**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Eficiência de transmissão de estirpes de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por cigarrinhas e o papel da adesina XadA2 na formação do biofilme no inseto vetor

Mariana Bossi Esteves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2019**

Mariana Bossi Esteves
Licenciada em Ciências Biológicas

Eficiência de transmissão de estirpes de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por cigarrinhas e o papel da adesina XadA2 na formação do biofilme no inseto vetor

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Esteves, Mariana Bossi

Eficiência de transmissão de estirpes de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por cigarrinhas e o papel da adesina XadA2 na formação do biofilme no inseto vetor / Mariana Bossi Esteves. - - Piracicaba, 2019.

105 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Relação bactéria vetor 2. Eficiência de transmissão, 3. Biofilme 4. Aquisição *in vitro* I. Título

A minha mãe Inês Bossi por ter me criado sozinha com tanto esforço, pelo apoio, companheirismo, paciência e amor durante toda a minha vida e principalmente durante essa árdua jornada!!!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me guiou e iluminou durante essa árdua jornada, sempre me fazendo levantar e seguir em frente perante aos obstáculos encontrados.

A minha mãe Inês, por todo o sacrifício feito para que eu pudesse estudar e realizar meus sonhos, por todas as novenas feitas em pró dos meus objetivos, por todo o amor, companheirismo e compreensão durante essa jornada.

Ao meu orientador João Lopes, por todo o aprendizado acadêmico desde a minha iniciação científica até o doutorado, pela paciência, ensinamentos, conselhos e amizade. Pelo exemplo de pesquisador e pessoa humilde. Agradeço a Deus por ter tido um orientador como você durante a minha formação.

Aos pesquisadores Alessandra A. de Souza e Helvécio D. Coletta-Filho do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” por toda ajuda durante esses quatro anos, sem vocês esse trabalho não seria possível. Agradeço também por terem feito parte da minha formação profissional, foi uma honra ter convivido e aprendido com vocês.

As amigas do CCSM Raquel Caserta e Isis por todos os ensinamentos na parte de produção das proteínas, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Foi um prazer ter trabalhado com pessoas tão dedicadas, competentes e alegres como vocês.

Ao professor Dr. Rodrigo Almeida da Universidade da Califórnia, Berkeley, por ter permitido a realização do meu doutorado-sanduíche no seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos e pela calorosa hospitalidade durante o intercâmbio. Agradeço também os demais membros do Almeida Lab.

A amiga Taciana, por toda ajuda com correções de projetos, relatórios, resumos, artigo e tese. Agradeço também pelos inúmeros conselhos em todos os aspectos da minha vida. Obrigada pela amizade e por me ajudar a superar as horas difíceis.

As amigas Camila e Nathalie por compartilharem comigo os altos e baixos vividos durante essa jornada, agradeço pela paciência e carinho.

A minha querida estagiária e amiga Júlia por me ajudar nos experimentos sem medir esforços e sem nem se importar com dia e horário.

Aos demais estagiários do Laboratório de Insetos Vetores que me ajudaram em algum momento dessa pesquisa, em especial a Karla e Isabella.

A todos os membros do Laboratório de Insetos vetores pelo convívio e pelos momentos de descontração compartilhados.

A todos os professores da ESALQ que eu tive a honra de conviver durante a pós-graduação, em especial ao professor Fernando CÔnsoli pela disposição do seu laboratório e pelas discussões e conselhos a respeito de projetos e apresentações.

A Bruna do Laboratório de Interações em Insetos pela disponibilidade em me ajudar sempre que foi necessário.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia.

Aos estatísticos Tiago Sales, Thiago Oliveira e Idemauro por todo o auxílio com as análises desse trabalho.

Aos amigos Gislaine e Fábio por toda a ajuda com os qPCRs no início do projeto e também pelos momentos de descontração regados com um bom vinho.

Ao amigo Fernando Sujimoto pela ajuda com as figuras do trabalho, pelas adoráveis aulas de inglês e pela amizade.

Aos colegas de pós-graduação que compartilharam comigo momentos de alegria e desespero, em especial a Fernanda Canassa pela amizade durante toda a pós-graduação.

A minha família que sempre me apoiou e torceu por mim, em especial a minha tia Neide que é minha segunda mãe e a minha prima Livia pela ajuda nos experimentos nos fins de semana e no auxílio com as referências da tese.

As amigas de sempre: Alice, Aline, Lidiane, Leticia, Tati, Vanessa, Andresa, Carla e Karina pelas conversas, risadas, rolês e momentos de descontração. Adoro vocês meninas!

*“O SUCESSO É A SOMA DE PEQUENOS ESFORÇOS REPETIDOS DIA
APÓS DIA”*

Robert Collier

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
REFERÊNCIAS.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. CARACTERÍSTICAS DE <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> WELLS ET AL., DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	17
2.2. DOENÇAS OCASIONADAS E MECANISMOS DE PATOGENICIDADE	21
2.3. INSETOS VETORES E EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO.....	23
2.4. RELAÇÃO <i>X. FASTIDIOSA</i> E INSETO VETOR: MECANISMO DE TRANSMISSÃO	25
2.5. DIETA ARTIFICIAL E ESTUDOS DE TRANSMISSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	28
3. EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DE <i>SEQUENCE TYPES</i> DE <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> SUBSP. <i>PAUCA</i> POR CIGARRINHAS VETORAS APÓS A AQUISIÇÃO <i>IN VITRO</i>	39
RESUMO	39
ABSTRACT	39
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.3. RESULTADOS	51
3.4. DISCUSSÃO	55
3.5. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES	65
4. PAPEL DA ADESINA XADA2 NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM SUPERFÍCIE DE POLISSACARÍDEOS DO INSETO VETOR E NA TRANSMISSÃO.....	69
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	69
4.1. INTRODUÇÃO	70
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	73
4.3. RESULTADOS	85

4.4. DISCUSSÃO.....	92
4.5. CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICES.....	102

RESUMO

Eficiência de transmissão de estirpes de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por cigarrinhas e o papel da adesina XadA2 na formação do biofilme no inseto vetor

Xylella fastidiosa é uma bactéria com alta diversidade genética, sendo responsável por várias doenças, com destaque para a clorose variegada dos citros (CVC) e *Pierce's disease* (PD) em videira. O sucesso da transmissão dessa bactéria depende da colonização em biofilme no xilema da planta e no estomodeu de vetores, que são cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). O conhecimento sobre o mecanismo de transmissão desta bactéria vem de estudos com a subespécie *fastidiosa* de videira. Com relação à CVC, que tem a subespécie *pauca* como agente causal, observa-se eficiência de transmissão mais baixa que em videira, indicando que os mecanismos envolvidos no processo de transmissão podem variar entre subespécies da bactéria. Neste sentido, os objetivos desse trabalho foram: i) adaptar e validar um sistema de alimentação em dieta artificial para a aquisição e transmissão de estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* por cigarrinhas; ii) aplicar a técnica estabelecida para investigar a eficiência de transmissão variando-se os *sequence types* (STs) de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e as espécies de cigarrinhas e iii) avaliar a importância da adesina XadA2 para a formação de biofilme por *X. fastidiosa* em superfície de polissacarídeos, bem como na aquisição e transmissão dessa bactéria pelos insetos. Verificou-se que o protocolo de aquisição usado para a entrega de células bacterianas da estirpe Temecula (subsp. *fastidiosa*) é transferível para estirpes da subsp. *pauca*. No entanto, diferentemente de *fastidiosa*, as estirpes de *pauca* testadas não necessitam interagir com o monômero de pectina (ácido galacturônico) para serem transmitidas para plantas. Com o sistema de aquisição *in vitro*, observou-se que todas as combinações STs de *pauca* e espécies de cigarrinhas resultaram na transmissão para plantas, indicando a ausência de especificidade de vetores. Todavia observaram-se diferenças nas taxas de aquisição e transmissão, que podem estar relacionadas com a interação inseto-ST. Em ensaios utilizando *X. fastidiosa* modificada com *green fluorescent protein*, incubada em meio de cultivo sem fonte de carbono e contendo asas como única fonte de carboidratos, verificou-se que a bactéria utiliza a quitina das asas para garantir a sobrevivência da colônia. Por meio de ensaios de bloqueio em asas, utilizando a adesina XadA2 e seu anticorpo específico como moléculas competidoras, foi possível observar que quando a adesina é bloqueada, há a redução significativa da formação de biofilme nas asas. Utilizando-se o sistema *in vitro* para a entrega de células de *X. fastidiosa* e do anticorpo para as cigarrinhas, observou-se diminuição da taxa de insetos infectivos, porém não houve diferença estatística nas taxas de transmissão. Esses resultados mostram que a adesina XadA2 é importante no início da colonização bacteriana no inseto e, juntamente com o método de aquisição *in vitro* adaptado nesse trabalho, estabelecem bases para estudos com outras estirpes ou subespécies de *X. fastidiosa*, e avaliação de outras proteínas-alvo visando o bloqueio da interação bactéria-vetor e, possivelmente, o controle das doenças.

Palavras-chave: Clorose variegada dos citros; Dieta artificial; *Sequence types*; Proteínas de adesão

ABSTRACT

Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* strains by sharpshooters and the role of adhesion XadA2 in biofilm formation in insect vector

Xylella fastidiosa is a bacterium with high genetic diversity, being responsible for several diseases, with emphasis on citrus variegated chlorosis (CVC) and Pierce's disease (PD) on grapevines. The success of the transmission of this bacterium depends on the biofilm colonization in the plant xylem and in the foregut of vectors, the sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). The knowledge about the transmission mechanism of this bacterium comes from studies with the *fastidiosa* subspecies of grapevine. With regard to CVC, which has the subspecies *pauca* as causal agent, transmission efficiency is lower than in vine, indicating that the mechanisms involved in the transmission process may vary between subspecies of the bacterium. In this sense, the objectives of this work were: i) to adapt and validate an artificial diet feeding system for the acquisition and transmission of strains of *X. fastidiosa* subsp. *pauca* by sharpshooters; ii) apply the established technique to investigate the efficiency of transmission by varying the sequence types (STs) of *X. fastidiosa* subsp. *pauca* and sharpshooters and iii) to evaluate the importance of XadA2 adhesin for *X. fastidiosa* biofilm formation on the surface of polysaccharides, as well as on the acquisition and transmission of this bacterium by the insects. The acquisition protocol used for the delivery of Temecula strain bacterial cells (subspecies *fastidiosa*) was transferable to strains of the subspecies *pauca*. However, unlike *fastidiosa*, the tested *pauca* strains do not need to interact with the pectin monomer (galacturonic acid) to be transmitted to plants. With the in vitro acquisition system, it was observed that all STs *pauca* and sharpshooter species combinations resulted in the transmission to plants, indicating the absence of vector specificity. However, there were differences in acquisition and transmission rates, which may be related to the insect-ST interaction. In tests using *X. fastidiosa* modified with green fluorescent protein, incubated in culture medium without carbon source and containing wings as only source of carbohydrates, it was verified that the bacterium uses the chitin of the wings to guarantee the survival of the colony. With wing-blocking assays, using XadA2 adhesin and its specific antibody as competing molecules, it was possible to observe that when adhesin is blocked, there is a significant reduction of biofilm formation in the wings. Using the in vitro system for the delivery of *X. fastidiosa* cells and the antibody to the sharpshooters, a decrease in the rate of infective insects was observed, but there was no statistical difference in the rates of transmission. These results show that XadA2 adhesin is important at the beginning of bacterial colonization in the insect and, together with the in vitro acquisition method adapted in this work, establishes bases for studies with other strains or subspecies of *X. fastidiosa*, and evaluation of other target proteins to block bacterial-vector interaction and, possibly, to control of the diseases.

Keywords: Citrus variegated chlorosis; Artificial diet; Sequence types; Adhesion proteins

1. INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica gram-negativa que coloniza os vasos do xilema de diversas espécies vegetais, comprometendo o desenvolvimento da planta devido ao bloqueio do movimento da água e dos nutrientes (Newman et al, 2003). É o agente causal de uma série de doenças de grande importância econômica em plantas cultivadas, tais como o mal de Pierce em videira (*Pierce's disease* - PD), clorose variegada dos citros (CVC), atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), escaldadura das folhas da ameixeira (EFA) e síndrome do declínio rápido em oliveira (*olive quick decline syndrome* - OQDS) (Hopkins & Purcell, 2002; Saponari et al, 2014).

Devido à alta variabilidade genética e fenotípica dentro dessa espécie de bactéria, além da especificidade das estirpes com seus hospedeiros, *X. fastidiosa* encontra-se atualmente dividida em cinco subespécies: *fastidiosa*, *multiplex*, *pauca*, *sandyi* e *morus* (Schaad et al, 2004; Schuenzel et al, 2005, Nunney et al, 2014). No entanto, mesmo se tratando da mesma subespécie, que compreende agrupamentos de estirpes geneticamente mais próximas, ainda há considerável diversidade genética e biológica, podendo-se agrupar as estirpes em *sequence types* (STs) usando-se a técnica de *Multilocus sequence typing* (MLST) (Nunney et al, 2010; Almeida & Nunney, 2015).

Essa bactéria é transmitida naturalmente entre as plantas hospedeiras por meio de insetos vetores, que são cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae) e superfamília Cercopoidea. A transmissão ocorre durante a alimentação desses insetos, a qual se dá exclusivamente nos vasos xilemáticos (Redak et al, 2004). Os estudos sugerem que não há especificidade na transmissão de *X. fastidiosa* para espécies de cigarrinhas que se alimentam da seiva de xilema, ou seja, qualquer espécie de Cicadellinae ou Cercopoidea é um vetor potencial, mas podem haver diferenças em eficiência de transmissão (Purcell, 1989; Almeida et al, 2005). Para o patossistema da CVC no Brasil, são conhecidas atualmente 13 espécies de Cicadellinae que são vetoras (Lopes & Krugner, 2016), sendo que a eficiência de transmissão entre elas varia de < 1 a 30% (Marucci et al, 2008; Lopes & Krugner, 2016).

O processo de transmissão deste fitopatógeno é constituído basicamente de três etapas: aquisição bacteriana em plantas doentes, retenção da bactéria no inseto vetor e inoculação em plantas sadias (Backus et al, 2015). Na etapa de retenção, sabe-se que *X. fastidiosa* fica restrita ao estomodeu do inseto, especificamente nas regiões do cibário e pré-cibário, formando um biofilme sobre a superfície de polissacarídeos presente no trato digestivo (Killiny & Almeida, 2009a). A colonização bacteriana sob a forma de biofilme é essencial para a sobrevivência da

colônia no estomodeu (Korstgens et al, 2001) e também está relacionada com a eficiência da transmissão pelos vetores (Cornara et al, 2016).

Sabe-se que a adesão de *X. fastidiosa* aos polissacarídeos do sistema digestivo do inseto é mediada por proteínas de adesão presentes na membrana da bactéria, denominadas adesinas (Killiny & Almeida, 2009b). Trabalhos de transmissão com o patossistema da PD, envolvendo estirpes mutantes para genes que codificam várias adesinas, têm demonstrado que além de exercerem um papel fundamental na adesão inicial da bactéria no estomodeu do inseto, algumas adesinas também estão relacionadas com a adesão célula-célula, sendo responsáveis pela manutenção da arquitetura do biofilme (Killiny & Almeida, 2009b; Killiny & Almeida, 2014).

Para isolados da subespécie *pauca* originados de citros, a importância de algumas adesinas para a formação do biofilme, tais como PilA2, PilC, XadA1 e XadA2, tem sido avaliada através de ensaios temporais da expressão das mesmas *in vitro* e em planta. Dessas proteínas, a XadA2 possui destaque por apresentar expressão desde as fases iniciais da formação do biofilme até as mais tardias (De Souza et al, 2005; Caserta et al, 2010), o que indica que essa adesina pode ser importante para as várias etapas da formação do biofilme. No entanto, para essa subespécie não há nenhum estudo que explore o papel das adesinas na formação do biofilme no vetor.

Estudos sobre a transmissão de *X. fastidiosa* são complexos, por se tratar de uma bactéria generalista com alta diversidade genética e fenotípica. As diversas espécies de cigarrinhas vetoras, embora sejam polífas, podem diferir quanto à preferência hospedeira (Hopkins & Purcell, 2002) e isso introduz uma série de variáveis que dificultam a execução de ensaios para estudos do patossistema. Para a CVC, os testes de transmissão são ainda mais difíceis, pois as plantas cítricas que são usadas como fonte de inóculo para a obtenção de insetos infectivos, além de apresentarem uma distribuição irregular da bactéria nos vasos xilemáticos, apresentam um baixo título bacteriano, o que reduz a eficiência de aquisição do patógeno pelo inseto vetor (Hill & Purcell, 1995; Almeida et al, 2001).

O fato dos estudos que procuram entender a relação de *X. fastidiosa* com seus vetores estarem mais alicerçados para o patossistema de PD em videira, deve-se em parte à adoção de um sistema aquisição *in vitro*, o qual tem proporcionado muitos avanços no conhecimento da interação molecular bactéria-vetor. A partir da implementação dessa metodologia, foi possível observar que *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* necessita interagir com a pectina do inseto para ser transmitida eficientemente entre as plantas (Killiny & Almeida, 2009a). Além disso, o uso do sistema de aquisição bacteriana por meio de dieta artificial, tem permitido o estudo de mutantes

para vários genes de interesse, o que é praticamente impossível por meio da aquisição em plantas (Killiny & Almeida, 2014).

Apesar do sistema de aquisição *in vitro* estar sendo utilizado amplamente em pesquisas com o patossistema da PD, a extrapolação dessa metodologia para os demais sistemas regidos por *X. fastidiosa* requer validação. Considerando a necessidade de melhorar o entendimento da transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, principalmente no que diz respeito ao patossistema da CVC, que é a doença de maior impacto econômico ocasionada por essa bactéria no Brasil, faz-se necessário a implementação de um sistema de aquisição mais eficiente para facilitar a execução dos testes de transmissão, que são fundamentais para a melhor compreensão da interação patógeno-vetor. Há também a necessidade de conhecer melhor o processo de retenção de *X. fastidiosa* da subsp. *pauca* no estomodeu de cigarrinhas vetoras. Para isso é essencial estudar o papel de adesinas na formação do biofilme no inseto, com o intuito de descobrir possíveis alvos de bloqueio da adesão bacteriana à superfície quitinosa no inseto, de modo a desestruturar a relação patógeno-vetor necessária para a disseminação de doenças ocasionadas por *X. fastidiosa*.

Neste sentido, os objetivos do presente estudo foram: i) adaptar e validar um sistema de alimentação em dieta artificial para a aquisição e transmissão de estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* por cigarrinhas vetoras; ii) aplicar a técnica estabelecida para investigar a eficiência de transmissão variando-se as estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e as espécies de cigarrinhas vetoras e iii) avaliar a importância da adesina XAdA2 para a formação de biofilme por *X. fastidiosa* em superfície de polissacarídeos, bem como na aquisição e transmissão dessa bactéria por cigarrinhas vetoras.

Referências

- Almeida, R. P. P., and Nunney, L. 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? Plant Disease, 99: 1457-1467.
- Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S., and Purcell, A. H. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. Annals of the Entomological Society of America, 98: 775-786.
- Backus, E. A., Shugart, H. J., Rogers, E. E., Morgan, J. K., and Shatters, R. 2015. Direct evidence of egestion and salivation of *Xylella fastidiosa* suggests shapshooters can be “flying syringes”. Phytopathology, 105: 608-620.

- Caserta, R., Takita, M. A., Targon, M. L., Rosselli-Murai, L. K., de Souza, A. P., Peroni, L., Strach-Machado, D. R., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A., and De souza, A. A. 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during the biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4250-4259.
- Cornara, D., Sicard, A., Zeilinger, A. R., Porcelli, F., Purcell, A. H., and Almeida, R. P. P. 2016. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevine by the meadow spittlebug. *Phytopathology*, 106: 1285-1290.
- Hopkins, D. L., and Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, 86: 1056-1066.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009a. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 22416-22420.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009b. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 521-528.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2014. Factors affecting the initial adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 420-426.
- Korstgens, V., Flemming, H. C., Wingender, J., and Borchard, W. 2001. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *Journal Microbiological Methods*, 46: 9-17.
- Lopes, J. R. S., and Krugner, R. 2016. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. Pages 195-208 in: *Vector-mediated transmission of plant pathogens*. Brown, J.K. ed. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, United States.
- Marucci, R. C., Lopes, J. R. S., and Cavichioli, R. R. 2008. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. *Journal of Economic Entomology*, 101: 1114-112.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., and Lindow, S. E. 2003. Use of a green fluorescent strain for snalysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7319-7327.

- Nunney, L., Schuenzel, E. L., Scally, M., Brcromley, R. E., and Stouthamer, R. 2014. Large-Scarle intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3025-3033.
- Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R., Hartung, J., Montero-Astúa, M., Moreira, L., Ortiz, B., and Stouthamer, R. 2010. Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: novel insight into the origin of Pierce's disease of grapevine in the US. *PLoS One*, 5: issue 11, e15488.
- Purcell, A. H. 1989. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. Pages 243-266 in: *Advances in disease vector research*. Harris, K. F., eds. Springer-Verlag.
- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizell III, R. F., and Andersen, P. C. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology*, 49: 243-270.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G. P., Krugner, R., And Porcelli, F. 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Phyllaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia Italy. *Journal of Economic Entomology*, 107: 1316-1319.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., and Chang, C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. Fastidiosa* subsp. *multiplex*, subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 290-300.
- Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R., and Nunney, L. 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3832-3839.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características de *Xylella fastidiosa* Wells et al., diversidade genética e distribuição geográfica

A bactéria *Xylella fastidiosa* (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) é um fitopatógeno gram-negativo aeróbio de formato baciliforme, não apresenta flagelos, possui a parede celular ondulada e dimensões estimadas em 0,25 a 0,5 µm de diâmetro e 0,9 a 4 µm de comprimento. Sua principal característica é um crescimento lento em meio de cultura, com temperaturas adequadas entre 26° C a 28° C e pH ótimo de 6,5 a 6,9 (Wells et al, 1987). Os meios de cultura para o cultivo desta bactéria necessitam ser complexos, pois ela exige vários aminoácidos além de macro e micronutrientes para o seu crescimento (Hopkins, 1989). As colônias crescidas nos meios apresentam-se de forma discreta, não pigmentadas e circulares medindo 0,6 mm de diâmetro com 10 dias e 1,5 mm depois de 30 dias de crescimento. O crescimento vagaroso em meio artificial aliado às altas exigências nutricionais faz essa bactéria ser considerada um micro-organismo fastidioso (Wells et al, 1987).

Xylella fastidiosa é a única espécie válida pertencente ao gênero *Xylella*, o qual é monofilético e tem *Xanthomonas* ssp. como clado irmã (Retchless et al, 2014). Estudos envolvendo a diversidade genética e fenotípica desta espécie são confusos e inconclusivos, devido a utilização de isolados de uma pequena variedade de plantas e distribuição geográfica restrita, aliado a aplicação de diferentes métodos para a tipagem desses isolados (Almeida & Nunney, 2015). Análises filogenéticas moleculares como hibridização DNA-DNA, tipagem de sequência multilocus (MLST) e sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal, têm mostrado que apesar de tratar de uma mesma espécie bacteriana, *X. fastidiosa* apresenta uma grande diversidade genética, e por esse motivo, encontra-se atualmente dividida em cinco subespécies: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ou *piercei* (compreende linhagens de videira e alfafa); *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (linhagens de pessegueiro, ameixeira e amendoeira); *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (inclui isolados de café, citros e oliveira), *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (linhagens de espirradeira, magnólia e jacarandá) e *X. fastidiosa* subsp. *morus* (isolados de amoreira) (Schaad et al, 2004; Schuenzel et al, 2005; Hernandez-Martinez et al, 2007, Elbeaino et al, 2014; Almeida & Nunney, 2015) (Figura 1). Um estudo realizado por Randall et al (2009) propõe a divisão de uma quinta subespécie, denominada por eles de *tashke*, porém para que essa nova subespécie seja devidamente inserida ao grupo, mais estudos com outras técnicas

moleculares, e análises envolvendo um maior número de *loci* devem ser realizados (Nunney et al, 2012).

As cinco subespécies de *X. fastidiosa* possuem diferenças quanto a sua origem e distribuição geográfica. As subespécies *fastidiosa*, *multiplex*, *morus* e *sandyi* foram primeiramente encontradas na América do Norte (Sally et al, 2005; Nunney et al, 2013), já a subsp. *pauca* é originária da América do Sul. As subsp. *sandyi* e *morus* estão restritas as regiões de origem, por outro lado, *fastidiosa* é encontrada também na América Central, a subsp. *multiplex* tem sido relatada colonizando ameixeiras na América do Sul e *pauca* que até recentemente estava restrita a América do Sul, desde 2013 tem sido associada à síndrome do declínio rápido em oliveiras em alguns países da Europa (Nunney et al, 2014, Saponari et al, 2013, Retchless et al, 2014; Almeida & Nunney, 2015). A principal forma de dispersão da bactéria para novos países e continentes tem sido atribuída às atividades antropogênicas via material contaminado, que tem mostrado exercer papel fundamental na geração de novas associações entre bactéria e espécie de planta hospedeira, ocasionando novas epidemias (Sicard et al, 2018). Alguns trabalhos têm relatado uma bactéria no Taiwan restrita ao xilema de pereiras, ocasionando queima nas folhas das plantas. Características do genoma sugeriram que fosse uma nova subespécie de *X. fastidiosa* (Su et al, 2014), no entanto, devido a grande distância filogenética com as demais subespécies, essa bactéria deve ser classificada como sendo uma nova espécie (Almeida & Nunney, 2015) (Figura 1), o nome *Xylella taiwanensis* (Su et al, 2016) tem sido proposto, contudo, ainda não foi validado.

