

# Engenharia genética contra a *Xylella*

Pesquisas definem  
novas estratégias de  
combate à praga das laranjas

RICARDO ZORZETTO



A primeira variedade de laranja doce geneticamente modificada, que abre caminho para a produção de laranjeiras resistentes a doenças, e uma série de bactérias mutantes, nas quais foram desativados genes considerados prejudiciais às plantas. Essas são algumas das novidades do 1º Simpósio Genoma Funcional da *Xylella fastidiosa*, realizado de 10 a 13 de dezembro em Serra Negra. Ali, os coordenadores dos 21 grupos de pesquisa do projeto Genoma Funcional, financiado pela FAPESP, anunciaram as estratégias de combate à *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora da doença conhecida como amarelinho – ou clorose variegada de citrus (CVC). Transmitida por um inseto – a cigarrinha –, essa é uma praga que, com sintomas mais graves ou mais amenos, atinge 65 milhões de laranjeiras no Estado de São Paulo (36% do total) e, a cada ano, torna improdutivas cerca de seis milhões delas.

Os alvos dos pesquisadores estão claros: são os genes que permitem à *Xylella* desencadear a doença (lhe conferem patogenicidade) ou determinam a agressividade (virulência) com que a planta será infectada. O trabalho, iniciado há dois anos, converge agora para a busca de mecanismos – como plantas ou bactérias alteradas geneticamente – que bloqueiem a ação desses genes maléficos, permitam o desenvolvimento de inseticidas mais eficientes para impedir que a cigarrinha transmita a bactéria a plantas saudáveis ou que levem ao desenvolvimento de plantas resistentes, produtoras de proteínas capazes de impedir a sobrevivência da *Xylella*.

Começa assim uma nova etapa na luta contra a bactéria causadora do amarelinho, deflagrada em 2000 com o vitorioso seqüenciamento de seu genoma em programa financiado pela FAPESP. Além das técnicas já em uso – controle dos insetos transmissores e uso de mudas livres de contaminação, que ao menos evitam o alastramento do problema para plantas ainda intactas –, será possível contar com os recursos da engenharia genética para

construir bactérias ou plantas modificadas geneticamente. Com isso se pretende bloquear o desenvolvimento da praga, que traz um prejuízo anual para a citricultura paulista estimado em US\$ 100 milhões.

No simpósio de Serra Negra, para uma platéia de cerca de 100 pesquisadores, Beatriz Mendes, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), e Francisco Alves Mourão Filho, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), ambos da Universidade de São Paulo (USP), apresentaram a primeira variedade de laranja doce geneticamente modificada, obtida a partir de tecido adulto.

**Conquista decisiva** - Em 2000, Beatriz e Mourão já haviam obtido uma planta transgênica a partir de tecido cítrico jovem, isto é, obtido logo depois da germinação da semente, mas não ficaram satisfeitos com o resultado: a planta pode demorar de cinco a oito anos para frutificar. Trabalharam durante um ano e meio avaliando os fatores que influenciam as condições de crescimento da planta – como o meio de cultura, o tempo de incubação e a temperatura. Finalmente, tiveram sucesso com a laranja da variedade Hamlin, a partir de seu tecido adulto, que frutifica mais cedo: cerca de dois anos.

É uma conquista que promete ser decisiva para a próxima etapa do projeto, com término previsto para meados deste ano. “Quando tivermos um gene que proporcione à planta resistência contra a bactéria, poderemos produzir plantas para testar no campo em uns dois anos”, calcula Beatriz.

Mais pesquisas devem amadurecer este ano. Na linha de frente dos resultados está João Lúcio de Azevedo, coordenador do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) e professor titular aposentado da ESALQ. Ele desenvolve uma *Xylella* mutante na qual poderá ser bloqueado o gene da enzima endoglucanase A, um dos associados à produção da goma fastidiana. É essa goma que a bactéria utiliza para aderir ao xilema, o sistema de vasos

que transporta água e sais minerais através de toda a planta.

A goma fastidiana está ligada ainda ao entupimento do xilema e, em consequência, à manifestação dos sintomas da doença – manchas amareladas – nas folhas da laranja. Azevedo espera obter já em 2002 os primeiros resultados da inoculação da bactéria modificada na planta maria-sem-vergonha ou vinca (*Catharantus roseus*), usada como modelo nesse tipo de experimento, bem como em citros. “Se funcionar”, diz ele, “podemos estender a técnica para as bactérias do gênero *Xantomonas*, que atacam citros e hortaliças”.

