria.....	25
1.4.7.1. Técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	25
1.4.7.2. qPCR (PCR quantitativa).....	27
2. Objetivo .....	29
2.1. Objetivos específicos .....	29
3. Material e Métodos.....	30
3.1. Estirpe de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	30
3.2. Metabólitos secundários avaliados .....	30
3.3. Ensaios realizados in Vitro .....	30

3.3.1. Meio de cultura utilizados.....	31
3.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) das amostras em teste sobre a bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	32
3.4. Ensaios in Vivo.....	35
3.4.1. Inoculação da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	35
3.4.2. Detecção da <i>Xylella fastidiosa</i> através da técnica PCR.....	36
3.4.2.1. Extração do DNA total das folhas de citros.....	36
3.4.2.2. Amplificação do DNA da <i>Xylella fastidiosa</i> -realização da PCR.....	38
3.4.3. Ensaio de inibição microbiana in vivo em casa de vegetação .....	39
3.4.4. Quantificação da bactéria. PCR quantitativo.....	40
3.5. Visualização do xilema das plantasdo experimento através de Microscopia Eletrônica de Varredura .....	42
3.5.1. Preparo das amostras.....	42
4. Resultados e Discussões.....	44
4.1. Amostras selecionadas.....	44
4.2. Ensaios in Vivo e in Vitro.....	44
4.3. Ensaios in Vitro. ....	45
4.3.1. Crescimento da bactéria e Contaminação dos ensaios. ....	45
4.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) das amostras testadas em microplacas (Placa Eliza®). ....	47
4.3.3. Resultado dos MICs dos ensaios in Vitro.....	48
4.4. Ensaio in Vivo.....	52
4.4.1. Caracterização de presença da <i>Xylella fastidiosa</i> no citros. ....	52
4.4.1.1. Extração do DNA total das folhas de citros.....	52
4.4.1.2. Amplificação do DNA pela técnica de PCR e visualização do DNA por Eletroforese em Gel Agarose. ....	54
4.4.2. Tratamento das plantas infectadas com a bactéria <i>X. fastidiosa</i> com as amostras Azadiracthina, Hesperidina, Naringinina. ....	56
4.4.3. PCR em Tempo Real (qPCR). ....	57
4.4.4. Resultado PCR quantitativo em Tempo Real.....	61
4.5. Visualização do xilema das plantas de citros por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	66

5. Conclusões. ....	68
6. Referências bibliográficas .....	69

## 1- Introdução

### 1.1- História da citricultura no Brasil

Os citros são plantas nativas do sudeste do continente asiático, de onde foram distribuídos para várias partes do mundo. Nas Américas, provavelmente essas plantas foram introduzidas a partir de 1493 através de sementes trazidas por Colombo (WEBBER et al., 1967). No Brasil, os citros foram introduzidos por volta de 1530 com o primeiro relato em Cananéia (SP), expandindo-se para outras partes do Brasil rapidamente (HASSE, 1987).

Percorrendo os laranjais da Califórnia, Texas e Flórida, nos Estados Unidos, em 1952, Sylvio Moreira afirmava convicto que, “graças as condições grandemente favoráveis a essa cultura existentes em nosso País, tínhamos uma promissora possibilidade de competir com o maior produtor mundial de citros”. Isso parecia uma utopia, até que a geada de 1962/63, ocorrida na Flórida, veio abrir, de forma inesperada, um novo e ambicionado campo para a colocação da produção brasileira na forma de suco concentrado congelado de citros, de larga aceitação mundial (MOREIRA, 1980).

O Brasil entra no século XXI com a produção de 18,5 milhões de toneladas de frutas cítricas, sendo atualmente o maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado. A principal área produtora é o Estado de São Paulo, produzindo 78,2% do total, e supera a produção da Flórida em quantidade de frutas e de suco concentrado congelado (SCC). Os demais estados brasileiros produtores de fruta cítrica no Brasil são: Sergipe, com 4,09%; Bahia, com 2,92%; Minas Gerais, com 2,27%; Rio Grande do Sul, com 1,87%; Paraná, com 1,16%; Rio de Janeiro, com 0,75% e Goiás, com 0,58% (AMARO e SALVA, 2001).

Aproximadamente 98% do suco concentrado é exportado para os Estados Unidos e União Européia, além do Japão e outros 45 países. A exportação da fruta *in natura* é pequena, e somada a fruta comercializada internamente, representa 30% da produção.

Entre as variedades produzidas no Brasil se destacam a laranja Pêra, com 37,8% do mercado, seguida da Natal e da Valência, ambas com 23,9% cada uma (POMPEU JUNIOR, 2001).

## **1.2- Futuro da citricultura brasileira.**

Sob a ótica comercial, os pontos fortes da citricultura brasileira – sobretudo da paulista – são o seu custo de produção competitivo e um parque industrial que atua em escala global.

Por outro lado, o ponto fraco encontra-se no principal ativo: os pomares. Nos últimos anos, o aparecimento de severas doenças comprometeu o custo e a oferta futura.

A história mostra que o setor acabou encontrando soluções graças a habilidade e a agilidade de pesquisas de vanguarda. Mas o aparecimento de novas doenças neste início de milênio é um risco econômico muito presente no setor e pode comprometer a competitividade brasileira no futuro (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

## **1.3- Doenças da citricultura**

Pode-se definir doença como um distúrbio fisiológico, resultado de uma irritação contínua causada por agentes bióticos ou abióticos e que pode levar ao aparecimento de sintomas (AGRIOS, 1997). Em consequência dessa definição, doença não pode ser confundida com o patógeno nem com os sintomas, nem com injúrias. Também por essa definição, fica claro que o mais importante não é a natureza do agente causal, mas, sim, a interação que ocorre com a planta.

Dentre os agentes bióticos, destaca-se os fungos e bactérias, além dos vírus, viróides e nematóides. Os agentes abióticos podem ser temperaturas muito altas ou muito baixas, intoxicação por pesticida ou minerais, falta ou excesso de luz ou umidade do solo, poluição atmosférica, acidez ou alcalinidade do solo, etc.

Qualquer que seja o agente causal, as doenças podem ser tipificadas de acordo com o processo fisiológico que afetam, e a partir dele ter uma idéia da evolução e do comportamento da interação patógeno-hospedeiro (FIGURA 1.1) (BEDENDO, 1995).

Tipo de doença					
I	II	III	IV	V	VI
← Agressividade					
Especificidade →					
Evolução do parasitismo →					

FIGURA 1.1. Agressividade, especificidade, e evolução da interação patógeno-hospedeiro em função do tipo de doença. Legenda: I = podridão de frutos, II = tombamento, III = podridão de raízes e colo, IV = doenças vasculares, V = manchas, e VI = viroses. (Fonte: MATTOS JUNIOR et al., 2005)

As doenças do tipo I são as doenças de órgão de reserva, onde as principais são: a verrugose, que recebe esse nome devido a deformação severa que causa na casca dos frutos cítricos. A melanose, cujos sintomas são pequenas manchas circulares, marrom escuras ou pretas, salientes. A mancha preta ou pinta preta, que é uma doença fúngica e seus sintomas são lesões circulares, com centro claro, deprimidas, circundadas por borda escura. Podridão de alternaria, onde os frutos afetados amarelecem prematuramente e podem apresentar cor marrom na casca, próximo a região estilar. Podridão floral ou estrelinha.

As doenças do tipo II são aquelas que causam danos em tecidos jovens onde a principal é o tombamento ou damping-off.

As doenças do tipo III são as que causam podridões de colo e de raízes, a principal delas é a Gomose, causada por um fungo e seus sintomas mais comuns são a exsudação de goma em lesões no tronco e colo da planta.

As doenças do tipo IV são as vasculares, onde a principal é a Clorose variegada dos citros (CVC).

As doenças do tipo V são as que afetam a fotossíntese, onde as principais são: Cancro cítrico, cujos sintomas são lesões levemente salientes nas folhas e frutos, os

frutos caem da planta antes de atingir a maturação. A fumagina, que não é considerada uma doença muito importante, mas pode afetar a fotossíntese, é a mais conhecida doença causada pelos “fungos de revestimento”, ou seja, fungos que crescem sobre tecidos das plantas, mas não os penetram. Mancha da alternário, uma das doenças mais recentes do Brasil e vem se disseminando no mundo nos últimos anos, ataca folhas e frutos, seus sintomas são manchas marrons que afetam o crescimento dos ramos e qualidade dos frutos.

As doenças do tipo VI são aquelas que alteram o uso de fotossintatos, onde as principais são causadas por vírus. A principal é o Greening, que é uma das mais destrutivas doenças do citros, seus sintomas são manchas amarelas interernervais nas folhas, confundindo com deficiência nutricional, podem também apresentar má formação nas pontas, muitas vezes em forma de coração apresentando geralmente uma produção pequena, com frutos deformados. A FIGURA 1.2 ilustra as principais doenças da citricultura brasileira (MATTOS JUNIOR et al., 2005)

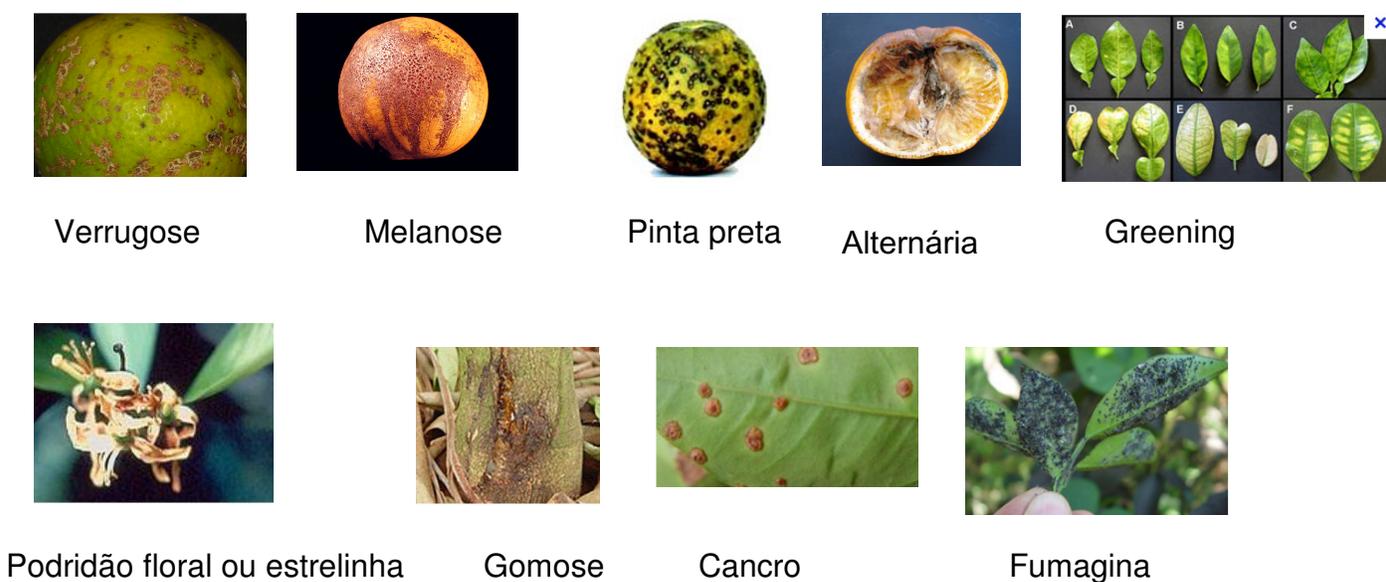


FIGURA 1.2. Imagens ilustrativas para os principais sintomas de doenças dos citros dos tipos I, II, III, IV e V. (Fonte: [www.fundecitros.com.br](http://www.fundecitros.com.br), janeiro 2013)

## 1.4 - A Clorose variegada dos citros: *Xylella fastidiosa*.

### 1.4.1 – Etiologia

Em 1987, a CVC foi pela primeira vez constatada em pomares da região Noroeste do Estado de São Paulo, reduzindo a produção e o tamanho dos frutos das principais variedades de laranja doce, independentemente do porta-enxerto utilizado (ROSSETTI et al., 1990; ROSSETTI e DE NEGRI, 1990). Inicialmente, suspeitou-se de desequilíbrio nutricional ou mesmo de manifestação de nova estirpe do closterovírus da tristeza do citros. A segunda hipótese foi logo refutada em vista da ausência do quadro sintomatológico típico. A primeira suspeita não foi confirmada e passou a ser considerada apenas como consequência: a CVC afeta a absorção e a distribuição de certos nutrientes, em especial o zinco e o potássio, cujos teores foliares são muito reduzidos. Tal redução, independe dos teores presentes no solo e de aplicação foliares de zinco.

Amostras de folhas foram enviadas a laboratórios franceses e americanos para que se estudasse a possibilidade de se tratar de *huanglongbing*, doença do citros até então não existente no Brasil e causada por organismo fastidioso limitado ao floema. Os resultados foram negativos para aquela doença, porém constatou-se a presença de bactérias similares a *X. Fastidiosa*, no xilema das plantas sintomáticas, o que não acontecia nas amostras de plantas sadias (ROSSETTI et al., 1990).

A identidade da bactéria (*X. Fastidiosa*) foi confirmada em 1991 (LEITE JUNIOR e LEITE, 1991). Por fim, em 1993, os postulados de Koch foram cumpridos (CHANG et al., 1993) e confirmados posteriormente (LEE et al., 1993; HARTUNG et al., 1994), determinando aquela bactéria como o agente etiológico da CVC.

*Xylella fastidiosa* isolada de plantas com CVC tem a forma de bastonetes, possui entre 1 e 4 µm de comprimento por 0,25 a 0,50 de diâmetro e apresenta parede celular com três camadas (externa; interna ou membrana citoplasmática; intermediária ou de peptidoglicanos). Sua reprodução se dá por fissão binária, ou seja, pela simples divisão ao meio de uma bactéria em duas (FIGURA 1.3).

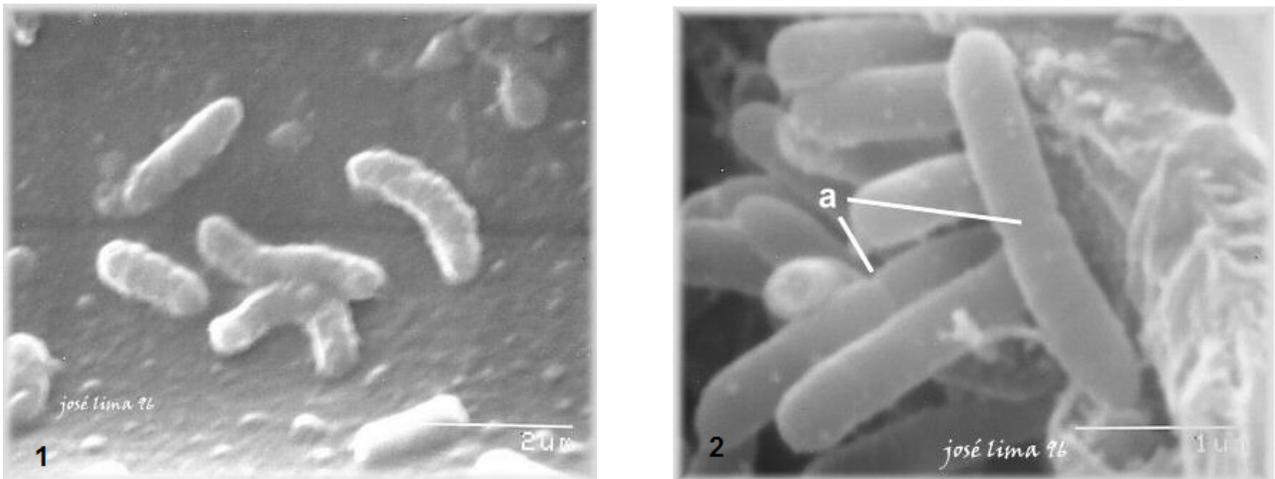


FIGURA 1.3. Imagens da bactéria *Xylella fastidiosa*. (1) Aumento de 18500x, (2) aumento de 40.000x, (a) fissão binária. (Fonte: LACAVA e MIRANDA, 2000).

Outras características importantes do ponto de vista sistemático seriam a não-motilidade devido a falta de flagelos, a não-pigmentação, o fato de ser aeróbica e também crescer muito lentamente em meio de cultura. A *X. Fastidiosa* possui ainda as seguintes características: i) crescimento ótimo entre 26 e 28 °C, ii) pH ótimo entre 6,5 e 6,9, iii) não hidroliza gelatina, iv) utiliza hipurato e v) não fermenta glicose, sendo negativa para indol, H<sub>2</sub>S, lipase, amilase, fosfatase e b-galactosidase, mas positiva para catalase e hidrólise de amido (LACAVA e MIRANDA, 2000).

Embora existam teorias a respeito da liberação de toxinas e de desregulação hormonal para outras doenças causadas por *X. fastidiosa* (HOPKINS, 1995), grande parte dos trabalhos publicados admite a ocorrência de estresse hídrico devido a colonização e entupimento dos vasos xilemáticos pela bactéria (EVERT e MULLINIX JUNIOR, 1983; GOODWIN et al., 1988; HOPKINS, 1995).

Com a CVC parece acontecer o mesmo, já que um dos seus sintomas, pelo menos em plantas muito afetadas, é a murcha de ramos. Confirmando essa observação, MACHADO et. al. (1994) mostraram que as folhas de plantas afetadas pela CVC apresentam sintomas de deficiência hídrica associada a diminuição na fotossíntese, na transpiração, na condutividade estomática e no potencial hídrico. Mostraram ainda, que a diminuição na fotossíntese estava possivelmente relacionada a

baixos valores de condutividade estomatal, os quais podem ser associados a deficiência hídrica. Também verificaram que a atividade estomatal não foi afetada, concluindo que os sintomas de déficit hídrico apresentado pelas plantas afetadas por CVC são causados pelo aumento na resistência ao fluxo de água nos vasos do xilema.

Em concordância com os resultados desse trabalho de fisiologia, LARANJEIRA e PALAZZO (1999) sugerem que as alterações nas características internas dos frutos são muito mais resultantes de déficit hídrico que de atuação direta no metabolismo da planta, ou seja, as alterações observadas naquelas características, como o aumento no teor de sólidos solúveis, são típicas de situações de déficit hídrico e podem também ser observadas em plantas saudáveis. São fartos na literatura os relatos de déficit hídrico alterando tamanho de fruto, coloração da casca, conteúdo de sólidos solúveis, acidez, etc.

Por outro lado, QUEIROZ-VOLTAN e PARADELO FILHO (1999), analisando as características de folhas de citros com sintomas da clorose variegada, detectaram não só uma redução no número de cloroplastos, mas também, nas áreas cloróticas, cloroplastos quase que totalmente destruídos. Além disso, relataram uma grande concentração de cristais de hesperidina nas folhas afetadas, assim como deposições de goma nos vasos do xilema. Esses autores, sugerem que a deposição de goma talvez seja um componente da obstrução dos vasos e, em consequência, do déficit hídrico. Sugerem ainda que os cristais de hesperidina se relacionem ao endurecimento dos frutos. Esses cristais de relacionariam também ao metabolismo de compostos fenólicos e hormônios vegetais, o que associaria *X. fastidiosa* a mecanismos de senescência e estresses nutricionais e ambientais. De certa forma, essa relação pode ser confirmada com o trabalho de GOMES et al. (1999) que relatam aumentos significativos nas concentrações de ácido abscísico (ABA) em plantas infectadas e submetidas a estresse hídrico. Como consequência, tais plantas apresentaram redução na condutância estomática, na assimilação de CO<sub>2</sub> e na transpiração. Do mesmo modo, em plantas com CVC e irrigadas, houve evolução de sintomas e a diminuição gradativa dos valores de condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub> e potencial de água nas folhas, indicando que a irrigação não foi uma prática eficaz para conter o avanço da doença ou para atenuar seus efeitos (MEDINA, 2002).

### **1.4.2 – *Xylella fastidiosa* e a formação do biofilme.**

Biofilmes são comunidades de microrganismos, que se aderem às superfícies e cujas células geralmente estão cobertas por uma matriz de exopolímeros (NOBILE et al, 2008). O biofilme confere várias vantagens para as colônias, entre elas, uma melhor proliferação celular decorrente de maior comunicação entre as células, melhoria na aquisição de nutrientes, acesso a diferentes nichos, e defesa contra fatores antagônicos como agentes oxidativos e antibióticos, o que, em geral, acaba contribuindo para um aumento da sobrevivência da colônia (LEITE et al., 2001). Os exopolissacarídeos comumente produzidos, por exemplo, tornam as colônias cerca de 500 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos, segundo COSTERTON et.al (1995). Assim, o biofilme consiste em uma estratégia de sobrevivência das bactérias (FEIL et al., 2007).

