

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
P.P.G. Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

“Influência da temperatura sobre fisiologia e crescimento de
Xanthomonas citri **subsp. citri”**

JULIA ALBANI PRADO SUMARES

Araraquara
2012

JULIA ALBANI PRADO SUMARES

**“Influência da temperatura sobre fisiologia e crescimento de
Xanthomonas citri subsp. *citri*”**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP- Araraquara como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Co-Orientador: Dr. José Belasque Júnior

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S955i Sumares, Julia Albani Prado
Influência da temperatura sobre fisiologia e crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Julia Albani Prado Sumares. – Araraquara, 2012
89 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Henrique Ferreira
Coorientador: José Belasque Júnior

1. Divisão celular. 2. Cancro cítrico. 3. Estresse térmico. I. Ferreira, Henrique, orient. II. Belasque Júnior, José, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Ferreira (Orientador e Presidente)

Dr. Franklin Behlau (Membro Titular)

Dr. Luís Octávio Regasini (Membro Titular)

Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento (Membro Suplente)

Dr. Nelson Arno Wulff (Membro Suplente)

Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins (Membro Suplente)

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini (Membro Suplente)

Dr. Sílvio Aparecido Lopes (Membro Suplente)

Araraquara, 27 de julho de 2012

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir

*Dedico este trabalho os meus amados pais, **Lucia** e **Marcelo**, cujo amor e apoio infinitos e incondicionais sempre me levaram adiante e me mostraram que sou capaz de mais.*

AGRADECIMENTOS

Dedico este espaço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram de meu trabalho ou de minha vida durante este duro período. Toda a ajuda e apoio, acadêmico ou pessoal, foi de grande valia para mim. Deixo aqui minha eterna gratidão.

Ao **Profº Dr. Henrique Ferreira**, pela oportunidade e por todos os ensinamentos;

Ao **Dr. José Belasque Jr.**, pelas valiosas discussões e opiniões e pelos ensinamentos em fitopatologia;

Ao **Fundecitrus**, pela disposição de equipamentos e mudas, Em especial ao **Fabrcio**, pela disponibilidade e ajuda com o plaqueador automático;

À equipe do **Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos**, pela receptividade e disponibilidade de equipamentos;

Aos inúmeros funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por toda a ajuda que me foi dada. Com certeza sem eles minha tarefa teria sido muito mais difícil;

Aos meu pais, **Lucia** e **Marcelo**, pelo apoio e compreensão incondicionais. A força e perseverança que vocês me ensinaram a ter foi meu maior apoio nesta etapa da minha vida;

Ao meu irmão, **Thyago**, pelo apoio e pela mais do que útil e oportuna ajuda ao meu entendimento de estatística;

À minha **família**, por toda preocupação dedicada a mim. Em especial às minhas avós **Amélia** e **Amália**;

À equipe do laboratório: **Amanda, Paula, Teresa**, por todas as discussões, opiniões e momentos de descontração no laboratório. E à **Ana**, cuja presença constante no laboratório levou à participação em várias destas conversas mais que prazerosas;

À **Isabel**, cujo apoio acadêmico e amizade foi fonte de muita força e ajuda durante todo o meu mestrado. Agradeço os sorrisos compartilhados e o ombro, quando foi necessário;

Às minhas amigas feitas em Araraquara durante estes 2 anos, principalmente **Rodrigo, Messias** e **Hermano**. Apesar de nossos caminhos seguirem separados daqui para frente, o carinho por vocês estará para sempre comigo. Muito obrigada por todo o apoio e companhia;

Aos amigos de São Paulo, **Mariana** e **Steve**, que apesar da distância estavam presentes em cada etapa de meu mestrado e me ajudaram a superar cada uma das dificuldades que apareceram neste período. Muito obrigada por todo o apoio e amizade que vocês me dedicam;

Ao **Gustavo**, que apesar de ter surgido só no final, me deu a energia e coragem para enfrentar a última etapa;

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS	12
ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
Capítulo 1	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. A doença e seu impacto para a citricultura brasileira	18
1.2. Histórico e distribuição do cancro cítrico no Brasil.....	19
1.3. Etiologia, epidemiologia e danos causados pelo cancro cítrico.....	20
1.4. Condições ambientais e a infecção por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	24
1.5. Influência de estresses ambientais na vida bacteriana	24
1.6. Clima do Estado de São Paulo e influência da temperatura sobre as culturas cítricas ..	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Gerais	29
2.2. Específicos	29
3. JUSTIFICATIVA	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Linhagens bacterianas e cultivo	33
4.2. Curva de crescimento padrão.....	33
4.2.1. Análise estatística.....	33
4.3. Choque térmico <i>in vitro</i>	34
4.4. Microscopia em contraste de fase.....	34
4.4.1. Análises estatísticas.....	35
4.5. Microscopia de contraste de fase e fluorescência	35