Para avançar, não se conta apenas com informações sobre como a bactéria provoca a doença e a agressividade com que a planta é infectada. Esses dados já foram aprofundados pelo conhecimento acumulado sobre o genoma da *Xylella*, cujo seqüenciamento contou com quase todos os pesquisadores que agora participam do Genoma Funcional. Também se avançou bastante no conhecimento das proteínas produzidas pela causadora do amarelinho – já são 130 as identificadas pelo Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – e, de modo mais amplo, na epidemiologia da doença.

Experimentos conduzidos sobretudo na ESALQ mostram que tanto o amarelinho quanto a cigarrinha se propagam mais intensamente nas regiões mais quentes do Estado, onde a escassez de água é comum. Assim, na área dos municípios de Barretos e Bebedouro, norte do Estado, 48% das laranjeiras estão infectadas, enquanto nos arredores de Limeira e Itapetininga, ao sul, não passam de 17%, segundo levantamento que o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), mantido pelos agricultores, fez em 2001.

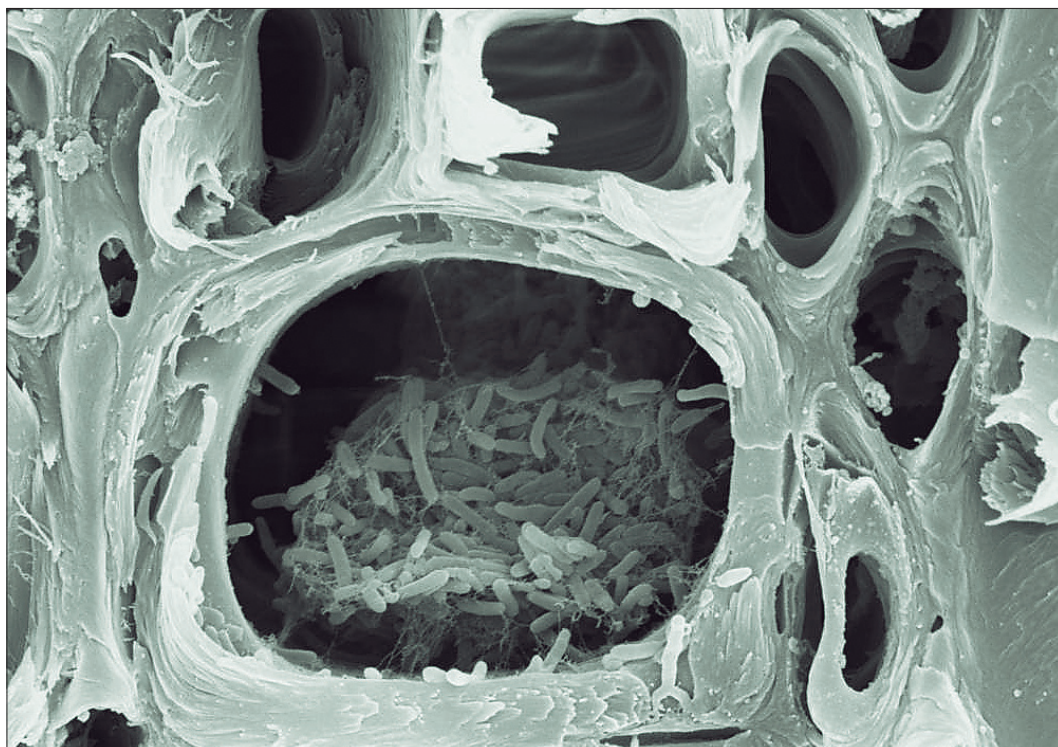
“As etapas mais importantes já foram vencidas”, comenta Jesus Aparecido Ferro, da Universidade Estadual Paulista (Unesp) em Jaboticabal, um dos coordenadores do Genoma Funcional: “Com certeza o progresso será mais rápido daqui para a frente”. Será ainda mais rápido no que depender

da bióloga Patrícia Brant Monteiro, do Fundecitrus: ela produziu colônias de bactérias mutantes estáveis para 12 genes, que regulam, entre outras coisas, a patogenicidade e a produção de toxinas para a planta ou de polissacarídeos (açúcares) que destroem o xilema.