Desde a implementação da técnica de MLST em 2005, a qual utiliza sete genes *house-keeping* ou *loci* bem conservados do genoma da bactéria para as análises, houve um aumento da compreensão das relações filogenéticas entre os isolados de *X. fastidiosa* e de como os dados são organizados em relação à planta hospedeira e região geográfica (Sicard et al, 2018). Até o momento, foram registrados 293 isolados de 76 espécies vegetais pertencentes a 3 continentes (<https://pubmlst.org/xfastidiosa/>). Esses isolados foram classificados dentro de 55 STs associados a 25 famílias de plantas (<https://microreact.org/project/Hkwv1v7tZ>).

Mesmo dentro de uma mesma subespécie, que compreende estirpes geneticamente mais próximas, a diversidade de nucleotídeos é alta, fazendo com que as mesmas sejam reagrupadas em STs através da técnica de MLST (Coletta-Filho et al, 2017). A subespécie *pauca* da América do Sul é a que possui maior diversidade em relação as demais já estudadas (*fastidiosa* e *multiplex*), mas, o número de plantas hospedeiras sintomáticas associadas com essa subespécie é inferior (Nunney et al, 2013). Ainda para *pauca* existe uma clara distinção genética entre os grupos de estirpes provenientes de citros e de café (Almeida et al, 2008). Além disso, esses

genótipos apresentam diferenças na especificidade com o hospedeiro. Testes de inoculação mecânica cruzada mostraram que estirpes de café não colonizam plantas cítricas, por outro lado, estirpes de citros quando são inoculadas em uma concentração bacteriana bastante elevada conseguem estabelecer a infecção em plantas de café (Almeida et al, 2008; Prado et al, 2008). Esses resultados sugerem que as estirpes de citros e café são biologicamente e geneticamente distintas (Nunney et al, 2013). A diferença na biologia das estirpes deve-se aos altos índices de recombinação homóloga, evento de troca de material genético entre sequências de DNA semelhantes que afeta de forma geral a comparação da diversidade genética desses grupos em curtos espaços de tempo (Coletta-Filho et al, 2017).

Figura 1. Árvore filogenética baseada nas distâncias genéticas de todos os *sequence types* disponíveis de *Xylella fastidiosa* identificados por *Multilocus sequence typing* (MLST) até o ano de 2015. As cinco subespécies atualmente aceitas estão representadas por linhas na árvore de diferentes cores, já o genótipo taiwanês está representado pela linha tracejada cinza na parte inferior da árvore como um ramo distante dos outros táxons. Fonte: adaptado de Almeida & Nunney (2015).

2.2 Doenças ocasionadas e mecanismos de patogenicidade

A espécie *X. fastidiosa* apresenta uma ampla gama de hospedeiros vegetais, descrita em 359 espécies de plantas (incluindo hídridos) pertencentes a 204 gêneros e 75 diferentes famílias botânicas, abrangendo mono e dicotiledôneas (EFSA, 2016). O sítio de colonização da bactéria nas plantas são os vasos xilemáticos, os quais são colonizados de forma irregular (Daugherty et al, 2010). Apesar das centenas de plantas hospedeiras, a maioria delas permanecem assintomáticas em relação a colonização por *X. fastidiosa*, não desenvolvendo doenças, devido as diferenças significativas de suscetibilidade entre os hospedeiros (EPPO, 2016).

Todavia, a importância da *X. fastidiosa* se deve às várias doenças ocasionadas em culturas de interesse econômico, tais como: o mal de Pierce (*Pierce's disease* - PD) em videira, a clorose variegada dos citros (CVC), a atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), a escaldadura das folhas da ameixeira (EFA), a queima das folhas da amendoeira (*almond leaf scorch* - ALS), carvalho (*oak leaf scorch* - OLS) e pera (*pear leaf scorch* - PLS), a murcha em vinca (*periwinkle wilt* - PW) o nanismo em alfafa (*alfalfa dwarf* - AD) e a síndrome do declínio rápido em oliveiras (*olive quick decline syndrome* - OQDS) (Davis et al, 1978; Davis et al, 1980; Wells et al, 1983; Chang et al, 1993; Hopkins & Purcell, 2002; Lima et al, 1998; Saponari et al, 2014).

No Brasil, a doença de maior impacto econômico para a agricultura ocasionada por *X. fastidiosa* é a CVC, também conhecida como amarelinho. Essa doença foi relatada pela primeira vez no país em 1987 em pomares do município de Colina (São Paulo), e logo se espalhou para praticamente todas as áreas citrícolas do país, afetando quase todas as variedades comerciais de laranja doce, independentemente do porta enxerto utilizado (Laranjeira et al, 2005; Rossetti & De Negri, 2011). A CVC foi a maior ameaça da citricultura da década de 90, sendo seu ápice de incidência atingido em 2004 com 43,8% das laranjeiras acometidas. A falta de conhecimento sobre a doença levou a erradicação de mais de 100 milhões de árvores desde o seu primeiro relato e a perdas de produção de mais 20% entre os anos de 2000 a 2005, momento de pico da CVC, sendo responsável por mais de R\$ 1 bilhão de prejuízos para toda a cadeia citrícola. Felizmente, com diversas pesquisas direcionadas ao patossistema e a adoção de medidas eficientes de manejo da doença, tais como: a adoção de mudas saudáveis, o controle de insetos vetores e a eliminação de plantas sintomáticas, a incidência da CVC caiu drasticamente nos últimos anos. Em um levantamento realizado em 2016 a doença estava presente em 3,02% dos pomares do cinturão citrícola e em 2018 sua incidência caiu ainda mais chegando em 1,30 % (Fundecitrus, 2018).

As plantas cítricas com CVC apresentam suas folhas com manchas amareladas que posteriormente evoluem para áreas cloróticas na parte superior e lesões de coloração castanho claro na parte inferior (Teixeira et al, 2004). As plantas severamente atacadas apresentam um declínio geral, com murchas nos horários mais quentes do dia mesmo em condição de umidade (Machado et al, 2007). Estudos têm demonstrado que há uma correlação positiva entre a severidade dos sintomas e a população do patógeno dentro da planta (Krivanek & Walker, 2005). Por fim os frutos ficam endurecidos e com tamanho drasticamente reduzido, além de uma forte alteração na acidez, o que torna inviável seu consumo *in natura* ou para processamento pela indústria de suco (Machado et al, 1994; Laranjeira & Pompeu Junior, 2002).

O alto impacto econômico da bactéria *X. fastidiosa* em plantas cítricas foi o motivo pelo qual ela foi o primeiro fitopatógeno a ter o genoma completamente sequenciado em 2000. Isso possibilitou acesso a informações relacionadas aos seus mecanismos de patogenicidade. Desta forma, observou-se que esta espécie bacteriana não possui genes de avirulência (avr) e também não apresenta sistema de secreção tipo III, características comuns em bactérias fitopatogênicas. Entretanto, foi comprovado outros mecanismos de patogenicidade, dentre eles a síntese de hemolisinas, proteínas responsáveis pela inativação e detoxificação de drogas, além de toxinas pertencentes a família RTX (*repeats-in-toxin*), as quais são importantes fatores de virulência em bactérias gram-negativas. A presença de genes codificadores de proteínas de adesão também foi constatado com abundância no genoma (Simpson et al, 2000).

Outro fator importante na patogenicidade de *X. fastidiosa* é a capacidade de deslocamento ao longo do vaso do xilema contra o fluxo de seiva, pelo movimento do tipo contração *twitching motility*, o qual é proporcionado por proteínas (pili tipo IV), e o movimento entre os vasos do xilema ocasionado por enzimas capazes de degradar as membranas pit, que são pontuações que separam os vasos adjacentes (Chatterjee et al, 2008).

Contudo, segundo De Souza et al (2005), o principal mecanismo de patogenicidade de *X. fastidiosa* está relacionado à formação do biofilme, que é uma matriz fechada de populações microbianas que se aderem umas às outras e às superfícies ou interfaces, possuindo um ciclo de desenvolvimento coordenado. A formação do biofilme no xilema provoca a oclusão dos vasos comprometendo o desenvolvimento das plantas, devido ao bloqueio do transporte de água e nutrientes realizado por esse vaso condutor. O biofilme é formado tanto no xilema da planta quanto no inseto vetor (Newman et al, 2003) sendo fundamental para a sobrevivência da colônia em ambientes sujeitos a forte pressão, como é o caso do lúmen do canal alimentar do inseto e

os vasos xilemáticos das plantas hospedeiras, além de proporcionar proteção contra antibióticos e compostos de defesa da própria planta (Korstgens et al, 2001).

A formação de biofilme em ambos hospedeiros (vetor e plantas) é mediada por um sistema de comunicação intercelular denominado *quorum sensing* (QS), que consiste em um importante mecanismo de patogenicidade em bactérias, pois permite que população bacteriana controle a expressão de genes de virulência de acordo com a sua densidade populacional (Ham, 2013). Esse sistema de QS é mediado por moléculas de ácido graxo (*diffusible signaling factor* -DSF), as quais a sua síntese e regulação depende de genes do cluster *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*) (Chatterjee et al, 2008).

Quando a bactéria é inoculada em uma planta hospedeira pelo vetor, ela reduz a produção de DSF, adquirindo um estado antiaderente proporcionado por vesículas de membrana externa, que são pequenas bolhas de lipídeos que conferem um efeito teflon às células (Ionescu et al, 2014). Proteínas relacionadas a mobilidade como a pili tipo IV, também são produzidas nessa fase (Chatterjee et al, 2008). Tanto as vesículas como essas proteínas permitem que a bactéria se movimente com facilidade dentro do xilema infectando a planta. Ao colonizar a planta suficientemente, *X. fastidiosa* interrompe a produção das vesículas e proteínas de mobilidade, facilitando a junção com outras células bacterianas. Com o aumento da densidade celular, há o acúmulo de DSF que sinaliza para a expressão de genes relacionados a proteínas de adesão e produção de exopolissacarídeos (EPS) para iniciar a formação do biofilme (Lindow et al, 2014). A expressão de genes que contribui para a colonização do xilema é suprimida, enquanto aqueles necessários para a aquisição pelo vetor são expressos com o aumento da concentração de DSF (Caserta et al, 2017). Além disso, as células encontradas em maior número nos vasos xilemáticos são mais prontamente adquiridas pelos vetores (Baccari et al, 2014).

2.3. Insetos vetores e eficiência de transmissão

Devido a sua localização restrita ao xilema, *X. fastidiosa* não tem um mecanismo próprio para ser disseminada de uma planta para outra, por isso depende de insetos vetores. A transmissão também pode ser feita artificialmente através de mudas e borbulhas contaminadas e inoculação mecânica por meio de agulhas (He et al, 2000).

Os insetos vetores de *X. fastidiosa* estão restritos a grupos taxonômicos que se alimentam exclusivamente nos vasos do xilema das plantas. A alimentação nesse vaso condutor só é possível porque esses insetos apresentam a região do cibário, que é a parte anterior do

estomodeu modificada em uma câmara de sucção bem desenvolvida, que possibilita a ingestão de líquidos sob forte pressão negativa (Lopes, 1996). Os vetores compreendem cigarrinhas pertencentes a dois grupos: sendo o primeiro Membracoidea (Cicadellidae: Cicadellinae) e o segundo Cercopoidea, com cinco espécies de Aphrophoridae e duas espécies de Clastopteridae (Almeida et al, 2005). Há também relatos de Cicadidae como transmissora de *X. fastidiosa* para cafeeiro (Paião et al, 1996; Krell et al, 2007;), no entanto, mais experimentos devem ser feitos para confirmar a transmissão por esses insetos.

Teoricamente, todos os insetos que se alimentam da seiva do xilema das plantas são vetores potenciais, pois sabe-se que a transmissão deste fitopatógeno tem pouca ou nenhuma especificidade dentro do grupo de insetos que se alimentam desse vaso condutor (Purcell, 1989; Almeida et al, 2005). Em estudo realizado por Esteves et al (2019) utilizando um sistema de dieta artificial para a aquisição de STs por quatro espécies de cigarrinhas da subfamília Cicadellidae, foi demonstrado que não houve especificidade na transmissão dos diferentes genótipos pelas espécies vetoras, sendo encontradas apenas diferenças quanto a eficiência de aquisição e transmissão de acordo com a combinação ST- espécie de cigarrinha.

A grande maioria das espécies de cigarrinhas são geralmente políagas, entretanto, a oviposição e desenvolvimento das ninfas ocorre em hospedeiros restritos. Os adultos são bastante móveis e se alimentam de uma grande variedade de plantas, o que dá a oportunidade para a *X. fastidiosa* ser inoculada em diversas espécies vegetais (Almeida et al, 2005).

Para a cultura de citros foi comprovado através de experimentos clássicos de transmissão que apenas a família Cicadellidae possui representantes que são vetores da CVC, sendo atualmente conhecidas 13 espécies: *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, 2002, *Acrogonia virescens* (Metcalf, 1949), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg, 1879), *Dilobopterus costalimai* Young, 1977, *Ferrariana trivittata* (Signoret, 1851), *Fingeriana dubia* Cavichioli, 2003, *Homalodisca ignorata* Melichar, 1924, *Macugonalia leucomelas* (Walker, 1851), *Oncometopia facialis* (Signoret, 1854), *Oragua discuidula* (Osborn, 1926), *Parathona gratiosa* (Blanchard, 1840), *Plesiommatia corniculata* Young, 1977 e *Sonesimia grossa* (Signoret, 1854) (Redak et al, 2004; Yamamoto et al, 2007; Lopes & Krugner, 2016). Dessas *B. xanthophis* e *M. leucomelas* destacam-se por apresentarem maiores eficiências de transmissão, sendo 11,9% e 15,9 respectivamente (Lopes & Krugner, 2016).

A eficiência de transmissão envolve a capacidade de aquisição do vetor, retenção e inoculação da bactéria. Entretanto, diversos fatores podem influenciar a transmissão, os quais estão inteiramente relacionados com as interações entre os elementos constituintes do patossistema: planta-patógeno-vetor, o que resulta em diferentes valores de eficiência de

transmissão (Daugherty et al, 2010). Para o patossistema da doença de Pierce em videiras, a média da eficiência de transmissão pelos vetores fica em torno de 90% (Hill & Purcell, 1995), entanto para os vetores conhecidos como transmissores da *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, que causa a CVC em citros, a taxa de transmissão varia de <1% a 30% (Marucci et al, 2008; Lopes & krugner, 2016).

Estudos realizados por Hill e Purcell (1997) mostraram que a eficiência de transmissão é influenciada positivamente pelo título bacteriano presente na planta-fonte. Insetos que ficaram confinados em plantas-fonte com títulos bacterianos mais elevados resultaram em maiores taxas de transmissão, como observado em videira (Almeida & Purcell, 2003). Este fato fica claro quando observamos a transmissão de *X. fastidiosa* entre plantas cítricas, como também entre amendoeiras. Geralmente essas plantas hospedeiras apresentam baixos títulos bacterianos, o que resulta em baixa eficiência de transmissão pelos insetos vetores (Almeida et al, 2001; Almeida & Purcell, 2003). Sabe-se que *X. fastidiosa* se distribui de forma irregular nos vasos xilemáticos das plantas, desta forma o comportamento alimentar das cigarrinhas vetoras também está intimamente ligado com a eficiência de transmissão. Se o local preferencial de alimentação do inseto coincidir com regiões de alta infecção bacteriana, as taxas de transmissão serão bem maiores. Estudos de transmissão envolvendo ensaios de livre escolha realizados por Daugherty et al (2010) mostraram que a cigarrinha *Draeculacephala minerva* Ball, que tem preferência em se alimentar da parte basal de plantas de alfafa, local onde há maior concentração bacteriana, são mais eficientes na transmissão do que a espécie *Graphocephala atropunctata* Signoret, que tem preferência em se alimentar da parte apical das plantas.

2.4. Relação *X. fastidiosa* e inseto vetor: mecanismo de transmissão

Grande parte do conhecimento atual sobre o mecanismo de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas vem de estudos com o patossistema associado ao mal de Pierce em videira. Acredita-se que o mecanismo de transmissão para as outras subespécies seja semelhante (Lopes, 1999). Dessa forma, sabe-se que a transmissão ocorre de modo propagativo não circulativo durante a alimentação desses insetos (Purcell, 1989; Backus & Morgan, 2011). Como esse fitopatógeno não é circulativo, ou seja, fica restrito a uma parte do corpo do inseto, não há um período de latência entre sua aquisição e inoculação (Lopes, 1996).

A transmissão de *X. fastidiosa*, assim como outros fitopatógenos que são transmitidos de maneira não circulativa envolve basicamente três etapas: i) aquisição, ii) retenção e iii) inoculação. O sucesso dessas três fases é responsável por determinar a eficiência de transmissão

(Backus et al, 2015). A aquisição ocorre durante a alimentação em uma planta infectada, onde o inseto vetor adquire a bactéria juntamente com a seiva do xilema. A bactéria se desprende da parede dos vasos devido a força de sucção exercida pelo inseto. O fluxo da seiva do xilema é estimado passar através do pré-cibário e cibário a uma velocidade média de 8 cm/s (Purcell & Finlay 1979). O processo de aquisição é relativamente rápido, entretanto, sabe-se que períodos mais longos de aquisição resultam em uma transmissão mais eficiente (Hopkins, 1989; Lopes, 1996).

Após a ingestão e aquisição da bactéria ocorre a fase de retenção, em que as bactérias se aderem às paredes internas do canal alimentar anterior (estomodeu) do inseto, principalmente nas regiões do cibário e pré-cibário, formando o biofilme sobre a superfície cuticular. A adesão ao trato digestivo é mediada por proteínas de membrana da bactéria, as quais se ligam aos polissacarídeos presentes nessa região. Inicialmente as células aderem-se lateralmente a cutícula do estomodeu, todavia com o aumento do tamanho da colônia, as células que estão no centro do biofilme se tornam polarmente ligadas aos polissacarídeos de modo a aumentar a área superfície para a absorção de nutrientes (Killiny & Almeida, 2009a) (Figura 2). Estudos têm demonstrado que a bactéria consegue interagir com polissacarídeos de superfície, principalmente, a quitina de modo a utilizá-los como fonte de carbono para obtenção de nutrientes para a colônia (Killiny et al, 2010).

Figura 2. Modelo hipotético da colonização de *Xylella fastidiosa* no estomodeu de cigarrinhas vetoras. A) as células bacterianas inicialmente se ligam lateralmente à superfície dos polissacarídeos do inseto, mediadas por proteínas de adesão presentes na membrana, B) há a produção de exopolissacarídeos e microcolônias são estabelecidas, C) as células do centro do biofilme tornam-se polarmente ligadas a cutícula para aumentar a área de contato e D) biofilme maduro com algumas células se desprendendo para colonizar uma nova região.

Fonte: Adaptado de Killiny e Almeida (2009a).

Por último ocorre a etapa de inoculação. As células bacterianas que estão anexadas no estomodeu do vetor se desprendem do biofilme e são inoculadas durante a alimentação do inseto (Purcell & Finlay, 1979; Lopes, 1996). A inoculação em si, ocorre por um processo denominado de salivação-egestão, no qual há o efluxo do fluido com as bactérias do cibário e pré-cibário em

direção aos estiletes, onde é misturado com a saliva aquosa do inseto e secretado durante a próxima alimentação (Backus et al, 2011; Backus et al, 2015). Não é imprescindível que a bactéria inicie sua propagação no estomodeu para que haja a inoculação, sendo necessárias poucas células bacterianas para que a transmissão ocorra (Hill & Purcell, 1995). No entanto, quanto maior for o título bacteriano presente na cigarrinha maior será a sua eficiência de transmissão (Almeida et al, 2005; Cornara et al, 2016).

As cigarrinhas que adquirem a bactéria na fase ninfal perdem a infectividade com a ecdise, pois o estomodeu, onde a bactéria encontra-se aderida, é de origem ectodérmica, sendo, portanto, trocado para dar origem a um novo forro cuticular a cada mudança de ínstar. Por outro lado, cigarrinhas que adquirem o patógeno na fase adulta podem transmiti-lo durante toda a vida, sendo que quanto mais tempo se passa após aquisição, maiores serão as populações bacterianas dentro do vetor, graças a multiplicação do patógeno (Hill & Purcell, 1995). Embora haja propagação do patógeno no corpo do vetor, não há evidências de transmissão transovariana de *X. fastidiosa* para a progênie (Freitag, 1951).

2.5. Dieta artificial e estudos de transmissão

O uso de dieta líquida para insetos sugadores usando a técnica de “sachês” foi primeiramente descrito por Mittler e Dadd (1962), na tentativa de criação de afídeos. Esse sistema é composto por uma gaiola cilíndrica de acrílico, onde em uma das extremidades são esticadas duas membranas de parafilme (Parafilm®), sendo que entre elas é colocada uma quantidade apropriada da dieta, o que varia de acordo com o tamanho da gaiola. A composição da dieta é semelhante a seiva de alimentação do inseto utilizado (Balbinotte, 2012).

Esse sistema de dieta artificial, tem sido empregado em estudos de transmissão de vários patossistemas agrícolas, dentre eles: na entrega de *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) para o afídeo da espécie *Rhopalosiphum padi* (L.) (Ingwell et al, 2012), para o Closteroviridae *Lettuce infections yellows virus* (LIYV) (Chen et al, 2011) e o Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Czosnek et al, 2017) ambos transmitidos por moscas-branca e também em trabalhos envolvendo o fitoplasma *Flavescence dorée* e cigarrinhas (Bressan et al, 2006).

No que diz respeito aos estudos de transmissão com *X. fastidiosa*, o sistema de aquisição *in vitro* tem sido utilizado amplamente para a subsp. *fastidiosa* de videiras e cigarrinhas vetoras. Killiny e Almeida (2009a) estabeleceram essa técnica para a aquisição bacteriana da estirpe *temecula*, e através dessa metodologia descobriram que a degradação do ácido galacturônico (AG), principal unidade da pectina ou a quebra da pectina pela enzima poligalacturonase, é um

sinal molecular fundamental para o sucesso da transmissão de *X. fastidiosa* para videiras. Rashed et al (2011) utilizaram o sistema de aquisição em sachês, para observar variações na quantidade de células bacterianas adquiridas e transmitidas por espécies de cigarrinhas vetoras, sem a influência da relação do patógeno com a planta hospedeira. O estudo de mutantes para genes envolvidos no processo de adesão bacteriana, retenção no inseto, assim como na produção de EPS, só foi possível a partir da adoção do sistema de dieta artificial para a entrega dos mutantes aos insetos, pois o método tradicional de aquisição bacteriana a partir de plantas-fonte, não permitia a posterior transmissão para plantas saudáveis (Killiny et al, 2013; Killiny & Almeida 2014). O sistema de aquisição *in vitro* também foi utilizado por Killiny e Almeida (2012) para a submissão dos insetos a moléculas como: proteínas, carboidratos e anticorpos, visando atrapalhar a formação do biofilme no vetor e consequentemente reduzir e/ou bloquear a transmissão bacteriana.

Apesar da técnica de aquisição *in vitro* estar sendo empregada com sucesso dentro do patossistema da PD, sua aplicação para as demais subespécies de *X. fastidiosa* precisa ser testada. Esteves et al (2019) adaptaram e implementaram o sistema de aquisição em sachês estabelecido para a subsp. *fastidiosa* da PD para o patossistema da CVC, e por meio dele foi demonstrado que estirpes de *pauca* não utilizam o AG como pista na transmissão da bactéria para plantas da espécie *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). A diferença de resultados entre esses patossistemas, mostra que nem todo o conhecimento adquirido para o processo de transmissão de uma subespécie de *X. fastidiosa* é transferível para as demais, o que enfatiza que cada patossistema deve ser estudado particularmente.

Referências

- Almeida, R. P. P., and Nunney, L. 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? Plant Disease, 99: 1457-1467.
- Almeida, R. P. P., and Purcell, A. H. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). Journal Economic Entomology, 2: 264-271.
- Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S., and Purcell, A. H. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. Annals of the Entomological Society of America, 98: 775-786.