A formação do biofilme é composta por diferentes estádios iniciando-se pela adesão na superfície, proliferação bacteriana dentro de microcolônias e expansão destas, formando estruturas altamente organizadas. STOODLEY et al, (2002) dividiu a formação do biofilme em cinco diferentes estádios (FIGURA 1.4). O estágio 1, correspondente à adesão reversível das células na superfície; o estágio 2, referente à adesão irreversível mediada principalmente pela produção de substâncias exopoliméricas; no estágio 3, onde inicia-se a primeira fase de maturação do biofilme caracterizada pelo início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; a segunda fase de maturação, estágio 4, corresponde ao biofilme totalmente maduro, com alta densidade celular, e a arquitetura do biofilme apresenta-se de forma complexa; o estágio 5 é referente à fase de dispersão das células do biofilme.

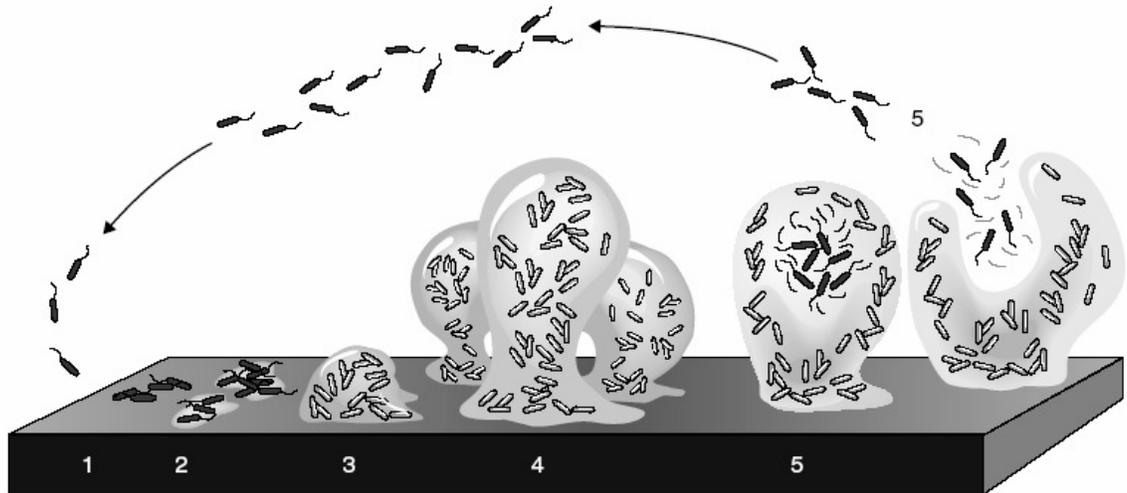


FIGURA 1.4. Modelo dos estádios de desenvolvimento de biofilme bacteriano. 1) Estádio onde as células bacterianas aderem de forma reversível na superfície. 2) Estádio que as células perdem sua motilidade e aderem na superfície de forma irreversível, uma etapa mediada principalmente por substâncias exopoliméricas. 3) Estádio correspondente ao início da maturação do biofilme, indicado pelo desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. 4) Estádio de total maturação do biofilme, indicado por uma complexa arquitetura do biofilme. 5) Estádio de dispersão, com o aparecimento de células móveis que deixam as microcolônias (STOODLEY et al, 2002).

*X. fastidiosa* apresenta a formação do biofilme tal qual bactérias patogênicas de humanos, com pelo menos cinco fases distintas, no entanto com o tempo de formação bem mais lento que outras bactérias, o que se explica por seu crescimento fastidioso (SOUZA et al., 2004). Em um trabalho realizado para análise do biofilme de *X. fastidiosa* nos diferentes dias de formação do biofilme *in vitro*, verificou-se que após três dias de crescimento inicia-se a formação do biofilme, com 15 dias o biofilme inicia sua maturação, após 20 dias ele se torna maduro, e após 30 dias ocorre a fase de dispersão celular (SOUZA et al., 2003).

Baseado no estudo funcional da *X. fastidiosa* causadora da CVC, foi proposto um modelo da formação do biofilme dessa bactéria no xilema da planta (FIGURA 1.5)

(SOUZA et al., 2006). Quando as células bacterianas atingem o estágio de biofilme maduro é ativado um sistema de sinalização denominado “*quorum sensing*”. Esta sinalização permite que as bactérias regulem a expressão de genes específicos como os associados a fatores de virulência, resistência a compostos antimicrobianos, respostas de defesa do hospedeiro, condições de deficiência nutricional, produção de antibióticos e transferência de plasmídeos por conjugação (DE KIEVIT e IGLEWSKI, 1999; DAVEY e O'TOOLE, 2000; RAHMATI et al., 2002; MOLIN e TOLKER-NIELSEN, 2003). Estas características permitem que as células em biofilme apresentem grande vantagem adaptativa e competitiva no hospedeiro (DAVEY e O'TOOLE, 2000). Tem sido demonstrado, por exemplo, que células em biofilme são 500 vezes mais resistentes a compostos antimicrobianos que em crescimento planctônico (COSTERTON et al., 1995).

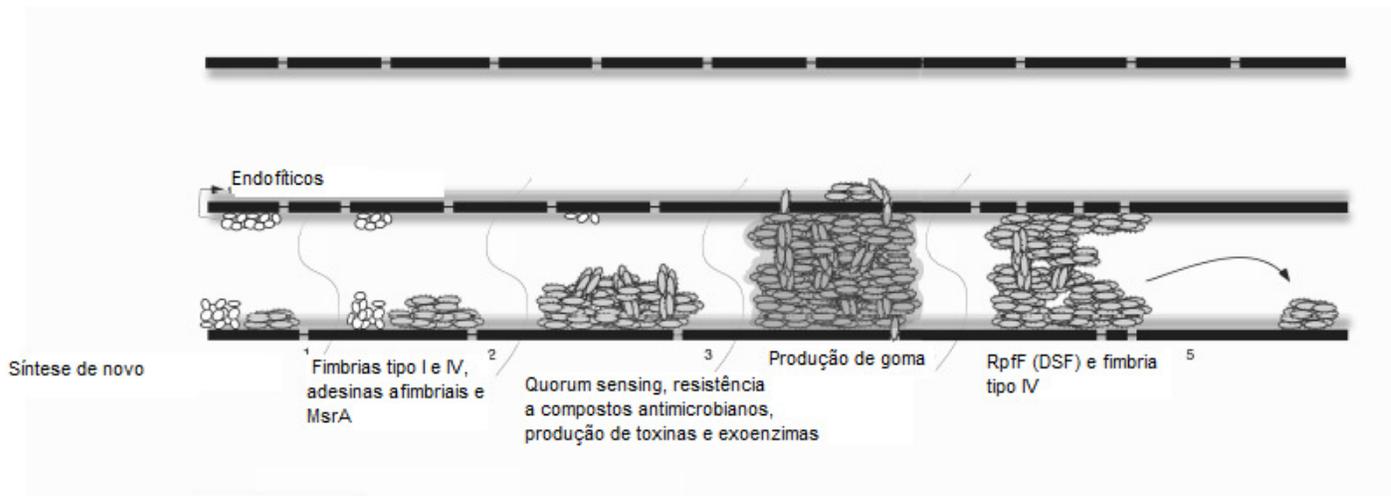


FIGURA 1.5. Modelo de interação e formação de biofilme das células de *X. fastidiosa* com a superfície do hospedeiro. Feixe vascular contendo endofíticos e seiva do xilema. 1. As células de *X. fastidiosa* são inoculadas pelo vetor. As células aderem à superfície do xilema devido a atração eletrostática mediada pela carga positiva das adesinas com a carga negativa dos vasos. 2. Multiplicação das células e início da formação do biofilme. Aumento da expressão de genes associados a adesão célula-célula e manutenção da adesão pela ação da enzima metionina sulfóxido redutase. 3. Formação de biofilme maduro e ativação de genes que conferem vantagens adaptativas e competitivas para a comunidade microbiana. 4. Aumento do biofilme resultando no bloqueio do feixe vascular e movimento das células através da degradação das pitmembranas. 5. Dispersão das células, possivelmente mediada pela sinalização por pequenas moléculas difusíveis (DSF), movimento dentro do vaso através de fímbrias do tipo IV e início da formação de biofilme em outra região da superfície do xilema. (SOUZA et al., 2006).

### 1.4.3 – Hospedeiros e sintomas.

O gênero *Citrus* é bastante afetado pela bactéria *Xylella fastidiosa*, já que laranjas doces, tangerinas, tangores, tangelos podem apresentar sintomas (LARANJEIRA et al., 1998 a, b).

No Brasil, a bactéria *X. fastidiosa* também pode ser encontrada em café, causando a atrofia dos ramos do cafeeiro (PARADELA FILHO et al., 1995, 1999), em ameixeira, associada a escaldadura da folha (KITAJIMA et al., 1981), e em diversas plantas daninhas, como guanxuma, capim pé-de-galinha e braquiária, entre outras (HARAKAVA et al., 1994; ROSSETO et al., 2000; TRAVENSOLO e LEITE JUNIOR, 1996; LOPES et al., 1999). Plantas ornamentais, como hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) e vinca [(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)] também são hospedeiras de *X. fastidiosa* no Brasil (UENO et al., 1998; KITAJIMA et al., 2000). Entretanto, ainda não se sabe se os isolados desses hospedeiros podem causar problemas em citros, ou se essas plantas são boas fontes de inóculo.

As laranjas doces aparecem como hospedeiras mais suscetíveis de *X. fastidiosa*. Dentro desse grupo, existem diferenças bastante acentuadas em relação à suscetibilidade (LARANJEIRA et al., 1995; LI et al., 1996). Entre as laranjas doces testadas, as variedades Rubi, Westin e Ovale apresentam menos sintomas foliares, com incidência de cinco a dez vezes menor que nas variedades mais suscetíveis (Barão, Pêra e Lima). Apesar disso, a intensidade de sintomas nas folhas não tem boa correlação com danos. A Rubi, por exemplo, apesar dos poucos sintomas foliares, tem sua produção muito diminuída, com danos comparáveis aos observados nas laranjas Pêra ou Barão. As variedades Westin (meia-estação) e Lue Gim Gong (tardia) sofrem os mesmos danos a produção (LARANJEIRA & POMPEU JUNIOR, 2002).

Os sintomas mais conhecidos da CVC constitui-se de pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha (FIGURA 1.6 A). Inicialmente, essas manchas não são muito extensas. A essas cloroses correspondem, na face inferior, manchas de coloração variando entre o vermelho e o marrom (FIGURA 1.6 B). Essas manchas podem ser pontuais ou mais difusas, não sendo entretanto, necróticas

(ROSSETI e DE NEGRI, 1990). Em plantas muito afetadas pela CVC, é comum a presença de desequilíbrios nutricionais, notadamente de zinco, magnésio ou potássio.

Os sintomas nos frutos surgem após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas nos ramos já afetados, havendo uma tendência a frutificação em “pencas” (ROSSETTI e DE NEGRI, 1990; LARANJEIRA, 1997). Os frutos são pequenos, endurecidos, aparentam deficiência de potássio e chegam a causar danos às máquinas de moagem das fábricas de suco concentrado (Figura 1.6 C) (LARANJEIRA, 1997).

Internamente, o fruto tem suas características organolépticas bastante afetadas. LARANJEIRA e PALAZZO (1999) mostraram que o teor de sólidos solúveis e a acidez aumentam, parecendo ser esse um efeito apenas de concentração, já que a quantidade de suco diminui. Como consequência, a produção total de sólidos solúveis é menor. Obviamente, essas características são bastante prejudiciais, tanto para produção de suco de laranja quanto para a comercialização dos frutos *in natura* (LARANJEIRA e PALAZZO, 1999).

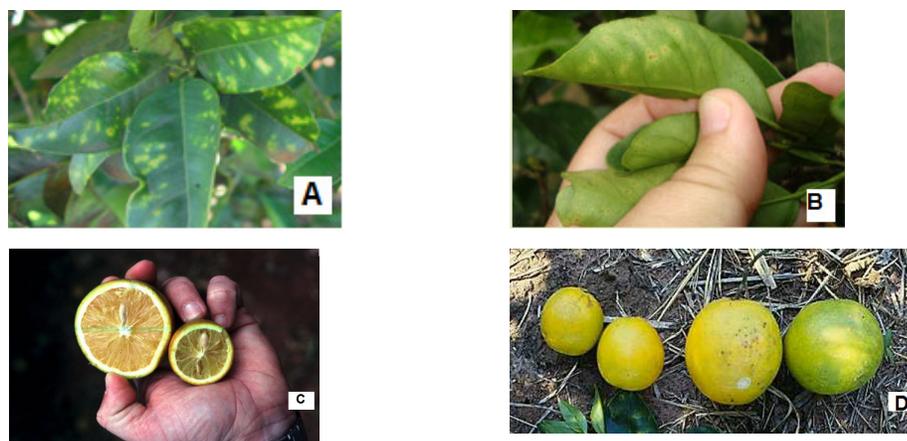


FIGURA 1.6. Sintomas da clorose variegada dos citros: A, clorose típica na face superior da folha; B, clorose típica na face inferior das folhas; C, fruto com tamanho reduzido (direita); D, frutos saudáveis (direita) e frutos com CVC (esquerda). (LARANJEIRA, 1997)

#### 1.4.4 – Vetores

Vetores são insetos transmissores de vírus ou bactérias causadoras de doenças em seres vivos. Os vetores “carregam” um determinado microrganismo, transmitindo-o ao seu hospedeiro definitivo através da picada ou sugamento.

Os vetores da bactéria *Xylella fastidiosa*, são as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) que se alimentam nos vasos do xilema das plantas, que foram identificadas como vetores de *X. fastidiosa* em citros e outras culturas, como pêssigo e videira.

Experimentalmente já foram reconhecidas 12 espécies de cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae), que se alimentam no xilema, que transmitem esse patógeno para as plantas de citros: *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *A. virescens* Metcalf, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* Young, *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Homalodisca ignorata* Melichar, *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Oncometopia facialis* (Signoret), *Parathona gratiosa* (Branchard), *Plesiommata corniculata* Young, *Fingeriana dubia* e *Sonesimia grossa* (Signoret) (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996; GRAVENA et al., 1997; YAMAMOTO et al., 2000).

Os cicadélíneos que ocorrem em citros são relativamente grandes (5 a 13 mm de comprimento), de cabeça protuberante, pela presença de uma forte musculatura que opera a câmara de sucção (cibário) na sua parte anterior. Esses insetos ingerem grandes quantidades de seiva do xilema das plantas (MILANEZ et al., 2003).

Em condições naturais, essas cigarrinhas são polípagas, alimentando-se e desenvolvendo-se em diversas daninhas, árvores e arbustos silvestres presentes em áreas de mata e de brejo adjacentes a pomares de laranja (MARUCCI et al., 1999; LOPES e GIUSTOLIN, 2000; GIUSTOLIN et al., 2002), sendo também observadas, ocasionalmente, em certas culturas agrícolas, tais como algodoeiro, girassol e quiabeiro (GRAVENA et al., 1997), cafeeiro (LOPES et al., 1998) e ameixeira (HICKEL et al., 2001).

Entre essas cigarrinhas vetoras, *D. costalimai*, *A. citrina*, *B. xanthophis* e *O. facialis* têm sido apontadas como as mais relevantes para a disseminação da CVC pela sua maior abundância em árvores cítricas (FIGURA 1.7) e pelo fato de plantas cítricas infectadas constituírem a principal fonte de inóculo da doença (GRAVENA et al., 1997; LARANJEIRA et al., 1998). As demais espécies são pouco importantes por terem baixa densidade populacional por preferirem alimentar-se em gramíneas (FIGURA 1.7), tais como *F. trivittata*, *M. leucomelas*, *P. corniculata* e *S. grossa* (PAIVA et al., 1996), ou em outras espécies de árvores e arbustos nativos (FIGURA 1.7), tais como *A. virescens*, *H. ignorata*, *P. gratiosa* e *F. dúbia* (FUNDECITRUS, 2005). Dentre as principais espécies de cigarrinhas vetoras, *B. xanthophis* predomina em pomares em formação, principalmente nos dois primeiros anos de vida da muda (YAMAMOTO et al., 2001), enquanto que *D. costalimai*, *A. citrina* e *O. facialis* predominam em pomares em produção com plantas de altura mais elevada devido ao seu hábito arbóreo (YAMAMOTO e LOPES, 2004).

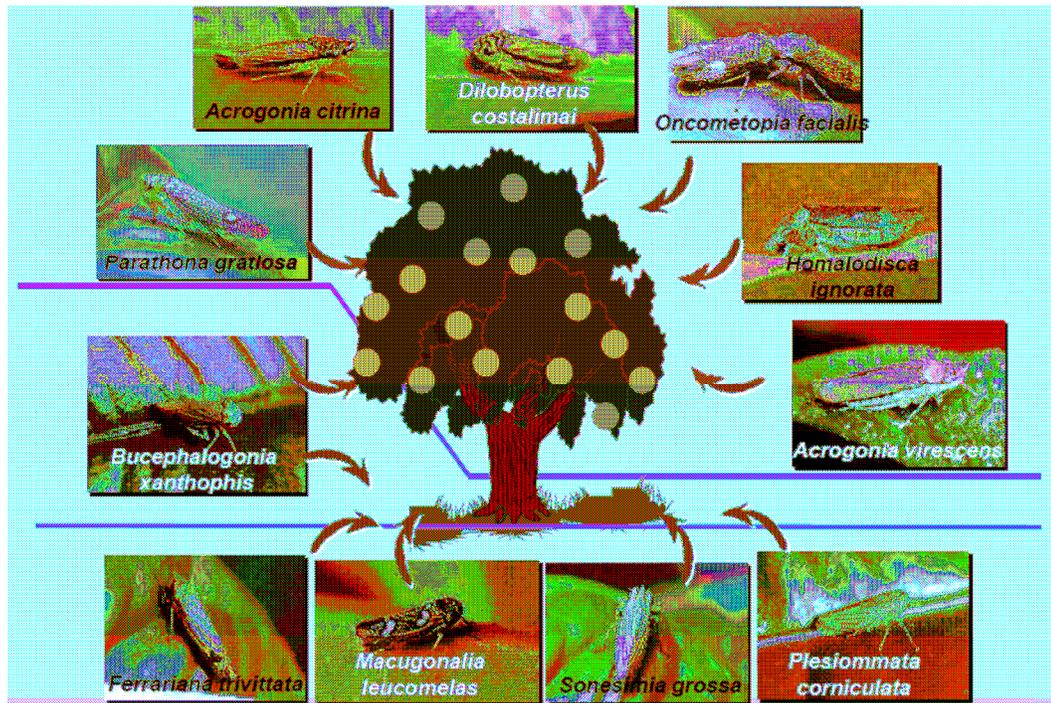


FIGURA 1.7. Cigarrinhas transmissoras de *Xylella fastidiosa* para citros. (Figura elaborada por Pedro T. Yamamoto).

### **1.4.5 – Métodos atuais de controle da CVC.**

Como medidas para o manejo da doença, tem-se adotado basicamente: (1) implantação de pomares com mudas sadias certificadas para evitar a introdução do patógeno; (2) eliminação das plantas doentes e poda dos ramos afetados; e (3) controle químico dos vetores (GRAVENA et al. 1997).

#### **1.4.5.1 – Implementação de pomares com mudas sadias.**

Os cuidados para a produção e a manutenção de plantas matrizes e borbulheiras livres de patógenos devem ser estendidas à produção de mudas. A produção de mudas sadias ainda se insere, *a priori*, no princípio da exclusão, visto que não se pretende levar qualquer patógeno para novos plantios. Essa preocupação com as mudas decorre do fato de serem o principal mecanismo de dispersão de patógenos citrícolas a grandes distâncias. Mudas infectadas tem sido apontadas como veículo de disseminação da CVC, HLB, cancro cítrico, leprose, tristeza, MSC, mancha preta, gomose e declínio lento dos citros (MATTOS JUNIOR et al. 2005).

Para a obtenção de mudas sadias, os viveiros devem ser preferencialmente conduzidos sob telado. No Estado de São Paulo, a utilização de viveiros revestidos com tela anticigarrinha é obrigatória desde 2002 visando à proteção contra os vetores da *X. fastidiosa*.

Os viveiros devem ficar distantes de plantios comerciais ou domésticos de citros, para dificultar a infecção das mudas por propágulos de patógenos provenientes de plantios contaminados próximos. O isolamento do viveiro contribui, também, para evitar a contaminação da água utilizada na irrigação das mudas.

Os viveiros devem ser inspecionados regularmente e, quando plantas suspeitas de contaminação por patógenos importantes da cultura forem detectadas, deve-se coletar e encaminhar amostras para análise fitopatológica (MATTOS JUNIOR et al. 2005).