4.6. Análise de virulência <i>in planta</i>	35
5. RESULTADOS	37
5.1. Determinação do padrão de crescimento de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> selvagem.	38
5.2. Alterações no desenvolvimento da cultura de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> causadas pela temperatura.....	39
5.3. Tratamento térmico promove alterações no tamanho de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	42
5.4. Influência da temperatura sobre processos essenciais bacterianos	46
5.5. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> mantém sua virulência após tratamentos térmicos	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
Capítulo 2	69
ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Lesões de cancro cítrico causadas por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	23
Figura 2: Curva de crescimento padrão <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	38
Figura 3: Relação entre densidade óptica e Unidades formadora de colônia por Mililitro para culturas crescidas a 30 °C.	39
Figura 4: Curvas de crescimento de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> em diferentes temperaturas.....	40
Figura 5: Morfologia celular de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> crescida em diversas temperaturas.....	43
Figura 6: Variação no tamanho de Xac após choque térmico.	45
Figura 7: Microscopia de fluorescência do mutante Xac <i>parB</i> ::pPM7g- <i>parB</i> ^{Xac}	48
Figura 8: Microscopia de fluorescência do mutante Xac <i>amy</i> ::pPM2a- <i>zapA</i> ^{Xac}	50
Figura 9: Sintomas de cancro cítrico causados por bactérias tratadas com diferentes temperaturas.....	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Número de unidades formadoras de colônia por mililitro após tratamento térmico em diferentes temperaturas.....	41
Tabela 2: Comprimento celular de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> cultivada em diferentes temperaturas.....	44

ABREVIATURAS

% - Porcentagem

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D.O. – Densidade óptica

Fundecitrus – Funde de defesa da citricultura

GFP – *Green Fluorescent Protein*

LB - Meio Luria-Bertani

m/s – metros por segundo

mg/mL – miligramas por mililitro

nm - nanômetros

NYG – meio *Nutrient Yeast Glycerol*

°C – Graus Celcius

R^2 – Fator de correlação

Rpm – rotações por minuto

subsp. - subspécie

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

WT – Wild type

Xac – *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

μm - Micrometros

σ – Fator Sigma

RESUMO

Sumares, J.A.P., **Influência da temperatura sobre fisiologia e crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2012. Dissertação (Mestrado). P.P.G. Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

O cancro cítrico asiático, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma das doenças mais importantes dos *Citrus* e de ocorrência mundial. Esta doença constitui um grande risco para a citricultura brasileira uma vez que os sintomas podem diminuir o valor de mercado das frutas, e, por vezes, até impedir a sua comercialização. Neste trabalho determinamos a influência da temperatura no crescimento e fisiologia de Xac, com especial atenção à temperatura da morte bacteriana e sua influência sobre a competência infecciosa da bactéria. Descobrimos que a taxa de crescimento de Xac é de forma geral influenciada por altas temperaturas. Notamos uma diminuição do crescimento quando bactérias foram submetidas a temperaturas superiores àquela considerada ótima para cultivo controlado (30 °C). Bactérias expostas a temperaturas de até 37 °C foram perfeitamente competentes para infectar o hospedeiro citros, além de recobrem perfil de crescimento padrão quando retornadas a temperatura de 30 °C. Tratamentos com temperaturas superiores a 40 °C promovem alterações fisiológicas irreversíveis e acima de 42 °C não foi possível resgatar células capazes de induzir sintomas de cancro cítrico, sendo, pois, designadas temperatura de morte. Temperaturas diferentes de 30 °C promoveram aumento de tamanho celular, sugestivo de perturbação de processos essenciais de replicação/segregação cromossômica e/ou divisão celular. Para investigar a influência do tratamento térmico em tais processos, submetemos linhagens de Xac com marcação para centrômero e septo bacterianos a tratamentos com diferentes temperaturas, seguindo-se avaliação por microscopia de fluorescência. Tratamento a 37 °C por 6 horas não alterou replicação e segregação cromossômicas, porém, promoveu parada do ciclo celular por interferir no processo de divisão bacteriana. Apesar da alteração, tais células não perderam sua capacidade infectiva. Nossas análises forneceram subsídios para a melhor compreensão da biologia deste patógeno como, também, indicaram uma direção para o desenvolvimento de métodos físicos de desinfecção de material vegetal, importantes no controle da disseminação desta bactéria.

Palavras-chave: divisão celular, cancro cítrico, estresse térmico.