- Almeida, R. P. P., Nascimento, F. E., Chau, J., Prado, S. S., Tsai, C. W., Lopes, S. A., and Lopes, J. R. S. 2008. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3690-3701.
- Almeida, R. P. P., Pereira, E. F., Purcell, A. H., and Lopes, J. R. S. 2001. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Disease*, 85: 382-382.
- Baccari, C., Killiny, N., Ionescu, M., Almeida, R. P. P., and Lindow, S. E. 2014. Diffusible signal factor-repressed extracellular traits enable attachment of *Xylella fastidiosa* to insect vectors and transmission. *Phytopathology*, 1: 27-33.
- Backus, E. A., and Morgan, D. J. W. 2011. Spatiotemporal colonization of *Xylella fastidiosa* in its vector supports the role of egestion in the inoculation mechanism of foregut-borne plant pathogens. *Phytopathology*, 101: 912-922.
- Backus, E. A., Shugart, H. J., Rogers, E. E., Morgan, J. K., and Shatters, R. 2015. Direct evidence of egestion and salivation of *Xylella fastidiosa* suggests shapshooters can be “flying syringes”. *Phytopathology*, 105: 608-620.
- Balbinotte, J. 2012. Desenvolvimento de sistema de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de patogenicidade. 2011, 92p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bressan, A., Clair, D., Sémétey, O., and Boudon-Padieu, E. 2006. Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of Flavescence Dorée Phytoplasma. *Phytopathology*, 96: 790-796.
- Caserta, R., Souza-Neto, R. R., Takita, M. A., Lindow, S. E., and De Souza, A. A. 2017. Ectopic expression of *Xylella fastidiosa* *rpfF* conferring production of diffusible signal factor in transgenic tobacco and citrus alters pathogen behavior and reduces disease severity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30: 866-875.
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V., and Bové, J. M. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, 27: 137-142.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P., and Lindow, S. 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 243-271.

- Chen, A. Y. S., Walker, G. P., Carter, D., and Ng, J. C. K. 2011. A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *Proceedings of the national academy of sciences*, early edition, 1-6.
- Coletta-Filho, H. D., Francisco, C. F., Lopes, J. R. S., Muller, C., and Almeida, R. P. P. 2017. Homologous recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen association in South America. *Phytopathology*, 107: 305-312.
- Cornara, D., Sicard, A., Zeilinger, A. R., Porcelli, F., Purcell, A. H., and Almeida, R. P. P. 2016. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevine by the meadow spittlebug. *Phytopathology*, 106: 1285-1290.
- Czosnek, H., Hariton-Shalev, A., Sobol, I., Gorovitis, R., and Ghanim, M. 2017. The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*, 9: 273.
- Daugherty, M. P., Lopes, J. R. S., and Almeida, R. P. P. 2010. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. *Ecological Entomology*, 35: 360-366.
- Davis, M. J., Purcell, A. H., and Thomson, S. V. 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science*, 199: 75-77.
- Davis, M. J., Thomson, S. V., and Purcell, A. H. 1980. Etiological role of the xylem-limited bacterium causing Pierce's disease in almond leaf scorch. *Phytopathology*, 70: 472-475.
- De Souza, A. A., Takita, M. A., Pereira, E. O., Coletta-Filho, H. D., and Machado, M. A. 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. *Microbiol*, 50: 223-228.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2016. Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 november 2015. *Scientific Report EFSA Journal*, 14: 4378.
- Elbeaino, T., Yassen, T., Valentini, F., Ben Moussa, I. E., Mazzoni, V., and Onchia, A. M. 2014. Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 53: 328-332.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2016. *Diagnostics Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2: 1-38.
- Esteves, M. B., Kleina, H. T., Sales, T. M., Oliveira, T. P., De Lara, I. A. R., Almeida, R. P. P., Coletta-Filho, H. D., and Lopes, J. R. S. 2019. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* subsp. pauca sequence types by sharpshooter vectors after *in vitro* acquisition. *Phytopathology*. DOI: 10.1094/Phyto-07-18-0254-FI.
- Freitag, J. H. 1951. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology*, 41: 920-934.

- FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). 2018. Levantamento da incidência das doenças dos citros, greening, CVC e cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro. Disponível em: www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/LevantamentoDeDoencas2018-greening-cvc-cancroCitrico.pdf
- Ham, J. J. 2013. Intercellular and intracellular signaling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, 13: 308-322.
- He, C. X., Li, W. B., Ayres, A. J., Hartung, J. S., Miranda, V. S., and Teixeira, D. C. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease*, 84: 622-626.
- Hernandez-Martinez, R., De La Cerda, K. A., Costa, H. S., Cooksey, D. A., and Wong, F. P. 2007. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains isolated from landscape ornamentals in Southern California. *Phytopathology*, 97: 857-864.
- Hill, B. L., and Purcell, A. H. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology*, 85: 1368-1372.
- Hill, B. L., and Purcell, A. H. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology*, 87: 1997-1201.
- Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 271-290.
- Hopkins, D. L., and Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, 86: 1056-1066.
- Ingwell, L. L., Sanford, D., Eigenbrode, S. D., and Bosque-Pérez, N. A. 2012. Plant viroses alter insect behavior to enhance their spread. *Nature Scientific Reports*, 2: 578.
- Ionescu, M., Zaini, P. A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A. M., and Lindow, S. E. 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 1-9.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009a. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 22416-22420.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009b. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 521-528.

- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2014. Factors affecting the initial adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 420-426.
- Killiny, N., HernandezMartinez, R., Dumenyo, C. K., Cooksey, D. A., and Almeida, R. P. P. 2013. The exopolysaccharide of *Xylella fastidiosa* is essential for biofilm formation, plant virulence, and vector transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 1044-1053.
- Killiny, N., Prado, S. P., and Almeida, R. P. P. 2010. Chitin utilization by the insect-transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6134-6140.
- Killiny, N., Rashed, A., Almeida, R. P. P. 2012. Disrupting the transmission of a vector-borne plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 638–643.
- Korstgens, V., Flemming, H. C., Wingender, J., and Borchard, W. 2001. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *Journal Microbiological Methods*, 46: 9-17.
- Krell, R. K., Boyd, E. A., Nay, J. E., Park, Y. L., and Perring, T. M. 2007. Mechanical and insect transmission of *Xylella fastidiosa* to *Vitis vinifera*. *American Journal Enology Viticulture*, 58: 211–216.
- Krivanek, A. F., and Walker, M. A. 2005. *Vitis* resistance to Pierce's disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. *Phytopathology*, 95: 44-52.
- Laranjeira, F. F., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Aguilar-Vildoso, C. I., and Coletta-Filho, H. D. Fungos, procariotos e doenças abiótica. In: Mattos Júnior, D., De Negri, J. D., Pio, R. M., Pompeu Júnior, J. (Ed). Citros. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; FUNDAG, 2005. p. 509-566.
- Laranjeira, F. F., and Pompeu Junior, J. 2002. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. *Laranja*, 23: 401-411.
- Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Coutinho, A., Roberto, R. S., and Carlos, E. F. 1998. Coffee leaf schorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Disease*, 88: 94-97.
- Lindow, S., Newman, K., Chatterjee, S., Baccari, C., Lavarone, A. T., and Ionescu, M. 2014. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease. *Mol. Plant Microbe Interact*, 27: 244–54.
- Lopes, J. R. S. 1996. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. *Laranja*, 17: 79-92.

- Lopes, J. R. S. 1999. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. *Laranja*, 20: 329-344.
- Lopes, J. R. S., and Krugner, R. 2016. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. Pages 195-208 in: *Vector-mediated transmission of plant pathogens*. Brown, J.K. ed. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, United States.
- Machado, E. C., Oliveira, R. F., Ribeiro, R. V., Medina, C. L., Stuchi, E. S., and Pavani, L. C. 2007. Deficiência hídrica agrava sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira 'natal'. *Bragantia*, 66: 373-379.
- Machado, E. C., Quaggio, J. A., Lagôa, A. M. M. A., Ticelli, M., and Furlani, P. R. 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6: 53-57.
- Marucci, R. C., Lopes, J. R. S., and Cavichioli, R. R. 2008. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. *Journal of Economic Entomology*, 101: 1114-112.
- Mittler, T. E., and Dadd, R. H. 1962. Artificial feeding and rearing of the aphid, *Mizus persicae* (Sulzer), on a completely defined synthetic diet. *Nature*, 195: 404-410.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., and Lindow, S. E. 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7319-7327.
- Nunney, L., Elfekin, S., and Stouthamer, R. 2012. The importance of Multilocus sequence typing: Cautionary tales from The bacterium *Xylella fastidiosa*. *Phytopatology*, 102: 456-460.
- Nunney, L., Schuenzel, E. L., Scally, M., Bromley, R. E., and Stouthamer, R. 2014. Large-Scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3025-3033.
- Nunney, L., Vickerman, D. B., Bromley, R. R., Russell, S. A., Hartman, J. R., Morano, L. D., and Stouthamer, R. 2013. Recent Evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 2189-2200.

- Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R., Hartung, J., Montero-Astúa, M., Moreira, L., Ortiz, B., and Stouthamer, R. 2010. Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: novel insight into the origin of Pierce's disease of grapevine in the US. *PLoS One*, 5: issue 11, e15488.
- Paião, F. G., Meneguim, A. M., Casagrande, E. C., and Leite Junior, R. P. 1996. Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 27: S67.
- Prado, S. S., Lopes, J. R. S., Demétrio, C. G. B., Borgatto, A. F., and Almeida, R. P. P. 2008. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. *Scientia Agricola*, 65: 251-258.
- Purcell, A. H. 1989. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. Pages 243-266 in: *Advances in disease vector research*. Harris, K. F., eds. Springer-Verlag
- Purcell, A. H., And Finlay, A. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology*, 69: 393-395.
- Randall, J. J., Golberg, N. P., Kemp, J. D., Radionenko, M., French, J. M., Olsen, M. W., and Hanson, S. F. 2009. Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the Southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5631-5638.
- Rashed, A., Killiny, N., Kwan, J., Almeida, R. P. P. 2011. Background matching behaviour and pathogen acquisition: plant site preference does not predict the bacterial acquisition efficiency of vectors. *Arthropod-Plant Interactions*, 5: 97-106.
- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizell III, R. F., and Andersen, P. C. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology*, 49: 243-270.
- Retchless, A. C., Labroussa, F., Shapiro, L., Stenger, D. C., Lindow, S., and Almeida, R. P. P. 2014. Genomic insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect host. *Genomics of plant associated Bacterial*, Berlin: Springer-Verlag. 177-202.
- Rossetti, V., and De Negri, J. D. 2011. Clorose variegada dos citros. *Citrus Research & Technology*, 32: 61-66.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G. P., Krugner, R., And Porcelli, F. 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Phyllaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia Italy. *Journal of Economic Entomology*, 107: 1316-1319.

- Scally, M., Schuenzel, E. L., Stouthamer, R., and Nunney, L. 2005. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 8491-8499.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., and Chang, C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. Fastidiosa* subsp. *multiplex*, subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 290-300.
- Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R., and Nunney, L. 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3832-3839.
- Sicard, A., Aeilinger, A. R., Vanhove, M., Schartel, T. E., Beal, D. J., Daugherty, M. P., and Almeida, R. P. P. 2018. *Xylella fastidiosa*: insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 56: 1–22.

- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., França, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani Jr, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., Oliveira, M. C., De Oliveira, R. C., De Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira Jr, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., Rosa, A. J. De M., Rosa Jr, V. E., De Sá, R. G., De Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., Silva, A. C. R., Da Silva, A. M., Da Silva, F. R., Silva, W. A., Da Silveira, J. F., Da Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., Souza, A. A., De Souza, A. P., De Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tshako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., and Setubal, J. C. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406: 151-157.
- Su, C. C., Deng, W. L., Jan, F. J., Chang, C. J., Huang, H., and Chen, J. 2014. Draft genome sequence of *Xylella fastidiosa* pear leaf scorch strain in Taiwan. *Genome Announcements*, 2: e00166-14.
- Su, C. C., Deng, W. L., Jan, F. J., Chang, C. J., Huang, H., Shih, H. D., and Chen, J. 2016. *Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 4766-4771.
- Teixeira, D. C., Rocha, S. R. P., Santos, M. A., Mariano, A. G., Li, W. B., and Monteiro, P. B. A. 2004. Suitable *Xylella fastidiosa* CVC strain for post-genome studies. *Current Microbiology*, 49: 396-399.
- Wells, J. M., Raju, B. C., and Nyland, G. 1983. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. *Phytopathology*, 73: 859-862.

- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisberg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen-nov, sp-nov-gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. International Journal of Systematics Bacteriology, 37: 136-143.
- Yamamoto, P. T., Felipe, M. R., Caetano, A. C., Sanches, A. L., and Lopes, J. R. S. 2007. First report of *Fingeriana dubia* Cavichioli transmitting *Xylella fastidiosa* to citrus. Fitopatologia Brasileira, 32: 266-266.

3. EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DE *SEQUENCE TYPES* DE *Xylella fastidiosa* SUBSP. *pauca* POR CIGARRINHAS VETORAS APÓS A AQUISIÇÃO *IN VITRO*

RESUMO

Xylella fastidiosa subsp. *pauca* é geneticamente diversa e possui uma ampla gama de espécies vetoras associadas. Entretanto há limitada informação sobre a especificidade com o vetor e eficiência de transmissão para diferentes *sequence types* (STs) dentro dessa subespécie de patógeno. Ambos STs de *X. fastidiosa* e vetores diferem em suas associações com as plantas, assim a avaliação da competência vetorial deve incluir a padronização da capacidade de aquisição da bactéria pelo vetor através de dieta artificial. Este trabalho teve como objetivo adaptar e validar um sistema de aquisição *in vitro* para estirpes de *X. fastidiosa* que causam a clorose variegada dos citros e comparar a eficiência de transmissão de STs da subespécie *pauca* por espécies de cigarrinhas vetoras. Primeiro, a aquisição e transmissão do ST13 por *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) e *Macugonalia leucomelas* (Walker) foi testada usando o sistema de dieta artificial com bactérias que cresceram em meio mínimo definido (Xfm) com ou sem 1% de ácido galacturônico (AG). Posteriormente, quatro espécies de cigarrinhas [*B. xanthophis*, *M. leucomelas*, *M. cavifrons* (Stal) e *Sibovia sagata* (Signoret)] foram comparadas como vetoras do ST13 adquirido a partir de dieta artificial, e quatro STs de *pauca* (11, 13, 65 e 70) foram testados quanto a aquisição e transmissão por *M. leucomelas*. O sistema artificial permitiu a aquisição e transmissão eficiente do ST13 para plantas sem diferença entre os meios testados. O ST13 foi transmitido mais eficientemente por *B. xanthophis* e *M. leucomelas* quando comparado com *M. cavifrons* e *S. sagata*. Diferentes STs influenciaram as taxas de aquisição e transmissão por *M. leucomelas*. A diferença na competência vetorial, apesar do uso de um sistema de aquisição padronizado, sugere que as interações entre ST-estomodeu do vetor e/ou vetor-planta podem influenciar a aquisição, retenção e inoculação pelo inseto.

Palavras-chave: Bactéria limitada ao xilema; Estirpes; Competência vetorial; Alimentação em membrana

ABSTRACT

Xylella fastidiosa subsp. *pauca* is genetically diverse and has many vector species. But there is limited information on vector specificity and efficiency for different sequence types (STs) within the pathogen subspecies. Both STs of *X. fastidiosa* and vectors differ in their associations with plants, so assessment of vector competence should include standardized vector acquisition ability of bacteria from artificial diets. This work aimed to adapt and validate an *in vitro* acquisition system for strains of *X. fastidiosa* that cause citrus variegated chlorosis, and to compare the transmission efficiency of STs of subspecies *pauca* by different species of sharpshooter vector. First, acquisition and transmission of ST13 by

Bucephalogonia xanthophis (Berg) and *Macugonalia leucomelas* (Walker) was tested using an artificial diet with bacteria grown on minimum defined medium (Xfm) with or without 1% galacturonic acid (GA). Subsequently, four sharpshooter species [*B. xanthophis*, *M. leucomelas*, *M. cavifrons* (Stal) and *Sibovia sagata* (Signoret)] were compared as vectors of ST13 acquired from artificial diets, and four STs of *pauca* (11, 13, 65 and 70) were tested for acquisition and transmission by *M. leucomelas*. The artificial system allowed efficient acquisition and transmission of ST13 to plants, with no differences between the media tested. ST13 was transmitted more efficiently by *B. xanthophis* and *M. leucomelas* when compared to *M. cavifrons* and *S. sagata*. Different STs influenced acquisition and transmission rates by *M. leucomelas*. The differences in vector competence, despite the standardized acquisition system, suggest that ST-vector foregut and/or vector-plant interactions may influence bacterial acquisition, retention and inoculation by the insect.

Keywords: Xylem-limited bacteria; Strains; Vector competence; Membrane feeding

3.1. Introdução

A bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al. (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) coloniza os vasos do xilema de diversas espécies de plantas e causa doenças em algumas culturas de interesse econômico, tais como: mal de Pierce em videira (*Pierce's disease* - PD), clorose variegada dos citros (CVC), atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), escaldadura das folhas da ameixeira (EFA), requeima das folhas da amendoeira (*almond leaf scorch* - ALS) e síndrome do declínio rápido em oliveira (*olive quick decline syndrome* - SDRO) (Hopkins & Purcell 2002; Saponari et al, 2014). Devido à sua localização restrita nos vasos do xilema das plantas, esta bactéria depende de insetos que se alimentem desse vaso condutor para a sua transmissão. Os insetos vetores com esse comportamento alimentar são cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae) e superfamília Cercopoidea (Redak et al, 2004).

Dentre as bactérias fitopatogênicas que dependem de insetos vetores para disseminação, *X. fastidiosa* é única no seu modo de transmissão e gama de vetores (Redak et al, 2004; Almeida & Nunney, 2015). Após a aquisição bacteriana em plantas infectadas, as células de *X. fastidiosa* aderem-se a regiões específicas do estomodeu (cibário e pré-cibário) das cigarrinhas, onde se multiplicam e formam o biofilme (Almeida & Purcell, 2006). Quando o inseto adquire a bactéria na fase ninfal, há perda da infectividade durante a ecdise, por outro lado, caso a aquisição ocorra no estágio adulto o inseto permanecerá bacteriolífero podendo

transmitir a bactéria por toda a vida (Purcell & Finlay, 1979; Almeida & Purcell, 2003). O tipo de transmissão é não circulativo, sem período latente entre a aquisição e inoculação (Purcell & Finlay, 1979).

A transmissão por várias espécies de cigarrinhas sugere baixa especificidade de vetores, o que parece estar relacionada, principalmente, com o hábito alimentar desses insetos (Purcell, 1989; Almeida & Nunney, 2015). Entretanto, estudos de transmissão envolvendo estirpes de amendoeira e citros usando várias espécies de cigarrinhas que se alimentam dos vasos xilemáticos, demonstraram que nem todas as espécies testadas foram capazes de transmitir *X. fastidiosa* (Lopes et al, 2009; Lopes & Krugner, 2016), embora isso possa ser devido as interações vetor-planta. Além disso, observa-se uma grande variação de eficiência de transmissão entre espécies vetoras e estirpes de *X. fastidiosa*. Para o patossistema da PD na Califórnia, por exemplo, a espécie *Graphocephala atropunctata* Signoret (Hemiptera: Cicadellidae) é um vetor muito eficiente, com taxas de transmissão acima de 90% (Hill & Purcell, 1995), comparado a apenas 20-30 % por *Homalodisca vitripennis* Germar (Hemiptera: Cicadellidae) (Daugherty & Almeida, 2009).

Para a CVC no Brasil, as taxas de transmissão de uma estirpe de citros por 13 espécies de vetores variam de menos de 1% a 30% (Marucci et al, 2008; Lopes & Krugner, 2016). Fatores relacionados às interações planta-vetor e *X. fastidiosa*-planta, têm sido propostos para explicar as variações relatadas na eficiência de transmissão, e estas podem estar correlacionadas com populações mais altas de *X. fastidiosa* nas plantas infectadas (Hill & Purcell, 1997), a preferência de vetores por plantas-fonte (Marucci et al, 2005; Daugherty et al, 2011) e por partes da planta com maior população bacteriana (Daugherty et al, 2010). A preferência alimentar das cigarrinhas é influenciada por vários fatores, como o estado nutricional da planta hospedeira, o qual varia sazonalmente ou até mesmo em um único dia (Mizell et al, 2008).

Por outro lado, aspectos diretamente relacionados a interação vetor-*X. fastidiosa*, como adesão bacteriana, propagação e formação de biofilme no trato digestivo do vetor, podem estar envolvidos na determinação da especificidade do vetor e na eficiência da transmissão. Sabe-se que a adesão no estomodeu é mediada por proteínas (adesinas) presentes na parede celular bacteriana, as quais se ligam a cutícula do trato digestivo que é constituída basicamente por quitina. A bactéria consegue utilizar a quitina como fonte de carbono e através da quebra desse polissacarídeo, ativar a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme e transmissão (Killiny & Almeida, 2009a; Killiny et al, 2010; Labroussaa et al, 2017). Mutantes de *X. fastidiosa* para quitinase e para genes que codificam proteínas de adesão, assim como genes envolvidos na regulação do sistema *quorum sensing*, apresentam comprometimento da

formação de biofilme e na transmissão por cigarrinhas (Killiny & Almeida, 2014; Labroussaa et al, 2017). Portanto, diferenças na competência vetorial relatadas na literatura podem estar associadas com as variações genéticas entre estirpes de *X. fastidiosa* ou espécies vetoras, as quais podem influenciar a adesão e / ou propagação bacteriana no vetor.

Há uma considerável variabilidade genética e fenotípica dentro de *X. fastidiosa*, o que permite que essa bactéria seja taxonomicamente subdividida dentro de subespécies (trabalhos recentes propõem cinco subespécies: *fastidiosa*, *multiplex*, *pauca*, *sandyi* e *morus*) (Nunney et al, 2014). Mesmo dentro do nível de subespécie, existe diversidade nucleotídica o que permite o agrupamento adicional das estirpes em *sequence types* (STs) através da técnica de tipagem de sequências *multilocus* (MLST). Os STs correspondentes a subespécie *pauca* da América do Sul são particularmente numerosos (Coletta-Filho et al, 2017). Devido as estirpes de *X. fastidiosa* e espécies de cigarrinhas vetoras diferirem quanto a interação com plantas hospedeiras, estudos visando comparar a aquisição e retenção da bactéria nos vetores devem ser realizados a partir da aquisição bacteriana de um sistema artificial padronizado, ou seja, sem a interferência de plantas-fontes atuando como fator de variação dos resultados. Killiny e Almeida (2009b) estabeleceram um sistema de dieta artificial para aquisição de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* por cigarrinhas que exclui o uso de plantas-fontes e permite a transmissão bem-sucedida da bactéria para videiras. Utilizando o sistema de aquisição *in vitro*, esses autores descobriram que o produto da degradação da pectina serve como uma “pista” molecular para a indução de mudanças na transcrição, tornando possível a colonização do vetor após a aquisição e subsequente transmissão da *X. fastidiosa*.

A aplicação do sistema de dieta artificial em estudos de transmissão com outras subespécies de *X. fastidiosa* requer validação, pois existem diferenças genéticas e biológicas entre elas, além das espécies vetoras envolvidas no processo de transmissão. Portanto, este trabalho teve como objetivo adaptar e validar um sistema de aquisição *in vitro* para estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* que causam a CVC e espécies de cigarrinhas vetoras em citros. Além disso, aplicou-se a técnica estabelecida para investigar a eficiência de aquisição e transmissão de diferentes STs da subespécie *pauca* por cigarrinhas vetoras.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Obtenção e criação dos insetos

As espécies de cigarrinhas *B. xanthophis* (Berg), *M. cavifrons* (Stal), *M. leucomelas* (Walker) e *S. sagata* (Signoret) utilizadas nos ensaios são pertencentes a tribo Cicadellini (Hemiptera: Cicadellidae), a qual apresenta indivíduos com maior competência na transmissão de *X. fastidiosa* (Marucci et al, 2008). Para o estabelecimento das colônias sadias dessas cigarrinhas foram realizadas coletas de campo em plantas de *Lagerstroemia indica* L., *Duranta repens* L., *Vernonia condensata* Baker e *Hibiscus* spp. As coletas ocorreram nas cidades de Piracicaba e Tatuí - SP.

Entre 50-60 adultos de cada espécie foram levados para casa de vegetação, equipada com sistema de arrefecimento tipo *pad-fan* e aquecedor ativado por termostato para controle de temperatura ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h), e então colocados em gaiolas [32 cm (base) $\times$ 50 cm (altura)] revestidas com tela anti-afídica, as quais continham plantas hospedeiras específicas para a alimentação, oviposição e desenvolvimento dos insetos. Para *B. xanthophis* e *S. sagata* foram utilizadas plantas de *V. condensata*, já para as espécies *M. leucomelas* e *M. cavifrons* a planta utilizada foi *Ocimum basilicum* L.

As plantas de *V. condensata* foram obtidas de estacas com cerca de 40 cm as quais foram plantadas em vasos plásticos de 3 L [15 $\times$ 20 cm (altura $\times$ diâmetro)] contendo o substrato comercial da marca Tropstrato HT (Vida Verde, Mogi Mirim, SP), constituído a base de casca de pinus, vermiculita, superfosfato simples e nitrato de potássio. Sementes de *O. basilicum* (Isla Pro seeds, Porto Alegre, RS) foram plantadas em bandejas de isopor e posteriormente transplantadas para vasos de 1,2 L [11 $\times$ 14 cm (altura $\times$ diâmetro)] contendo o mesmo substrato. As plantas de *V. condensata* e *O. basilicum* ficaram mantidas em casa de vegetação coberta com tela anti-afídica e foram fertilizadas duas vezes por semana via irrigação com 0,08 g/L de nitrato de amônia (33% N, 1% K) e 0,91 g/L de nitrato de cálcio (15,5% N, 18% Ca); e uma vez por semana com 0,33g/L de sulfato de magnésio (1% K₂O, 11,8% S, 9% Mg); 0,36g/L de nitrato de potássio (12% N, 43% K₂O, 1% S, 1% Mg); 0,14 g/L de fosfato monoamônico (12% N, 61% P₂O₅); 0,09g/L de ferro (5% Fe orto-orto, 6% quelato de Fe EDTA); 0,03 g/L de sulfato de cobre (24% Cu, 11% S) e 0,02 g/L de sulfato de zinco (20% Zn, 10% S).