#### **1.4.5.2 - Eliminação de plantas doentes e poda de ramos afetados.**

Esta medida de manejo pode ser considerada como uma sanitização anual preventiva (MATTOS JUNIOR et al. 2005).

Em essência, a sanitização anual preventiva atua de acordo com os princípios da erradicação, proteção e regulação. São realizadas práticas que reduzem o inóculo inicial, protegem a planta com aplicação de agroquímicos, e alteram o microclima do pomar. Esse conjunto de operações não é específico para dado grupo de doenças, mas atua de maneira a diminuir a incidência geral de enfermidades no próximo ciclo de produção.

A sanitização anual preventiva age, principalmente, na fase de sobrevivência do patógeno entre ciclos de produção e, em consequência, reduz o inóculo inicial. Esse efeito é obtido pela remoção de tecidos mortos ou infectados, reduzindo possíveis focos de infecção de doenças da parte aérea das plantas. Esse tratamento é também importante por permitir melhor aeração na parte interna da copa das plantas, estabelecendo condições menos favoráveis às infecções de órgãos da parte aérea, como frutos e ramos principais (MATTOS JUNIOR et al. 2005).

O manejo da clorose variegada dos citros é uma exceção na sanitização anual preventiva. Considerando as características da doença, a poda não se pode limitar aos meses mais secos. Tal atitude levaria a um atraso na remoção das fontes de inóculo (ramos sintomáticos, por exemplo) e talvez a erros em sua identificação. Para a CVC, as inspeções na região Centro-Sul do Brasil devem ser feitas entre janeiro e julho, época em que os sintomas são mais visíveis. Caso as plantas sejam recuperáveis, os ramos sintomáticos devem ser identificados e a poda realizada numa forquilha, a, pelo menos 70 cm da última folha com sintomas (FIGURA 1.8). Os instrumentos de corte devem ser desinfetados com bactericidas.

No caso da erradicação da planta, plantas com CVC de até dois anos de idade devem ser erradicadas. Essa recomendação deriva do fato de que plantas dessa idade provavelmente foram infectadas na fase de muda. Assim, a bactéria causadora da doença encontra-se disseminada por toda a árvore e, portanto, podas de ramos

sintomáticos não solucionam o problema. O mesmo raciocínio é aplicado para aquelas com mais de dois anos de idade, porém com grande intensidade de sintomas nos frutos: são irrecuperáveis e devem ser erradicadas, pois, caso contrário, apenas estarão atuando como fonte de inoculo (MATTOS JUNIOR et al. 2005).



FIGURA 1.8. Poda de ramos doentes em plantas com mais de 2 anos. (Fonte: [www.fundecitros.com.br](http://www.fundecitros.com.br), janeiro 2013).

#### 1.4.5.3 – Controle químico dos vetores.

O manejo químico da CVC com inseticidas visa evitar a transmissão por cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em pomares e viveiros. A utilização desses inseticidas requer cuidados no sentido de preservar os inimigos naturais dessas cigarrinhas. A aplicação de inseticidas via tronco deve ser priorizada, pois trata-se de método de alta seletividade ecológica e de maior eficiência de controle.

Em pomares, a decisão de aplicar inseticidas contra cicadelídeos transmissores da CVC só deve ser tomada para plantas com menos de seis anos de idade e quando em 10% das árvores tenha sido detectada, pelo menos, uma cigarrinha. A amostragem deve ser periódica – como no manejo de outras pragas – em 1 a 2% das plantas do talhão – e pode ser feita com armadilha amarela adesiva, puçá ou, visualmente, caso o avaliador seja bem treinado. Em pomar com mais de seis anos de idade, o monitoramento deve ser igual, porém o controle químico só deve ser executado quando

ele estiver próximo a pomares novos, baixadas ou matas nativas. Como alternativa a essa situação, pode-se pulverizar apenas uma faixa de trinta metros nas bordas do talhão mais velho e mais trinta metros para dentro dos mais novos (MATTOS JUNIOR et al. 2005).

Os inseticidas registrados para o controle destas cigarrinhas são a deltametrina e imidacloprid, porém as pulverizações devem ser criteriosas. O uso indiscriminado de produtos químicos eliminam os inimigos naturais que, sozinhos, são responsáveis pelo controle de 40% da população de cigarrinhas e podem causar surtos de pragas secundárias.

Não havendo ainda um controle químico específico para o controle da bactéria *Xylella fastidiosa*, tendo assim atualmente que controlar o seu vetor, buscamos pesquisar novas moléculas a busca de um controle para esta bactéria e conseqüentemente, diminuir o uso de inseticidas para o controle das cigarrinhas.

#### **1.4.6 – Desenvolvimento de novos produtos de controle da CVC.**

##### **1.4.6.1 - Peptídeos antimicrobiais (AMPs).**

Tradicionalmente, microrganismos e plantas vegetais biosintetizam pequenas moléculas que podem seletivamente matar ou parar o crescimento das bactérias, os antibióticos. Cientistas estão colocando em estudo, agentes microbianos chamados de peptídeos antimicrobiais (AMPs), pois representam uma extrema forma de defesa natural contra bactérias e fungos e agora vem sendo desenvolvidos para uma variedade de aplicações na medicina e agricultura. Em muitos casos, os peptídeos são produzidos como reação a uma doença ou infecção (NAYLER et al., 1989; CAMMUE et al. 1992; CASTEELS et al., 1993; PEREIRA et al., 1993; TAILOR et al. 1997; SCHRODER, 1999).

KUZINA et al. 2005, testaram a eficiência de 18 peptídeos antimicrobiais, dos quais alguns já haviam sido testados *in vitro* em *Xylella fastidiosa* extraídas de plantas de uva infectadas com a doença obtendo resultados satisfatórios de controle. Dentre os 18 peptídeos, apenas quatro mostraram atividade antimicrobiana.

ISHIDA et al. 2004, também testaram a eficiência de um peptídeo, o Cercropin B. Os Cercropins compreendem uma família de peptídeos antimicrobiais homólogos que possuem cadeias de 35 a 37 aminoácidos e são derivados de uma mariposa (MERRIFIELD et al., 1994; MERRIFIELD et al., 1982; RAO, 1995). A atividade destes produtos naturais variam imensamente de acordo com as ações biológicas matando bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos, protozoários e até mesmo vírus em concentrações que variam de 0,25 a 4 µg / mL (para os cecropins 0,07 a 1 µM) (HANCOCK et al., 1998). Experimentos *in vitro* mostraram a eficiência bactericida do Cercropin B para diversas doenças economicamente importantes, incluindo *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp. e *Clavibacter* spp. (DESTEFANO et al., 1991). Cercropin e seus análogos são mais tóxicos para as bactérias patogênicas de plantas do que em células de plantas hospedeiras (Destefano et al., 1991; MILLS et al., 1994; MILLS et al., 1993; MOURGUES et al., 1998; NOORDEEN et al., 1992).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram o Cercropin B como um poderoso bactericida contra muitas bactérias patogênicas de plantas, incluindo *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Clavibacter* spp e *Xylella fastidiosa*.

#### 1.4.6.2 – Compostos fenólicos.

MADDOX et al., 2010, testou a atividade de compostos fenólicos contra a *Xylella fastidiosa*.

Metabólitos secundários vegetais de baixo peso molecular são essenciais para a resistência de doenças em plantas. O acúmulo de certos metabólitos secundários em plantas atuam sobre o ataque do patógeno e estes metabólitos se referem as fitoalexinas. Algumas fitoalexinas tem um amplo espectro de atividades contra diversos patógenos, enquanto outras são alvos de determinados patógenos específicos. Fenólicos são uma classe de compostos metabólicos secundários que contém uma ou mais hidroxilas derivados do anel de benzeno. Eles são distribuídos em plantas e possuem funções de defesa em muitas espécies de plantas (BOUDET, 2006).

Compostos fenólicos com estruturas de menor complexidade, assim como o catecol e cumarinas, vem mostrado uma inibição nas atividades bactericidas e fúngicas

(COWAN, 1999). O aumento do acúmulo de fitoalexinas fenólicas em plantas, podem promover uma defesa nos hospedeiros contra os patógenos.

Para determinar se estes compostos podem inibir o crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa in vitro*, MADDOX et al., (2010), conduziram um experimento diluindo um grupo destes compostos, que já possuíam uma atividade microbiana, em PW agar, que é um meio de cultura favorável ao crescimento da *Xylella fastidiosa*. Ela utilizou estirpes da *Xylella fastidiosa* de uva e amêndoas. Foram testados 12 compostos fenólicos, dentre eles: Cumarina, Cateco, Resveratrol, Ácido Gálico, Ácido p-Cumárico, Ácido Cafeico, Ácido Ferulico, Ácido Sinápico, Naringenina, Quercetina, Ritina (FIGURA 1.9).

Seus estudos mostraram que os compostos fenólicos, podem inibir o crescimento da *Xylella fastidiosa*, e que os flavonóides, comparados com os ácidos fenólicos, tiveram uma atividade melhor com relação ao crescimento da bactéria, MIC menor. Porém, ainda não se sabe o modo de ação que estes compostos atuam na inibição da bactéria.

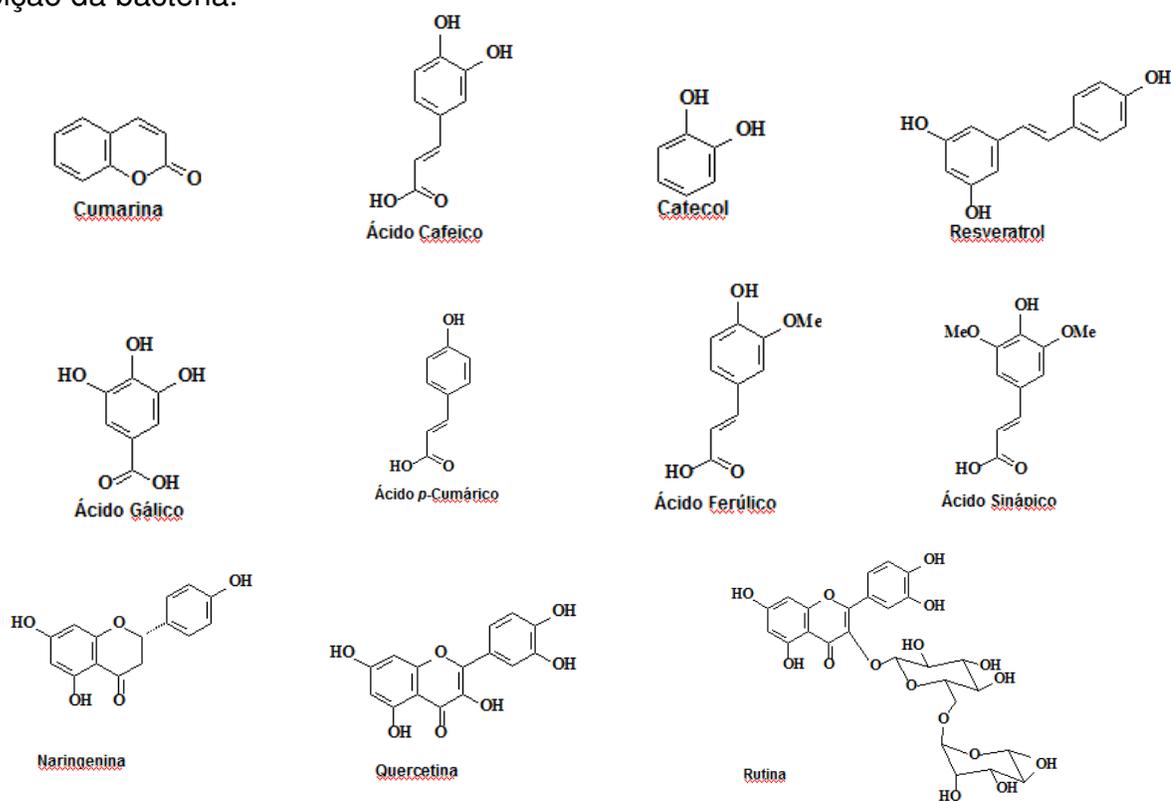


FIGURA 1.9. Estruturas químicas de compostos fenólicos que foram avaliados neste estudo.

### 1.4.6.3 – Benzotiadiazole e silício

(MARTINATI, *et al.*, 2007), avaliou o efeito da aplicação do benzotiadiazol (BTH) e do silício (Si) sobre o controle da doença causada pela *Xylella fastidiosa* em *Nicotiana tabacum*. Uma abordagem interessante no controle de doenças vegetais é a ativação de mecanismos de defesa inerentes à planta, por meio da aplicação de produtos bióticos ou abióticos não tóxicos, que atuam como indutores de mecanismos de resistência em plantas. Esses mecanismos estão associados à expressão coordenada de um conjunto de genes de defesa, fenômeno este conhecido por resistência sistêmica adquirida (“*system acquired resistance*” – SAR) (KUC, 1995; STICHER *et al.*, 1997). Entre os indutores de resistência abióticos, tem sido demonstrado que o composto químico sintético benzotiadiazol (BTH) atua como agente ativador dos mecanismos de defesa em plantas e as protege, sistemicamente, contra uma larga gama de doenças causadas por fungos e bactérias, sem demonstrar efeitos tóxicos diretos e significativos contra a planta (RUESS *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2000; IRITI e FAORO, 2003; EDREVA, 2004). Segundo YAMAGUSHI, (1998), o BTH não possui ação direta sobre o patógeno e atua, supostamente, com papel semelhante ao ácido salicílico na via de transdução de sinais que levam à SAR. Recentemente, foi sugerida a utilização de silício na redução da incidência e desenvolvimento de doenças em mono e dicotiledôneas (EPSTEIN, 1999; LIMA FILHO *et al.*, 1999; POZZA *et al.*, 2004; FAUTEUX *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2006). A silicificação das células epidérmicas, observada em plantas tratadas com metassilicato, via foliar ou pela incorporação ao solo, constitui uma barreira física à penetração de patógenos e tem sido apontada como um dos possíveis mecanismos de ação do Si na proteção de plantas contra doenças (FAUTEUX *et al.*, 2005). O Si parece, ainda, ativar nas plantas mecanismos de defesa em resposta ao ataque de patógenos, como o aumento na síntese de compostos fenólicos e das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e beta-glicosidase (LIMA FILHO *et al.*, 1999). Foi demonstrado que plantas de *Nicotiana tabacum* apresentam sintomas foliares de *X. fastidiosa*, significativamente mais rápidos que citros, em condições de casa de vegetação, o que a torna uma excelente planta modelo para o estudo dessa bacteriose (LOPES *et al.*, 2000).

Segundo os resultados de Martinati, *et al.* 2007, o BTH não conferiu proteção as plantas, em relação a *Xylella fastidiosa*. Já o fornecimento de silício para plantas foi promissor para a indução de resistência contra a *X. fastidiosa*.

#### **1.4.6.4 - Uso de produtos naturais**

A natureza abunda compostos orgânicos de quase toda classe concebível de estruturas químicas. O estudo destes constituintes tornou-se uma fascinante e fértil área de investigação científica. As células de organismos vivos – plantas, fungos, bactérias, líquens, insetos e animais superiores – são locais de uma intrigante e complexa atividade biossintética que resultou na formação de uma notável ordem de compostos orgânicos. Estes compostos podem ser classificados entre policetídeos, terpenóides, amino ácidos, proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucléicos (DNA, RNA), etc. Tais compostos são usados como materiais de partida para bio-síntese de produtos específicos, geralmente controlados e catalisados por reações enzimáticas que levam a complexos compostos caracterizados como metabólicos secundários (GEISSMAN e CROUT, 1969, DEWICK, 1998). Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal entre plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila. Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas.

Muitos compostos secundários apresentam uma grande importância econômica em diversos projetos de desenvolvimento sustentável e ambientalmente corretos. Diversos trabalhos descrevem seu uso em diversas áreas de conhecimento como, por exemplo, medicina, medicina veterinária, cosmetologia, fármacos, controle de pragas agrícolas e vegetais (herbicidas), etc. Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos. Desse modo, produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e micro-organismos

simbiontes. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais (POST-BEITTENMILLER, 1996; BRISKIN, 2000).

#### **1.4.6.5 – Hesperidina, Azadirachtina e Naringinina como bactericidas naturais.**

A hesperidina e Naringinina são flavonoides produzidos por frutas cítricas Figura 10. Há dados na literatura relatando a presença de cristais em forma de ráfides (agulhas) no lúmen de alguns vasos do xilema em plantas com sintomas de CVC quando analisadas por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) (GOTTARDI et al., 2004).

Análises em plantas com inoculação natural mostraram que estes cristais se formavam no lúmen a partir das pontuações, indicando que nos mesmos se originavam de células do parênquima do xilema e que, possivelmente, tais cristais sejam de hesperidina (GOTTARDI et al., 2004). A presença de cristais dendríticos de hesperidina já havia sido verificada anteriormente com o emprego da luz polarizada, utilizando-se um fotomicroscópio óptico (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1999). A presença dos cristais sugere uma resposta da planta a um possível ataque da bactéria *Xylella fastidiosa* no citros (GOTTARDI et al., 2004).

A Azadirachtina, FIGURA 1.10, é um composto isolado do Nim (*Azadirachta indica*), pertencente a Família Meliaceae. É utilizada como inseticida na agricultura e como anti-séptico, curativo e vermífugo. Seu estudo como efeito bactericida para o controle da bactéria *Xylella fastidiosa* foi testado em ensaios In Vitro por (Abdelnur, 2006) para avaliar sua Concentração Inibitória Mínima (MIC), e os resultados foram satisfatórios, apresentando um MIC no valor de 2,1  $\mu$ M (ABDELNUR, 2006).

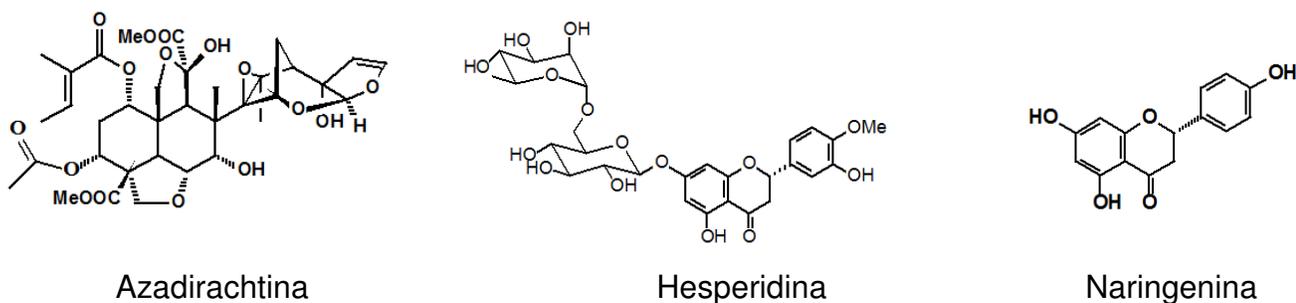


FIGURA 1.10. Moléculas com princípio bactericida natural.

## 1.4.7 – Métodos de identificação e quantificação da bactéria.

### 1.4.7.1 – Técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Para minimizar o tempo de execução e liberação do atestado de fitossanidade, uma das alternativas é o uso de técnicas baseadas na PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), que poderiam ser utilizadas de modo complementar às usuais. Este método baseia-se na extração de DNA do material suspeito e amplificação de regiões genômicas específicas de cada patógeno (SASSERON, 2008).

Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA (dupla fita) em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídios iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3' e 5', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar.

Para realizar a PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleotídios iniciadores, os quatro

desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o cofactor  $Mg^{2+}$ . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em:

Desnaturação do DNA alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96 °C), de modo a separar as duas cadeias.

Associação dos iniciadores por ligações de hidrogênio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reação é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 a 65 °C, durante 1 minuto).

Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (tipicamente 1 minuto a 72 °C) (FIGURA 1.11).

O processo envolvendo estes passos pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente. Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de DNA aumentaria  $2^{25}$  vezes, embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento fique por um milhão de vezes.

Como na técnica de PCR se encontram envolvidos vários ciclos de amplificação, foi desenvolvido equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. Para tal ser concretizável, as DNA polimerases utilizadas deverão ser termoestáveis, tendo tal sido conseguido com o isolamento da DNA polimerase da estirpe termofílica *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) que atua a temperaturas elevadas levando assim a um aumento da especificidade da reação. De referir ainda que o produto de PCR pode ser visualizado a eletroforese em gel agarose e o seu tamanho ser estimado por comparação com padrões lineares de DNA.

A vantagem de realizar o diagnóstico molecular reside no tempo de execução, uma vez que, dependendo do caso e da consistência da validação, poderá dispensar a etapa de isolamento do patógeno. Isso é particularmente crítico quando não é possível concretizar o isolamento em função da qualidade e da quantidade disponível do material original (SASSERO, 2008).