Tanto Patrícia como Azevedo trabalham na técnica de interrupção de genes. É a “leitura” do gene que determina a produção de proteínas específicas. Ao se colocar um trecho de DNA no meio de um gene, essa leitura fica perturbada e, assim, ele é “desligado”. A bactéria que resulta dessa modificação é uma mutante: ela passa a carregar o gene alterado no seu material genético.

**P**atrícia foi pioneira na construção de uma *Xylella* mutante, resistente à incorporação de material genético exótico – vindo de outros organismos – ao seu genoma. Ela superou o problema ao utilizar como vetor um plasmídeo (segmento de DNA circular) desenvolvido em laboratório e que continha um pequeno trecho de material genético da própria bactéria.

Esse trabalho abriu caminho para outros grupos. As pesquisadoras da USP Marilis Marques, do Instituto de Ciências Biomédicas, e Suely Gomes, do Instituto de Química, também obtiveram sucesso na produção de bactérias mutantes. Utilizando uma estratégia diferente, desenvolveram um plasmídeo que permitiu a incorporação de DNA exótico no genoma da *Xylella*. Marilis e Suely desenvolveram colônias de *Xylella* que têm o gene *gspD* alterado. Esse gene é responsável pela produção de uma proteína que forma canais na parede da bacté-



EDUARDO ALVES/ESALQ-USP

Colônias de *Xylella* crescendo dentro dos vasos condutores de seiva: ação começa a ser contida

ria, por onde são secretadas as enzimas que destroem os vasos do xilema.

Recentemente, testes feitos com o uso de material radiativo para marcação de genes comprovaram que uma em cada oito colônias de bactérias mutantes mantém incorporado o trecho de DNA alterado, mesmo depois de dez ciclos reprodutivos. “Começamos a dominar a técnica de transformação da *Xylella*, o que é importante para determinar a função de cada gene na doença”, revela Marilis. Agora ela procura produzir bactérias mutantes usando transposons (pedaços de DNA que mudam de lugar no cromossomo) como vetores, no lugar de plasmídeos. A vantagem disso seria obter, a partir do uso de um único tipo de vetor, várias colônias de bactérias transformadas, cada uma com um gene diferente desligado.

**Pesquisas integradas** - Dominar a técnica de produção de mutantes foi igualmente essencial para o grupo coordenado em Piracicaba por Sérgio Pascholati, da Esalq. Ele trabalhou na identificação de genes que codificam exoenzimas – proteínas que a bactéria produz e servem para obter nutrientes e colonizar a planta. Valendo-se

das informações do genoma da *Xylella*, identificou oito possíveis exoenzimas e, em testes de laboratório, caracterizou três delas: são três celulases, enzimas que digerem celulose e a transformam em glicose, molécula essencial para qualquer organismo obter energia. Próxima etapa: desenvolver bactérias com genes alterados que impeçam a produção dessas proteínas.

Outro gene que os pesquisadores de Piracicaba querem desligar é o Xf1940, produtor da enzima metionina sulfóxido redutase. Essa enzima participa do mecanismo de adesão da bactéria à parede do xilema e a outras bactérias, para formar colônias, segundo modelo desenvolvido por Breno Leite, da equipe de Pascholati. A metionina também estaria relacionada à fixação da *Xylella* no aparelho bucal da cigarrinha. Eles acreditam poder chegar a um mecanismo de controle da doença, se bloquearem a ação desse gene.

Pascholati trabalha em conjunto com especialistas do Fundecitrus, ligados também à equipe de Azevedo e ao NIB de Mogi das Cruzes, que interage ainda com a Esalq e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Não se busca uma estratégia única para deter

o estrago provocado pelo amarelinho na citricultura paulista.

A própria equipe de Azevedo, além de bloquear genes, trabalha em outra forma de controlar a praga: por meio de microrganismos endofíticos, bactérias que convivem com a *Xylella* na laranjeira, mas não provocam a doença na planta. Seu grupo identificou nove gêneros de bactérias endofíticas de citros. Entre elas está a *Pantoea agglomerans*, na qual os pesquisadores já conseguiram introduzir um gene que produz a xantanase. Essa enzima impede a formação da goma xantana, produzida pelas bactérias do gênero *Xantomonas* e semelhante à goma fastidiana.