As plantas foram oferecidas aos insetos quando as hastes (*O. basilicum*) ou ramos jovens (*V. condensata*) tinham cerca de 20 cm de comprimento (6-7 semanas após o plantio). Para garantir que os insetos utilizados nos experimentos estivessem livres de *X. fastidiosa*, os adultos foram removidos das gaiolas após duas semanas, ficando apenas os ovos e ninfas sobre

as plantas. As cigarrinhas da primeira geração que se alimentaram em *V. condensata* (planta previamente comprovada como não hospedeira de *X. fastidiosa*) (Marucci et al. 2003) foram utilizadas nos experimentos. Para as cigarrinhas que foram colocadas em plantas de *O. basilicum*, as ninfas recém eclodidas foram transferidas para plantas sadias da mesma espécie, usando apenas os insetos de segunda geração para os experimentos.

3.2.2. Plantas utilizadas nos ensaios de transmissão

Mudas sadias de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) foram usadas como plantas-teste para a inoculação bacteriana nos ensaios de transmissão, por ser essa espécie hospedeira de diferentes estirpes de *X. fastidiosa* (Purcell & Saunders, 1999), apresentar crescimento rápido e mostrar sintomas mais cedo do que as plantas cítricas (Monteiro et al, 2001). Sementes coletadas em plantas de *C. roseus* no campus da ESALQ/USP, Piracicaba - SP, foram semeadas em bandejas de isopor e transplantadas para vasos de 1,2 L [11 × 14 cm (altura × diâmetro)] usando a mesma mistura de substrato descrita anteriormente. As mudas ficaram mantidas em casa de vegetação, onde receberam a fertirrigação feita da mesma forma detalhada na sessão anterior. As plantas foram utilizadas nos experimentos 10-12 semanas após o plantio (2 semanas após o transplante), quando os ramos tinham aproximadamente 10 cm de altura. As plantas inoculadas foram pulverizadas com dimetoato (Perfekthion®) e mantidas em uma casa de vegetação com tela anti-afídica separadas das plantas sadias até a infecção por *X. fastidiosa* atingir um nível detectável por análise de PCR.

3.2.3. Sequence types (STs) de *Xylella fastidiosa*

Cinco estirpes representando quatro diferentes STs de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* foram usadas nos experimentos. As estirpes foram isoladas de plantas cítricas com sintomas de CVC [T-19/C13 (representando o ST11); 9a5c e U24d (ambas classificadas como ST13); e BS1 (representando o ST65)] no Estado de São Paulo; e a partir de hibisco [Hib4 (representando o ST70)] em Brasília, DF (Coletta-Filho et al, 2017). Após o isolamento primário, todos os isolados passaram por tríplice clonagem, tipagem por MLST e foram mantidos a -80 °C na coleção de bactérias do Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ (Instituto Agrônomo – IAC) de Cordeirópolis, SP. Quando necessário, as estirpes foram recuperadas em meio *Periwinkle wilt gelrite* (PWG) (Hill & Purcell, 1995) e as colônias cultivadas a 28 °C por 15 dias.

3.2.4. Avaliação da plantas-teste *C. roseus* como hospedeira dos STs de *X. fastidiosa*

Como apenas a estirpe 9a5c (ST13) já havia sido testada anteriormente quanto a infecção em plantas de *C. roseus* (Monteiro et al, 2001), foi necessário observar se os demais STs também são capazes de colonizar essa espécie herbácea. Para isso, foi realizada a inoculação mecânica dos STs [11, 13 (estirpe U24d), 65 e 70) nas plantas. Para a produção do inóculo as estirpes cresceram em meio PWG (2-3 transferências) a 28°C por 7-10 dias. As colônias foram raspadas do meio de cultivo com auxílio de uma alça de platina e ressuspensas em tampão fosfato salino autoclavado (*phosphate buffered saline* - PBS) até a obtenção de uma suspensão turbida com concentração que variou de 10^7 a 10^8 UFC/mL. As suspensões celulares de cada isolado foram inoculadas nas plantas usando o método *pin-prick* (Hopkins 1985) em dois pontos da haste de 9-10 plantas de *C. roseus*, sendo que cada ponto recebeu 7 μ L da suspensão bacteriana. Aos 60 dias após o término do experimento, 4-5 folhas localizadas próximas do local de inoculação foram coletadas e testadas quanto a presença de *X. fastidiosa* através da técnica de PCR convencional usando o conjunto de *primers* RST31/RST33 (Minsavage et al, 1994). Como os dados não apresentaram normalidade e homogeneidade de variâncias, a porcentagem de plantas positivas em cada tratamento foi analisada usando o teste qui-quadrado e modelos lineares generalizados (*generalized linear models* - GLM) no software R (R core team, 2017). O teste de Tukey HSD (*honestly significant difference*) ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para múltiplas comparações de médias quando foi detectado efeito significativo entre os tratamentos, usando o pacote *multcomp* no software R (Hothorn et al, 2008).

3.2.5. Adaptação e validação de um sistema de aquisição *in vitro* de *X. fastidiosa* por insetos vetores

A estirpe de citros 9a5c (ST13) foi escolhida para validar esse ensaio por ser a estirpe tipo de *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, sendo amplamente utilizada nas pesquisas. As colônias bacterianas foram raspadas do meio PWG em que estavam crescendo com o auxílio de uma alça de platina, ressuspensas em tampão PBS e novamente plaqueadas em meio de cultivo, só que dessa vez foi utilizado o meio mínimo definido para essa bactéria denominado *Xylella fastidiosa* medium (Xfm) sob duas formas i) Xfm sólido (Almeida et al, 2004) e ii) Xfm sólido acrescido de 1% de ácido galacturônico (AG) (Killiny & Almeida, 2009). Depois da incubação por 10-15 dias a 28°C, as colônias resultantes dos meios Xfm e Xfm+AG foram raspadas e

colocadas em dieta artificial (0,7 mM L-glutamina, 0,1 mM L-asparagina, 1 mM citrato de sódio, pH 6,4) (Killiny & Almeida, 2009b), com concentração bacteriana ajustada para 10^8 UFC/mL ($DO_{600} = 0,6$ nm).

A dieta contendo a bactéria foi oferecida as cigarrinhas das espécies *B. xanthophis* e *M. leucomelas*, após as mesmas passarem por um período de jejum de 1 h. A alimentação dos insetos ocorreu por meio de um sistema de sachês, os quais consistiram de frascos plásticos com aproximadamente 1 cm de diâmetro e 3 cm de comprimento. Cada sachê era aberto nas duas extremidades e coberto na parte superior com uma camada de parafilme (Parafilm®), sobre a qual era depositada uma gota de 35 μ L da suspensão celular, sendo em seguida recoberta por outra camada de parafilme. Pela extremidade inferior eram colocadas as cigarrinhas (1 indivíduo por sachê), e posteriormente a mesma era fechada com uma rolha. Os insetos permaneceram em contato com a dieta por um período de acesso à aquisição (PAA) de 6 horas, em ambiente com luz artificial (150 W) e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O controle negativo deste experimento constituiu de cigarrinhas expostas apenas a dieta artificial (livre de *X. fastidiosa*).

Após o PAA o número de insetos mortos em cada tratamento foi contabilizado e os indivíduos sobreviventes de cada espécie foram agrupados de acordo com o tratamento (Xfm, Xfm+AG e controle) e colocados para se alimentar por um período de 24 h em *V. condensata*, para a lavagem do estomodeu e consequente remoção das células bacterianas que não estavam de fato aderidas ao vetor. Posteriormente, os insetos representando cada tratamento foram redistribuídos dentro de grupos contendo 1-3 indivíduos (dependendo da mortalidade durante o PAA e do período de lavagem do estomodeu) e confinados em 12 plantas saudáveis de *C. roseus* para o período de acesso à inoculação (PAI) de 72 h, através de gaiolas plásticas do tipo *clipcage* (5,5 $\times$ 4 cm) (modelo G320, Gary Plastic Packaging Corp., New York, NY) contendo uma abertura circular com tela anti-afídica para a ventilação. A mortalidade dos insetos foi avaliada a cada 24 h do PAI, visando verificar a aceitabilidade de ambas espécies de cigarrinhas quanto a planta-teste utilizada. Tanto o período de lavagem do estomodeu como o PAI foram conduzidos em condições controladas [$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com 14-h de fotoperíodo sob luz fluorescente (150W)].

O experimento seguiu o delineamento de blocos completamente aleatorizados com efeito fixo do bloco, espécie de cigarrinha e tratamento (meio de cultura). Entretanto devido a restrições experimentais, cada bloco foi repetido três vezes no tempo (maio - setembro/2017). Foram consideradas duas espécies de cigarrinhas, três níveis de meio [(dieta líquida com suspensão celular de *X. fastidiosa* que cresceu em Xfm ou Xfm+AG) e dieta sem células bacterianas (controle)]. Cada tratamento foi composto pela combinação: nível de espécie $\times$

nível de meio de cultura. Além disso, cada tratamento foi repetido quatro vezes em cada bloco. Portanto, cada bloco teve 24 unidades experimentais (4 repetições $\times$ 2 níveis de espécies $\times$ 3 níveis de meio).

Análises de eficiência de aquisição e transmissão. As taxas de aquisição foram determinadas com base na porcentagem de indivíduos de cada tratamento que adquiriram *X. fastidiosa* por bloco. Um modelo foi desenvolvido para estimar as probabilidades de transmissão por indivíduo neste experimento, porque grupos heterogêneos (1-3 insetos) foram utilizados para inocular as plantas-teste. Onde z_{ijk} é a variável resposta que assume valores de 1 se a planta está infectada ou 0 caso contrário no i -th bloco, j th espécie, e k th tratamento. Portanto, $Z_{ijk} \text{ Bernoulli}(\pi_{ijk})$ é um caso particular da equação (1), onde $\pi_{ijk} = P[Z_{ijk} = 1]$. Entretanto para estimar essa probabilidade foi considerado o peso um fator, o qual é dado pela fórmula:

$$w_{ijk} = \frac{\text{Number of insects that acquired the bacterium}}{\text{Total number of insects}} \in [0,1]$$

O preditor linear que incorpora a informação sobre o bloco, espécie, tratamento e peso w_{ijk} é dado por:

$$\eta_{ijk} = \beta_0 + \beta_{1i}Block_i + \beta_{2j}Species_j + \beta_{3k}Treatment_k + \gamma_{jk}(Species:Treatment)_{jk} + offset(w_{ijk})$$

Em que β_0 é o intercepto, β_{1i} , β_{2j} , e β_{3k} são respectivamente o principal efeito do i th bloco ($i = 1,2,3$), j th espécie ($j = 1,2$), k th tratamento ($k = 1,2,3$), γ_{jk} é o efeito da interação entre espécie (j th) e tratamento (k th) e w_{ijk} é um termo incluído conhecido como *offset*. Foi utilizado o procedimento de verossimilhança para estimar os parâmetros dos modelos. A seleção do modelo foi dada pelo teste da razão de verossimilhança (diferença de desvio), considerando o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

As taxas de aquisição e estimativas de probabilidade de transmissão foram testadas quanto a normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Como a suposição de normalidade não foi atendida, utilizou-se o modelo linear generalizado (GLM) para analisar os dados através da análise *two-way* de desvio usando o pacote *stats* no software R (R core team 2017). Os fatores considerados no preditor linear foram bloco, espécie, meio de cultura e a interação entre espécie e meio de cultura. Quando efeitos significativos foram observados, múltiplas comparações de médias foram realizadas por meio do teste de Tukey HSD usando o pacote *multcomp* (Hothorn et al, 2008).

Análises das taxas de mortalidade. Para analisar a mortalidade dos insetos foi utilizado o modelo de regressão logística em que cada espécie de cigarrinha e tratamento (dieta) foram considerados como fatores fixos no preditor linear. A seleção da variável foi feita por teste de razão de verossimilhança ($\alpha = 0,05$). Modelos lineares generalizados mistos foram utilizados para analisar os dados de mortalidade para cada espécie ao longo do tempo. Ademais, como se tratam de dados longitudinais, foi considerado a inclusão de um efeito aleatório na estrutura do modelo (regressão binomial-normal) para modelar a correlação intra-unidade experimental (grupo de insetos), dada a presença dos fatores espécie e tratamentos. O modelo de regressão logística misto adotado para a análise longitudinal tem a seguinte estrutura funcional:

$$\log\left(\frac{\pi_{ijklt}}{1 - \pi_{ijklt}}\right) = (\beta_0 + b_i) + \beta_{1j}Block_j + \beta_{2l}Species_l + \beta_{3k}Treatment_k + \beta_{4t}Time_t$$

Onde π_{ijklt} é a probabilidade da l th espécie de inseto morrer no j th bloco, k th tratamento, e t th no tempo; β_0 , β_{1j} , β_{2l} , β_{3k} e β_{4t} são os parâmetros de efeito fixo do modelo e b_i é uma variável aleatória que é assumida como tendo uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 . O modelo mais adequado foi selecionado conforme descrito para o teste de transmissão. A análise estatística foi realizada no software R (R Development Core Team, 2017), usando os pacotes *hnp* (Moral et al. 2017) e *ggplot2* (Wickham 2016) para investigar a adaptação do ajuste e para a construção dos gráficos, respectivamente.

3.2.6. Efeito da espécie de cigarrinha na aquisição *in vitro* e transmissão de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauc*

O sistema de dieta artificial descrito anteriormente foi utilizado para a aquisição da estirpe 9a5c (ST13) pelas espécies de cigarrinhas *B. xanthophis*, *M. cavifrons*, *M. leucomelas* e *S. sagata*. Para esse experimento, as bactérias cresceram apenas em meio Xfm sólido simples antes de serem colocadas nos sachês juntamente com a dieta. Após o PAA de 6 h, os insetos de cada espécie passaram pelo período de 24 h de lavagem do estomodeu em *V. condensata*, e em seguida foram transferidos em grupos de três indivíduos para plantas-teste de *C. roseus* para o PAI de 48 horas. O experimento foi conduzido em blocos completamente aleatorizados, os quais foram repetidos três vezes no tempo (outubro/2017 - janeiro/2018). Cada bloco foi composto por 20-21 indivíduos (replicatas) de cada espécie de cigarrinha. Em adição, 12 indivíduos de cada espécie foram submetidos ao PAA de 6 h em dieta artificial sem bactéria (controle negativo). As taxas de aquisição e transmissão das espécies de cigarrinhas foram

comparadas por análise de deviência *one-way* usando a abordagem GLM e o teste Tukey HSD para múltiplas comparações das medias como descrito no experimento anterior. Entretanto, a probabilidade de transmissão por indivíduo foi estimada como descrito por Swallow (1985), devido ao fato de grupos homogêneos ($n = 3$) terem sido utilizados para inocular as plantas-teste nesse experimento.

3.2.7. Efeito do *sequence type* (ST) de *X. fastidiosa* sobre a eficiência de aquisição e transmissão por cigarrinhas

Os STs 11, 13, 65 e 70 foram comparados quanto a aquisição e transmissão por *M. leucomelas*, uma das espécies mais eficientes na transmissão de *X. fastidiosa* para citros (Lopes & Krugner, 2016). Neste experimento, o ST13 foi representado pela estirpe U24d. Os STs foram plaqueados em meio Xfm e incubados a 28 °C por 12 dias. As suspensões celulares foram oferecidas para as cigarrinhas através do sistema de dieta artificial por um PAA de 6 h. Depois do PAA, os insetos foram submetidos ao período de lavagem do estomodeu de 24 h em *V. condensata* e foram individualmente transferidos para plantas de *C. roseus* para o PAI de 48 h. O experimento seguiu o desenho experimental de blocos completamente aleatorizados, com blocos repetidos em três vezes no tempo entre novembro de 2017 a março de 2018. Cada bloco foi composto por 18-20 cigarrinhas (replicatas) para cada um dos quatro STs testados. Como controle negativo, grupos de 15 indivíduos por bloco foram submetidos ao PAA de 6 h em dieta livre de bactérias. A proporção de indivíduos que adquiriram *X. fastidiosa* (taxa de aquisição) e a proporção de plantas infectadas (taxa de transmissão) foram analisadas por análise de desvio *one-way* usando a abordagem GLM e o teste Tukey HSD para as múltiplas comparações de média como já descrito anteriormente.

3.2.8. Detecção de *X. fastidiosa* nos insetos e plantas

Após o PAI nas plantas-teste, as cigarrinhas tiveram suas cabeças retiradas com o auxílio de lâminas de bisturi, e individualmente foram submetidas a extração de DNA através do método a base de *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) descrito por Rogers & Bendich (1988). Logo após, o produto da extração foi quantificado baseando-se na absorbância obtida através do espectrofotômetro Epoch (Biotek® Instruments, Inc., Winooski, USA). As concentrações de DNA foram padronizadas (20-100 ng/μL) para a PCR quantitativa em tempo

real (qPCR), a qual foi realizada usando o conjunto de oligonucleotídeos XF16Sf/XF16Sr (Li et al, 2013) combinado com o master mix Maxima SYBR green/ROX qPCR (2×) (Thermo Fisher Scientific, SP). A amplificação foi realizada no equipamento ViiA7 *Real-Time* PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) programado com as seguintes condições: um ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 62 °C por 45 s. Cada reação teve um controle positivo (inseto sabidamente positivo) e um controle negativo (água Milli-Q®). Todas as amostras foram analisadas em duplicatas (replicatas técnicas). Uma curva padrão foi construída a partir da diluição seriada (10^{-1} - 10^{-9}) do DNA extraído diretamente das colônias de *X. fastidiosa* (676 ng/μL), em DNA total de cabeças de cigarrinhas sadias como proposto por Francis et al (2006). Essas diluições padronizadas foram usadas para estabelecer uma curva de calibração relacionando o valor do *cycle threshold* (CT) (eixo y) contra o $\log_{10}$ do número de cópias do gene 16S rRNA (eixo x). A relação foi obtida entre o valor de CT e a quantidade de cópias do gene 16S rRNA, indicado pela equação de regressão $y = -3.426 \times \log (16S \text{ rRNA número de cópias}) + 35,05$, $R^2 = 0,997$. Com base nos valores obtidos a partir da curva padrão, foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram valor de $CT \leq 30$.

As plantas-teste usadas nos ensaios de transmissão, bem como aquelas inoculadas mecanicamente tiveram 4-5 folhas amostradas (próximas ao local de inoculação) aproximadamente 60-90 dias após o término do experimento. Os pecíolos foram removidos com o auxílio de lâmina de bisturi para a extração de DNA, a qual seguiu o método descrito por Murray & Thompson (1980). A presença de *X. fastidiosa* nas plantas-teste foi avaliada por PCR convencional em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA 02172, EUA) programado com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 45 s; em seguida 1 ciclo de 72 °C por 10 min, por fim estabilizando em 20 °C por tempo indeterminado. Para a reação de amplificação foi utilizado o conjunto de oligonucleotídeos RST31/RST33 (Minsavage et al, 1994).

Após a reação de amplificação, foi adicionado cerca de 2 μL de corante (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarose) por amostra e visualizou-se o produto da reação do PCR através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM e 2 mM EDTA; pH 8,0), suplementado com 4 μL de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV e documentados no sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA).

3.3. Resultados

3.3.1. Avaliação da planta-teste *C. roseus* como hospedeira dos STs de *X. fastidiosa*

Todos os STs usados para a inoculação artificial resultaram em infecção detectável nas plantas de *C. roseus* aos 60 dias após a inoculação mecânica. As porcentagens de plantas infectadas (e número de plantas inoculadas) foram 50% (n = 10) e 67% (n = 9) para os STs 11 (estirpe T-19/C13) e 70 (estirpe hib4) respectivamente, e 60% (n = 10) para os STs 13 (estirpe U24d) e 65 (estirpe BS1) respectivamente. Não houve diferença estatística entre as taxas de infecção para os diferentes STs ($X^2 = 0,56$; g.l. = 3; $P = 0,90$).

3.3.2. Adaptação e validação de um sistema de aquisição *in vitro* de *X. fastidiosa* por insetos vetores

O ST13 (strain 9a5c) de *X. fastidiosa* foi adquirido por ambas espécies de cigarrinhas a partir de dieta artificial independente do meio de cultivo utilizado no crescimento bacteriano (Xfm ou Xfm + AG). As taxas de aquisição resultantes da porcentagem de indivíduos positivos por qPCR foram 44,4% e 63,8% após a alimentação em dieta contendo a bactéria que cresceu em meio Xfm para *B. xanthophis* e *M. leucomelas*, respectivamente, e 52,7 e 61,1%, respectivamente após a alimentação em dieta com bactérias que cresceram em Xfm + AG (Figura 1). Não houve diferença estatística entre as espécies de cigarrinhas ($X^2 = 0,09$; g.l. = 1; $P = 0,25$) ou entre os dois meios de cultura testados ($X^2 = 0,001$; g.l. = 1; $P = 0,83$). *X. fastidiosa* não foi detectada nos insetos que se alimentaram em dieta sem bactérias (controle negativo n = 36), assim confirmando que as cigarrinhas utilizadas no experimento estavam inicialmente livres do patógeno.

Figura 1. Influência do meio de cultura nas eficiências de aquisição e transmissão de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* sequence type 13 (estirpe 9a5c) por *Bucephalogonia xanthophis* e *Macugonalia leucomelas*. A bactéria foi cultivada em *Xylella fastidiosa* medium (Xfm) ou Xfm + ácido galacturônico (Xfm + AG) e então ressuspensa em dieta artificial para um período de acesso de aquisição in vitro (PAA) de 6 h. Após o PAA, os insetos foram colocados para se alimentar em *Vernonia condensata* (planta não hospedeira de *X. fastidiosa*) por 24 h e, posteriormente, foram confinados em grupos de 1-3 indivíduos em plantas saudáveis de *Catharanthus roseus* para um período de acesso à inoculação de 72 h. A eficiência de aquisição é representada pela porcentagem de insetos que adquiriram a bactéria da dieta. As probabilidades de transmissão por insetos individuais dentro dos grupos heterogêneos (1-3 insetos por planta) foram estimadas pelo modelo descrito em Materiais e Métodos. As barras representam o erro padrão da média.

Após aquisição das bactérias cultivadas em Xfm, as taxas de transmissão estimadas individualmente por inseto utilizando plantas de *C. roseus* foram de 14,7 e 19,8% para *M. leucomelas* e *B. xanthophis*, respectivamente. Quando *X. fastidiosa* cresceu em meio Xfm + AG, as taxas de transmissão por indivíduo foram 3,9% para *M. leucomelas* e 5,7% para *B. xanthophis* (Figura 1). Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os meios de cultura utilizados para o crescimento de *X. fastidiosa* ($X^2 = 3,4$; g.l. = 1; $P = 0,065$) ou entre as espécies de cigarrinhas ($X^2 = 2,3$; g.l. = 1; $P = 0,125$). Não houve transmissão bacteriana pelos insetos que se alimentaram apenas de dieta (controle negativo).

A taxa de mortalidade de *B. xanthophis* e *M. leucomelas* durante o PAA de 6 h em dieta líquida foi $\leq 15\%$, não ocorrendo efeito significativo de espécie de cigarrinha ($X^2 = 0$; g.l. = 1; $P = 1$) nem da interação entre espécie e dieta ($X^2 = 0,46$; g.l. = 2; $P = 0,792$). No entanto, observou-se efeito do tratamento dieta ($X^2 = 6,6$; g.l. = 2; $P = 0,037$), com menor mortalidade

em dieta artificial contendo *X. fastidiosa* que cresceu em Xfm (4,1%) ou Xfm + AG (5,6%) quando comparado com dieta livre de bactérias (controle negativo) (15,3%). Estes resultados mostram que altas concentrações bacterianas (10^8 UFC/mL) usadas na dieta artificial não afetaram a sobrevivência das cigarrinhas. Durante o PAI de 72 h em plantas de *C. roseus*, o efeito de espécie foi marginalmente significativo ($X^2 = 3,8$; g.l. = 1; $P = 0,05$), com *M. leucomelas* apresentando menor mortalidade em relação a *B. xanthophis* (Figura 2).

Figura 2. Estimativa da probabilidade de mortalidade das cigarrinhas *Bucephalagonia xanthophis* e *Macugonalia leucomelas*. Os insetos foram avaliados a cada 24 h durante o período de acesso à inoculação (PAI) de 72 horas, durante o qual *Xylella fastidiosa* foi transmitida para plantas-teste de *Catharanthus roseus*. A curva ajustada mostra a probabilidade de morte de insetos ao longo do tempo por nível de espécie. Os marcadores circulares representam as respostas observadas em cada ponto de tempo experimental (PAI) para cada bloco de repetição.