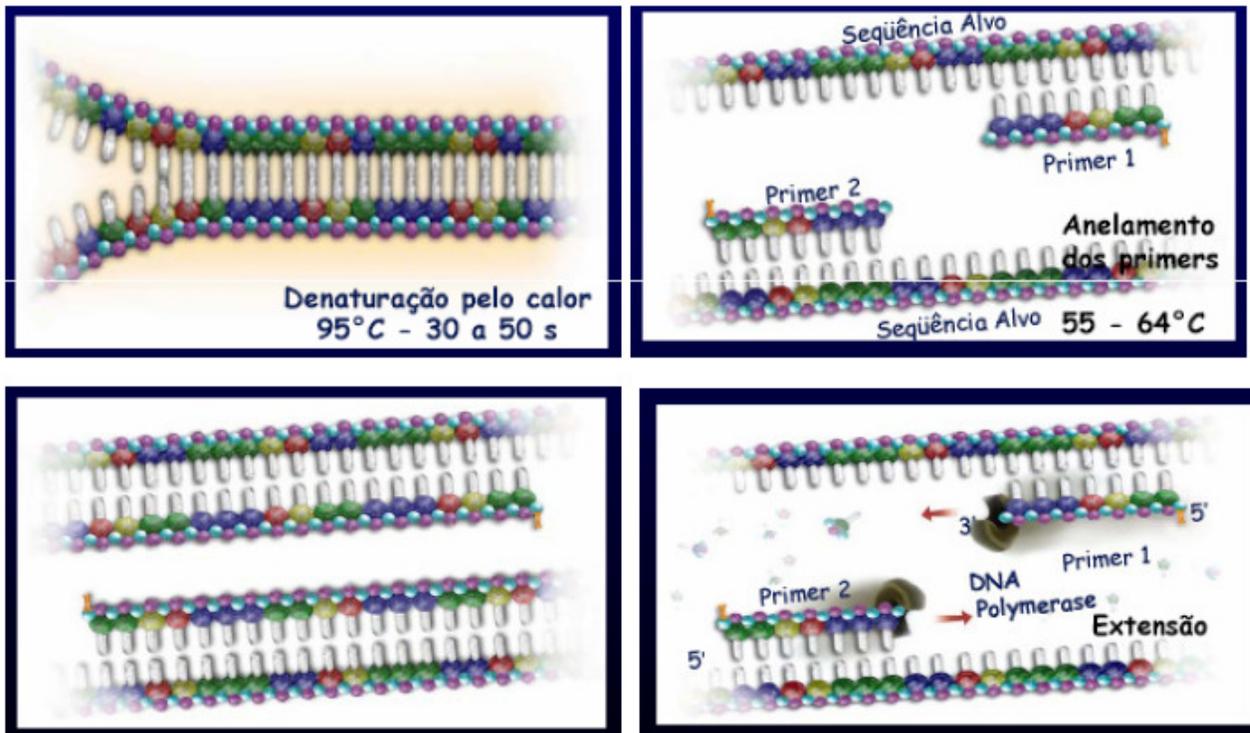


FIGURA 1.11. Primeiro ciclo da PCR.

#### 1.4.7.2 – qPCR (PCR quantitativo).

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é um método que foi desenvolvido com o objetivo de determinar o número de moléculas alvo que servem de molde para amplificação pela DNA polimerase. A diferença entre o qPCR e o PCR comum é que o primeiro método quantifica o produto de PCR em cada ciclo, utilizando uma curva exponencial, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada. No segundo método o resultado corresponde à fase de saturação da reação (GACHON et al., 2004).

A principal vantagem do qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis. Este método é altamente sensível na detecção de DNA e RNA, devido à combinação de amplificação pelo PCR e o sistema de detecção, podendo em qualquer caso verificar a especificidade com a PCR por eletroforese, curva de dissociação e dados do

sequenciamento. Outra vantagem desta técnica é que pode ser utilizada para estudos com pequena quantidade de material inicial (FREEMAN et al., 1999).

Atualmente existem três estratégias para detectar os produtos de qPCR (BUSTIN, 2000) e todas utilizam corantes fluorescentes. O método *SyBR green* utiliza corantes fluorescentes que se ligam às moléculas de DNA de dupla fita, enquanto que a *Molecular beacon* e *Taqman* baseiam-se na hibridização de sondas fluorescentes que se ligam ao amplicon específico (BUSTIN, 2000). Os métodos mais utilizados em plantas são o *SyBR green* e o *Taqman* (GACHON e SAINDRENAN, 2004).

## 2. Objetivo

Desenvolver e validar métodos biológicos, *in vitro* e *in vivo*, e avaliar novas moléculas derivadas de produtos naturais para o controle da bactéria *Xylella fastidiosa* em pomares de citros.

### 2.1. Objetivos específicos:

Desenvolver método rápido *in vitro* para varredura de potenciais produtos bactericida;

Validar a eficiência do método *in vitro* em ensaios *in vivo*.

Avaliar a eficiência bactericida de produtos naturais (modelos) para o controle da *X. fastidiosa*.

Investigar a eficiência de produtos naturais complexados e/ou nanoencapsulados.

### **3 - Material e Métodos**

#### **3.1 – Estirpe de *Xylella fastidiosa***

A estirpe de *X. fastidiosa* utilizada em todos os experimentos foi a 9a5c, re-isolada em meio PW (DAVIS et al., 1981) de plantas de laranja ‘Pêra’ com sintomas de CVC e mantidas sob condições de telado.

Esta estirpe foi fornecida pelo Centro de Citricultura Silvio Moreira – IAC, isolada por Alessandra Alves de Souza.

As bactérias foram conservadas em freezer (-80 °C) sob meio de cultura PW líquido e glicerina, não havendo um volume específico.

#### **3.2 – Metabólitos secundários avaliados.**

As amostras testadas no experimento In Vitro foram: a Azadirachtina, Hesperidina, Naringenina, Naringenina complexada com rutênio, Naringenina complexada com magnésio e Hesperidina complexada com magnésio. Os complexos foram preparados e fornecidos pela Prof. Dra. Rose Carlos da Universidade Federal de São Carlos.

#### **3.3 – Ensaios realizados *in Vitro*.**

Os ensaios in vitro foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LAPEMA) na Universidade de Franca (Unifran), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

### 3.3.1 – Meios de cultura utilizados

Para o crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa* foram utilizados os meios de cultura PW (PERIWINKLE WILT, DAVIS et al., 1978) e o meio PCYE (*Phosphate Charcoal Yeast Extract Agar*).

O meio PW foi utilizado para o crescimento da bactéria em meio líquido e sólido, tanto para repicagem como para os testes de MIC realizados. Sua composição foi descrita na Tabela 1. Seus componentes foram pesados e preparados com água destilada. Para a preparação do PW líquido, não adicionava-se o agar.

O pH do meio foi acertado com auxílio de solução NaOH 0,1M e HCl 0,1 M para 6,8 e autoclavado por 20 min em uma autoclave vertical da marca Primatec a temperatura de 120 °C e 15 lb de pressão.

Após esterilização em autoclave e resfriamento por volta de 65 °C em meio ambiente, o meio de cultura foi levado a uma Câmara de Fluxo Laminar Vertical e adicionou-se ao meio, sob condições estéreis, 100 mL de L- Glutamina (4%, m/v) e 60 mL de Soro Albumina Bovina V (BSA) (10%, m/v).

As soluções de Glutamina e BSA foram preparadas em Câmara de Fluxo Laminar Vertical com água estéril e esterilizadas por filtração em Membrana de Millipore de 0,2 µm.

O meio PCYE (*Phosphate Charcoal Yeast Extract Agar*), foi utilizado para o crescimento da bactéria em meio sólido. Sua composição foi descrita na TABELA 3.1. Seus componentes foram pesados e autoclavados da mesma forma que o meio PW.

Após sua esterilização em autoclave, o meio foi resfriado a 65 °C e levado para Câmara de Fluxo Laminar onde o meio foi invertido em Placas de Petri e estas deixadas semitampadas na Câmara até a solidificação do meio.

TABELA 3.1. Composição para 1000 mL do meio de cultura PW e PCYE.

Compostos	Meio de Cultura	
	PW	PCYE
Peptona de soja	4,0 g	*
Triptona	1,0 g	*
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g	1,1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,4 g	0,4
Hemina Clorada (0,1%)	10 mL	*
Vermelho de Fenol (0,2%)	10 mL	*
Extrato de Levedura	*	10 g
Carvão Ativado	*	2 g
Ágar	*	15g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	*	0,25 g
Água destilada	840 mL	1000 mL

### 3.3.2 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) das amostras em teste sobre a bactéria *Xylella fastidiosa*.

Foi utilizado o método de determinação do MIC por microdiluição em microplaca. A técnica do MIC foi realizada segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações (NCCLS, 2003). Foram utilizadas microplacas com 96 orifícios. Utilizou-se um protocolo de diluição seriada iniciando-se em 2.000 µg/mL à 0,9800 µg/mL.

Para o preparo da solução estoque se pesou 2,0 mg do composto em estudo que, em seguida foi diluída em 125 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido), totalizando uma concentração de 16.000 µg/mL. Em seguida, dissolveu-se em 125 µL de caldo, ficando a amostra preparada com 8.000 µg/mL.

#### Preparo do inóculo:

A bactéria *Xylella fastidiosa*, guardada em tubo de ensaio em freezer, foi reativada sendo inoculada em Placa de Petri com meio de cultura PCYE. A placa foi mantida em BOD a 25 °C, por aproximadamente 20 dias, tempo necessário para formação e desenvolvimento de colônia.

Após a visualização das colônias em placas, preparou-se o inóculo, que seria o crescimento dessa bactéria em meio PW líquido.

Em um tubo de ensaio com 10 mL de caldo PW, inoculou-se a bactéria através de uma alça esterilizada, tomando uma pequena amostra da colônia na placa, sendo este meio também incubado por 20 dias. Após este período, a concentração de bactéria para o MIC foi medida, através da Escala de MC Farland, sendo ajustado para 0,5, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  quantidades de bactéria (UFC). Se a densidade do inóculo estivesse maior que o padrão especificado, o meio era diluído com o meio de cultura PW líquido até se alcançar a escala de 0,5; se a densidade fosse menor, o inóculo era retornado a BOD mantendo o crescimento.

Estando o inóculo e as soluções preparadas, foram realizados os ensaios de MIC.

#### Realização do MIC:

A placa Eliza foi dividida entre colunas (identificadas por números) e fileiras (identificadas por letras) (Figura 2.1). As primeiras fileiras foram utilizadas para a diluição seriada das amostras. Na fileira A (primeira) e na fileira H (última) inseriu-se 200 µL de água, pois como a placa ficará vários dias na BOD, não haverá o risco da solução nos poços secarem.

Para os ensaios, primeiramente foi inserido 100 µL de caldo PW em todos os poços a serem usados. Nos poços B1, C1 e D1, foi introduzido 100 µL da solução estoque, caindo sua concentração que era de 8.000 µg/mL para 4.000 µg/mL, e a partir daí fez-se a diluição seriada até os poços da coluna 12. No final, todos os poços ficaram com 100 µL de solução estoque completado com caldo PW na quantidade suficiente para 100 µL de solução. Em seguida, colocou-se 100 µL do inóculo em cada poço a ser testado, caindo a concentração da solução para 2.000 µg/mL. Portanto, temos a concentração inicial da amostra de 2.000 µg/mL no primeiro poço, 1000 µg/mL

no segundo poço, 500 µg/mL no terceiro poço e assim sucessivamente, até chegarmos na concentração final de 0,98 µg / mL no ultimo poço (FIGURA 2.1).

Na fileira E foi submetido o mesmo procedimento descrito nas fileiras anteriores, porém em vez de se usar as amostras testadas, foi usado apenas o DMSO, verificando se o DMSO não apresentaria efeitos bactericidas.

A fileira F foi usada como controle positivo com Streptomicina. Por ultimo, a fileira G foi utilizada para o controle das amostras, do antibiótico, do solvente, do meio de cultura e controle de crescimento do inoculo ( FIGURA 3.1).

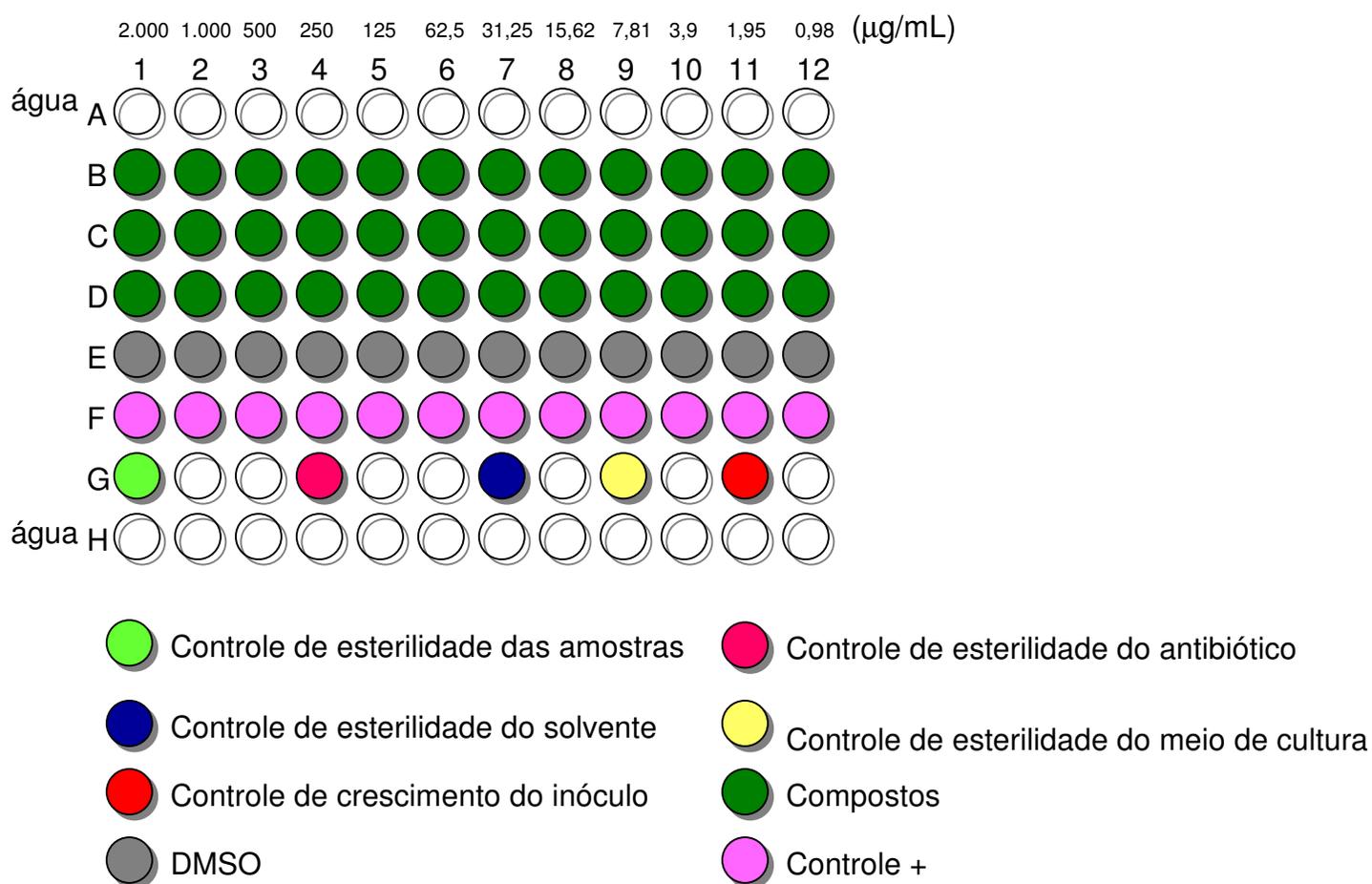


FIGURA 3.1. Esquematização para a realização da técnica de microdiluição em caldo usado para a determinação do MIC.

Após a realização da microdiluição seriada, as placas foram embrulhadas em papel alumínio, mantendo a umidade e impedindo que a solução nos poços secasse.

As placas foram guardadas na BOD na temperatura de 25 °C e após 15 dias foram analisadas.

Análise dos resultados das placas:

A análise se houve ou não crescimento bacteriano nos poços, foi realizada adicionando em cada poço 30µL de solução aquosa de resazurina (Sigma) 0,02% (m/v) (Palomino, et. al., 2003), como revelador do crescimento microbiano.

Após adicionar a resazurina, embrulhou-se a placa com papel alumínio novamente, para não haver fotodegradação. Após um período de 24 horas, cada poço foi avaliado, onde os orifícios que apresentaram coloração rosa foram os que ocorreram crescimento bacteriano e os que permaneceram em azul, onde não houve crescimento.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima das (MIC) das amostras em teste, foram feitas em triplicata.

### **3.4 – Ensaios In Vivo**

Os ensaios In Vivo foram realizados no Centro de Citricultura Silvio Moreira – IAC, em Cordeirópolis em colaboração com a pesquisadora Dra. Alessandra Alves de Souza.

#### **3.4.1 – Inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*.**

Trinta e uma plantas saudáveis de laranja Pêra de aproximadamente seis meses, foram cedidas pelo IAC de Cordeirópolis. Estas plantas foram artificialmente infectadas com 20 µL de uma suspensão da bactéria *Xylella fastidiosa* estirpe 9a5c na quantidade de 10<sup>8</sup> células por mL em PBS (fosfato de sódio 100 mM; NaCl 0,85%). Esta infecção artificial foi realizada injetando uma gota da suspensão bacteriana na ramificação entre o talo principal e o pecíolo da folha nas plantas saudáveis, como mostra a FIGURA 3.2 A. Em seguida com o auxílio de uma agulha entomológica, FIGURA 3.2 B, fez-se pequenos furinhos na região da gota, para que a suspensão penetrasse na planta. Este procedimento foi feito em três partes de cada planta.

Após a inoculação, todas as plantas foram identificadas por números de 1 a 31 levadas e mantidas a Casa de Vegetação.

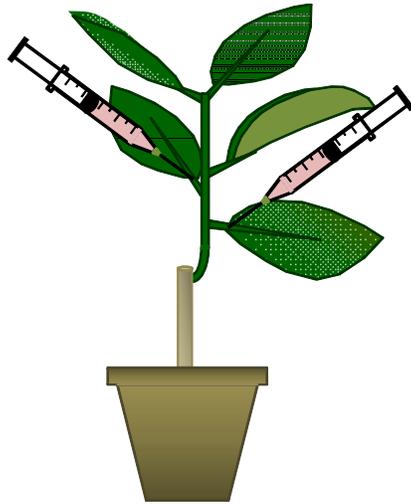


FIGURA 3.2. Inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa* em mudas de laranja.

### 3.4.2 – Detecção da *Xylella fastidiosa* através da técnica PCR.

#### 3.4.2.1 – Extração do DNA total das folhas de citros.

Após noventa dias do processo de inoculação da bactéria nas mudas sadias, fez-se análise por PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia pela Polimerase) de diagnóstico, para constatar a presença ou não de células de *Xylella fastidiosa* nas plantas de citros.

A extração de DNA, segundo protocolo de Murray e Thompson., 1980, seguiu o seguinte procedimento:

Coletou-se as folhas e lavou-as em água corrente.

Preparou-se tampão CTAB – Sarcosyl em banho-maria a 60 °C (colocou-se no Mercapto depois).

Extraiu-se a nervura central das folhas, colocou-as em almofariz e triturou-as com N<sub>2</sub> líquido até obter um pó bem fino. Este foi colocado em cada eppendorff e devidamente identificados.

Colocou-se em cada tubo 800 µL de tampão CTAB/Sarcosyl e fez-se uma homogeneização com o um auxílio de um Vortex marca Phoenix e modelo AP-56.

Incubou-se os tubos durante 30 minutos em banho-maria a 60 °C, agitando a cada 10 minutos.

Após retirados do banho-maira, os tubos foram esfriados a temperatura ambiente e adicionou-se 1 volume (700 µL) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). A suspensão foi agitada por volta de 2 min.

Os tubos foram Centrifugados a 8.000 rpm durante 10 min em uma Centrífuga Transferiu-se o sobrenadante para outro eppendorf.

Adicionou-se 0,1 volume (50 µL) de CTAB 10% (m/v), misturando.

As etapas de extração descritas nos itens 6 e 7 foram repetidas outra vez. Transferiu-se o sobrenadante para um eppendorf novo medindo o volume (aproximadamente entre 400 a 500 µL).

Ao sobrenadante se adicionou 1 volume (400 µL) de tampão de precipitação CTAB, misturando gentilmente e deixando de 30 a 60 min em repouso.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 11.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado.

O sedimento foi dissolvido em 400 µL de TE alto sal, em banho-maria a 65 °C.

O DNA foi novamente precipitado adicionando 2 volumes (800 µL) de etanol absoluto gelado e centrifugou por 5 min a 12.000 rmp.