**Alvos selecionados** - “Temos de testar todas as possibilidades”, diz o coordenador Ferro, da Unesp: “Não sabemos qual vai dar certo”. Patrícia pretende testar os mutantes em plantas ainda este ano, mas sabe que há incertezas: “Será sorte se conseguirmos uma *Xylella* não-patogênica, pois metade dos genes dos organismos em geral codificam proteínas de funções ainda desconhecidas”.

Para que o combate à praga seja eficiente, os cientistas tiveram de criar instrumentos que ajudem a determinar os melhores alvos. Entre eles está o microarranjo (*microarray*), também chamado biochip, uma lâmina de microcópico onde são depositados os genes da bactéria. O biochip indica, de uma vez só, quais os genes – entre todos do genoma – estão mais ativos em determinada situação.

Foi o grupo de Regina de Oliveira, do NIB de Mogi das Cruzes, que concluiu a terceira versão do biochip da *Xylella*, com cerca de 2.500 genes – 93% dos cerca de 2.700 que compõem o material genético da bactéria. “É como se tirássemos uma fotografia da expressão gênica da célula em determinado momento”, explica Luiz Nunes, do NIB. Ele já identificou um conjunto de genes que a bactéria aciona, por exemplo, em resposta ao estresse oxidativo – que ocorre quando é atacada por for-

mas reativas de oxigênio, como o peróxido de oxigênio, liberadas pelo sistema de defesa da planta hospedeira.

Regina e Nunes trabalham em cooperação com Sílvio Lopes, da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp), que estuda a atividade dos genes de cepas da *Xylella* que infectam plantas diferentes. “Já identificamos vários genes que acreditamos estar ligados à patogenicidade da bactéria e à sua especificidade com relação ao hospedeiro”, diz Nunes.



Fungos que digerem a goma xantana: contra o amarelinho

Marcos Antônio Machado, do Centro de Citricultura do IAC, utilizou o biochip para comparar a expressão gênica da bactéria em duas situações de crescimento: a de isolamento primário, quando é recém-retirada da planta, e a de cultivos sucessivos, depois de 25 ciclos de reprodução em laboratório. No primeiro estado, a *Xylella* se desenvolve lentamente em cultura artificial, mas, quando inoculada, coloniza a planta rapidamente. No segundo caso, ocorre o inverso.

**Banco de proteínas** - A comparação das duas situações mostrou que alguns genes, ligados à capacidade de adesão, tornam-se menos ativos quando a *Xylella* é cultivada fora da planta. “Esses resultados comprovam que a capacidade de colonização está associada à de agregação”, diz Machado. “Talvez possamos desenvolver alguma forma de reduzir a ação desses genes.” Para conhecer os genes mais ativos na bactéria em determinada situação, os

especialistas do Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Biologia da Unicamp adotam uma abordagem diferente. Em vez de analisar diretamente os genes, observam o resultado final: as proteínas.

Em quatro meses, esse grupo de Campinas, único que estuda o Proteoma (conjunto de proteínas) da *Xylella*, coordenado por José Camillo Novello, identificou 130 proteínas produzidas pela bactéria. As principais estão associadas aos processos de adesão e agregação, à captação e ao armazenamento de ferro e à eliminação de toxinas. Também foram encontradas proteínas de membrana, que atuam na captação de nutrientes. Até o final da atual etapa do Genoma Funcional, prevista para terminar em meados do ano, a equipe da Unicamp espera formar um banco de dados com 250 a 300 proteínas caracterizadas.

**Meio de cultura** - O encontro de Serra Negra marcou ainda a superação de uma das etapas mais complicadas do Genoma Funcional: o desenvolvimento de um meio de cultura definido, no qual se conhecem todos os nutrientes – vitaminas, minerais, hidrocarbonetos e aminoácidos – necessários ao crescimento da bactéria. Ao fim de dois anos de trabalho, as pesquisadoras Eliana de Macedo Lemos e Lúcia Carareto Alves, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp em Jaboticabal, produziram um meio de cultura mínimo, que tem como única fonte de nitrogênio o ácido aspártico (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>). “O estudo das vias metabólicas mostrou que a bactéria pode crescer num meio relativamente simples, em condições muito próximas às do xilema”, diz Eliana. A determinação do meio de cultura é uma ferramenta importante para quem trabalha com fisiologia ou genética da *Xylella*, pois permite conhecer os genes expressos em determinada condição e auxilia na seleção de formas mutantes da bactéria. A *Xylella* que se cuida. ●

JOELMA MARCONES/IG-USP