3.3.3. Efeito da espécie de cigarrinha na aquisição *in vitro* e transmissão de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*

Todas as espécies de cigarrinhas (*B. xanthophis*, *M. cavifrons*, *M. leucomelas* e *S. sagata*) adquiriram o ST13 (estirpe 9a5c) a partir de dieta artificial. As taxas de aquisição variaram de 28,8 (*M. leucomelas*) a 38,1% (*B. xanthophis*), no entanto, não houve diferença estatística entre as espécies ($X^2 = 4,0$; g.l. = 3; $P = 0,26$) (Figura 3). Todas as espécies de cigarrinhas transmitiram o ST13 para plantas de *C. roseus*, com maiores taxas de transmissão para *B. xanthophis* (14,9%) e *M. leucomelas* (15,8%) comparadas com *M. cavifrons* (3,3%) e *S. sagata* (7,1%) ($X^2 = 35,6$; g.l. = 3; $P < 0,001$) (Figura 3). A bactéria *X. fastidiosa* não foi detectada nos controles negativos de nenhuma das quatro espécies (insetos que se alimentaram em dieta livre de células bacterianas). *X. fastidiosa* também não foi detectada nas plantas em que esses insetos se alimentaram.

Figura 3. Efeito de espécies cigarrinhas nas eficiências de aquisição e transmissão de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* sequence type 13 (estirpe 9a5c). Após crescimento em *Xylella fastidiosa* medium (Xfm), as células bacterianas foram suspensas em dieta artificial por um período de acesso à aquisição *in vitro* de 6 h pelas espécies de cigarrinhas *Bucephalagonia xanthophis*, *Macugonalia cavifrons*, *Macugonalia leucomelas* e *Sibovia sagata*. Após o PAA, os insetos foram colocados para se alimentar em *Vernonia condensata* (planta não hospedeira de *X. fastidiosa*) por 24 h, e posteriormente confinados em grupos de três indivíduos em plantas saudáveis de *Catharanthus roseus* para um período de acesso à inoculação de 48 h. A eficiência de aquisição é representada pela porcentagem de insetos que adquiriram a bactéria da dieta (colunas pretas). As probabilidades de transmissão por indivíduo foram estimadas de acordo com Swallow (1985) (colunas brancas). Valores e barras nas colunas representam o número de amostras testadas e o erro padrão da média respectivamente.

3.3.4. Efeito do Sequence type (ST) de *X. fastidiosa* sobre a eficiência de aquisição e transmissão por cigarrinhas

A espécie de cigarrinha *M. leucomelas* foi escolhida para este ensaio devido ao fato de apresentar uma taxa de mortalidade relativamente baixa na espécie de planta-teste *C. roseus*. *M. leucomelas* adquiriu todos os STs testados através do sistema de dieta artificial. A eficiência de aquisição foi significativamente afetada pelo ST ($X^2 = 30,1$; g.l. = 3; $P < 0,001$), com maiores taxas para os STs 11, 13 (estirpe U24d) e 65 (28,9, 30 e 40,4%) respectivamente, comparado com o ST 70 (15%) (Figura 4). *M. leucomelas* transmitiu os quatro STs para plantas de *C. roseus*, porém a taxa de transmissão por indivíduo foi significativamente maior para o ST13

(34,9%) em comparação aos STs 70, 11, 65 (15, 17 e 23%) respectivamente ($X^2 = 30,4$; g.l. = 3; $P < 0,001$) (Figura 4). Por outro lado, quando apenas a proporção de insetos positivos para qPCR que transmitiram *X. fastidiosa* foi considerada, os valores obtidos foram 58,9, 76,6, 86,2 e 89% para STs 11, 65, 13 e 70, respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Efeito dos *sequence types* (STs) de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* na eficiência de aquisição e transmissão por *Macugonalia leucomelas*. Após o crescimento dos STs 11, 13 (estirpe U24d), 65 e 70 em *Xylella fastidiosa medium* (Xfm), as células bacterianas foram oferecidas aos insetos por meio da aquisição *in vitro* por um período de acesso à aquisição (PAA) de 6 h. Após o PAA, os insetos foram alimentados por 24 h na planta não hospedeira de *X. fastidiosa* (*Vernonia condensata*) e confinados individualmente em plantas sadias de *Catharanthus roseus* por um período de acesso à inoculação de 48 horas. A eficiência de aquisição (colunas pretas) é representada pela porcentagem de insetos que adquiriram os STs da dieta e eficiência de transmissão (colunas brancas) pela porcentagem de plantas infectadas (PCR-positivas) em relação ao número total inoculado pelas cigarrinhas. A coluna em linha tracejada mostra a proporção de insetos positivos para qPCR que transmitiram *X. fastidiosa* para as plantas. Valores e barras nas colunas representam, respectivamente, o número total de amostras testadas e o erro padrão da média.

3.4. Discussão

A transmissão de *X. fastidiosa* por vetores consiste em três etapas: aquisição bacteriana, retenção no estomodeu do inseto e inoculação nas plantas (Lopes et al, 2009). Neste trabalho foi adaptada e implementada a técnica de aquisição bacteriana *in vitro* utilizada no patossistema PD (*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*) (Killiny & Almeida, 2009b) para os estudos com *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e as cigarrinhas vetoras das estirpes bacterianas causadoras da CVC. Estudos convencionais de transmissão que utilizam citros como fonte de inóculo para

estirpes da CVC (subsp. *pauca*) são difíceis de serem realizados devido a dificuldade na obtenção de plantas cítricas com alta concentração bacteriana (Almeida et al, 2001), o que reduz a eficiência de aquisição de patógenos por vetores (Hill & Purcell, 1995). Além disso, a proporção de vasos de xilema colonizados pela bactéria é relativamente baixa em citros em comparação com outras plantas hospedeiras (Alves et al, 2004), e ainda, as espécies de cigarrinhas testadas rejeitam plantas com sintomas de CVC, mostrando baixa taxa de ingestão de seiva quando confinadas nessas plantas (Marucci et al, 2005).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que a técnica de aquisição *in vitro* permite a transmissão de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* para plantas de *C. roseus*. A utilização de diferentes meios de cultura (Xfm sólido e Xfm + AG) para o crescimento bacteriano antes da aquisição pelo inseto não resultou em alteração fenotípica das colônias da estirpe 9a5c (informação pessoal). Também não houve diferença significativa na eficiência de aquisição e transmissão quando a bactéria foi cultivada em meio Xfm com ou sem AG, o qual é um componente (monômero) da pectina. Killiny & Almeida (2009b) observaram maior eficiência de transmissão com a subsp. *fastidiosa* cultivada em meio Xfm contendo pectina em comparação ao meio Xfm na sua forma original. Esses autores também observaram um fenótipo mais adesivo quando a estirpe Temecula (subsp. *fastidiosa*) foi cultivada em meio com pectina. Posteriormente, em estudos envolvendo aquisição e transmissão *in vitro* de uma estirpe mutante para a enzima poligalacturonase (*PlgA*), Killiny & Almeida (2014) observaram eficiências de transmissão similares ao longo do tempo para a estirpe selvagem cultivada em meio com pectina e a estirpe mutante quando cultivada em meio com a presença de AG. Esses resultados mostraram que o processamento do AG ou a atividade da *PglA* resultando na quebra da pectina no seu respectivo monômero, é fundamental para a transmissão eficiente de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* por vetores a partir de dieta artificial. A estirpe bacteriana (9a5c) utilizada neste estudo não possui a *PglA* funcional (Simpson et al, 2000), assim como outras linhagens de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* para as quais existem dados disponíveis [incluindo U24d (ST13, usado neste estudo), Fb7 (ST69) e J1a12 (ST11) - todos de citros, e 3124 (ST16) de café] (Apêndice A). Nesse sentido, esperava-se que a adição de AG ao meio de cultivo levasse à indução de um fenótipo mais adesivo da estirpe 9a5c, resultando em maior eficiência de transmissão por cigarrinhas, mas isso não foi observado. Então, sugere-se que o AG na estirpe 9a5c (ST13) de *pauca* não sirva como uma “pista” para a indução da expressão de genes necessários para a transmissão, como acontece na subsp. *fastidiosa*.

No presente trabalho também foi investigada a possibilidade de especificidade entre os STs de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* e espécies de cigarrinhas vetoras usando um sistema de

aquisição *in vitro* para eliminar o efeito da planta hospedeira sobre as cigarrinhas e/ ou na estirpe bacteriana. Não foi observada nenhuma diferença significativa nas taxas de aquisição do ST13 entre as quatro espécies de cigarrinhas testadas, no entanto, maiores taxas de transmissão foram observadas para *B. xanthophis* (14,9%) e *M. leucomelas* (15,8%). Os resultados obtidos na transmissão individual para estas espécies estão dentro do intervalo já relatado para *B. xanthophis* (5-12%) e *M. leucomelas* (16%) (Lopes & Krugner, 2016; Marucci et al, 2008) em estudos usando a aquisição a partir de plantas-fontes. Devido ao fato das taxas de aquisição encontradas serem semelhantes, as variações na eficiência de transmissão entre as espécies se deve a fatores relacionados às interações vetor-planta. As espécies de cigarrinhas podem variar em sua preferência por locais de alimentação e / ou no comportamento alimentar em *C. roseus*, o que pode interferir na eficiência de inoculação nesta espécie de planta-teste. Em alfafa, por exemplo, a competência vetorial é, em parte, determinada pela preferência alimentar das cigarrinhas em relação à distribuição espacial da *X. fastidiosa* dentro da planta infectada. Maior eficiência de transmissão foi observada por *Draeculacephala minerva* Ball, a qual prefere a porção basal da haste da planta, onde a bactéria possui populações mais elevadas (favorecendo assim a aquisição bacteriana), comparada com *G. atropunctata*, que prefere a parte superior das hastes das plantas (Daugherty et al, 2010). Possíveis variações nas características do cibário e precibário entre espécies de vetores (Almeida et al, 2005) podem ter implicações na multiplicação bacteriana nesses locais de retenção e no desprendimento das células do biofilme durante a inoculação. Embora não seja necessário a multiplicação de *X. fastidiosa* no trato digestivo do inseto para que a inoculação ocorra (Hill & Purcell, 1995), maiores populações bacterianas detectadas no inseto estão positivamente correlacionadas com maiores eficiências de transmissão por vetores (Cornara et al, 2016).

Os STs 11, 13 e 65 de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* foram adquiridos por *M. leucomelas* com eficiência semelhante, porém o ST70 do hibisco apresentou menor taxa de aquisição. A taxa de transmissão medida pela proporção de plantas infectadas foi maior para o ST13, mas não diferiu estatisticamente entre os outros STs. A variação na taxa de aquisição pela mesma espécie de cigarrinha após a alimentação em dieta com concentração de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* padronizada, sugere diferenças na capacidade dos STs em colonizar o estomodeu do vetor, enquanto as diferenças na taxa de transmissão para plantas de *C. roseus* podem estar relacionadas às interações vetor-ST e ST-planta. Contudo, foram observadas taxas de infecção estatisticamente iguais quando os STs foram inoculados mecanicamente em *C. roseus*, sugerindo que as diferenças nas taxas de transmissão por *M. leucomelas* não estão relacionadas à capacidade dos STs em infectar e colonizar esta planta-teste.

O processo de colonização de *X. fastidiosa* no inseto vetor é complexo e consiste em três etapas: i) adesão inicial no estomodeu e início da colonização, ii) maturação do biofilme e iii) desprendimento das células bacterianas do estomodeu (Killiny & Almeida, 2009a). É possível que haja variação na interação das estirpes testadas (diferentes STs) com vetores, resultando em diferenças na eficiência de aquisição. Estes quatro STs apresentaram diferenças fenotípicas marcantes quando crescidos em meio PWG (Apêndice B) com o ST13 apresentando maior quantidade de agregados bacterianos e formação de biofilme *in vitro* (informação pessoal). Essas características de crescimento *in vitro* podem estar relacionadas com genes importantes para a colonização dos vetores. A menor taxa de aquisição do ST70 por *M. leucomelas* pode ser devido a menor capacidade de adesão desta estirpe ao inseto, que por sua vez pode estar relacionada à ausência ou abundância de adesinas na membrana celular. Da mesma forma, considerando a porcentagem de insetos positivos para qPCR que transmitiram a bactéria às plantas, é evidente que o ST70 mostrou uma taxa de inoculação eficiente (89%), ou seja, quase todos os indivíduos que adquiriram este ST via dieta artificial foram capazes de transmiti-lo para plantas-teste. O ST11 que foi mais eficientemente adquirido, apresentou menor taxa de inoculação por insetos positivos (cerca de 60%). Desse modo, aquisição, retenção e inoculação são processos distintos e podem apresentar eficiência diferenciada de acordo com a combinação particular espécie vetora-ST.

Através da técnica de aquisição *in vitro*, verificamos experimentalmente a falta de especificidades de vetores entre as quatro espécies de Cicadellinae avaliadas para transmissão do ST13 ou entre os diferentes STs de subsp. *pauca* testados para transmissão por *M. leucomelas*. No entanto, há uma variação significativa nas eficiências de transmissão dependendo das espécies de cigarrinhas ou da estirpe bacteriana testada. Este é o primeiro registro de *M. cavifrons* e *S. sagata* atuando como vetores de *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Em um estudo anterior usando citros infectados para aquisição, *M. cavifrons* não conseguiu transmitir uma estirpe da CVC de *X. fastidiosa* (Lopes & Krugner, 2016).

Os resultados obtidos neste trabalho fornecem uma base para novos estudos, incluindo outras estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ou até mesmo outras subespécies ainda não testadas. Além disso, o uso do sistema de aquisição bacteriana *in vitro* permite o estudo de mutantes de vários genes de interesse, como já demonstrado para o patossistema PD (Killiny & Almeida, 2014). Com a implementação do sistema de aquisição artificial para vários STs e espécies vetorais associadas a CVC, é possível reduzir as limitações experimentais do uso de plantas cítricas como fonte de inóculo. A partir desse sistema é plausível usar grandes populações bacterianas para melhorar a eficiência da transmissão e padronizar a quantidade de

inóculo oferecida aos insetos. Assim, estudos de transmissão podem ser alavancados e otimizados para diferentes patossistemas, que possuem estirpes de *X. fastidiosa* que variam em suas características genéticas e biológicas, e uma diversidade de vetores associados. A aquisição a partir de uma dieta artificial contorna fatores que, na natureza, influenciam não apenas a alimentação de vetores, mas também populações bacterianas em plantas infectadas, com impactos potenciais na precisão das estimativas de eficiência de aquisição e transmissão. Não obstante, se os resultados forem interpretados com cautela, será uma ferramenta valiosa para estudos comparativos entre estirpes de *X. fastidiosa* ou mutantes e espécies de cigarrinhas visando investigar a especificidade e os mecanismos relacionados à aquisição, retenção e inoculação bacteriana por vetores.

3.5. Conclusões

- O sistema de aquisição *in vitro* estabelecido para a estirpe *temecula* da subsp. *fastidiosa* pode ser utilizado para a aquisição das estirpes da subsp. *pauca* de citros, sendo que não há necessidade de crescer as células bacterianas em meio contendo ácido galacturônico.
- Não há especificidade entre as quatro espécies de cigarrinhas da subfamília Cicadellidae e os STs de *pauca* testados.
- Apesar da utilização de um sistema de aquisição padronizado, sem a interferência de plantas-fonte, há variações nas taxas de aquisição e transmissão para as diferentes combinações ST-espécie de cigarrinha.

Referências

- Almeida, R. P. P., and Nunney, L. 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? Plant disease, 99: 1457-1467.
- Almeida, R. P. P., and Purcell, A. H. 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). Journal Economic Entomology, 2: 264-271.
- Almeida, R. P. P., and Purcell, A. H. 2006. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization on the precibarium of sharpshooter vectors relative to transmission to plants. Arthropods in relation to plant disease, 99: 884-890.

- Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S., and Purcell, A. H. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 775-786.
- Almeida, R. P. P., Ferreira, E. F., Purcell, A. H., and Lopes, J. R. S. 2001. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Disease*, 85: 382-382.
- Almeida, R. P. P., Mann, R., and Purcell, A. H. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a Minimal Solid Defined Medium. *Current Microbiology*, 48: 368-372.
- Alves, E., Marucci, R. C., Lopes, J. R. S., and Leite, B. 2004. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology*, 152: 291-297.
- Coletta-Filho, H. D., Francisco, C. F., Lopes, J. R. S., Muller, C., and Almeida, R. P. P. 2017. Homologous recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen association in South America. *Phytopathology*, 107: 305-312.
- Cornara, D., Sicard, A., Zeilinger, A. R., Porcelli, F., Purcell, A. H., and Almeida, R. P. P. 2016. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevine by the meadow spittlebug. *Phytopathology*, 106: 1285-1290.
- Daugherty, M. P., and Almeida, R. P. P. 2009. Estimating *Xylella fastidiosa* transmission parameters: decoupling sharpshooter number and feeding period. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132: 84-92.
- Daugherty, M. P., Lopes, J. R. S., and Almeida, R. P. P. 2010. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. *Ecological Entomology*, 35: 360-366.
- Daugherty, M. P., Rashed, A., Almeida, R. P. P., and Perring, T. M. 2011. Vector preference for hosts differing in infection status: sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. *Ecological Entomology*, 36: 654-622.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H., and Civerolo, E. L. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 203-213.
- Hill, B. L., and Purcell, A. H. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology*, 85: 1368-1372.
- Hill, B. L., and Purcell, A. H. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology*, 87: 1997-1201.

- Hopkins, D. L. 1985. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. The American Phytopathological Society, 75: 713-717.
- Hopkins, D. L., and Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. Plant Disease, 86: 1056-1066.
- Hothorn, T., Bretz, F., and Westfall, P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. Biometrical Journal, 50: 346-363.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009a. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. Applied and Environmental Microbiology, 75: 521-528.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009b. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 22416-22420.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2014. Factors affecting the initial adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. Applied and Environmental Microbiology, 80: 420-426.
- Killiny, N., Prado, S. P., and Almeida, R. P. P. 2010. Chitin utilization by the insect-transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. Applied and Environmental Microbiology, 76: 6134-6140.
- Labrousseau, F., Ionescu, M., Zeilinger, A. R., Lindow, S. E., and Almeida, R. P. P. 2017. A chitinase is required for *X. fastidiosa* colonization of its insects and plant host. Microbiology, 63: 505-509.
- Li, W., Teixeira, D. C., Hartung, J. S., Huang, Q., Duan, Y., Zhou, L., Chen, J., Lin, H., Lopes, S., Ayres, A. J., and Levy, L. 2013. Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing Citrus Variegated Chlorosis. Journal of Microbiological Methods, 92: 79-89.
- Lopes, J. R. S., and Krugner, R. 2016. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. Pages 195-208 in: Vector-mediated transmission of plant pathogens. BROWN, J.K, ed. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, United States.
- Lopes, J. R. S., Daugherty, M., and Almeida, R. P. P. 2009. Context dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. Entomologia Experimentalis et Applicata, 13: 216-224.

- Marucci, R. C., Giustolin, T. A., Miranda, M. P., Miqueiote, H., Almeida, R. P. P., and Lopes, J. R. S. 2003. Identification of a non-host plant of *Xylella fastidiosa* to rear healthy sharpshooter vectors. *Scientia Agricola*, 60: 669-675.
- Marucci, R. C., Lopes, J. R. S., and Cavichioli, R. R. 2008. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. *Journal of Economic Entomology*, 101: 1114-1121.
- Marucci, R. C., Lopes, J. R. S., Vendramim, J. D., and Corrente, J. E. 2005. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selections by leafhopper vectors. *Entomologia Experimentalis et applicata*, 113: 95-103.
- Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B., and Stall, R. E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84: 456-461.
- Mizell, R. F., Tipping, C., Andersen, P. C., Brodbeck, B. V., Hunter, W. B., and Northfield, T. 2008. Behavioral model for *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae): optimization of host plant utilization and management implications. *Environmental Entomology*, 37: 1049-1062.
- Monteiro, P. B., Renaudin, J., Jagoueix-Eveillard, S., Ayres, A. J., Garnier, M., and Bové, J. M. 2001. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, 85: 246-251.
- Moral, R. A., Hinde, J., and Demétrio, C. G. B. 2017. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in {R}: The hnp package. *Journal of Statistical Software*, 81: 1-23.
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
- Nunney, L., Schuenzel, E. L., Scally, M., Bromley, R. E., and Stouthamer, R. 2014. Large-Scarle intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3025-3033.
- Purcell, A. H. 1989. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. Pages 243-266 in: *Advances in disease vector research*. HARRIS, K.F., eds. Springer-Verlag
- Purcell, A. H., and Finlay, A. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology*, 69: 393-395.
- Purcell, A. H., and Saunders, S. R. 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common Riparian Plants in California. *Plant Disease*, 83: 825-830.
- R core Team. The R environment, 2017. URL <https://www.r-project.org/>.

- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizell Iii, R. F., and Andersen, P. C. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology*, 49: 243-270.
- Rogers, S. O., and Bendich, A. J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Pages 73-83. In: Gelvin S.B.; Schilperoort R.A., eds. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G. P., Krugner, R., and Porcelli, F. 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Phylaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia Italy. *Journal of Economic Entomology*, 107: 1316-1319.

- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., França, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani Jr, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., Oliveira, M. C., De Oliveira, R. C., De Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira Jr, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., Rosa, A. J. De M., Rosa Jr, V. E., De Sá, R. G., De Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., Silva, A. C. R., Da Silva, A. M., Da Silva, F. R., Silva, W. A., Da Silveira, J. F., Da Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., Souza, A. A., De Souza, A. P., De Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tshako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., and Setubal, J. C. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406: 151-157.
- Swallow, W. H. 1985. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. *Phytopathology*, 75: 882-889.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisberg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen-nov, sp-nov-gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematics Bacteriology*, 37: 136-143.
- Wikham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag: New York.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Sequências de DNA de *Xylella fastidiosa*, mostrando a mutação *frameshift* para a enzima poligalacturonase em estirpes da subespécie *pauca*.