O sobrenadante foi novamente descartado e ao precipitado adicionado 700 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugou a 12.000 rpm por 5 min.

A solução hidroalcoólica foi descartada e o precipitado solubilizado com 400 µL de etanol 100% e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min.

Removeu o sobrenadante e secou o DNA.

Dissolveu-se o pellet em 25 µL de TE 10% mais RNase mantendo-se por 1 hora a 37 °C.

### 3.4.2.2 – Amplificação do DNA da *Xylella fastidiosa* – realização da PCR.

Após a extração do DNA total da planta, os eppendorfs contendo as amostras foram analisados num Nanodrop, onde o DNA total foi quantificado. Deste modo se pode determinar a eficiência de extração.

Em seguida, junto a 3  $\mu\text{L}$  do DNA extraído e quantificado adicionou-se uma solução Mix, contendo: 2,5  $\mu\text{L}$  de TE (tampão alto sal); 1,25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 1,0  $\mu\text{L}$  DNTP 2,5 mM; 0,8  $\mu\text{L}$  do “forward primer” CVC-1 (5'-AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA-3'; 424-404 pb) e 0,8 do “primer” reverso CCSM-1 (5'-GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT-3'; 306-286 pb) ; 0,3  $\mu\text{L}$  do Taq polimerase; completou-se com 15,35  $\mu\text{L}$  de água, totalizando 25  $\mu\text{L}$  de amostra. Estas foram levadas para o aparelho Mastercycler Personal da Eppendorf, programou-se os ciclos de PCR e deixou a reação acontecer pelo tempo de 3 horas.

Os produtos de PCR foram analisados por Eletroforese em Gel Agarose. O gel foi preparado misturando 160 mL de TE (tampão alto sal), 1,5 g de agarose e 4,5  $\mu\text{L}$  de Brometo de Etídio. Este gel foi colocado em uma cuba juntamente com pentes para a formação dos poços onde as amostras foram introduzidas. Após a solidificação do gel, este foi colocado em uma cuba submerso a uma solução salina onde foi aplicada uma corrente elétrica.

Nas amostras, foi aplicado um corante, usado para aumentar a sua densidade, impedindo que elas saiam dos poços e também para visualizar o progresso eletroforético. Nos poços, formados pelo pente, foram aplicadas as amostras. No primeiro poço, foram aplicados 10  $\mu\text{L}$  do Ladder, sendo este de 700 pb (pares de base), utilizado como um marcador. Nos poços subseqüentes, foram aplicados 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra, em um poço aplicou-se um branco e em outro o DNA da *Xylella*. Aplicou-se uma voltagem entre as extremidades do gel de 100V e corrente de 20 mA (FIGURA 3.3).

Após a corrida, as bandas que correspondem ao DNA, foram visualizadas sobre transluminação UV, pois o brometo de etídio possui afinidade pelo DNA e fluoresce (tornando-se visível) na presença da luz ultravioleta, e fotodocumentados.

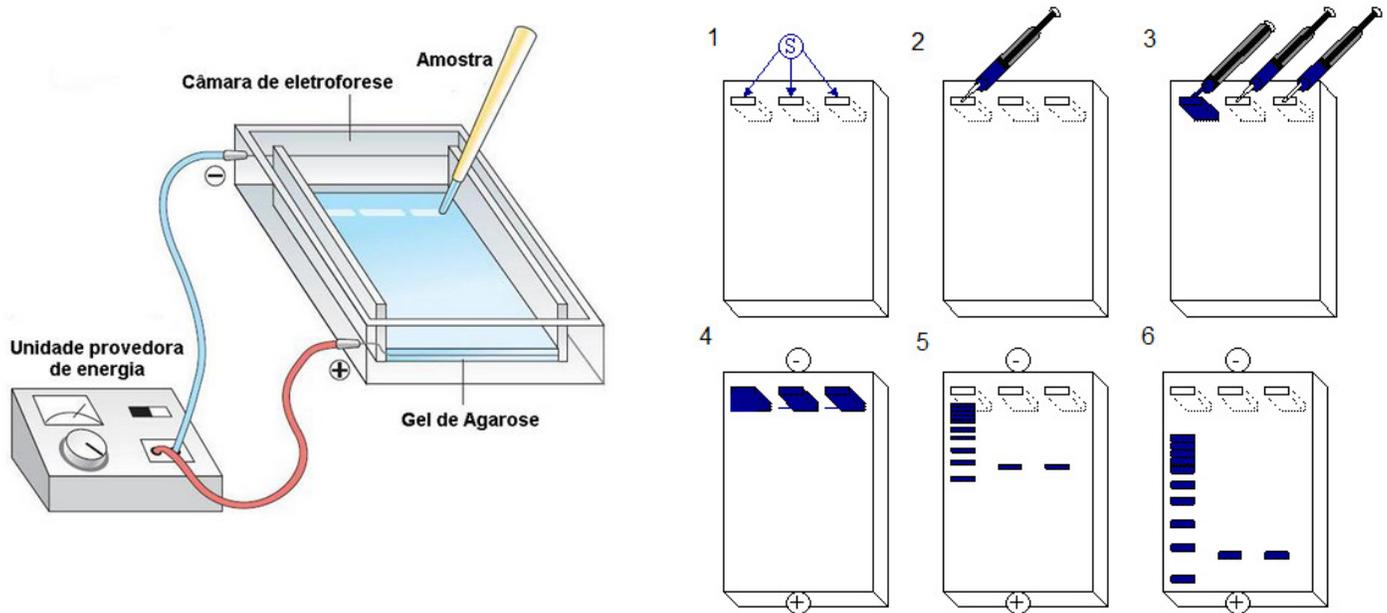


Figura 3.3. Esquema mostrando como funciona uma Eletroforese em Gel Agarose. (1) gel, (2) aplicação do marcador (Ladder), (3) aplicação das amostras, (4) indução de corrente elétrica, (5) deslocamento e separação dos fragmentos, (6) eletroforese realizada.

### 3.4.3 – Ensaio de inibição microbiana *in vivo* em casa de vegetação.

Após constatar, através do PCR de diagnóstico quais as plantas que estavam ou não contaminadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, as plantas infectadas foram submetidas aos seguintes procedimentos:

As plantas infectadas foram separadas entre 7 tratamentos com 3 repetições, sendo: 5 tratamentos com os compostos ensaiados *in Vitro*; 1 tratamento com água (testemunho); 1 tratamento com Sulfado de Cobre (controle positivo) e 3 plantas sadias tratadas com água. Portanto, no total foram utilizadas 21 plantas infectadas com a bactéria e 3 plantas sadias. As plantas sadias foram utilizadas para avaliar possíveis resultados de estresse vegetal em resposta a manipulação das mesmas

As plantas de citros foram tratadas com os compostos na concentração de 5 mg/mL. Cada planta recebeu uma dose única de 5 mL. Esta solução foi colocada em seringa, e esta acoplada na base das plantas com o auxílio de um tubo de silicone, onde sua fixação foi feita em um orifício aberto com o auxílio de uma furadeira manual na base do caule principal da planta, como mostra a FIGURA 3.4.

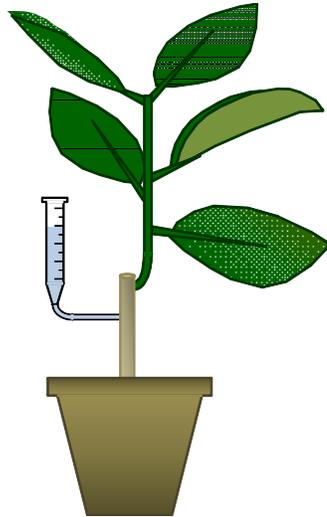


FIGURA 3.4. Imagem ilustrativa de como as plantas eram alimentadas pelos compostos em teste.

Estas plantas foram encaminhadas à casa de vegetação, mantidas por 60 dias a uma temperatura média de 22,5 °C, umidade relativa de 72,6% e submetidas a estresse hídrico, sendo no final analisadas por PCR quantitativo. Novamente o DNA total das plantas tratadas foram extraídos (procedimento item 2.4.2.1) e juntamente com o DNA extraído antes dos tratamentos, foram quantificados.

#### **3.4.4 – Quantificação da bactéria. PCR quantitativo.**

Para a quantificação do número de células de *Xylella fastidiosa* nas plantas com CVC, foi necessário estabelecer uma Curva Padrão, que foi feita da seguinte forma: extraiu-se DNA da bactéria, e o número de células presentes na amostra foi calculado da seguinte forma: uma fita de DNA de *X. fastidiosa* possui 2679310 pb, que multiplicado pelo peso molecular do DNA, que é 660 Daltons, dará o peso molecular de

uma molécula de DNA de *Xylella fastidiosa* por célula. Em seguida converteu-se Daltons para nanogramas (ng), obtendo assim o peso do genoma de uma célula de *Xylella fastidiosa*. Através deste cálculo, foi possível determinar o número de células de *Xylella fastidiosa* para iniciar as diluições que deram origem a curva de calibração padrão.

Após determinar a quantidade inicial de  $10^8$  células de DNA de *Xylella fastidiosa*, fez-se uma diluição seriada com base 10, transferindo 1  $\mu$ L da suspensão até chegar na concentração de  $10^3$  células de *Xylella fastidiosa*. Fez-se o mesmo com DNA puro de laranja Pêra, iniciando na concentração de  $10^6$  até chegar na concentração de  $10^1$ . Em seguida, foram misturadas as diluições do DNA de *X. fastidiosa*, com as do DNA de laranja. Essas diluições foram utilizadas para determinar a curva padrão para o qPCR. A FIGURA 3.5 ilustra o procedimento de diluição.

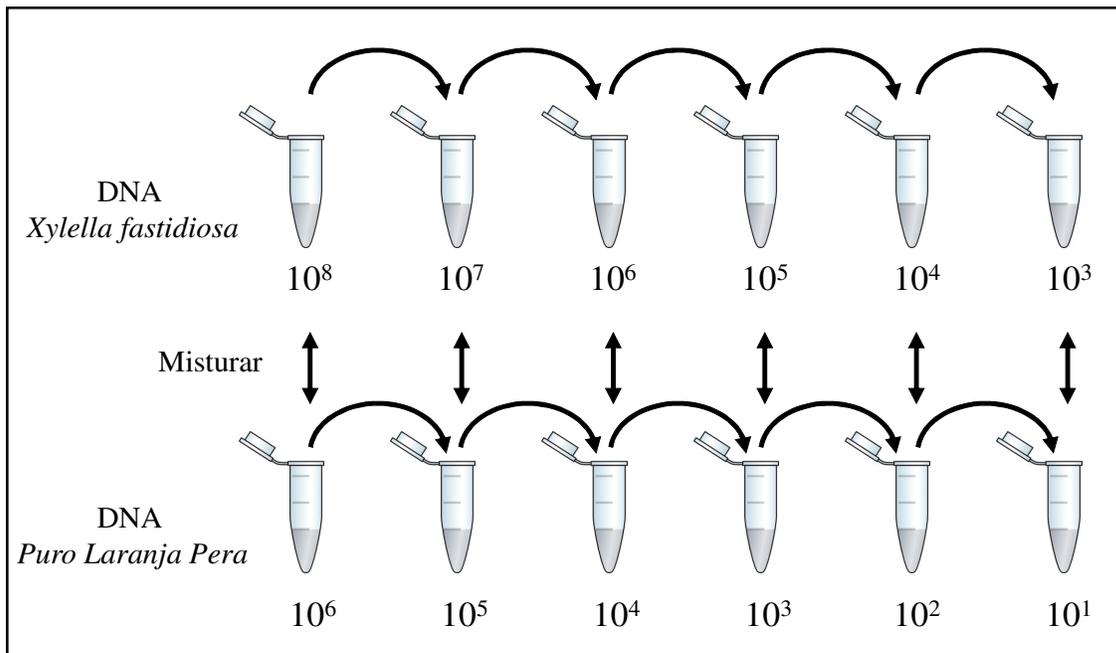


FIGURA 3.5. Esquema de diluição seriada para construção de curva de calibração de análise quantitativa do DNA de *X. fastidiosa*.

Tanto o DNA antes do tratamento, como o DNA após tratamento das plantas, foram quantificados por espectrofotômetro Nanodrop e obtiveram sua quantidade padronizada.

Preparou-se um Mix, com os seguintes reagentes: 6,5 µL do Taq Man; 1,5 µL do Primer CVC-1; 1,5 µL do Primer CCSM-1, 1,5 µL da sonda TAQ CVC (5' –(6FAM)AAC CGC AGC AGA AGC CGC CGC TCA TC(TAMRA)p-3'; 335-313 pb). A sonda e os primers foram sintetizados pela Applied Biosystems.

Junto com o Mix, adicionou 2 µL de DNA de cada amostra a ser quantificada. As misturas DNA *X. fastidiosa* + DNA da planta, para a realização da curva padrão, também foram adicionadas no Mix. E no caso das amostras em branco, no lugar do DNA adicionou-se água.

Adicionaram-se 13 µL de cada reação em dois poços (duplicata), adicionando-se primeiramente as reações para curva padrão, em placa Elisa proveniente do Kit PCR quantitativo, fornecida pela Applied Biosystems.

Estas amostras foram amplificadas e seus dados foram analisados pelo aparelho ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems).

### **3.5 – Visualização do xilema das plantas do experimento através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).**

#### **3.5.1 – Preparo das amostras.**

Coletou-se folhas das plantas de citros do experimento após o término dos tratamentos. As folhas coletadas das plantas do experimento *in Vivo*, foram imersas em hidrogênio líquido, congeladas e em seguida seus pecíolos foram cortados em finas camadas com bisturi e desidratados por 10 minutos cada em uma série de concentrações de solução de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%).

Os tecidos desidratados foram inseridos em um porta amostra e levados a um dessecador, onde permaneceu por 24 horas. Posteriormente, estas amostras então dessecadas, foram recobertas por uma fina camada de ouro e analisadas por

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) através do equipamento de marca e modelo Philips XL30 FEG operando a 30kV numa ampliação de 2000x.

## 4 – Resultados e Discussões

### 4.1- Amostras selecionadas.

Neste trabalho, a escolha das moléculas de hesperidina, azadirachtina e naringenina, para os ensaios *in Vitro* e *in Vivo*, foram feitas por serem produtos naturais e por apresentarem resultados anteriores como inibidores de crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa*.

Ribeiro et. al., (2008), testaram a azadirachtina e hesperidina como inibidores da bactéria *Xylella fastidiosa* e os resultados foram satisfatórios, concentração inibitória mínima (MIC) de 2.000 µg/mL e 1.600 µg/mL respectivamente.

Maddox et. al., (2009), testaram diversos compostos fenólicos como inibidores da bactéria, entre estes compostos estava a naringenina. Dos resultados obtidos, alguns sub-grupos de flavonoides, incluindo a naringenina, foram que obtiveram um melhor resultado na inibição da bactéria *Xylella fastidiosa*, comparado com os ácidos fenólicos.

Validar os métodos utilizados também foi um dos objetivos deste trabalho, por isso também a escolha de moléculas estudadas anteriormente.

### 4.2- Ensaios *in Vivo* e *in Vitro*.

O experimento iniciou-se com os ensaios *in vitro*, pois o método utilizado, que foi o de microdiluição em caldo em microplacas de 96 orifícios, nos permite testar diversas amostras em uma única placa e também ter um custo muito mais baixo que os ensaios *in vivo*.

Os ensaios *in vivo* foram realizados para validar os resultados *in vitro*, pois as plantas sofrem interferências externas e os resultados das amostras testadas podem não coincidirem com os resultados obtidos *in vitro*.

### 4.3 – Ensaio *in Vitro*.

#### 4.3.1 – Crescimento da bactéria e Contaminação dos ensaios.

Nos ensaios *in vitro*, a bactéria *Xylella fastidiosa*, cultivada em meio PW ágar, obteve crescimento lento, de aproximadamente 15 a 20 dias para que suas colônias ocupassem uma área de aproximadamente 50% da placa de Petri. Como bem descrito na literatura, esta bactéria é de crescimento fastidioso. Após constatar o seu crescimento em meio PW ágar, esta foi inoculada em meio PW líquido, que obteve seu crescimento necessário para realização do MIC, também por volta de 20 dias. A densidade do crescimento da bactéria para a realização do MIC foi observado através da Escala de Mc Farland, que foi de 0,5, isto é,  $1,5 \times 10^8$  quantidades de bactéria, valor padronizado para a realização do MIC para a bactéria *Xylella fastidiosa*.

Nos experimentos iniciais ocorreram diversos problemas com contaminação observada através da turvação do meio de cultura nos poços da placa, confirmando crescimento microbiano, FIGURA 4.1. Como o meio de cultura era estéril, assim como todo o material utilizado e o experimento conduzido em Câmara de Fluxo Laminar, desconfiou-se que a contaminação pudesse estar vindo das amostras em teste.

Resolveu-se então isolar as amostras em teste em meio de cultura agar-sangue. Este meio de cultura, foi escolhido por ser pouco seletivo, permitindo o crescimento de outras bactérias ou fungos. Deste modo pode-se confirmar a origem da contaminação, além disso, em um meio de crescimento rápido. Como previsto, após isolar todas as amostras, estas foram analisadas em 24 horas e constatou-se alta contaminação por outros tipos de bactérias, como mostra a FIGURA 4.2.

Após a confirmação de que eram as amostras que estavam contaminando o meio de cultura nos poços da placa Eliza®, durante o experimento do MIC, as amostras foram submetidas a processos mais rigorosos de assepsia utilizando filtros certificados de 0,2 µm, manipulação somente em câmara de Fluxo laminar e banho de luz UV em toda a vidraria.

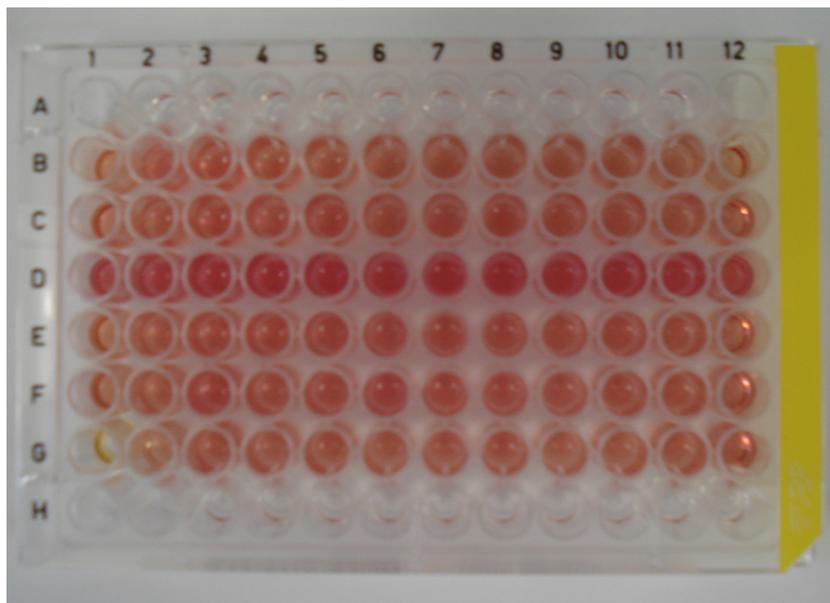


FIGURA 4.1. Placa Eliza® onde foi realizado o MIC com as amostras contaminadas.

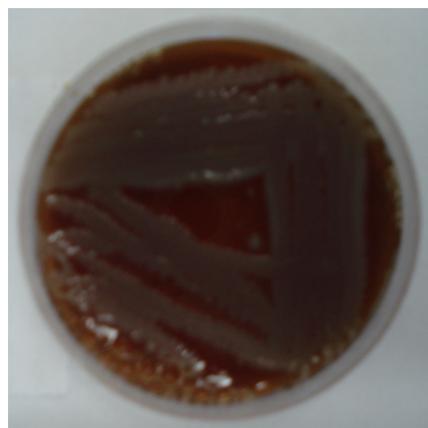
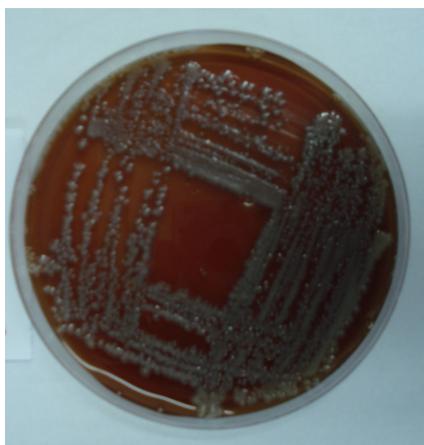


FIGURA 4.2. Placas com meio de cultura agar-sangue contaminadas com bactérias provenientes das amostras que foram testadas.

### 4.3.2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) das amostras testadas em microplacas (Placa Eliza®).

A leitura do MIC foi realizada visualmente com a adição da resazurina. A resazurina de cor azul é oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração vermelha, facilitando a verificação da presença de crescimento microbiano. Desta forma, foi possível determinar a menor concentração de cada amostra testada capaz de inibir o crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa*.

Por ser uma bactéria de metabolismo fastidioso, inicialmente foi necessário monitorar a virada da cor, da oxidação da resazurina em resofurina, onde caso houvesse crescimento da bactéria apresentaria cor vermelha (resofurina) e se não houvesse crescimento, permanecia na cor azul (resazurina). A total oxidação da resazurina foi observada com aproximadamente 24 horas após a aplicação da resazurina, FIGURA 4.3.

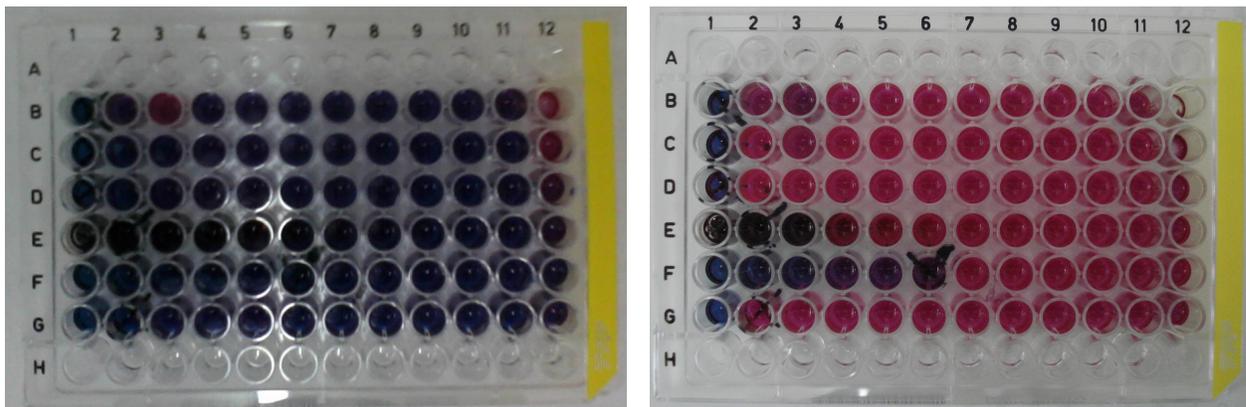


FIGURA 4.3. Aplicação de resazurina nos poços para a identificação da presença da bactéria.

### 4.3.3 – Resultado dos MICs dos ensaios in Vitro.

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos compostos testados *in vitro*, em microplacas através de diluição seriada, podem ser observados na TABELA 4.1.

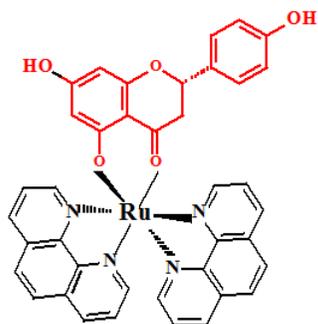
TABELA 4.1. MIC dos compostos testados in Vitro em  $\mu\text{g/mL}$ .

Compostos	MIC
Fenantrolina 99%	N.D
Hesperidina complexada com rutênio	N.D
Hesperidina	2.000
Hesperidina complexada com Magnésio	2.000
Naringenina	2.000
Azadiracthina	1.500
Naringenina complexada com Magnésio	450
Naringenina complexada com Rutênio	162,5

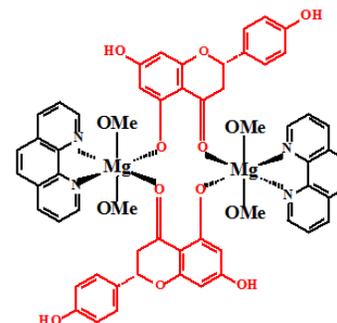
*N.D = Não determinado*

A Concentração Inibitória Mínima, segundo o Protocolo de Diluição Seriada utilizado, é dada em  $\mu\text{g/mL}$ . Estes resultados tiveram que ser convertidos em  $\mu\text{M}$  (micromolar), pois a comparação da concentração mínima para inibir o crescimento da bactéria, vai depender da quantidade de matéria utilizada em teste.

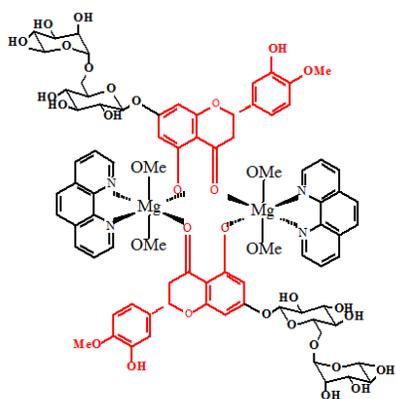
Após a conversão, as moléculas que apresentaram os melhores resultados podem ser observadas na FIGURA 4.4. Os produtos marcados com N.D na TABELA 4.1 não mostraram atividade em todas as concentrações avaliadas.



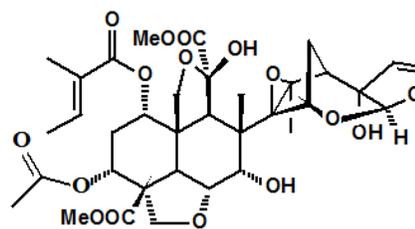
Naringenina complexada com Rutênio

MIC = 0,19  $\mu$ M

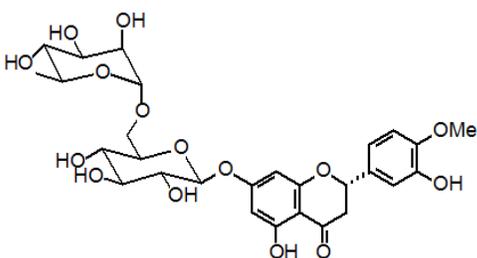
Naringenina complexada com magnésio

MIC = 0,34  $\mu$ M

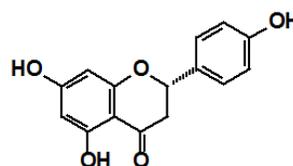
Hesperidina complexada com Magnésio

MIC = 1,4  $\mu$ M

Azadirachtina

MIC = 2,1  $\mu$ M

Hesperidina

MIC = 3,27  $\mu$ M

Naringenina

MIC = 7,3  $\mu$ M

FIGURA 4.4. MIC das moléculas que mostraram atividade nas concentrações avaliadas.

Segundo estes resultados, foi possível observar que o composto que obteve melhor inibição ao crescimento da bactéria *X. fastidiosa* foi a Naringenina complexada com rutênio, seguida pela Naringenina complexada com magnésio, Hesperidina complexada com Magnésio, a Azadiracthina, a Hesperidina sozinha e por ultimo a Naringenina, como mostra na FIGURA 4.5.

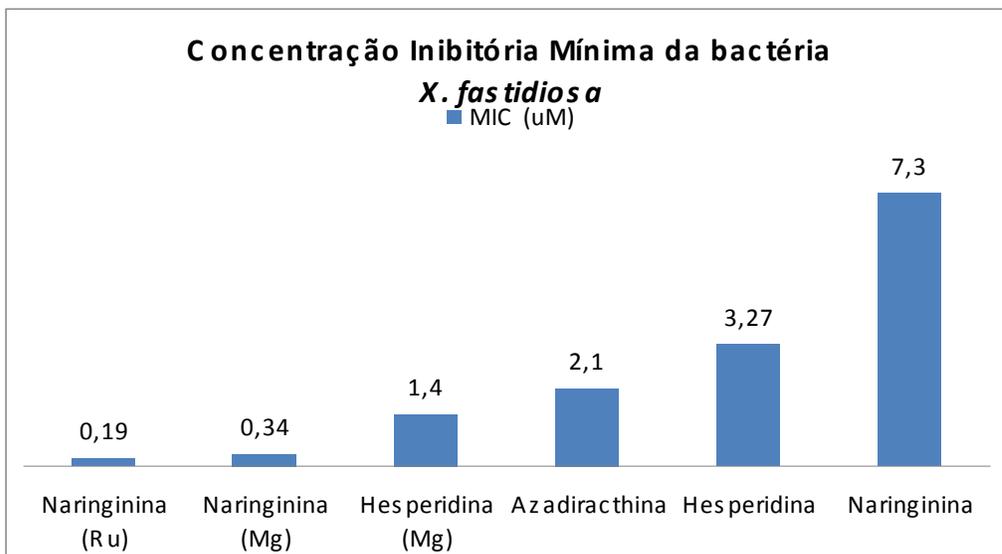


FIGURA 4.5. Concentração inibitória mínima dos compostos testados in Vitro, através de microdiluição em microplaca.

Estes resultados se mostraram promissores. A Azadiracthina e Hesperidina já haviam sido testadas por RIBEIRO et al., (2008), e os resultados foram semelhantes aos deste trabalho, a Azadiracthina apresentou um MIC de 1.600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e a Hesperidina 2.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . MADDIX et al., (2009) testou alguns compostos fenólicos como inibidores da bactéria *Xylella fastidiosa*, entre eles a naringenina, que obteve um resultado de 200  $\mu\text{M}$ .

Não há na literatura nenhum bactericida capaz de controlar com eficácia a contaminação do citros pela bactéria *Xylella fastidiosa* e também nenhum produto com registro para esta doença. A maioria dos trabalhos, como os citados acima, foram feitos apenas in Vitro. Estes compostos fenólicos, até hoje, só foram testados in Vitro.

Até hoje, o controle da bactéria é feito através das cigarrinhas, que são as vetoras da bactéria. Alta quantidade de pesticidas são aplicados nas lavouras de citros para o controle destas pragas para evitar que estas contaminem o citros com a bactéria. Muitos são prejudiciais a animais e seres vivos e possuem um período de carência, isto é, possuem um prazo após a aplicação para serem consumidos. Os compostos avaliados neste trabalho, são moléculas naturais, biodegradáveis e não tóxicas a animais e seres vivos, podendo até serem aplicados no dia da colheita, não precisando obedecer um período de carência.

Através da FIGURA 4.5 observou-se que a Naringenina e Hesperidina complexadas obtiveram melhor resultado do que quando testadas sozinhas. A Naringenina complexada com rutênio foi 38,4 % mais ativa que a não complexada, a Naringenina com magnésio foi 21,5 % mais ativa que a não complexada e a Hesperidina complexada com magnésio foi 2,33% mais ativa que a não complexada. Estes flavonóides complexados com rutênio e magnésio já foram testados por OLIVEIRA, (2012) como inseticidas para formiga cortadeira e seus resultados mostraram que os compostos complexados apresentam maior estabilidade no estado sólido, na maioria dos solventes orgânicos testados e em diversos pH's e, são mais hidrossolúveis e lipossolúveis que os flavonóides livres, mostrando um melhor resultado como inseticida.

Entre as moléculas não complexadas, a Azadirachtina foi a mais ativa, sendo 1,56 e 3,50 vezes mais ativa que a Hesperidina e Naringenina, respectivamente.

## **4.4 – Ensaio *in Vivo*.**

### **4.4.1 – Caracterização de presença da *Xylella fastidiosa* no citros.**

#### **4.4.1.1 - Extração do DNA total das folhas de citros.**

Após um período de 90 dias da inoculação de solução da bactéria *Xylella fastidiosa* nas plantas de citros sadias, coletou-se as folhas das plantas numeradas de 1 a 31 e fez-se a extração total do DNA de cada uma, como descrito no item 3.4.2.1, diagnosticando a presença ou não da bactéria em cada planta.

Este procedimento assegurou que todas as plantas que receberam as amostras testes realmente estavam infectadas com a bactéria *Xylella fastidiosa*.

A extração do DNA total das plantas de citros é um procedimento minucioso e que requer tempo e cautela, desde a maceração das folhas à visualização final do DNA no fundo dos eppendorfs (material precipitado). Visivelmente, as extrações foram eficazes, uma vez que não houve perda do DNA. Devido ao grande número de etapas, a extração teve que ser bem planejada, dedicando um tempo exclusivo evitando perdas por degradação.

O DNA extraído de cada planta de citros foi quantificado por Espectrofotômetro Nanodrop e de acordo com os resultados da TABELA 4.2, podemos observar que a extração foi bastante eficaz.

TABELA 4.2. Quantificação do DNA total extraído das plantas em  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  antes da realização dos tratamentos.

Plantas	Quantidade de DNA extraído ( $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ )
1	506,2
2	641
3	1055
4	250,8
5	824
6	980,2
7	1397
8	580,2

Plantas	Quantidade de DNA extraído ( $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ )
9	799
10	1264
11	1318
12	1405
13	994,4
14	711,6
15	868,7
16	386,4

Plantas	Quantidade de DNA extraído ( $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ )
17	239,5
18	1300
19	1086
20	981,9
21	455,4
22	1079
23	392
24	979

Plantas	Quantidade de DNA extraído ( $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ )
25	932,3
26	819,1
27	934,4
28	1205
29	1140
30	730,2
31	1275

#### 4.4.1.2 – Amplificação do DNA pela técnica de PCR e visualização do DNA por Eletroforese em Gel Agarose.

Após a extração do DNA total e a confirmação da eficiência da extração (TABELA 4.2), adicionaram-se os primers para a *Xylella fastidiosa* para verificarmos a presença ou não da bactéria, através da amplificação e replicação do DNA, e de sua visualização através da eletroforese em gel.

Após as amostras serem retiradas do termociclador, onde o DNA da bactéria *Xylella fastidiosa* foi amplificado e replicado, isto no caso de ter células de *X. fastidiosa* nas amostras, fez-se a eletroforese para visualização do DNA bacteriano..

A visualização do DNA foi fotodocumentado, como mostra na FIGURA 3.6. A banda eletroforética de 700 pb, correspondente ao DNA amplificado da *Xylella fastidiosa*, está destacada em amarelo. As bandas mais intensas são as que apresentam maior concentração do DNA da bactéria. O DNA de *Xylella fastidiosa* tem aproximadamente 700pb e vimos que o DNA das amostras correspondia ao de *Xylella*, pois as bandas se encontravam na mesma altura correspondente a 700pb do ladder.

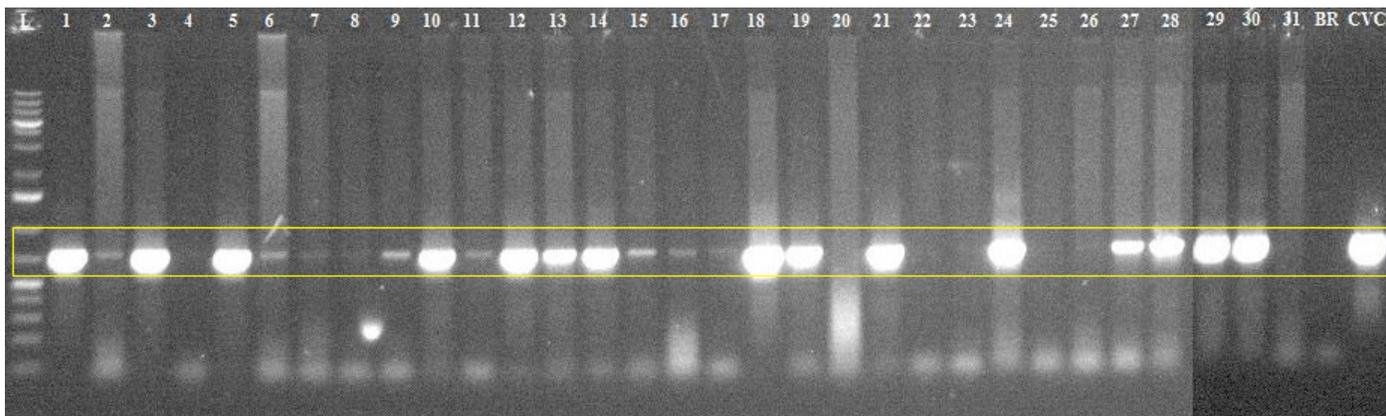


FIGURA 4.6. Padrão eletroforético das reações de amplificação para a detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* a partir do DNA extraído de plantas de citros anteriormente saudas e que foram submetidas à inoculação de uma solução da bactéria.

Na FIGURA 4.6 visualizada acima, os números de 1 a 31 representam as amostras, L o Ladder de 700 pb, BR o branco e CVC o DNA da *Xylella fastidiosa*. Através do resultado acima podemos verificar que as amostras positivas, isto é, aquelas onde podemos observar as bandas do DNA da bactéria *Xylella fastidiosa*, foram as amostras 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28, 29 e 30; e o restante negativas, como mostra a TABELA 4.3. As plantas numeradas infectadas foram então separadas para os ensaios *in Vivo*.

Através desses resultados, pode-se diagnosticar as plantas de citros que estavam ou não contaminadas com a CVC (Clorose Variegada do Citros).

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que a inoculação da bactéria nas plantas de citros sadias foi muito eficiente, uma vez que das 31 plantas cedidas, 23 foram contaminadas pela bactéria, isto é, praticamente 75% de eficiência de inoculação.

Este foi um resultado muito satisfatório, uma vez que muitos que realizaram o mesmo procedimento de inoculação da bactéria em mudas sadias, não obtiveram grandes porcentagens de inoculação.

TABELA 4.3. Diagnóstico de bactéria *Xylella fastidiosa* em plantas de citros previamente sadias. As plantas foram enumeradas de 1 a 31. (+) indica a presença da bactéria e (-) ausência da mesma.

Plantas	Resultado
1	+
2	+
3	+
4	-
5	+
6	+
7	+
8	-
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+

Plantas	Resultado
16	+
17	+
18	+
19	+
20	-
21	+
22	-
23	-
24	+
25	-
26	-
27	+
28	+
29	+
30	+
31	-

#### 4.4.2 – Tratamento das plantas infectadas com a bactéria *X. fastidiosa* com as amostras Azadiracthina, Hesperidina, Naringinina.

Após a confirmação da contaminação das plantas pela bactéria, se iniciaram os tratamentos na busca de substâncias com potencial ação bactericida. Merece destaque aqui que o objetivo principal de se desenvolver o estudo *in Vivo* era validar os resultados dos ensaios *in Vitro*.

No período em que as plantas estavam sendo tratadas com as amostras na casa de vegetação, estas sofreram um estresse hídrico, para garantir que toda a solução preparada com as amostras fossem absorvidas pela planta, para que assim tivesse um resultado confiável pensando nessas amostras como futuros bactericidas para as lavouras de citros.

#### **4.4.3 – PCR em Tempo Real (qPCR).**

Após os tratamentos realizados nas plantas de citros, fez-se a extração do DNA das plantas novamente. Este DNA, juntamente com o DNA das mesmas plantas antes do tratamento (armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), foram submetidos ao procedimento de quantificação através espectrofotômetro Nanodrop, para que suas quantidades fossem padronizadas, e também para verificar se a extração foi eficaz, no caso do DNA pós tratamento, e no caso do DNA guardado, verificar se não houve degradação (TABELA 4.4 ).

Todas as amostras de DNA extraído tiveram suas concentrações padronizadas para  $100\text{ }\eta\text{g}/\mu\text{L}$ , antes da realização do PCR quantitativo.

Através dos resultados observados na TABELA 4.4, pode-se confirmar pelos valores, que a extração do DNA das plantas pós-tratamento foi bastante eficaz, uma vez que os valores estão na média de  $800\text{ }\eta\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo que a concentração padronizada para a realização da qPCR deve ser de  $100\text{ }\eta\text{g} / \mu\text{L}$ .

A FIGURA 4.7 ilustra a comparação da quantidade de DNA quantificado antes e após armazenamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , comprovando que não houve problema de degradação.

TABELA 4.4. Quantificação do DNA extraído das plantas de citros pelo Nanodrop em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

(A)

Plantas	Quantidade DNA
1	507,3
2	513,6
3	1086
4	215
5	698,3
6	820,7
7	1565
8	626,5
9	718,4
10	1144
11	1397
12	1661
13	523,3
14	603,1
15	861,3
16	345,6
17	282,2
18	1359
19	430
20	961,6
21	465,5
22	1079
23	372,7
24	1014
25	616,4
26	873,5
27	993,3
28	905,9
29	1146
30	776,2
31	1353
<b>Média</b>	<b>835,9483871</b>

(B)

Plantas	Quantidade DNA depois tratamento
1	849,7
2	1057
3	192
5	486,2
6	1141
7	721,1
9	624,2
10	415,9
11	880,4
12	470,7
13	536,8
14	1153
16	606,5
17	597,9
18	616,9
19	752,2
21	313,6
24	976,3
25	76,09
26	859,3
27	319,7
28	579,9
29	135,4
30	918,3
31	717,3
<b>Média</b>	<b>639,8956</b>

Observando a TABELA 4.4, observa-se que a TABELA 4.4 B não apresenta todas as plantas, isto porque após a constatação da bactéria nas plantas, onde se realizou o PCR de diagnóstico, utilizamos para o tratamento as plantas infectadas com a bactéria e apenas 3 plantas saudias.