Estirpe Temecula subsp. *fastidiosa* de videira

```
MNLD RFLPLV FGLHCF AAMGGTADTVFRV SQSPS D LSEPVS VKTLWG EVQRPSLP THVCTV
LPARLTPEHDSL DALDANPRAS QPDTKRLQDAIDDCPAGSAVKLVMDSHRKS GFLSGPLHLKSGVT
TLWIDDGVT LFA SRNPKDYDKGN GTCGTGTSTYEFSC MPLISAINTTSSGIVGGGVIDGRGGSILT
GGKHARQRTW WDLAYQNKHHALHQQVPRLIQIRGGNDFTLYRVAIENAPNFHV VADTVSGVTAW
GIRILTPSLVY TTPGYHCPPGTT PDVVT PATCFTPTDVKNTDGFDPGQSNHVLLAYS YISTGDDHV
AIKARGKMP SDALSFLHNYFGYGHGMSIGSDTESGVHDMEVSDLSIDGFDSPNSNGLHMKSDTD
HGGVVDHVTYSKICMRRLKRPLAFDTFYKPSNGNSYPLFKNIVLQDIHVLES PVFGAGQLLFMGL
GSGNNLPM TSLDNVVF DGF LPTLIAPPSSVVFANPQAVHFHFGPGPVSFAPLITPSVAYDVTVS
GSPGVGNPYDCSAAFINFSSVFPD S P I Stop
```

Estirpe 9a5c subsp. *pauca* de citros (ST13)

```
MNLD RFLPLV FGLHCF AAMGGTADTVFRGSQPSLS D LSEPVS VKTLWG EVQRPSLP THVCTVLP A
RLTPEHGS L DALDANPRAS KPD TKRLQDAIDDCPAGSAVKLVMDSHRKS GFLSGPLHLKSGVT L
WIDDGVT LFA SRNPKDYDKGN GTCGTATSTYEFSC MPLDLRDQHHR Stop RYRGW GCD Stop WAW
R Stop HFDWW Stop ACSAAYLVG SGLSEQAPCTASTGTTVDPNQGR Stop RLHVVP CRHRKCT Stop LP
CGC Stop YGQWCHR MGHYPDPKLG LYGAGVPLSARYHAGCCDAGD MLYPGH GQEHRWL Stop SW
AIKPRAASV LLHQHWG Stop PRCHQSAGQDAKRRELLTQPLWLWTWHVHR Stop RHRVRCTRYGS
Q Stop FEYRRL Stop QP Stop QQLAYEI Stop CRSWRSGR SCHLLQN MHASSET SAGV Stop HLLQTFQ
REFLSTLQKYRAARYSCA Stop KSCLWCWSA AFHGDPRQWE Stop SANDAESG Stop RIRRRFFANID
SASQQCRIRQSAGSAFSLRSRSGQFRSFDYPLGCLRCDC EWKSR CGQPIRLFGGIYQFFQRIS
Stop FAYL
```

Estirpe U24d subsp. *pauca* de citros (ST13)

```
MNLD RFLPLV FGLHCF AAMGGTADTVFRGSQPSLS D LSEPVS VKTLWG EVQRPSLP THVCTVLP A
RLTPEHGS L DALDANPRAS KPD TKRLQDAIDDCPAGSAVKLVMDSHRKS GFLSGPLHLKSGVT L
WIDDGVT LFA SRNPKDYDKGN GTCGTATSTYEFSC MPLDLRDQHHR Stop RYRGW GCD Stop WAW
R Stop HFDWW Stop ACSAAYLVG SGLSEQAPCTASTTTVDPDQGR Stop RLHVVP CRHRKCA Stop LP
CGC Stop YGQRRHR MGHPPDPKLG LYGAGVPLSARYHAGCCDAGD MLYPGH GQEHRWL Stop SW
AIKPRAASV LLHQHWG Stop PRCHQSAGQDAKRRELLTQPLWLWTWHVHR Stop RHRVRCTRYGS
Q Stop FEYRRL Stop QP Stop QQLAYEI Stop CRSWRSGR SCHLLQN MHASSET SAGV Stop HLLQTFQ
REFLSTLQKYRAARYSCA Stop KSCLWCWSA AFHGDPRQWE Stop SANDAESG Stop RIRRRFFANID
SASQQCRIRQSAGSAFSLRSRSGQFRSFDYPLGCLRCDC EWKSR CGQPIRLFGGIYQFFQRIS
Stop FAYL
```

Estirpe J1A12 subsp. *pauca* de citros (ST11)

```
MNLD RFLPLV FGLHCF AAMGGTADTVFRGSQPSLS D LSEPVS VKTLWG EVQRPSLP THVCTVLP A
RLTPEHGS L DALDANPRAS KPD TKRLQDAIDDCPAGSAVKLVMDSHRKS GFLSGPLHLKSGVT L
WIDDGVT LFA SRNPKDYDKGN GTCGTATSTYEFSC MPLDLRDQHHR Stop RYRGW GCD Stop WAW
R Stop HFDWW Stop ACSAAYLVG SGLSEQAPCTASTTTVDPDQGR Stop RLHVVP CRHRKCA Stop LP
CGC Stop YGQRRHR MGHPPDPKLG LYGAGVPLSARYHAGCCDAGD MLYPGH GQEHRWL Stop SW
AIKPRAASV LLHQHWG Stop PRCHQSAGQDAKRRELLTQPLWLWTWHVHR Stop RHRVRCTRYGS
Q Stop FEYRRL Stop QP Stop QQLAYEI Stop CRSWRSGR SCHLLQN MHASSET SAGV Stop HLLQTFQ
REFLSTLQKYRAARYSCA Stop KSCLWCWSA AFHGDPRQWE Stop SANDAESG Stop RIRRRFFANID
SASQQCRIRQSAGSAFSLRSRSGQFRSFDYPLGCLRCDC EWKSR CGQPIRLFGGIYQFFQRIS
Stop FAYL
```

Estirpe FB subsp. pauca de citros (ST69)

MNLDRFLPLVFGFLHCF AAMGGTADVFRGSQPSLSDLSEPVSVKTLWGGEVQRPSLP THVCTVLP A
 RLTPEHGSLDALDANPRASKPDTKRLQDAIDDCPAGSAVKLVMDSHRKSGFLSGPLHLKSGVT L
 WIDDGVTLFASRNPKDYDKNGTTCGTATSTYEFSCMPLDLRDQHHRStop RYRGWGCDStop WAW
 RStop HFDWWStop ACSAAYLVGSGLSEQAPCTASTSTTVDPDQGRStop RLHVVPCHRRKCAStop LP
 CGCStop YGQRRHRMGHPHPDPKLG LYGAGVPLSARYHAGCCDAGDMLYPGHGQEHRWLStop SW
 AIKPRAASVLLHQHWGStop PRCHQSAGQDAKRRSELLTQPLWLWTWHVHRStop RHRVRCTRYGS
 QStop FEYRRLStop QPStop QQWLAYEIStop CRSWRSGRPPCHLLQN MHASSETSAGVStop HLLQTFQ
 REFLSTLQKYRAARYSCAStop KSCLWCWSAAFHGDPRQWEStop SANDAESGStop RRIRFFANID
 SASQQCRIRQSAGSAFSLRSRSGQFRSFDYPLGCLRCDC EWKSRCGQPIRLFGGIYQFFQRIS
 Stop FAYL

Estirpe 3124 subsp. pauca de café (ST16)

MNLDRFLPLVFGFLHCF AAMGGTADVFRGSQPSLSDLSEPVSVKTLWGGEVQRPSLP THVCTVLP A
 RLTPEHGSLDALDANPRASKPDTKRLQDAIDDCPAGSAVKLVMDSHRKSGFLSGPLHLKSGVT L
 WIDDGVTLFASRNPKDYDKNGTTCGTATSTYEFSCMPLDLRDQHHRStop RYRGWGCDStop WAW
 RStop HFDWWStop ACSAAYLVGSGLSEQAPCTASTSTTVDPDQGRStop RLHVVPCHRRKCAStop LP
 CGCStop YGQRRHRMGHPHPDPKLG LYGAGVPLSARYHAGCCDAGDMLYPGHGQEHRWLStop SW
 AIKPRAASVLLHQHWGStop PRCHQSAGQDAKRRSELLTQPLWLWTWHVHRStop RHRVRCTRYGS
 QStop FEYRRLStop QPStop QQWLAYEIStop CRSWRSGRPPCHLLQN MHASSETSAGVStop HLLQTFQ
 REFLSTLQKYRAARYSCAStop KSCLWCWSAAFHGDPRQWEStop SANDAESGStop RRIRFFANID
 SASQQCRIRQSAGSAFSLRSRSGQFRSFDYPLGCLRCDC EWKSRCGQPIRLFGGIYQFFQRIS
 Stop FAYL

APÊNDICE B

Características das colônias dos *sequence types* (STs) de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* em meio *periwinkle wilt gelrite*. A) ST13 (estirpe U24d); B) ST65 (estirpe BS1); C) ST11 (estirpe T-19/C13) e D) ST70 (estirpe Hib4).

4. PAPEL DA ADESINA XADA2 NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Xylella fastidiosa* EM SUPERFÍCIE DE POLISSACARÍDEOS DO INSETO VETOR E NA TRANSMISSÃO

RESUMO

Xylella fastidiosa é uma bactéria que causa diversas doenças em culturas de interesse econômico de vários países. Sua disseminação é realizada principalmente por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). Sabe-se que para a bactéria ser transmitida com sucesso, ela necessita formar um biofilme sobre a superfície do estomodeu dos vetores. A interação bactéria inseto vetor é específica, e mediada por proteínas de adesão da membrana bacteriana. Medidas que visem interromper essa relação, podem resultar em táticas eficientes de bloqueio da transmissão. Neste trabalho foram realizados vários bioensaios para mostrar que a adesina afimbrial XadA2 é importante para a adesão inicial, e pode ser usada como alvo de bloqueio da formação do biofilme no trato digestivo do inseto. Primeiro foi demonstrado que esta proteína tem afinidade de ligação por polissacarídeos. Sabendo que todo o exoesqueleto dos insetos é constituído basicamente por quitina, asas de cigarrinhas foram utilizadas como substrato de adesão para simular as interações entre *X. fastidiosa* e estomodeu. Através dessa metodologia observou-se que quando as bactérias são cultivadas em meio sem fonte de carbono, elas degradam a quitina da asa, de modo a utilizá-la como fonte de nutrientes e formam o biofilme sobre a superfície quitinosa. Houve uma redução significativa na formação do biofilme por *X. fastidiosa* nas asas, quando foram realizados ensaios de competição, que consistiram no uso da proteína XadA2 sintética, assim como do seu anticorpo específico. Essas moléculas bloquearam a ação dessa proteína resultando na diminuição dos aglomerados bacterianos nas asas. Em testes de transmissão utilizando o sistema de dieta artificial para a entrega da bactéria e do anticorpo anti-xadA2 aos insetos, observou-se uma menor taxa de insetos infectivos, quando o anticorpo estava na dieta. Todavia não foi detectada diferenças nas taxas de transmissão para plantas quando os insetos adquiriram a suspensão bacteriana com e sem o anticorpo. Os resultados mostram que a XadA2 é uma proteína importante para o início da colonização bacteriana no inseto, no entanto, existem várias outras adesinas que influenciam esse processo e também podem ser utilizadas como alvo de bloqueio a partir da metodologia de estudo empregada neste trabalho.

Palavras-chave: Biofilme; Adesinas; Cigarrinhas; Moléculas competidoras; Quitina

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a bacterium that causes various diseases in crops of economic interest in several countries. Its spread is mainly carried out by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). It is known that for the bacterium to be successfully transmitted, it needs to form a biofilm on the foregut

surface of the vectors. The bacterium-insect vector interaction is specific and mediated by bacterial membrane adhesion proteins. Measures aimed at disrupting this relationship can result in efficient transmission blocking strategies. In this work, several bioassays were performed to show that the afimbrial adhesin XadA2 is important for initial adhesion and can be used as a blocking target for biofilm formation in the digestive tract of the insect. Firstly, we have shown that this protein has binding affinity for polysaccharides. Knowing that the whole exoskeleton of insects is constituted basically by chitin, sharpshooter wings were used as an adhesion substrate to simulate the interactions between *X. fastidiosa* and the foregut. By this methodology, it was observed that when the bacteria are cultivated in medium without carbon source, they degrade the chitin of the wing in order to use it as a source of nutrients and form the biofilm on the chitinous surface. There was a significant reduction in *X. fastidiosa* biofilm formation in the wings when competition assays were performed, which consisted of using the synthetic XadA2 protein, as well as its specific antibody. These molecules blocked the action of this protein resulting in the decrease of bacterial aggregations in the wings. In transmission tests using the artificial diet system for the delivery of the bacterium and the anti-XadA2 antibody to the insects, a lower rate of infective insects was observed when the antibody was in the diet. No differences were detected in the rates of transmission to plants when the insects acquired the bacterial suspension with or without the antibody. These results show that XadA2 is an important protein for the initiation of bacterial colonization in the insect, but there are several other adhesins that influence this process and can also be used as a blocking target from the study methodology employed in this work.

Keywords: Biofilm; Adhesins; Sharpshooters; Competing molecules; Chitin

4.1. Introdução

As interações de insetos vetores e patógenos variam desde mecanismos simples de transmissão até interações mais complexas, nas quais os micro-organismos se desenvolvem e se multiplicam dentro de seus vetores (Killiny & Almeida, 2009a). Embora doenças disseminadas por insetos sejam objeto de crescente preocupação na agricultura, a maioria das pesquisas dedicam-se a compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro (planta ou animal), e poucos têm sido os estudos que procuram compreender a interação patógeno-vetor, sendo que o melhor entendimento dessa relação pode resultar na elaboração de medidas eficazes de controle das doenças (Killiny & Almeida, 2009b; Killiny et al, 2012).

Xylella fastidiosa (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) é uma bactéria generalista que causa várias doenças em culturas agrícolas de interesse econômico, com destaque para a clorose variegada dos citros (CVC), mal de Pierce (*Pierce's disease* - PD) em videiras e, mais

recentemente, a síndrome do declínio rápido das oliveiras (Hopkins & Purcell, 2002; Saponari et al, 2014). A disseminação desta bactéria entre as plantas hospedeiras ocorre por meio de insetos conhecidos como cigarrinhas, pertencentes a grupos taxonômicos de Auchenorrhyncha que se especializaram na alimentação em seiva de xilema de plantas, tais como Cicadellinae (Cicadellidae) e Cercopoidea (Redak et al, 2004; Almeida et al, 2005).

Esse fitopatógeno apresenta um modo de vida complexo, pois para ser disseminado com sucesso necessita colonizar com êxito dois ambientes distintos: o estomodeu do inseto, que compreende a parte anterior do trato digestivo, especificamente as regiões do cibário e pré-cibário e os vasos xilemáticos das plantas hospedeiras (Chatterjee et al, 2008; Retchless et al, 2014). A colonização em ambos se dá sob a forma de um biofilme, que é definido como uma matriz fechada de populações microbianas que se aderem umas às outras e às superfícies ou interfaces possuindo um ciclo de desenvolvimento coordenado (De Souza et al, 2004). A formação do biofilme é caracterizada por três fases bem definidas: adesão das células à superfície, maturação do biofilme e por fim o desprendimento das células do biofilme maduro para a colonização de um novo ambiente (Monroe, 2007). Uma característica fundamental do biofilme é a presença de uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), que envolve as células bacterianas proporcionando estrutura e coesividade, mesmo em ambientes sujeitos a forte pressão como é o caso do lúmen do estomodeu do inseto vetor e o xilema das plantas, além de proporcionar proteção contra antibióticos e compostos de defesa da própria planta (Korstgens et al, 2001).

A colonização por biofilme nas plantas ocasiona a obstrução dos vasos xilemáticos, dificultando ou até mesmo bloqueando o transporte de água e nutrientes realizado por esse vaso condutor e, como consequência, há o aparecimento de sintomas de doença que se assemelham aos de deficiência hídrica (Hopkins, 1989; Machado et al, 2007). A formação de biofilme no xilema é considerada o principal mecanismo de patogenicidade desta bactéria (De Souza et al, 2005).

A formação de biofilme por *X. fastidiosa* está intimamente relacionada com os polissacarídeos estruturais presentes nos orifícios dos vasos do xilema, assim como na superfície cuticular do estomodeu do inseto. A bactéria possui enzimas para a degradação desses polissacarídeos, que permitem que a mesma os utilize como fonte de carbono para obtenção de nutrientes para a colônia. Na planta, os polissacarídeos mais comumente utilizados pela bactéria são pectina, glucano e celulose, já no vetor *X. fastidiosa* se utiliza principalmente de quitina, que é um polissacarídeo presente não apenas no trato digestivo, mas em todo exoesqueleto do inseto (Van Sluys et al, 2003; Killiny & Almeida 2009a).

Estudos têm demonstrado que a interação da *X. fastidiosa* com os polissacarídeos do estomodeu dos vetores é específica e mediada por proteínas de adesão (adesinas), presentes na membrana da bactéria (Killiny & Almeida, 2009b). Essas adesinas podem ser de dois tipos: fimbriais (estruturas filamentosas denominadas fimbrias) e afimbriais (apenas projeções na membrana externa da célula) (Hultgren et al, 1993). Com o sequenciamento do genoma da *X. fastidiosa*, revelou-se uma enorme diversidade de genes relacionados à síntese dessas proteínas de adesão (Simpson et al, 2000).

A importância das adesinas para o início da formação do biofilme, assim como para a manutenção da sua arquitetura, tem sido demonstrada em vários trabalhos com a subespécie *fastidiosa* de *X. fastidiosa*, responsável por PD em videiras. Estudos realizados por Killiny e Almeida (2009b) mostraram que estirpes mutantes para duas adesinas afimbriais semelhantes a hemaglutininas (HxfA e HxfB) foram ineficientes na formação de biofilme *in vitro*. Mais tarde, Killiny e Almeida (2014) demonstraram que as adesinas HxfA, HxfB e FimA são fundamentais para a adesão inicial e manutenção do biofilme, visto que mutantes para as mesmas apresentaram redução tanto na aquisição como na retenção bacteriana, o que ocasionou a diminuição da eficiência de transmissão pelos insetos vetores. Labroussaa et al (2016) utilizou o sistema de dieta artificial (Killiny & Almeida, 2009a) para a aquisição pelos insetos de células de *X. fastidiosa* oferecidas juntamente com os peptídeos PD1764 e HxfAD1-3, oriundos de proteínas envolvidas na colonização bacteriana. A aquisição dos peptídeos pelo vetor, resultou na redução significativa da transmissão para plantas, fato que se deve provavelmente a uma competição das células bacterianas e dos peptídeos pelos dos sítios de ligação presentes no inseto.

Com relação ao patossistema da CVC, que tem a subespécie *pauca* como agente causal, a importância de algumas proteínas de adesão tanto fimbriais como PilA2 e PilC, quanto afimbriais como XadA1 e XadA2, foi verificada através da quantificação da expressão dessas proteínas durante as várias fases da formação do biofilme *in vitro* e em planta. Verificou-se que as quatro proteínas se expressavam com diferentes intensidades durante as distintas etapas do biofilme. A diferença temporal na expressão das adesinas indica que esse tipo de proteína pode atuar desde adesão inicial da bactéria até as fases mais tardias da formação do biofilme (Caserta et al, 2010).

Para a subespécie *pauca* não há nenhum estudo que explore o papel das adesinas durante a formação do biofilme no vetor. A falta de trabalhos envolvendo os mecanismos moleculares de adesão bacteriana no inseto se deve em grande parte à dificuldade em estudar a interação da bactéria diretamente no estomodeu, seu sítio natural de adesão. Esta estrutura situa-se no

interior da cabeça do inseto, exigindo cortes histológicos detalhados para sua visualização em microscopia (Killiny & Almeida, 2009a). Considerando que todo o exoesqueleto do inseto é constituído de polissacarídeos estruturais como a quitina, assim como a superfície cuticular do estomodeu, asas de insetos podem ser utilizadas para simular as interações da *X. fastidiosa* com o lúmen do estomodeu. Assim, este trabalho teve por objetivos avaliar a importância da adesina afimbrial XadA2 para a formação de biofilme por *X. fastidiosa* em superfícies de polissacarídeos do inseto vetor, utilizando-se asas de cigarrinhas como substrato de adesão, assim como a influência dessa adesina na aquisição da bactéria em sistema de dieta artificial e na transmissão por cigarrinhas vetoras.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Obtenção de plantas para a criação dos insetos e ensaios de transmissão

Para a criação das cigarrinhas foram produzidas mudas de duas espécies vegetais: *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) e *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae), sendo a primeira delas obtida a partir de estacas de aproximadamente 30-40 cm, que foram plantadas em vasos plásticos de 3 L [15 x 20 cm (altura x diâmetro)] contendo substrato a base de casca de pinus, vermiculita, superfosfato simples e nitrato de potássio (Tropstrato HT Vida Verde, Mogi Mirim-SP). A obtenção de mudas de *O. basilicum* ocorreu por meio do plantio de sementes (Isla Pro sementes, Porto Alegre-SP) em bandejas de isopor contendo o mesmo substrato, e posterior transplantio para vasos de 1,2 L [11 x 14 cm (altura x diâmetro)].

Como planta-teste para os experimentos de transmissão, utilizou-se *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), que se mostrou uma boa hospedeira experimental de *X. fastidiosa* subsp. *pauciflorus* em trabalhos anteriores (Monteiro et al, 2001, Esteves, 2014, Esteves et al, no prelo). Essa espécie vegetal foi semeada em bandejas de isopor contendo o substrato citado acima, sendo transplantada após a emergência para vasos de 1,2 L [11 x 14 cm (altura x largura)] contendo o mesmo substrato descrito acima e utilizada no experimento quando tinha aproximadamente, 10 cm de altura.

Todas as espécies vegetais (*C. roseus*, *O. basilicum* e *V. condensata*) foram produzidas e mantidas casa de vegetação protegida com tela anti-afídeos, onde receberam fertirrigação duas vezes por semana com 0,08 g/L de nitrato de amônia (33% N, 1% K) e 0,91 g/L de nitrato de cálcio (15,5% N, 18 % Ca); e uma vez por semana com 0,33 g/L de sulfato de magnésio (1% K₂O, 11,8% S, 9% Mg); 0,36 g/L de nitrato de potássio (12% N, 43% K₂O, 1% S, 1% Mg);

0,14 g/L de fosfato monoamônico (12% N, 61% P₂O₅); 0,09 g/L de ferro (5 % Fe orto-orto, 6% quelato de Fe EDTA); 0,03 g/L de sulfato de cobre (24% Cu, 11% S) e 0,02 g/L de sulfato de zinco (20% Zn, 10% S).

4.2.2. Criação das cigarrinhas

Como insetos vetores, utilizaram-se as cigarrinhas *Bucephalonia xanthophis* (Berg), *Macugonalia leucomelas* (Walker) e *Sibovia sagata* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae), que foram coletadas em arbustos e árvores [*Lagerstroemia indica* L. (Lythraceae), *Duranta repens* L. (Verbenaceae), *V. condensata*, e *Hibiscus* spp (Malvaceae)] em Piracicaba-SP e Tatuí-SP. Cerca de 50-60 indivíduos adultos de cada espécie foram colocados em gaiolas [32 × 32 cm (base) × 50 cm (altura)] revestidas com tela anti-afídica, utilizando-se plantas de *V. condensata* para a criação (oviposição e desenvolvimento) de *B. xanthophis* conforme descrito por Marucci et al (2003) e plantas de *O. basilicum* para *M. leucomelas* e *S. sagata*. As gaiolas foram mantidas em casa de vegetação equipada com sistema de resfriamento do tipo *pad-fan* e aquecedor ativados por termostato para controle de temperatura (25 ± 5 °C). Considerando-se que *O. basilicum* é uma planta hospedeira de *X. fastidiosa* (Esteves, 2014), para garantir que as cigarrinhas utilizadas nos testes de transmissão estavam livres de *X. fastidiosa*, os adultos de *M. leucomelas* e *S. sagata* coletados em campo e confinados sobre *O. basilicum* foram retirados após uma semana, deixando-se sobre as plantas apenas os ovos. Após a eclosão das ninfas, as mesmas foram transferidas para plantas sadias de *O. basilicum*, sendo utilizados para os experimentos os adultos resultantes da segunda geração. No caso dos insetos que tiveram contato com *V. condensata*, planta previamente comprovada como não hospedeira da bactéria (Marucci et al, 2003), os adultos da primeira geração foram utilizados nos experimentos.

4.2.3. Estirpes de *X. fastidiosa*

Para os ensaios foram utilizadas duas estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* provenientes de citros: 9a5c (Simpson et al, 2000) e 11399 (Coletta-Filho et al, 2001), sendo esta última transformada por Niza et al (2015) através de eletroporação usando o vetor pKLN59 com os genes para a expressão da *green fluorescent protein* (GFP) (Newman et al, 2003) e de resistência a canamicina. Ambas as estirpes, que estavam mantidas a -80 °C na coleção de

bactérias do Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ (Instituto Agronômico, Cordeirópolis-SP), foram recuperadas em meio de cultivo *Periwinkle wilt gelrite* (PWG) (Hill & Purcell, 1995), sendo que para a estirpe 11399-GFP, o meio foi acrescido de canamicina (50 µg/mL). As colônias bacterianas cresceram nos seus respectivos meios por aproximadamente 15 dias.

4.2.4. Obtenção da proteína XadA2 e seu anticorpo específico

A construção utilizada para a expressão de uma região hidrofílica e de alta antigenicidade da proteína XadA2 foi desenvolvida por Caserta et al (2010), sendo a mesma utilizada em trabalhos anteriores, onde se desenvolveu anticorpos contra a região de interesse da proteína. Ambos, construção e anticorpo específico contra essa proteína denominado anti-XadA2, foram gentilmente cedidos por Caserta et al (2010) para a realização deste trabalho.

Para a realização dos experimentos, as células bacterianas foram recuperadas em meio de cultura *Lúria Bertani* (LB) sólido, contendo 50 µg/mL do antibiótico canamicina. Após 24 horas de crescimento, as colônias contendo o plasmídeo de interesse foram selecionadas das placas de cultivo e colocadas em *erlenmeyer* com o mesmo meio LB líquido. As colônias foram colocadas para crescer em sob agitação de 200 rpm a 37 °C, até que atingissem uma densidade óptica (DO) de 0,6 nm. Após o período de crescimento bacteriano, foi realizada a indução da proteína alvo utilizando 1mM de IPTG e rotação de 200 rpm a 37 °C por 4 horas. O meio foi centrifugado por 20 min a 5000 rpm a uma temperatura de 9 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em tampão (Tris 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,5). O rompimento celular teve início com a adição de 1 mM de lisozima e 1 mM do inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), seguido da quebra mecânica em gelo utilizando um disruptor de células ultrassônico, segundo especificações do fabricante (Unique, Indaiatuba, SP). Os restos celulares e proteínas insolúveis, chamados de fase insolúvel do extrato, e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis do extrato, chamado de fase solúvel, foram separados por meio de centrifugação a 12.000 rpm a 4 °C por 10 min. O padrão da expressão da proteína XadA2 nas amostras foi monitorado através de gel SDS-PAGE na concentração de 12%. O gel foi corado em solução contendo *coomassie brilliant R-250* e descorado em solução feita a partir de metanol e ácido acético.

As proteínas que estavam na fração solúvel foram purificadas através do método de cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna carregada com níquel, seguindo o procedimento descrito por Caserta et al (2010). Frações resultantes do processo de purificação foram analisadas através de gel SDS-PAGE, e a concentração de proteínas foi estimada através

do equipamento *Varioskan LUX Multimode Microplate reader* (Thermo Fisher Scientific) utilizando um ensaio de solução de proteína (Bio-Rad; *Bradford solution*), comparando os resultados com uma curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas de BSA ($R^2 = 0,9657$).

Como as amostras estavam eluidas em tampão contendo imidazol, reagente que pode influenciar os resultados dos bioensaios, foi necessário realizar um processo de remoção deste químico utilizando o kit coluna-Amicon® Ultra-0.5 filter devices (Millipore) seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.5. Ensaio *in vitro* de afinidade da proteína XadA2 por carboidratos

Este ensaio foi conduzido no laboratório “*Ecology of Insect-borne Plant Diseases*” da Universidade da Califórnia em Berkeley, EUA, e teve como objetivo demonstrar experimentalmente que o fragmento da proteína XadA2 utilizado nesse trabalho, tem de fato afinidade por polissacarídeos que compõem os vasos do xilema da planta e o estomodeu do inseto. Para isso, utilizou-se quitina coloidal (Sinapse-Inc, Miami, FL) como polissacarídeo do vetor e celulose (Sinapse-Inc, Miami, FL) representando os polissacarídeos da planta.