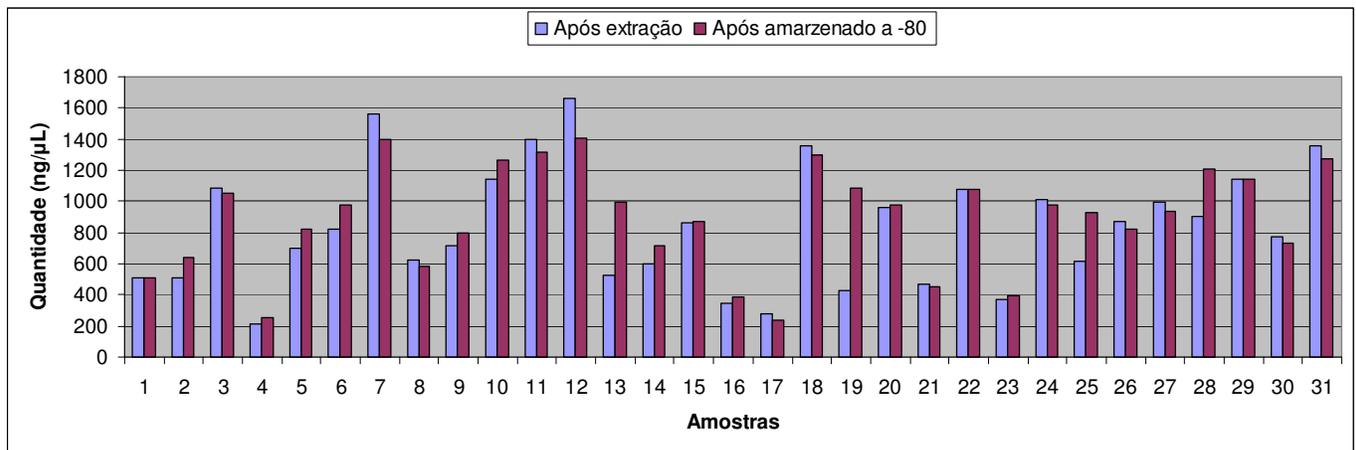


FIGURA 4.7. Comparação da estabilidade de armazenamento para amostras de DNA de citros logo após a extração e depois de ser armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 60 dias.

No gráfico da FIGURA 4.7, observa-se que as amostras de DNA que foram guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , não obtiveram efeito de degradação, comparando com sua quantificação realizada logo após a sua extração das plantas. Este procedimento é de grande importância, uma vez que o PCR quantitativo foi realizado para verificar a quantidade de células de *Xylella fastidiosa* presentes nas plantas antes dos tratamentos realizados e depois dos tratamentos, para verificarmos se houve efeito bactericida dos produtos testados.

Portanto, é de grande importância que o DNA que foi guardado esteja adequado para o teste que será realizado. Além da quantificação por espectrofotometria no Nanodrop, foi realizada uma análise em Eletroforese em Gel Agarose, para confirmarmos que o DNA está definitivamente presente e que não está degradado, como mostra na Figura 4.8. A FIGURA 4.8 não representa um resultado de uma PCR, mas sim, o DNA que foi extraído, ou seja, a banda eletroforética, destacada em amarelo, é apenas o DNA puro, esta eletroforese só foi feita para verificar se o DNA

estaria degradado ou se seria possível realizar o PCR quantitativo, pois para o PCR quantitativo precisava-se saber a quantidade exata de DNA que se extraiu (por isso sua quantificação em nanodrop, resultado da TABELA 3.4) e quão degradado ele estaria, pois se as bandas da FIGURA 4.8 estivesse ruim, isto é, com rastros, não seria possível a realização da qPCR.

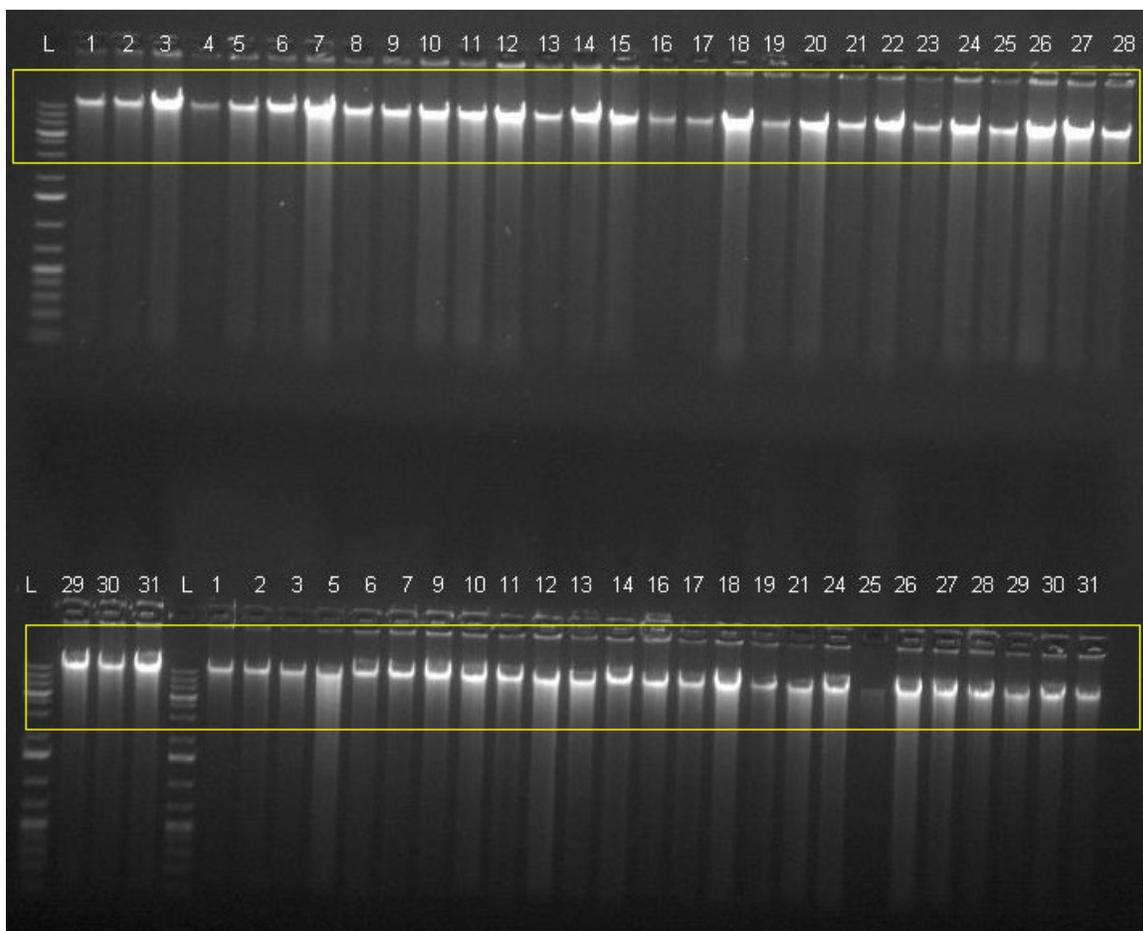


FIGURA 4.8. Foto em Eletroforese em Gel Agarose do DNA extraído das plantas de citros antes e depois dos tratamentos com os produtos bactericidas.

#### 4.4.4 – Resultado PCR quantitativo em Tempo Real.

As amostras de DNA antes e depois dos tratamentos com os bactericidas foram amplificadas e quantificadas pelo qPCR. O resultado forneceu o número de células de *Xylella fastidiosa* por  $\eta$ g de amostra, como mostra a TABELA 4.5.

Os tratamentos foram feitos em triplicata, e fez-se a média dos valores obtidos, que podem ser vistos na TABELA 4.5. Nestes resultados, podemos observar a grande diferença no número de células de *Xylella fastidiosa* antes e depois do tratamento realizado nas plantas de citros doentes com as substâncias com caráter bactericida.

TABELA 4.5. Resultado do PCR quantitativo em Tempo Real para a bactéria *Xylella fastidiosa* do citros.

Amostras	Número de células de <i>Xylella fastidiosa</i> / ng de DNA. Antes tratamento	Número de células de <i>Xylella fastidiosa</i> / ng de DNA. Pós tratamento
Cobre	30721,8	35,5
Naringinina (Ru)	52333,4	47,6
Azadirachtina	4460,3	35,1
Naringinina (mg)	2370,7	21,2
Naringinina	318111,4	30954,4
Hesperidina	415,1	54,8
Água	285423,2	971599,1

A TABELA 4.6 ilustra a porcentagem de bactéria viva após os tratamentos com os bactericidas comparados com a quantidade de bactéria antes dos tratamentos durante os 60 dias de experimento. Para a testemunha água, a porcentagem de bactéria viva no final do tratamento com relação à sua quantidade antes dos tratamentos, foi de 340%. Este resultado demonstra que o procedimento experimental não alterou o desenvolvimento da planta.

TABELA 4.6. Porcentagem de células da bactéria *Xylella fastidiosa* no pós tratamento, em relação a antes do tratamento ser realizado.

Amostras	% de células de <i>Xylella</i> em relação ao início
Cobre	0,1
Naringinina (Ru)	0,1
Azadirachtina	0,8
Naringinina (mg)	0,9
Naringinina	9,7
Hesperidina	13
Água	340

A TABELA 4.6 nos mostra a porcentagem de bactéria viva pós-tratamento. Analisando estes resultados, se observa a primeira vista que o Cobre e a Naringenina complexada com Rutênio, foram os que obtiveram um melhor resultado bactericida, porém, se deve considerar a quantidade de matéria de cada molécula utilizada, para maior precisão entre dose-resposta, equiparando as doses e aí sim identificar a molécula que apresentou o melhor resultado bactericida.

Sabendo-se o peso molecular de cada molécula, calculou-se a dose utilizada em Mol por Litro (M/L) e em seguida, calculou-se a concentração que deveria ser utilizada para matar 99,9% de bactérias (melhor resultado). Estes resultados estão apresentados na TABELA 4.7

TABELA 4.7. Concentração em moles por litro de cada molécula utilizada nos testes com as plantas de citros infectadas com a bactéria *Xylella fastidiosa* para matar 99,9% de bactéria.

Amostras	Concentração em M/L x10 <sup>-2</sup> para 0,1% bactéria viva
Naringenina (Mg)	0,07
Naringenina (Ru)	0,12
Azadirachtina	0,14
Hesperidina	0,18
Naringenina	0,39
Cobre	0,63

Sendo assim, depois dos cálculos feitos com relação à concentração de cada molécula, através da TABELA 4.7 pode-se dizer qual substância teve o melhor efeito bactericida. Analisando os resultados da TABELA 4.7 se observa-se que a Naringenina complexada com Magnésio foi que obteve melhor resultado, seguida da Naringenina complexada com Rutênio, depois a Azadirachtina, Hesperidina, Naringenina sozinha e por final o Cobre, FIGURA 4.9.

Com exceção da Naringenina sozinha e o Cobre, todos os outros tiveram seus valores aproximados. O cobre que a primeira vista foi um dos que teve o melhor resultado, depois de calcularmos sua concentração utilizada, observamos que foi o de menor eficiência, FIGURA 4.9.

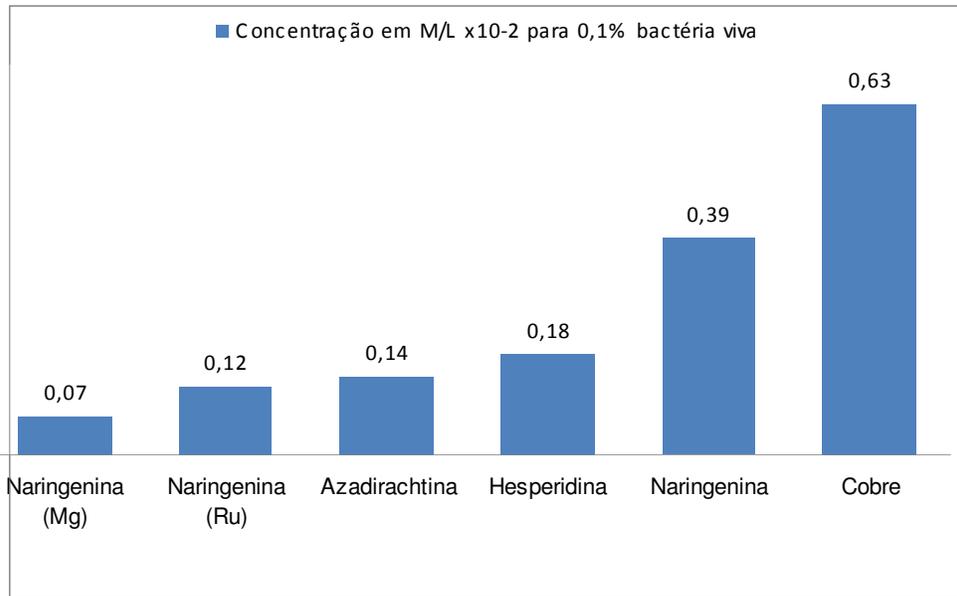


FIGURA 4.9. Resultado dos compostos testados como bactericidas para a bactéria *X. fastidiosa* do citros.

Como observado nos experimentos *in vitro*, os experimentos *in vivo* também apresentaram melhores resultados para os polifenóis complexados do que livres. A naringenina complexada com o magnésio e rutênio foram aproximadamente 5 e 3 vezes mais ativa (potente) que a naringenina livre. Estes complexos melhoram os compostos em sua estabilidade no estado sólido, na maioria dos solventes orgânicos testados e em diversos pH's e, são mais hidrossolúveis e lipossolúveis que os flavonóides livres, é o que mostra o experimento realizado por OLIVEIRA, (2012), que testou a hesperidina e naringenina complexadas com rutênio e magnésio como inseticidas para formigas cortadeiras.

Comparando os resultados entre os ensaios *in Vitro* e *in Vivo*, como mostra a FIGURA 4.10, pode-se dizer que foram coerentes, isto é, se obteve os mesmos resultados entre o que foi observado *in Vitro* com o avaliado *in Vivo*.

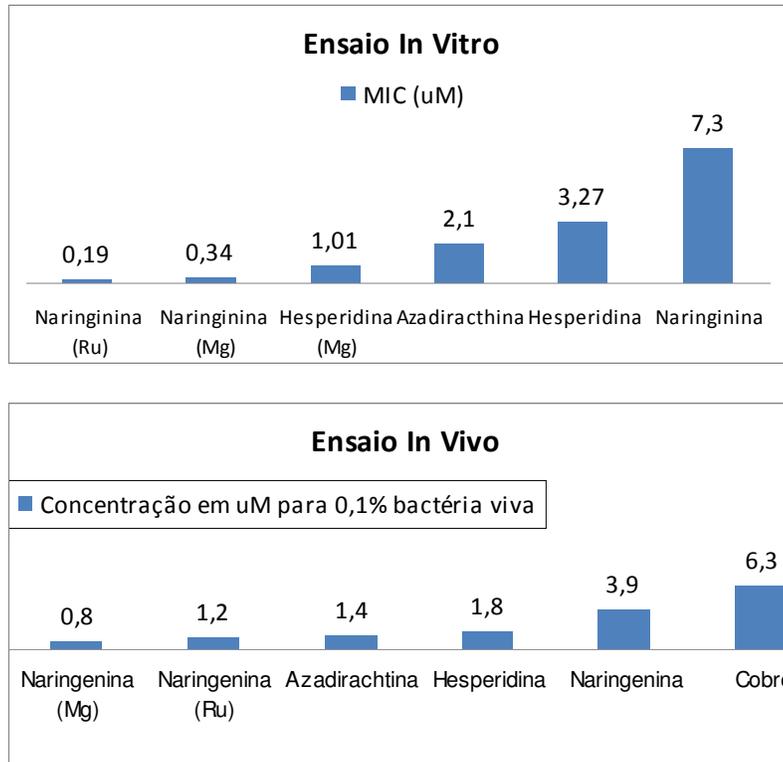


FIGURA 4.10. Comparação dos resultados In Vitro e In Vivo.

Isto nos mostra que o trabalho foi bem executado e os resultados satisfatórios, pois in Vivo há grandes chances dos resultados serem diferentes do in Vitro, uma vez que in Vivo existem os fatores externos, que podem contribuir para alterar os resultados.

Houve uma pequena diferença na atuação da naringenina complexada, nos ensaios in Vitro, ela complexada com o Rutênio, teve maior eficiência, já no ensaio in Vivo a Naringenina complexada com Magnésio teve maior eficiência. Mas pode-se observar que nos resultados in Vivo a diferença foi pouca, podendo dizer mesmo assim que os resultados foram coerentes.

MADDOX et. al., (2009), testaram compostos fenólicos para o controle da bactéria *Xylella fastidiosa*, dentre estes compostos a Naringenina, onde ele demonstrou dentre todos os compostos testados, que a Naringenina foi a que apresentou uma das melhores concentrações inibitórias para a bactéria, num valor de 200  $\mu$ M.

RIBEIRO et.al., (2008), testaram a Azadiracthina e Hesperidina como inibidores da bactéria *X. fastidiosa*, e seus resultados foram bem semelhantes destes resultados.

A Azadirachtina teve uma Concentração Inibitória Mínima de 1.600  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e a Hesperidina um MIC de 2.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sendo que no resultado deste trabalho a Azadirachtina teve um MIC *in Vitro* igual e a Hesperidina um MIC de 1.500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Porém RIBEIRO et.al. (2008), testou estes compostos apenas *in Vitro*, já neste trabalho, a Azadirachtina e Hesperidina foram testadas *in Vitro* e depois *in Vivo*. Isto significa confiabilidade nestes resultados, uma vez que todos foram feitos em triplicata, os resultados *in Vitro* foram posteriormente testados *in Vivo* e obtiveram o mesmo resultado, e um outro trabalho publicado já havia demonstrado valores semelhantes.

#### 4.5 – Visualização do xilema das plantas de citros por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As folhas coletadas das plantas de citros do experimento, ao término dos tratamentos, foram preparadas para a visualização de seus xilemas por Microscopia Eletrônica de Varredura, onde coletou-se folhas de todos os tratamentos. Na FIGURA 4.11 a foto 1 mostra folhas com sintomas da CVC que foram tratadas apenas com água e na foto 2 folhas das plantas tratadas com as amostras em teste que não apresentam sintomas da doença, isto mostra mais uma evidência da eficiência dos bactericidas em teste.



FIGURA 4.11. Fotos das folhas de citros coletadas após o término do tratamento com os bactericidas em teste.

Após o preparo das amostras das folhas, estas foram submetidas a Microscopia Eletrônica de Varredura e como a bactéria *Xylella fastidiosa* coloniza exclusivamente os vasos do xilema, através dessa metodologia, pode-se observar no xilema dos pecíolos das plantas a presença ou não da bactéria. (FIGURA 4.12). A foto 1 mostra vasos do xilema colonizados pela bactéria *Xylella fastidiosa*, pertencentes a folhas das plantas tratadas apenas com água. Nas fotos subsequentes, os vasos do xilema pertencentes à folhas coletadas das plantas submetidas aos tratamentos com os bactericidas em teste apresentam-se limpos, isto é, ausentes da bactéria. Os resultados observados na FIGURA 4.12, confirmam a eficiência dos bactericidas testados.