Primeiramente, os carboidratos foram ressuspensos em tampão (KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 2 mM, pH 7) para produzir soluções estoque de 10 mg/mL, que foram agitadas continuamente para obter uma suspensão uniforme. Em seguida, cada polissacarídeo na concentração de 1 mg/mL foi colocado em microtubos juntamente com 50 $\mu\text{g/mL}$ da proteína XadA2. Como controle deste experimento foi utilizada a proteína BSA, a qual também foi incubada separadamente com ambos polissacarídeos (celulose e quitina coloidal). Com o intuito de normalizar os resultados, cada proteína foi colocada em microtubos na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ sem a presença dos polissacarídeos, sendo no final mensurado a concentração de proteínas quando não há interação das mesmas com o substrato.

Todas as amostras foram incubadas por 1 hora em *shaker* vertical (*tube rotator*, a Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) a uma temperatura de 4 °C a 60 rpm. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi retirado para a quantificação das proteínas remanescentes, ou seja, aquelas que não aderiram ao substrato. A quantificação foi realizada através em equipamento *Varioskan LUX Multimode Microplate reader*, como já descrito no item 4.2.4. O ensaio foi conduzido em dois blocos completamente aleatorizados com três replicatas em cada bloco (n=6).

4.2.6. Ensaio de agregação celular

Para observar se a região da proteína XadA2 utilizada neste trabalho exerce alguma influência na capacidade de agregação da bactéria, a estirpe 11399-GFP foi repicada 2 vezes em meio PWG sólido contendo canamicina, e após 7 dias de crescimento bacteriano, as células foram coletadas com alça de platina e ressuspensas em meio Xfm líquido sem fonte de carbono. Uma alíquota foi retirada para a quantificação da DO, sendo esta considerada o tempo zero (T0). Em seguida, cerca de 3 mL da suspensão celular foi separada em um tubo falcon e foi acrescentado a proteína XadA2 sintética na concentração de 10 µg/mL, o mesmo volume da suspensão bacteriana foi aliquoteado em outro tubo falcon, sem a adição da proteína. A cada 1 hora, durante um período de seis horas, foram retiradas alíquotas de 150 µL da parte superior da suspensão, sem perturbar os tubos. Essas alíquotas foram utilizadas para a determinação da DO_{600nm}. Este experimento foi constituído de três repetições biológicas independentes.

4.2.7. Formação de biofilme em asas de cigarrinhas

Para adaptar a metodologia de observação do biofilme de *X. fastidiosa* no inseto vetor, foram realizados testes iniciais que envolveram três espécies de cigarrinhas: *B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *S. sagata*. Asas posteriores dessas espécies foram utilizadas como substrato experimental para simular as interações das células bacterianas com a superfície do estomodeu do inseto. As asas foram retiradas com o auxílio de pinças e lâminas cortantes, e submetidas a um processo de desinfecção, o qual consistiu nas seguintes etapas: álcool 70% por 2 min, hipoclorito 30% por 2 min e 3 lavagens em água destilada autoclavada por 2 min cada. Após a assepsia, as asas foram colocadas separadamente de acordo com a espécie em microtubos contendo 500 µL de *Xylella fastidiosa* medium (Xfm) (Almeida et al, 2004) sem suas fontes de carbono (succinato de sódio e citrato de sódio), com a estirpe 11399-GFP ressuspensa a uma DO_{600nm} de 0,6. Foram feitas 10 asas para cada espécie de cigarrinha. Como controle negativo do experimento, três asas de cada espécie de cigarrinha foram colocadas separadamente em microtubos contendo apenas 500 µL do meio Xfm sem células de *X. fastidiosa*. As asas ficaram imersas nos seus respectivos tratamentos durante 10 dias a 28 °C. Após a incubação, as asas foram imersas 2 vezes em microtubos contendo água destilada, com o intuito de remover as células que não estavam de fato aderidas ao substrato. Em seguida, foram montadas lâminas das asas, as quais tiveram sua fluorescência avaliada por meio de lupa de fluorescência Olympus MVX10 (Olympus Life Science) com filtro para GFP, em aumento de 40x no Centro

de Citricultura ‘Sylvio Moreira’. Os controles de cada espécie foram observados quanto à emissão de autofluorescência pelas estruturas da asa, e as asas embebidas em suspensão bacteriana, foram visualizadas para a determinação da fluorescência emitida pela formação de biofilme por *X. fastidiosa*-GFP.

As imagens obtidas pela lupa de fluorescência foram analisadas através do software Quant v.1.0.0.22 (Fernandes Filho et al, 2002), o qual permite diferenciar a área fluorescente do restante da asa.

4.2.8. Utilização da quitina como fonte de carbono

Para demonstrar que *X. fastidiosa* consegue obter sua fonte de carbono através da asa da cigarrinha vetora, a qual é rica em polissacarídeos, principalmente a quitina, realizou-se um ensaio comparando-se asas posteriores de *M. leucomelas* como superfície biótica e fragmentos de lamínulas representando uma superfície abiótica como substrato de adesão. Primeiramente, as asas e lamínulas foram esterilizadas em álcool, hipoclorito e água destilada como descrito acima. Células de *X. fastidiosa*-GFP que estavam crescendo em meio PWG com canamicina, foram raspadas das placas com alça de platina e ressuspensas em meio Xfm sem fonte de carbono até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. Em um microtubo foi colocado 500 μ L do meio contendo a bactéria, juntamente com 10 asas. Em um outro microtubo adicionou-se à suspensão bacteriana 10 pedaços de lamínulas. Como controle deste experimento, três asas e três lamínulas foram colocadas em microtubos contendo apenas 500 μ L do meio Xfm. Todos os tratamentos ficaram incubados por 10 dias a 28 °C. Após a incubação, cinco representantes de cada tratamento foram observados através de lupa de fluorescência, sendo que antes da visualização, as superfícies bióticas e abióticas passaram por duas lavagens em água destilada para remoção das células planctônicas, ou seja, as células que não haviam se aderido. Os outros cinco representantes dos tratamentos contendo a bactéria, foram plaqueados em meio de cultura PWG sólido com canamicina (50 μ g/mL), a fim de quantificar as células que se mantiveram vivas durante esse período através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), que foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico com aumento de 4x (Motic SMZ-168-TL).

4.2.9. Bloqueio da adesão de *X. fastidiosa* em asas do inseto vetor

Com o intuito de avaliar a importância da adesina XadA2 para o início da formação do biofilme no vetor, foram realizados dois tipos de testes: ensaio de saturação, utilizando sintéticos da adesina XadA2 e ensaio de bloqueio, usando o anticorpo anti-XadA2. O ensaio de saturação consistiu no uso de sintéticos de XadA2 para saturar os sítios de ligação da proteína presentes na asa do inseto (Figura 1C). Já no ensaio de bloqueio, utilizou-se o anticorpo, para o mesmo se ligar às proteínas XadA2 presentes na membrana da bactéria de modo a impedir a ligação das adesinas aos polissacarídeos da asa (Figura 1D).

Figura 1. Bloqueio da formação de biofilme por *Xylella fastidiosa* em superfície de polissacarídeos do inseto vetor através de moléculas competidoras. A) asa de cigarrinha, B) ligação de células de *X. fastidiosa* à quitina da asa, C) XadA2 sintética saturando os sítios de ligação da quitina presente na asa e impedindo a adesão da bactéria e D) ligação do anticorpo anti-xadA2 às proteínas XadA2 presentes na membrana da bactéria, bloqueando a ligação dessas adesinas à superfície quitinosa.

4.2.9.1. Ensaio de saturação

Asas posteriores da cigarrinha *M. leucomelas* foram cuidadosamente retiradas com auxílio de uma lâmina e pinça, e submetidas ao processo de desinfecção já descrito no item 4.2.7. Após a esterilização, as asas foram divididas nos seguintes tratamentos: I) asas que ficaram por 4 horas incubadas com a proteína XadA2 (10 µg/ml) a 28 °C, sendo após esse período adicionado o meio Xfm líquido sem sua fonte de carbono contendo *X. fastidiosa*-GFP (DO 600_{nm} = 1); II) asas + meio Xfm com Xf-GFP (DO 600_{nm} = 1) (controle positivo) e III) asas + meio Xfm (controle negativo). Todos os tratamentos contaram com 10 repetições e ficaram incubados por 10 dias a 28 °C para o crescimento bacteriano.

Após a incubação, as asas foram imersas 2 vezes em microtubos contendo água destilada para a remoção das células planctônicas, sendo em seguida realizada a montagem das lâminas, as quais tiveram sua fluorescência avaliada por meio de lupa de fluorescência com filtro para GFP. As Imagens obtidas foram analisadas através do software Quant v.1.0.0.22 como já descrito anteriormente.

4.2.9.2. Ensaio de bloqueio

Neste ensaio também foram utilizadas asas posteriores da espécie de cigarrinha *M. leucomelas* como substrato de adesão. As asas foram retiradas dos insetos e submetidas ao processo de esterilização já descrito nos demais bioensaios. A estirpe 11399-GFP que estava crescendo por 7 dias (2-3 repiques) em meio PWG com canamicina, foi raspada das placas com auxílio de alça de platina e ressuspensa em meio Xfm líquido sem fonte de carbono até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. Metade da suspensão celular (500 µL) foi colocada em um microtubo contendo apenas as asas, representando o controle positivo, no restante da suspensão bacteriana, foi adicionado as asas e o anticorpo anti-XadA2 na concentração 2:1000. Foram realizadas 10 repetições (asas) para cada tratamento, e o controle negativo do experimento consistiu de três asas que foram incubadas apenas com o meio Xfm. Todos os tratamentos ficaram incubados a 28 °C durante 10 dias. Após esse período, as asas foram lavadas e observadas em lupa de fluorescência como já descrito anteriormente. A quantificação da área fluorescente foi feita do mesmo modo que no item 4.2.7.

4.2.10. Bloqueio da aquisição e transmissão de *X. fastidiosa* pelo anticorpo anti-XadA2

Este experimento teve como objetivo perturbar a interação específica entre *X. fastidiosa* e o inseto vetor por meio do anticorpo anti-XadA2, e consequentemente diminuir a eficiência de aquisição e transmissão da bactéria por cigarrinhas. Para isso, a estirpe 9a5c que foi recuperada em meio PWG, foi repicada 2 vezes em meio Xfm, onde permaneceu 10-12 dias a 28 °C. Após o crescimento bacteriano nesse meio, as colônias foram raspadas com alça de platina e ressuspensas em dieta artificial (0,7 mM L-glutamina, 0,1 mM L-asparagina, 1 mM citrato de sódio, pH 6,4) (Killiny & Almeida, 2009a), sendo que a concentração bacteriana foi ajustada para 10^8 UFC/mL ($DO_{600} = 0,6$).

A dieta contendo a bactéria foi oferecida às cigarrinhas da espécie *M. leucomelas* após um período de jejum de 1 hora. A entrega da dieta contendo as células bacterianas se deu através de um sistema de sachês, que consistiu de frascos plásticos com aproximadamente 1 cm de diâmetro e 3 cm de comprimento. Cada sachê era aberto nas duas extremidades e coberto na parte superior com uma camada de parafilme (Parafilm®), sobre a qual era depositada uma gota de 35 µL da suspensão celular, sendo em seguida recoberta por outra camada de parafilme. Pela extremidade inferior eram colocadas as cigarrinhas, 1 indivíduo por sachê, e posteriormente a mesma era fechada com uma rolha para impedir que os insetos escapassem (Figura 2).

Figura 2. Sachê utilizado para a aquisição de células de *Xylella fastidiosa* pela cigarrinha *Macugonalia leucomelas*.

Este experimento foi conduzido em blocos completamente aleatorizados, sendo cada bloco repetido três vezes no tempo. A cada realização foram utilizados 20 insetos ($n = 60$) para os tratamentos: I) sachês com a dieta e *X. fastidiosa* (controle positivo) e II) sachês contendo *X. fastidiosa* e o anticorpo anti-XadA2 (2:1000). Como controle do experimento, a cada bloco 10

insetos foram colocados para se alimentar de sachês contendo apenas dieta artificial (sem células de *X. fastidiosa*). Os insetos permaneceram em contato com seus respectivos tratamentos por um período de acesso à aquisição (PAA) de 6 horas, em ambiente com luz artificial (150 W) e temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após o PAA, os insetos oriundos de cada tratamento foram divididos em duplas e colocados em plantas saudáveis de *C. roseus* para o período de acesso à inoculação (PAI) da bactéria de 72 horas. O confinamento nas plantas-teste se deu através de gaiolas plásticas do tipo *clipcage* ($5,5 \times 4\text{ cm}$) (modelo G320, Gary Plastic Packaging Corp., New York, NY) contendo uma abertura circular com tela anti-afídica para a ventilação. Durante o PAI, as plantas ficaram mantidas em sala com condições controladas [$25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 14 horas de fotoperíodo sob luz fluorescente (150W)]. Após o término do experimento, os insetos foram colocados em microtubos e acondicionados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises moleculares. Já as plantas tiveram as folhas que ficaram em contato com os insetos marcadas com caneta permanente, com o intuito de maximizar as chances de detecção da bactéria, e foram levadas para casa de vegetação coberta com tela anti-afídica, onde permaneceram até a data de avaliação.

Para a obtenção dos dados de aquisição, após o PAI as cigarrinhas tiveram suas cabeças retiradas com auxílio de lâminas cortantes e submetidas a extração dos ácidos nucleicos através do protocolo a base de CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Roger & Bendich, 1988). Em seguida os extratos de DNA foram quantificados em espectrofotômetro Epoch (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT), sendo as concentrações de DNA padronizadas entre 20-100 ng/ μL para a posterior reação de cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A reação de amplificação utilizou o conjunto de primers XF16Sf/XF16Sr (Li et al, 2013) combinado com o master mix qPCR Maxima SYBR green/ROX (2x) (Thermo Fisher Scientific, SP), e foi conduzida no equipamento ViiA7 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), programado com um ciclo inicial de desnaturação a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s e anelamento/extensão a $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s. Cada reação contou com um controle positivo (inseto sabidamente positivo) e um controle negativo (água Milli-Q®), sendo que todas as amostras foram analisadas em duplicatas. Uma curva padrão foi construída a partir da diluição seriada (10^{-1} - 10^{-9}) do DNA extraído diretamente das colônias de *X. fastidiosa* (676 ng/ μL) em DNA total de cabeças de cigarrinhas saudáveis como proposto por Francis et al (2006). Essas diluições padronizadas foram usadas para estabelecer uma curva de calibração relacionando o valor do *cycle threshold* (CT) (eixo y) contra o $\log_{10}$ do número de cópias do gene 16S rRNA (eixo x). A relação foi obtida entre o valor de CT e a quantidade de

cópias do gene 16S rRNA, indicado pela equação de regressão $y = -3.426 \times \log(16S \text{ rRNA número de cópias}) + 35,05$, $R^2 = 0,997$. Baseando-se nos valores obtidos a partir da curva padrão, foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram valor de $CT \leq 30$.

A eficiência de transmissão foi obtida através da avaliação das plantas-teste de *C. roseus* com 30-60 dias após o término do experimento. Cerca de 4-5 folhas foram coletadas para a extração de DNA, que seguiu o protocolo descrito por Murray & Thompson (1980). Para a reação de amplificação dos ácidos nucleicos foi utilizado *Dream Taq PCR Master Mix* (Thermo Scientific, São Paulo, SP), e o conjunto de oligonucleotídeos RST31/RST33 (Minsavage et al, 1994). Cada reação continha dois controles positivos (DNA de plantas que já haviam sido diagnosticados como positivos em PCRs anteriores) e dois controles negativos, sendo um representado por água Milli-Q® e o outro pelo DNA de uma planta sadia. A PCR ocorreu em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, EUA) programado com 1 ciclo inicial de 94° C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, seguido de extensão a 72 °C por 45 s; e um 1 ciclo de 72 °C por 10 min.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram corados com corante a base de azul de bromofenol (0,25%) e foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% suplementado com 4 µl de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV e documentados no sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

4.2.11. Análises estatísticas

Os valores obtidos para área fluorescente nos experimentos de formação de biofilme nas asas (4.2.7) e de bloqueio da formação do biofilme com o uso de proteínas sintéticas (4.2.9.1) e do anticorpo (4.2.9.2), foram analisados baseando-se em dados de proporções, cujos valores foram transformados em $\text{Arcoseno}\sqrt{x}$ para que apresentassem distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Os dados transformados foram submetidos à análise de variância e teste F ($\alpha=0,05$) para a verificação de diferenças entre os tratamentos. Em seguida procedeu-se a comparação de médias por meio do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Nos experimentos de utilização de quitina como fonte de carbono (4.2.8) e no da influência do uso do anticorpo anti-XadA2 na eficiência de aquisição e transmissão de *X. fastidiosa* por *M. leucomelas* (4.2.10), os dados obtidos para fluorescência e UFC/mL no primeiro experimento, assim como os dados de aquisição e transmissão do segundo foram submetidos ao teste *t* de Student ($\alpha=0,05$), sendo os valores em proporção previamente

transformados por meio de $\text{Arcoseno}\sqrt{x}$. Para a obtenção dos dados de transmissão por indivíduo as probabilidades foram estimadas como descrito por Swallow (1985). O mesmo procedimento foi adotado para a análise do experimento de agregação celular (4.2.6). No entanto, para este caso foram calculadas as médias dos valores de densidade óptica em cada tempo de avaliação (0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 min) e estes foram comparados entre os tratamentos para cada avaliação.

Com relação ao experimento de afinidade da proteína XadA2 por polissacarídeos (4.2.5), os valores obtidos para a quantidade de proteína remanescente no sobrenadante não atendiam os pressupostos necessários para a análise de variância tradicional, sendo, portanto, utilizados os modelos lineares generalizados (*generalized linear models* - GLM), aplicando-se o teste de qui-quadrado ($\alpha = 0,05$), para verificação de diferenças entre os tratamentos e o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), para a comparação de médias, por meio do pacote multcomp (Hothorn et al, 2008).

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) para verificação da normalidade, sendo que todos os procedimentos estatísticos foram realizados no programa computacional R Studio (R Studio team, 2016).

4.3. Resultados

4.3.1. Ensaio *in vitro* de afinidade da proteína XadA2 por polissacarídeos

Os resultados demonstram que o fragmento da proteína XadA2 de *X. fastidiosa* utilizado neste trabalho, tem de fato afinidade aos polissacarídeos de ambos hospedeiros, planta e inseto. Quando a XadA2 ficou incubada com celulose a concentração de proteína remanescente foi de 3,65%. Outro polissacarídeo testado foi quitina, e após incubação com XadA2 a concentração de proteína remanescente foi de 4,70%. Essas concentrações de proteínas remanescentes após incubação com polissacarídeos são baixas quando se comparada à concentração após incubação apenas em tampão, que foi de 43,15% (Figura 3) ($X^2 = 530,69$; g.l = 5; $P < 0,0001$). A pequena concentração da XadA2 no sobrenadante, indica que a maior parte das proteínas ficaram aderidas aos substratos utilizados. Já quando foi utilizado a proteína inespecífica BSA, a concentração de proteína remanescente ao final do experimento, foi estatisticamente igual para celulose (42,36%), quitina (44,09%) e controle sem polissacarídeo (39,34%).

Figura 3. Afinidade da adesina afimbrial XadA2 de *Xylella fastidiosa* por polissacarídeos. Porcentagem média ($\pm$ EPM) da quantidade das proteínas XadA2 e BSA remanescentes no sobrenadante após a incubação com os polissacarídeos celulose e quitina e com o tampão sem polissacarídeos (controle). Médias seguidas de letras iguais, para cada proteína, não diferem estatisticamente entre si pelo teste qui-quadrado ($P < 0,0001$).

4.3.2. A proteína XadA2 e a capacidade de agregação de *X. fastidiosa*

Ao observar a capacidade de auxílio da proteína XadA2 na adesão célula-célula de *X. fastidiosa*, verificou-se que a adição da proteína sintética não influenciou a formação de agregados celulares pela bactéria, visto que não houve diferença nos valores de absorbância obtidos durante as 6 horas de avaliação do meio Xfm contendo apenas *X. fastidiosa* e do meio Xfm contendo a bactéria e a proteína (Figura 4) ($P > 0,05$).

Figura 4. Influência da adesina XadA2 sobre a capacidade de agregação de *Xylella fastidiosa*. Valores médios ($\pm$ EPM) de absorvância encontrados quando *X. fastidiosa* ficou incubada com ou sem a proteína XadA2 sintética.

4.3.3. Formação de biofilme em asas de cigarrinhas

Através das imagens obtidas por lupa de fluorescência, pôde-se observar que as asas das três espécies testadas apresentaram autofluorescência, principalmente na região de inserção da asa ao tórax do inseto (Apêndice A). Quando foi quantificado esse parâmetro para cada espécie, verificou-se que *B. xanthophis* apresentou maior área com autofluorescência (2,52%) que *M. leucomelas* (0,95%) e *S. sagata* (0,26%) (Figura 5) ($F = 5,62$; g.l. = 2; $P = 0,018$). No entanto, a autofluorescência emitida pela asa não interferiu na visualização do biofilme, visto que o software utilizado foi capaz de distinguir as diferentes intensidades de fluorescência nas asas. As imagens também mostraram que as três espécies de cigarrinhas propiciaram a formação do biofilme por *X. fastidiosa* (Apêndice A). Todavia houve diferença nas áreas de fluorescência emitida pelos agregados bacterianos entre as espécies. *M. leucomelas* apresentou a maior área com biofilme (20,96%), já *B. xanthophis* e *S. sagata* tiveram áreas de 6,42 e 5,15% respectivamente (Figura 5) ($F = 7,88$; g.l. = 2; $P = 0,006$).

Figura 5. Porcentagem média ($\pm$ EPM) das áreas de autofluorescência das asas posteriores de três espécies de cigarrinhas (*Bucephalogonia xanthophis*, *Macugonalia leucomelas* e *Sibovia sagata*) e das áreas fluorescentes resultado da formação do biofilme por *Xylella fastidiosa* da estirpe 11399 modificada com *green fluorescent protein* sobre as asas. As letras minúsculas indicam comparação entre as médias das áreas de autofluorescência de *B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *S. sagata*, e as letras maiúsculas indicam a comparação das médias das áreas de fluorescência do biofilme entre as mesmas espécies de cigarrinhas, sendo que médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3.3. Utilização da quitina como fonte de carbono

A comparação entre o biofilme formado por *X. fastidiosa* quando exposta ao meio Xfm sem fonte de carbono, contendo asas da cigarrinha *M. leucomelas* como superfície biótica e fragmentos de lamínulas como superfície abiótica para adesão, demonstrou que houve uma maior aderência, e conseqüentemente maior quantidade de aglomerados bacterianos, sobre as asas do que em lamínulas (Apêndice B). O valor médio estimado para a área fluorescente nas asas foi de 16,26%. Já para as lamínulas, a área fluorescente foi de 2% (Figura 6) ($T = 3,11$; g.l. = 5,09; $P = 0,025$). Com relação aos controles negativos desse experimento, superfícies biótica e abiótica expostas apenas ao meio Xfm sem células bacterianas, houve maior valor de área com autofluorescência (0,63%) para asas do que para as lamínulas (0,07%) ($T = 6,83$; g.l. = 3,63; $P = 0,003$). O plaqueamento das células de *X. fastidiosa*, que se mantiveram vivas ao final do período de incubação de 10 dias com a superfície biótica e abiótica, demonstrou que houve um maior número de UFC/mL quando as células bacterianas ficaram em meio contendo as asas ($2,4 \times 10^4$), do que quando ficaram incubadas com os fragmentos de lamínulas ($3,9 \times 10^3$) ($T = 5,83$; g.l. = 5,51; $P = 0,001$), o que mostra que a bactéria conseguiu utilizar a quitina da asa como fonte de nutrientes.

Figura 6. Porcentagem média ($\pm$ EPM) das áreas de autofluorescência das asas da cigarrinha *Macugonalia leucomelas* e de fragmentos de lamínulas, assim como das áreas fluorescentes resultado da formação de biofilme por *Xylella fastidiosa* da estirpe 11399, contendo *green fluorescent protein* na superfície biótica, representada pelas asas e superfície abiótica (lamínula). Letras minúsculas indicam comparação entre as médias de fluorescência do biofilme entre asa e lamínula. Letras maiúsculas indicam a comparação de médias da área de autofluorescência entre os tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$).

4.3.4. Bloqueio da adesão de *X. fastidiosa* através da saturação dos sítios de ligação na asa do inseto

Houve uma menor quantidade de aglomerados bacterianos nas asas das cigarrinhas quando estas ficaram primeiramente incubadas por 4 horas com a proteína XadA2 sintética, antes de serem colocadas em meio Xfm contendo *X. fastidiosa*-GFP em relação as asas que foram incubadas simultaneamente com o meio Xfm e as células bacterianas (controle positivo) (Apêndice C). Quantificou-se maior área fluorescente (49,74%) resultante da formação do biofilme por *X. fastidiosa* nas asas sem a adição da proteína como agente competidor (controle positivo), do que no tratamento em que as asas foram primeiro saturadas com as proteínas sintéticas para depois serem expostas a suspensão bacteriana (11%) (Figura 7) ($F = 17,03$; $g.l = 2$; $P < 0,001$). Não houve diferença estatística no tratamento contendo a proteína sintética e o controle negativo.