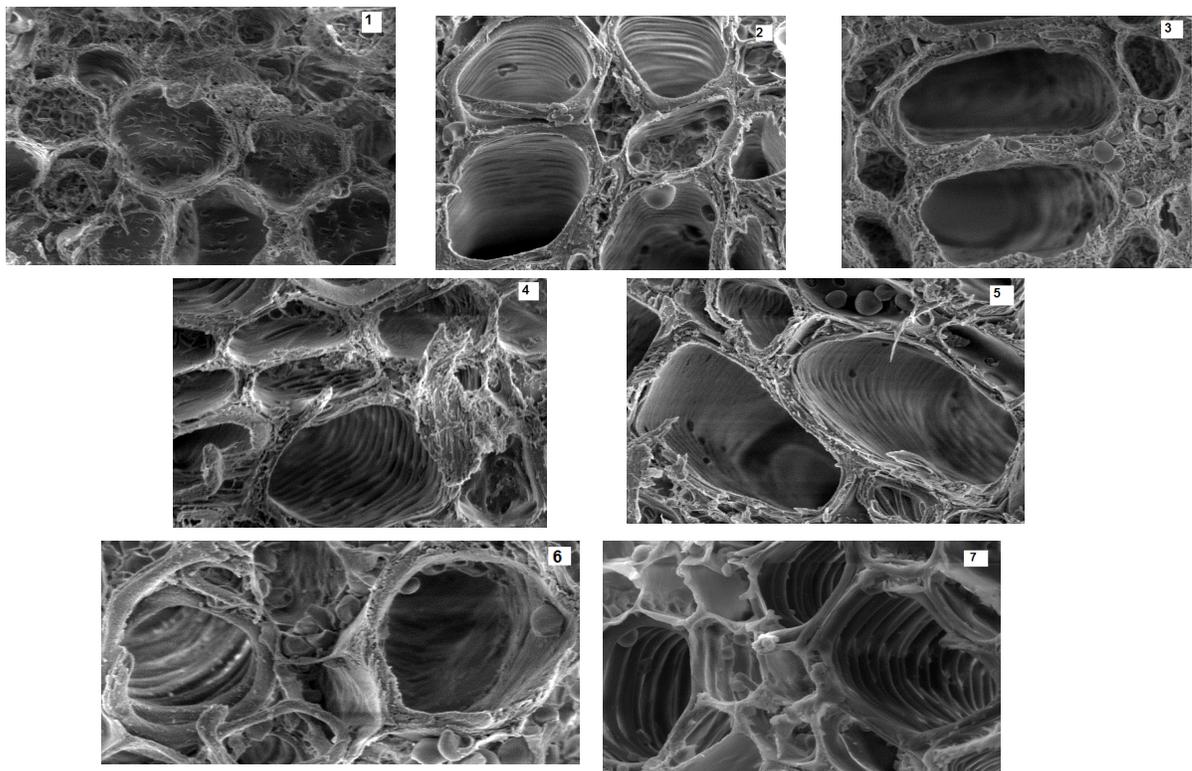


FIGURA 4.12. Xilema do pecíolo das plantas do experimento visualizados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), aumento de 2000X. Foto 1, tratamento com água; foto 2, tratamento cobre; foto 3, tratamento azadirachtina; foto 4, tratamento hesperidina; foto 5, tratamento naringenina; foto 6, tratamento naringenina complexada com rutênio; foto 7, naringenina complexada com magnésio.

## 5. Conclusões.

Com base nos resultados do presente estudo, conclui-se que:

Nos ensaios *in vitro*, a Naringinina complexada com Rutênio, teve uma maior eficiência na inibição do crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa*. A Naringinina complexada com magnésio também obteve um bom resultado, sendo seu valor próximo à complexada com rutênio.

O Magnésio e o Rutênio ajudam na eficiência da Naringinina e Hesperidina, pois estudos anteriores comprovaram que estes complexos tornam os flavonóides mais hidrossolúveis, lipossolúveis e estáveis em diferentes pH's.

Nos ensaios *in vivo*, os resultados da eficiência das amostras corresponderam com os resultados das amostras dos ensaios *in vitro*.

O Cobre, que hoje é um dos bactericidas mais utilizados na agricultura, devido a sua eficiência, teve a menor eficiência com relação à inibição da bactéria.

Através da análise visual das folhas das plantas testadas, observamos que as plantas tratadas apenas com água apresentavam sintomas da doença, já as folhas tratadas com os bactericidas testados, não apresentavam sintomas da doença.

A visualização do xilema das plantas testadas, em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), mostra a eficiência bactericida dos compostos testados, uma vez que no tratamento com água os vasos do xilema estavam colonizados pela bactéria, já os vasos das plantas tratadas com os bactericidas estavam limpos, isto é, ausentes de bactéria e a *Xylella fastidiosa* é uma bactéria que desenvolve apenas nos vasos do xilema.

Portanto, através de nossos resultados, podemos apostar no desenvolvimento das amostras testadas como futuros bactericidas para o controle da bactéria *Xylella fastidiosa*.

## 6. Bibliografia

- ABDELNUR, P.V. (2006). Estudo fitoquímico de *citrus*: resistência a *Xylella fastidiosa* e interação com *Oncometopia facialis*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar. Tese Doutorado, 299p.
- AGRIOS. G.N. (1997). Plant pathology. 4.ed. San Diego: Academic press. 635p.
- AMARO, A.A.; SALVA, R.A. (2001). Production of citrus nursery trees in São Paulo State: an economic vision. In: INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001. Ribeirão Preto. *Proceedings...* Ribeirão Preto: [s.n], 55-66.
- BEDENDO, I.P. (1995). Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, K.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 331-342.
- BOUDET, A. (2006). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68, 2722–2735.
- BRISKIN, D. P. (2000) Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124, 507-514.
- BUSTIN, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, Bristol, 25, 169-193,. Review.
- CAMMUE, B.P.A., DE BOLLE, M.F.C., TERRAS, F.R.G., PROOST, P., VAN DAMME, J., REES, S.B., VANDERLEYDEN, J. AND BROEKAERT, W.F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem* 267, 2228–2233.
- CASTEELS, P., AMPE, C., JACOBS, T. AND TEMPST, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antimicrobial polypeptide that is infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *J Biol Chem.*, 268, 7044–7054.
- CHANG, C.J. et al. (1993). Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease. In: INT. ORG. CITRUS VIROL., 12., 1992, New Delhi. *Proceedings...*Riverside: IOCV and University os California Press, 294-300.
- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D.; LAPPIN, S. (1995). Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 711-745.
- COWAN, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 12, 564–582.

DAVEY, M.E. e O'TOOLE, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 847-867.

DESTEFANO-BELTRAN L, NAGPALA P, KIM JH, DODDS JH, JAYNES JM. (1991) Genetic transformation of potato to enhance nutritional value and confer disease resistance. In: Dennis ES, Llewelyn DT, editors. *Plant gene research: molecular approaches to crop improvement*. New York: Springer. 17–32.

DE KIEVIT, T.R e IGLEWSKI, B. H. (1999). Quorum sensing, Gene expression, and *Pseudomonas* Biofilms. In: *Meth. Enzymol.: Biofilms*. ed: Doyle, R.J. Academic Press, 310, 117-119.

DEWICK, P.M. (1998). *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. John Wiley & Sons. Chichester.

EDREVA, A. (2004). A novel strategy for plant protection: induced resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 3, 61-69.

EPSTEIN, E. Silicon. (1999). *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 641-664.

EVERT, D.R.; MULLINIX JUNIOR, B.G. (1983). Xylem water potential of peach trees infected with phony disease. *HortScience*, 18, 719-721,.

FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. (2005). Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249, 1-6,.

FEIL, H.; FEIL, W.S.; LINDOW, S. E. (2007). Contribution of fimbrial and afimbrial adhesins of *Xylella fastiosa* attachment to surfaces and virulence to grape. *Phytopathology*, 97, 318-24.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, Natick, 26, 112-125.

FUNDECITRUS. (2005). Nova cigarrinha é identificada. *Revista do Fundecitrus* 21, 12.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. (2004). Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, 42, 367-371,.

GEISSMAN, T.A. E CROUT, D.H.G. (1969). *Organic chemistry of secondary plant metabolism*. Freeman, Cooper & Company. San Francisco. 592p.

GIUSTOLIN, T.A.; LOPES, J.R.S.; MENDES, M.A.; MORAES, R.C.B. & RODRIGUES, R.R. (2002). Levantamento de hospedeiros alternativos das cigarrinhas vetoradas da

*Xylellas fastidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., Manaus. Resumo. Manaus: SEB, 215.

GOMES, M.M.A. et al. (1999). Quantificação do ácido abscísico em laranjeiras `Pêra` infectadas pela *Xylella fastidiosa* e submetidas à deficiência hídrica. *Summa Phytopathol.*, 25, 29.

GOODWIN, P.H.; DEVAY, J.E.; MEREDITH, C.P. (1988). Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine. *Physiol. Mol.Plant Pathol.*, 32, 1-15.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T, & ROBERTO, S.R. (1997). Os vetores de *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Eds.). Clorose variegada dos citros. Bebedouro: EECB/Fundecitrus, 37-53.

HANCOCK RE, LEHRER R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*, 16, 82-8.

HARAKAVA, R. et al. (1994). Detection of *Xylella fastidiosa* antigens in weeds, collected from citrus orchards affected by Citrus Variegated Chlorosis (CVC). *Fitopatol. Bras.*, 19, 319.

HARTUNG, J.S. et al. (1994). Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, 84, 591-597.

HASSE, G. (1987). A laranja no Brasil 1500-1987. São Paulo: Edição de Duprat; lobe Propaganda, 296p.

HICKEL, E.R.; DUCROQUET, J-P.H.J.; LEITE-JUNIOR, R.P. & LEITE, R.M.V.B.C. (2001). Fauna de Homoptera: Auchenorrhyncha em pomares de ameixeira em Santa Catarina. *Neotropical Entomology* 30, 725-729.

HOPKINS, D.L. (1995). *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. (Ed.). *Pathogenesis and host specificity in plant diseases*. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. V.i – PROKARYOTES. Great Britain: Elsevier Science, 185-197.

IRITI, M.; FAORO, F. (2003). Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, 151, 171-180.

ISHIDA, M.L.; ANDERSEN, P.C.; LEITE, B. (2004). Effect of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay xylem fluid on cecropin B activity against *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 73-81.

KITAJIMA, E.W. et al. (1981). Ocorrência da escaldadura das folhas da ameixeira nos estados do Paraná e Santa Catarina, *Fitopat. Brás.* 6, 285-292,.

- KITAJIMA, E.W. et al. (2000). Escaldadura das folhas em *Hibiscus schizopetalus* associada à infecção por *Xylella fastidiosa* em Brasília – DF. *Fitopat. Brás.* 25, 323,. (Suplemento).
- KUC, J. (1995). Systemic induced resistance. *Aspects of Applied Biology*, 42, 235-242.
- KUZINA, L.V.; MILLER, T.A.; COOKSEY, D.A. (2006), *In vitro* activities os antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. *Letters in Applied Microbiology* 42, 514-520.
- LACAVAL, P.M.; MIRANDA, V.S. (2000). Utilização de provas bioquímicas na caracterização da bactéria *Xylella fastidiosa* dos citros. *Summa Phytopathol.*, 26, 124-125.
- LARANJEIRA, F.F. (1997). *Dinâmica temporal e espacial da clorose variegada do citros*. Piracicaba,. 150p. Mestrado (Dissertação). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HAKAKAVA, R. (1995). Seleção de variedades resistentes e/ou tolerantes a clorose variegada do citros (CVC). *Fitopat. Brás.*, 20, 324.
- LARANJEIRA, F.F. et al. (1998). Screening for tolerance of citrus to *Xylella fastidiosa*, the causal agent of citrus variegated chlorosis CVC. *Fruits*, 53, 345-349.
- LARANJEIRA, F.F. et al. (1998). Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopat. Brás.*, 23, 147-154.
- LARANJEIRA, F.F.; PALAZZO, D. (1999). Danos qualitativos à produção de laranja `Natal` causada pela clorose variegada dos citros. *Laranja*, 20, 77-91.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J. (2002). Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada do citros. *Laranja*, 23, 401-411.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JR., J.; HAKAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O.; CARVALHO, S.A. & COLETTA FILHO, H.D. (1998). Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condição de campo. *Fitopatologia Brasileira* 23, 147-154.
- LEE, R.F. et al. (1993). Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathol.*, 19, 123-125.
- LEITE, B.; PASCHOLATE, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. I. (2001). Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. *RAPP*, 9, 1-41.
- LEITE JUNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. (1991). Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathol.*, 17, 7.

- LIMA FILHO, O.F. de; LIMA, M.T.G. de; TSAI, S.M. (1999). Supressão de patógenos em solos induzida por agentes abióticos: o caso do silício. *Informações Agrônomicas*, v.87, p.8-12.
- LI, W.B.; DONADIO, L.C.; SEMPIONATO, O.R. (1996). Pesquisas recentes sobre a clorose variegada dos citros na EECB. *Inf. Coopercitrus*, 10, 20-21.
- LOPES, A.S.; ROBERTO, G.P.; FRANÇA, S.C. (1999). Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* dos citros. *Fitopat. Brás.*, 24, 250,.
- LOPES, J.R.S. & GIUSTOLIN, T.A. (2000). Outros hospedeiros das cigarrinhas. *Revista do Fundecitrus*, 14, 14.
- LOPES, J.R.S.; BERRETA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.P.P.; KRÜGNER, R. & GARCIA JR., A. (1996). Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da Clorose Variegada dos Citrus, *Xylella fastidiosa*. *Fitopatologia Brasileira* 21, 343. Suplemento.
- LOPES, J.R.S.; GIUSTOLIN, T.A.; MARUCCI, R.C.; TAKIMOTO, J.K. & MENDES, M.A. (1998). Composição de espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Auchenorrhyncha) em café e citros na região de Bebedouro, SP. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 28. Encontro Nacional de Fitossanitaristas, 7. Rio de Janeiro. Resumos. p.615.
- LOPES, S.A.; RIBEIRO, D.M.; ROBERTO, P.G.; FRANÇA, S.C. (2000). *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Disease*, 84, 827-830.
- MACHADO, E.C. et al. (1994). Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Rev. Brás. Fisiol. Vegetal*, 6, 53-57.
- MADDOX, C.E.; LAUR, L.M. (2010). Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbial* 60, 53-58.
- MARTINATI, J.C.; LACAIVA, P.T.; MIYASAWA, S.K.S.; GUZZO, S.D.; AZEVEDO, J.L.; TSAI, S.M. (2007). Redução dos sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por meio de aplicação de benziotiazole e silício. *Pesq. Agropec. Brás.*, Brasília, 42, 1083-1089.
- MARUCCI, R. C.; R. R. CAVICHIOLI & R. A. ZUCCHI . (1999). Chave para as espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) vetoras da clorose variegada dos citros (CVC). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28, 439-446.
- MATTOS JUNIOR, D. de; NEGRI, J.D. de; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (2005). *Citros*, 33.

MEDINA, C.L. (2002). *Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja 'Pêra' com CVC submetida à deficiência hídrica..* 147p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas.

MERRIFIELD RB, ENIFIELD EL, JUVVADI P, ANDREU D, BOMAN HG. (1994). Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Ciba Found Symp*;186, 5–20.

MERRIFIELD RB, VIZIOLI LD, BOWMAN HG. (1982). Synthesis of an antibacterial peptide cecropin A (1–33). *Biochemistry*;21, 5020–31.

MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; CUSTÓDIO, I.A.; MAGRI, D.C.; CERA, C. & LOPES, J.R.S. (2003). Feeding and survival of citrus sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) on host plants. *Florida Entomologist* 86:154-157. Paiva, P.E.B.; Silva, J.L.; Gravena, S. & Yamamoto, P.T. 1996. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja no Estado de São Paulo. *Laranaja* 17, 41-54.

MILLS D, HAMMERSCHLAG FA, NORDEEN RO, OWENS LD. (1994). Evidence for the breakdown of cecropin B by proteinases in the intercellular fluid of peach leaves. *Plant Sci*;104, 17–22.

MILLS D, HAMMERSCHLAG FA. (1993). Effect of cecropin B on peach pathogens, protoplasts, and cells. *Plant Sci.*; 93, 143–50.

MOLIN, S. AND TOLKER-NIELSEN, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14, 255-261.

MORAES, S.R.G.; POZZA, E.A.; ALVES, E.; POZZA, A.A.A.; CARVALHO, J.G.; LIMA, P.H.; BOTELHO, A.O. (2006). Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.69-75.

MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.C.P. (Ed.). *Citricultura brasileira*. 1.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1980. 1, 3-28.

MOURGUES F, BRISSET MN, CHEVREAU E. (1998). Activity of different antibacterial peptides on *Erwinia amylovora* growth, and evaluation of the phytotoxicity and stability of cecropins. *Plant Sci.*, 139, 83–91.

NAYLER, W.G., GU, X.H. AND CASLEY, D.J. (1989). Sarafotoxin S6c is a relatively weak displacer of specifically bound. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 89–94.

NCCLS; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition.; NCCLS document M7-A6. NCCLS, USA; 2003.

NOBILE, C.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. (2008). Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.*, 18, 1017- 1024.

NORDEEN RO, SINDEN SL, JAYNES JM, OWENS LD. (1992). Activity of cecropin SB37 against protoplasts from several plant species and their bacterial pathogens. *Plant Sci.*, 82, 102–7.

OLIVEIRA, R.M.M. (2012). Novos complexos de Ru e Mg com flavonóides: atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar,. Dissertação de Doutorado, 197p.

PAIVA, P.E.B.; SILVA, J.L.; GRAVENA, S. & YAMAMOTO, P.T. (1996). Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja no Estado de São Paulo. *Laranja* 17, 41-54.

PARADELA FILHO, O. et al. (1995).Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja*, 16, 135-136.

PARADELA FILHO, O. et al. (1999) *Atrofia dos ramos de cafeeiro, causada por Xylella fastidiosa*. Campinas: Instituto Agrônomo,10p. (Boletim Técnico, 182).

PEREIRA, H.A., ERDEM, I., POHL, J. AND SPITZNAGEL, J.K. (1993). Synthetic bactericidal peptide based on CAP37: a 33-kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4733–4737.

POMPEU JUNIOR, J. (2001). Rootstock and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: Int. Cong. Citrus Nurserymen, 6.,. Ribeirão Preto. *Proceedings...* Ribeirão Preto: [s.n], 2001. p.331.

POST-BEITTENMILLER, D. (1996). Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 405-430.

POZZA, A.A.A.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; DE CARVALHO, J.G.; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P.T.G.; SANTOS, D.M. (2004). Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 185-188.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. (1999). Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. *Laranja*, 20, 55-76.

RAHMATI, S.; YANG, S.; DAVIDSON, A.L. & ZECHIEDRICH, E.L. (2002). Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol. Microbiol.*, 43, 677-685.

RAO AG. (1995). Antimicrobial peptides. *Mol Plant Microbe Inter*; 8, 6–13.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; MIRANDA, V.S. & LIMA, J.E.O. (1996). Associação entre a Clorose Variegada e as cigarrinhas-do-xilema predominantes em citros. *Fitopatologia Brasileira* 21, 54-67.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. (1990). Clorose variegada dos citros – revisão. *Laranja*, 11, 1-14.

ROSSETTI, V. et al. (1990). Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variéegée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *C.R. acad. Sci. Paris*, t.310, serie III, 345-349.

ROSSETTO, E.A. et al. (2000). Hospedeiros alternativos da *Xylella fastidiosa* dos citros no RS. *Fitopat. Brás.*, 25, 329 (Suplemento).

RUESS, W.; KUNZ, W.; STAUB, T.; MÜLLER, K.; POPPINGER, N.; SPEICH, J.; AHL GOY, P. (1995). Plant activator CGA 245704: a new technology for disease management. *European Journal of Plant Pathology*, 101, 424.

SASSERON, G.R. (2008). Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros. 82p. Mestrado. Instituto Agrônômico.

SCHRODER, J.M. (1999). Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 57, 121–134.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V.; MARTINS JUNIOR, H.; CAMPOS, J.R.; SOUZA, R.M.; CASTRO, R.M. (2000). Épocas e modo de aplicação do ativador de plantas benzothiadiazole (BTH) na proteção contra a mancha bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, 18, 375-376.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; BARATA, R.M.; CAMARGO, L.E.A.; MACHADO, M.A. (2006). Genômica Funcional de Bactérias Fitopatogênicas . Revisão anual de patologia de plantas, Passo Fundo -RS, 14, 1-57.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. (2004). Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.237, p.341-353.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235-270.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*, 56, 187-209.

TAILOR, R.H., ACLAND, D.P., ATTENBOROUGH, S., CAMMUE, B.P.A., EVANS, I.J., OSBORN, R.W., RAY, J.A., RECS, S.B. et al. (1997). A novel family of small cysteine-

rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem* 272, 24480–24487.

TRAVENSOLO, R.F.; LEITE JUNIOR, R.P. (1996). Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com clorose variegada. *Fitopat. Bras.*, 21, 336.

UENO, B. et al. (1998). Primeiro relato de ocorrência da *Xylella fastidiosa* em *Catharanthus roseus* no Brasil. *Fitopat. Brás.*, 23, p.217.

WEBBER, H.J.; REUTHER, W., LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W., WEBBER, H.J.; BTCHELOR, L.D. (Ed.). *The citrus industry*. Riverside: University of California, 1, 1-39.

YAMAGUCHI, I. (1998). Activators for systemic acquired resistance. In: HUTSON, D.; MIYAMOTO, J. (Ed.). *Fungicidal activity: chemical and biological approaches to plant protection*. New York: Wiley. 193-219.

YAMAMOTO, P.T.; LOPES, J.R.S. (2004). Cigarrinhas na proliferação da clorose variegada dos citros. *Visão Agrícola* 2, 60-63.

YAMAMOTO, P.T.; PRIA JÚNIOR, W.D.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, M.R. & DE FREITAS, E.P. (2001). Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. *Neotropical Entomology* 30, 175-177.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; DALLA PRIA JUNIOR, W.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C. & LOPES, J.R.S. (2000). Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescences* e *Molomea cincta* (Hemíptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathologica* 26, 128.