Figura 7. O uso da proteína XadA2 sintética de *Xylella fastidiosa* como agente competidor pelos sítios de ligação do inseto. Porcentagem média ($\pm$ EPM) da área de autofluorescência das asas posteriores de *Macugonalia leucomelas*, e da área fluorescente resultado da formação do biofilme por *Xylella fastidiosa* estirpe 11399 contendo *green fluorescent protein* em asas submetidas apenas ao meio *Xylella fastidiosa medium* (Xfm) e em asas incubadas primeiramente com a proteína XadA2 sintética e em seguida com o meio Xfm contendo a bactéria. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3.5. Bloqueio da adesão de *X. fastidiosa* através do uso do anticorpo contra a proteína XadA2

Ao utilizar o anticorpo anti-XadA2 para atuar contra as proteínas XadA2 presentes na membrana da bactéria, observou-se uma menor intensidade do biofilme no tratamento contendo asas imersas em meio Xfm com *X. fastidiosa* e o anticorpo, do que quando se incubou apenas as asas com o meio contendo *X. fastidiosa*-GFP (Apêndice D). A área correspondente a região com fluorescência emitida pelo biofilme no tratamento em que foi utilizado o anti-XadA2 foi de 0,61%, diferindo estatisticamente do tratamento contendo apenas asas em meio Xfm com *X. fastidiosa* (controle positivo) (13,4%) ($X^2 = 16,343$, g.l = 2; $P < 0,001$). O tratamento com a adição do anticorpo não diferiu estatisticamente da área de autofluorescência do controle negativo do experimento (Figura 8).

Figura 8. Uso do anticorpo específico para a inativação da proteína XadA2 de *Xylella fastidiosa*. Porcentagem média ($\pm$ EPM) da área de autofluorescência das asas posteriores de *Macugonalia leucomelas*, e da área fluorescente resultado da formação do biofilme por *Xylella fastidiosa* estirpe 11399 contendo *green fluorescent protein* em asas submetidas apenas ao meio *Xylella fastidiosa* medium (Xfm) e em asas incubadas juntamente com células bacterianas e o anticorpo anti-XadA2. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3.6. Influência do uso do anticorpo anti-XadA2 na eficiência de aquisição e transmissão de *X. fastidiosa* por *M. leucomelas*

A eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* *in vitro* por *M. leucomelas*, foi significativamente afetada quando foi adicionado o anticorpo anti-XadA2 à dieta contendo células bacterianas ($F = 101,1$; $g.l = 2$; $P = 0,001$) (Tabela 1). Em insetos que se alimentaram de dieta apenas com *X. fastidiosa*, a taxa de aquisição, dada pela porcentagem de indivíduos positivos por qPCR, foi de 56,29%. Já as cigarrinhas que foram submetidas à alimentação em dieta contendo *X. fastidiosa* e o anticorpo específico contra a proteína XadA2 (anti-XadA2), apresentaram menor taxa de aquisição por indivíduo (18,4%) (Tabela 1). Por outro lado, quando foi avaliado a influência do anticorpo na transmissão de *X. fastidiosa* por *M. leucomelas*, não foi observada diferença estatística entre as taxas de plantas positivas obtidas por PCR entre os tratamentos: dieta e células bacterianas (20%) e dieta contendo bactéria e o anticorpo (6,67%) (Tabela 1) ($T = -1,8412$; $g.l = 3$; $P = 0,148$). Quando foi estimado a taxa de transmissão por inseto, também não foi detectada diferença estatística entre os tratamentos, sendo obtidos valores médios de 10,67% para as cigarrinhas que se alimentaram em dieta contendo apenas com as células bacterianas e 3,42% para aquelas que ficaram expostas à dieta com bactérias e o anticorpo anti-XadA2 (Tabela 1) ($T = -1,8585$; $g.l = 3,6125$; $P = 0,1459$). Não foi detectada

a presença de *X. fastidiosa* em nenhum inseto que se alimentou de dieta artificial livre de células bacterianas (controle negativo), e em nenhuma planta em que esses indivíduos se alimentaram.

Tabela 1. Influência do anticorpo anti-XadA2 na eficiência de aquisição e transmissão de *Xylella fastidiosa* por *Macugonalia leucomelas*.

Tratamento	Taxa de aquisição ¹ (%)	Plantas infectadas ² (%)	Transmissão por indivíduo ³ (%)
Dieta + <i>X. fastidiosa</i>	56,29 ± 6,7 a ⁴	20,00 ± 5,8 a	10,67 ± 3,2 a
Dieta + <i>X. fastidiosa</i> + anti-xadA2	18,40 ± 2 b	6,67 ± 3,3 a	3,42 ± 1,7 a

¹Taxa de aquisição obtida sobre um total de 60 insetos avaliados por qPCR em cada tratamento

²Proporção de plantas positivas para *X. fastidiosa* por PCR (n = 30)

³Taxa de transmissão por indivíduo (n = 60) estimada de acordo com Swallow (1985)

⁴Médias iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste *t* de Student (*P* = 0,05)

4.4. Discussão

O sucesso da transmissão de *X. fastidiosa* por insetos vetores depende da capacidade da bactéria colonizar o estomodeu do inseto vetor e o xilema da planta hospedeira (Chatterjee et al, 2008). A colonização bacteriana em ambos, ocorre sob a forma de um biofilme, o qual apresenta três fases bem definidas: adesão das células aos polissacarídeos que revestem a superfície dos hospedeiros, multiplicação bacteriana e maturação do biofilme e por fim a dispersão das células do biofilme maduro a fim de colonizar uma nova região (Sauer et al, 2002; Monroe, 2007). Neste trabalho foi explorada a possibilidade de interferir na primeira fase da formação do biofilme no inseto vetor, ou seja, na adesão de *X. fastidiosa* aos polissacarídeos de superfície, partindo do princípio que proteínas de adesão mediam essa interação e são fundamentais para o início da colonização bacteriana (Killiny & Almeida, 2009b). Para isso, a proteína afimbrial de *X. fastidiosa* denominada XadA2 foi usada como alvo de bloqueio da formação do biofilme em superfícies de polissacarídeos no inseto. Trabalhos anteriores demonstraram que essa proteína é expressa desde o início da formação do biofilme até suas fases mais tardias (De Souza et al, 2005; Caserta et al, 2010), o que evidencia a importância dessa adesina em várias etapas da formação do biofilme.

A proteína XadA2 pertence ao grupo de proteínas triméricas autotransportadoras de superfície celular de bactérias gram negativas, que mediam a adesão bacteriana no hospedeiro e em proteínas da matriz celular (Koiwai et al, 2016). A região que compreende a proteína XadA2 em *X. fastidiosa* possui domínios Hia, os mesmos presentes na proteína Hsf, que é similar a XadA2 em *Haemophilus influenzae*. Estes domínios mostraram atividade adesiva em células epiteliais de mamíferos *in vitro* (Cotter et al, 2005) e na adesão com proteínas

específicas (St Geme et al, 1996). A região da XadA2 utilizada nesse trabalho também mostra alto grau de similaridade com a adesina YadA, de bactérias do gênero *Yersinia*, que são patogênicas a humanos e tem função de conferir aderência às células e componentes da matriz extracelular (Leo & Skurnik, 2011). Sua aderência já foi comprovada em diversas superfícies, como colágeno, fibronectina, laminina e mucosa intestinal para mediar o processo de infecção bacteriana (El Tahir & Skurnik, 2001).

No ensaio de afinidade da proteína XadA2 por polissacarídeos, foram escolhidos representantes presentes no inseto e na planta. No caso do inseto, quitina foi escolhida para o teste, por ser o polissacarídeo mais abundante no exoesqueleto, e como representante da planta a celulose foi avaliada. Foi comprovado que o fragmento da proteína utilizado neste trabalho apresenta alta afinidade de ligação pelos polissacarídeos dos hospedeiros, visto que uma baixa quantidade de proteínas remanescentes foi encontrada no sobrenadante quando a proteína ficou incubada com esses carboidratos. Killiny e Almeida (2009b) realizaram uma série de experimentos que permitiram concluir que outras proteínas afimbriais de *X. fastidiosa* de videira, como HxfA e HxfB tem afinidade de ligação pela quitina presente na superfície cuticular das cigarrinhas, e são fundamentais para o início da formação do biofilme no vetor. Proteínas de membrana de bactérias gram-positivas não patogênicas, como *Lactobacillus plantarum*, também tem se mostrado fundamentais para a ligação a superfícies quitinosas assim como em muco salivar e gastrointestinal de humanos (Sanchez et al, 2011).

Como a proteína XadA2 mostra maior intensidade de expressão nas fases mais tardias da formação do biofilme (De Souza et al, 2005; Caserta et al, 2010), não seria inesperado se a adição de sintéticos da proteína aumentasse a adesão célula-célula da bactéria. No entanto, esse comportamento não foi observado neste trabalho, pois no experimento que avaliou a capacidade de agregação celular de *X. fastidiosa*, quando houve a adição da proteína sintética, foram detectados valores iguais para a absorbância do sobrenadante nas suspensões com e sem sintéticos da proteína. Esse resultado evidencia que o potencial agregativo da bactéria não foi alterado na presença da proteína sintética.

Embora não se conheça detalhadamente a composição química do estomodeu de cigarrinhas, sabe-se que ele é de origem ectodérmica e assim como o restante do exoesqueleto é composto principalmente por quitina, além de outros polissacarídeos, proteínas e lipídios (Andersen, 1979). Neste trabalho foi apresentada uma metodologia de estudo da formação do biofilme em superfície quitinosa do inseto vetor, utilizando asas posteriores de cigarrinhas como substrato de adesão, devido ao fato do estomodeu e as asas terem basicamente a mesma composição. Além disso, as asas são estruturas externas e por não necessitarem de cortes

histológicos complexos, como é o caso do estomodeu, a metodologia utilizada neste trabalho representa uma facilitação para avaliações dessa natureza. As asas das três espécies testadas, *B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *S. sagata*, propiciaram a formação de biofilme. Embora a metodologia seguida tenha sido a mesma, a maior intensidade de agregados celulares foi observada em *M. leucomelas*, e por isso essa espécie foi utilizada nos demais experimentos.

Neste trabalho também comprovamos que *X. fastidiosa* consegue utilizar a quitina presente nas asas das cigarrinhas como fonte de carbono, pois quando as células bacterianas ficaram incubadas em meio Xfm sem fonte de carbono contendo uma superfície abiótica, representada por pedaços de lamínulas, houve baixa adesão à superfície e baixa sobrevivência das bactérias. Resultado exatamente contrário foi observado quando as asas foram adicionadas a suspensão bacteriana. Killiny et al (2010), trabalhando com *X. fastidiosa* de videira, também realizaram experimentos com o meio de cultura Xfm sem suas fontes de carbono, acrescido ou não de quitina, e obtiveram maiores populações bacterianas e maior quantidade de biofilme no meio contendo a presença desse carboidrato, assim como um fenótipo mais adesivo das colônias. A degradação da quitina é feita pela enzima quitinase, a qual está presente no genoma de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Simpson et al, 2000) e na subsp. *fastidiosa* (Van Sluys et al, 2003). Os resultados obtidos com as estirpes de citros e videira, aliado a presença de quitinase no genoma de ambas subespécies, indicam que a bactéria degrada a quitina presente na cutícula do inseto, transformando-a no seu monômero N-acetilglicosamina de modo a utilizá-la como fonte de nutrientes para a sobrevivência da colônia. Estudos têm demonstrado que a quitinase bacteriana e as proteínas com afinidade por quitina (*chitin-binding proteins*-CBPs) trabalham sinergicamente, e exercem um papel fundamental na degradação do polímero quitina, sendo que o produto dessa quebra serve como fonte de nutrientes para as mais variadas bactérias. As CBPs possuem um domínio denominado CBM33, o qual é capaz de facilitar a acessibilidade à quitinase a matrizes de quitina, e além disso, esse domínio também consegue clivar esse polissacarídeo (Frederiksen et al, 2013).

As duas formas de bloqueio da formação do biofilme por *X. fastidiosa* em asas de cigarrinhas utilizadas nesse trabalho resultaram na diminuição significativa da adesão bacteriana aos polissacarídeos. Com o uso da proteína XadA2 sintética, acredita-se que houve a ligação específica das adesinas aos sítios de ligação presentes na asa do inseto. Dessa forma, quando a bactéria foi adicionada ao meio, os carboidratos da superfície já estavam saturados com a proteína, resultando em menor adesão bacteriana e conseqüentemente menor formação de biofilme. Quando o anticorpo específico contra a proteína XadA2 foi utilizado como molécula competidora, também foi observada uma drástica redução dos aglomerados de

biofilme. Nesse caso, presume-se que o anticorpo produzido especificamente contra a região da XadA2 usada neste trabalho, se ligou às proteínas presentes na membrana da bactéria de modo a impedir que elas se ligassem a quitina e dessem início à formação do biofilme.

O uso do anticorpo foi empregado em ensaios de transmissão deste trabalho, que envolveram a aquisição do anti-xadA2 juntamente com a dieta e células bacterianas a partir de um sistema artificial, seguido da transmissão para plantas-teste. Como resultado, houve menor eficiência de aquisição quando os insetos foram colocados em dieta contendo o anticorpo, se comparado aos insetos que se alimentaram do tratamento contendo apenas dieta e bactéria. Por outro lado, não foi observada influência da taxa de transmissão quando o anticorpo estava presente na suspensão bacteriana. Táticas de bloqueio da transmissão focadas na interação bactéria-vetor, usando moléculas competidoras para interromper a formação do biofilme, já tem sido estudadas dentro do patossistema da PD, que tem a subsp. *fastidiosa* como agente causal. O monômero N-acetilglicosamina foi utilizado como agente competidor e inibiu a formação de biofilme em asas de cigarrinhas (Killiny & Almeida, 2009b). Killiny e Almeida (2012) usaram lectinas (proteínas que se ligam a carboidratos), carboidratos e anticorpos contra algumas proteínas como XadA1, XadA2 e Hxf como moléculas competidoras para reduzir a eficiência de aquisição e transmissão por cigarrinhas. Apesar deste último trabalho ter usado o anticorpo anti-xadA2 para interromper a transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, nenhum aspecto da interação molecular, como a afinidade dessa proteína com os polissacarídeos do inseto, foi abordado. Os autores apenas sugerem que o menor número de insetos positivos foi devido a uma redução na adesão inicial das bactérias aos vetores. No presente trabalho, primeiro foi comprovado que a proteína XadA2 tem afinidade por quitina, assim como por celulose, o que indica uma ligação específica da proteína nesses polissacarídeos. Aqui também foi demonstrado, através do uso de asas de cigarrinhas como substrato de adesão, que quando bloqueamos a ação da adesina XadA2 pelo seu anticorpo específico, ou através da saturação dos sítios de ligação da asa, há a redução da adesão bacteriana ao substrato e consequentemente menor formação de biofilme. Como o estomodeu tem a mesma composição química das asas, acredita-se que o mesmo ocorre dentro do trato digestivo do inseto. Com isso é possível afirmar que a proteína XadA2 é fundamental para a adesão bacteriana no inseto vetor.

Em conclusão, os resultados da presente pesquisa mostram que a proteína XadA2 pode ser utilizada como alvo em ensaios de bloqueio da adesão bacteriana no inseto vetor em patossistemas com a subespécie *pauca*. No entanto, é necessário ter cautela ao transferir esse conhecimento para as demais subespécies de *X. fastidiosa*, devido à grande diversidade genética

e fenotípica existente dentro dessa espécie de bactéria. Por isso, cada patossistema deve ser estudado dentro das suas particularidades.

4.5. Conclusões

- A região da proteína XadA2 utilizada neste trabalho apresenta afinidade pela quitina presente do exoesqueleto dos insetos vetores, assim como pela celulose que compõem os vasos xilemáticos das plantas hospedeiras.
- Asas de cigarrinhas da espécie *M. leucomelas* são as mais indicadas para o estudo da formação do biofilme por *X. fastidiosa* em superfícies de polissacarídeos.
- *X. fastidiosa* quando cultivada em meio de cultura sem fonte de carbono, utiliza a quitina da asa de cigarrinha como fonte de nutrientes para a sobrevivência da colônia.
- A proteína XadA2 é fundamental para a adesão inicial da bactéria no inseto, e pode ser utilizada como alvo de bloqueio da formação do biofilme no vetor em patossistemas regidos pela subespécie *pauca*.

Referências

- Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S., and Purcell, A. H. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 775-786.
- Almeida, R. P. P., Mann, R., and A. H. Purcell. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Current Microbiology*, 48: 368-372.
- Andersen, S. O. Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review of Entomology*, 24: 29-59.
- Caserta, R., Takita, M. L., Targon, L. K., Rosselli-Murai, A. P., de Souza, L., Peroni, D. R., Stach-Machado, A., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima, E. W., and Machado, M. A. 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during the biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4250-4259.
- Charterjee, S., Almeida, R. P. P., and Lindow, S. 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 243-271.

- Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., de Souza, A. A., Aguilar-Vildoso, C. I., and Machado, M. A. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4091-4095.
- Cotter, S. E., Yeo, H. J., Juehne, T., and St Geme III, J. W. 2005. Architecture and adhesive activity of the *Haemophilus influenzae* Hsf adhesin. *Journal of Bacteriology*, 187: 4656-4664.
- De 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., and Machado, M. A. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiology Letter*, 237: 341-353.
- De Souza, A. A., Takita, M. A., Pereira, E. O., Coletta-Filho, H. D., and Machado, M. A. 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Microbiol*, 50: 223–228.
- El Tahir, Y., and Skurnik., N. 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *International Journal of medical Microbiology*, 291: 209-218.
- Esteves, M. B. 2014. Seleção de plantas hospedeiras experimentais para ensaios de transmissão da estirpe de citros de *Xylella fastidiosa*. 2014, 76p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Fernandes-Filho, E. I., Vale, F. X. R., and Liberato, J. R. 2002. QUANT v.1.0.0.22: Quantificação de doenças de plantas. Viçosa: UFV, 2002. 1 CD-ROM.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H., and Civerolo, E. L. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 203–213.
- Frederiksen, R. F., Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M. H., Ingmer, H., Palcic, M. M., and Leisner, J. J. 2013. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology*, 159: 833-847.
- Hill, B. L., and Purcell, A. H. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology*, 85: 1368-1372.
- Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 271-290.
- Hopkins, D. L., and Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce’s Disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease*, 86: 1056-1066.

- Hothorn, T., Bretz, F., and Westfall, P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50: 346-363.
- Hultgren, S. J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St. Geme III, J. W., and Normark, S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: Assembly and function in cell recognition. *Cell*, 73: 887-901.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009a. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 22416-22420.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2009b. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 521-528.
- Killiny, N., and Almeida, R. P. P. 2014. Factors affecting the initial adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 420-426.
- Killiny, N., Prado, S. P., and Almeida, R. P. P. 2010. Chitin utilization by the insect-transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6134-6140.
- Killiny, N., Rashed, A., and Almeida, R. P. P. 2012. Disrupting the transmission of a vector-borne plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 638-643.
- Koiwai, K., Hartmann, M. D., Linke, D., Lupas, A. N., and Hori, K. 2016. Structural basis for toughness and flexibility in the C-terminal passenger domain of Acinobacter trimeric autotransporter adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 291: 3705-3724.
- Korstgens, V., Flemming, H. C., Wingender, J., and Borchard, W. 2001. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *Journal Microbiological Methods*, 46: 9-17.
- Labroussa, F., Zeilinger, A. R., and Almeida, R. P. P. 2016. Blocking the transmission of a noncirculative vector-borne plant pathogenic bacterium. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29: 535-544.
- Leo, J. C., and Skurnik, M. 2011. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. *Advances in microbiology infectious diseases and public health*, 715: 1-15.
- Li, W., Teixeira, D. C., Hartung, J. S., Huang, Q., Duan, Y., Zhou, L., Chen, J., Lin, H., Lopes, S., Ayres, A. J., Levy, L. 2013. Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing Citrus Variegated Chlorosis. *Journal of Microbiological Methods*, 92: 79-89.

- Machado, E. C., Oliveira, R. F., Ribeiro, R. V., Medina, C. L., Stuchi, E. S., and Pavani, L. C. 2007. Deficiência hídrica agrava sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'natal'. *Bragantia*, 66: 373-379.
- Marucci, R. C., Giustolin, T. A., Miranda, M. P., Miquelote, H., Almeida, R. P. P., and Lopes, J. R. S. 2003. Identification of a non-host plant of *Xylella fastidiosa* to rear healthy sharpshooter vectors. *Scientia Agricola*, 60: 669-675.
- Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B., Stall, R. E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84: 456-461.
- Monroe, D. 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*, 5: 2458-2461.
- Monteiro, P. B., Renaudin, J., Jagoueix-Eveillard, S., Ayres, A. J., Garnier, M., and Bové, J. M. 2001. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, 85: 246-251.
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., and Lindow, S. E. 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7319-7327.
- Niza, B., Coletta-Filho, H. D., Merfa, M. V., Takita, M. A., and de Souza, A. A. 2015. Differential colonization patterns of *Xylella fastidiosa* infecting citrus genotypes. *Plant Pathology*, 64: 1259-1264.
- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizell III, R. F., and Andersen, P. C. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology*, 49: 243-270.
- Retchless, A. C., Labroussaa, F., Shapiro, L., Stenger, D. C., Lindow, S., and Almeida, R. P. P. 2014. Genomic insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect host. *Genomics of plant associated Bacterial*, Berlin: Springer-Verlag. 177-202.
- Rogers, S. O., and Bendich, A. J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Pages 73-83. In: Gelvin S.B.; Schilperoort R.A., eds. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
- RStudio Team. 2016. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

- Sanchez, B., González-Tejedo, C., Ruas-Madiedo, P., Urdaci, M. C., and Margoles, A. 2011. Lactobacillus plantarum extracellular chitin-binding protein and its role in the interactions between chitin Caco-2 cells, and mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 1123-1126.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G. P., Krugner, R., and Porcelli, F. 2014. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Phylaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia Italy. *Journal of Economic Entomology*, 107: 1316-1319.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184: 1140-1154.
- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., França, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani Jr, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., Oliveira, M. C., De Oliveira, R. C., De Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira Jr, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., Rosa, A. J. De M., Rosa Jr, V. E., De Sá, R. G., De Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., Silva, A. C. R., Da Silva, A. M., Da Silva, F. R., Silva, W. A., Da Silveira, J. F., Da Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., Souza, A. A., De Souza, A. P., De Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tshako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., and Setubal, J. C. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406: 151-157.

- St. Geme III, J. W., Cutter, D., and Barenkamp, S. J. 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *Journal of Bacteriology*, 178: 6281-6287.
- Swallow, W. H. 1985. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. *Phytopathology*, 75: 882-889.
- Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan L. R., Camargo, L. E. A., and Kitajima. 2003. Comparative analysis of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology*, 185: 1018–26.

APÊNDICES

Apêndice A. Imagens obtidas com lupa de fluorescência (Olympus MVX10) em aumento de 40x das asas de três espécies de cigarrinhas: *Bucephalogonia xanthophis*, *Macugonalia leucomelas* e *Sibovia sagata* após incubação em meio Xfm com e sem *Xylella fastidiosa* modificada com o gene *green fluorescent protein* (GFP). A, C e E representam respectivamente a autofluorescência das asas de *B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *S. sagata*, sendo essas incubadas apenas em meio Xfm. As imagens B, D e F mostram o biofilme formado por *X. fastidiosa*-GFP em asas de *B. xanthophis*, *M. leucomelas* e *S. sagata* respectivamente.

Apêndice B. As imagens apresentam a fluorescência do biofilme formado por *Xylella fastidiosa* transformada com o gene *green fluorescent protein* (GFP), após 10 dias de incubação a 28 °C em meio Xfm contendo como substrato de adesão superfície biótica (asa de *Macugonalia leucomelas*) (A) e abiótica (lamínula) (B). As fotos foram obtidas por lupa de fluorescência (Olympus MVX10) em aumento de 40x.

Apêndice C. Formação de biofilme em asas posteriores de *Macugonalia leucomelas* sob a influência da proteína XadA2 sintética. A) asa que ficou incubada apenas em meio Xfm (controle negativo), B) asa incubada com o meio Xfm contendo *Xylella fastidiosa* modificada com o gene *green fluorescent protein* (GFP) e C) asa que ficou durante 4h incubada com a XadA2 sintética, sendo em seguida submetida a suspensão celular. As foram obtidas por lupa de fluorescência (Olympus MVX10) em aumento de 40x.

Apêndice D. Formação de biofilme em asas posteriores de *Macugonalia leucomelas* sob a influência do anticorpo anti-xadA2. A) asa que ficou incubada apenas em meio Xfm (controle negativo), B) asa incubada com o meio Xfm contendo *Xylella fastidiosa* modificada com o gene *green fluorescent protein* (GFP) e C) asa que ficou em contato com o meio Xfm, células bacterianas e o anticorpo. As foram obtidas por lupa de fluorescência (Olympus MVX10) em aumento de 40x.