ABSTRACT

Sumares, J.A.P., **Temperature influence over physiology and growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2012. Msc. Thesis. Graduate Program in Biosciences e Biotechnology Applied to Pharmacy. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

Asiatic citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), is one of the most important *Citrus* diseases and occurs worldwide. This disease poses a major risk to the Brazilian citrus industry since the symptoms may decrease the market value of the fruit, and restrict its commercialization. In this work we have determined the influence of temperature on growth and physiology of Xac, with special attention to the temperature of bacterial death and its influence on the bacterial infectious competence. We have found that the growth rate of Xac was generally affected by high temperatures. We have noticed a decrease of bacterial growth when exposed to temperatures higher than that considered optimal for controlled cultivation (30 °C). Bacteria exposed to temperatures up to 37 °C were fully competent to infect the citrus host, and regain ability to grow when temperature was returned to 30 °C. Treatments at temperatures above 40 °C promote irreversible physiological changes. Above 42 °C it has not been possible to recover viable cells that could produce symptoms of citrus canker, and therefore, it was designated death temperature. Temperatures different from 30 °C caused an increase in cell size, suggesting disturbance on essential biological processes, as chromosomal replication/segregation and/or cell division. To investigate the influence of heat treatment in such processes, we have submitted mutant Xac strains, marked for bacterial centromere and septum, to treatments at different temperatures, followed by fluorescence microscopy analysis. Treatment at 37 °C for 6 hours did not affect replication and chromosome segregation, however, promoted cell cycle arrest by interfering in the process of bacterial division. Despite the change, such cells have not lost their infectivity. Our analyzes provided information for better understanding the biology of this pathogen and also pointed the direction for the development of physical disinfection methods for plant material, important for controlling the spread of this bacteria.

Keywords: Cell division, citrus canker, thermal stress

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico asiático é a doença de cítricos mais importante causada por *Xanthomonas* (Vernière, Gottwald *et al.*, 2003) e ocorre na maioria dos centros produtores de cítricos por todo o mundo (Gottwald, Bassanezi *et al.*, 2007), atingindo pelo menos 30 países (Amorim e Bergamin-Filho, 2001). Causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad, Postnikova *et al.*, 2006), uma bactéria Gram-negativa, bastonetiforme, aeróbia e móvel por um único flagelo polar, é capaz de induzir sintomas em praticamente qualquer espécie de *Citrus* e alguns gêneros da família Rutaceae (Massari e Belasque Júnior, 2006a). Esta doença constitui um grande risco à citricultura brasileira (Kimati, Amorim *et al.*, 2005).

1.1. A doença e seu impacto para a citricultura brasileira

Originária do sudoeste asiático, onde ocorre endemicamente em todos os países (Amorim e Bergamin-Filho, 2001), foi primeiramente detectada no Brasil na cidade de Presidente Prudente, SP em 1957 (Amaral, 1957) e, apesar dos esforços para a erradicação na época, esta se disseminou para várias regiões citrícolas e não citrícolas brasileiras (Schubert, Rizvi *et al.*, 2001), atingindo atualmente vários estados (Kimati, Amorim *et al.*, 2005).

Apesar de o cancro cítrico não ser endêmico no país, a citricultura é continuamente ameaçada por esta doença, uma vez que ela diminui a qualidade dos frutos e gera a necessidade de quarentena (Graham, Gottwald *et al.*, 2004), além de restrições à importação da fruta e diminuição na sua negociabilidade, em razão da prevenção de contaminação ou novas introduções de Xac nos países importadores (Gottwald, Bassanezi *et al.*, 2007).

Com 50 % da produção mundial de suco de laranja e 85 % de participação no mercado mundial, o Brasil é hoje o maior produtor de laranjas do mundo. Apenas na safra 2009/2010 a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg, levando a um faturamento total dos elos da cadeia produtiva de citros foi de US\$ 14,6 bilhões. Flórida e São Paulo detêm 81 % da produção mundial de suco, sendo que apenas o Estado de São Paulo possui 53 % do total. Em 2009, o PIB do setor citrícola foi de US\$ 6,5 bilhões, sendo US\$ 4,3 bilhões no mercado interno e US\$ 2,2 bilhões no mercado externo (Neves, Trombin *et al.*, 2010).

Desde 1999 até 2008, aproximadamente US\$ 360 milhões foram gastos no Fundecitrus e inspeções dos talhões. Considerando US\$ 20.00 o preço de uma árvore cítricas no campo e US\$ 2.00 o preço de uma planta cítrica em viveiro, pode-se estimar que mais de

US\$ 116 milhões foram perdidos com a eliminação de plantas infectadas e expostas a Xac nos últimos dez anos (Bassanezi, Belasque Júnior *et al.*, 2009).

1.2. Histórico e distribuição do cancro cítrico no Brasil

A mais antiga constatação do cancro cítrico foi feita por Fawcett & Jenkeins, em 1933, em folhas herbarizadas de *Citrus medica*, coletadas na Índia entre 1827 e 1831, no entanto, a doença só foi descrita em 1915, quando primeiramente introduzida nos EUA (Amorim e Bergamin-Filho, 2001). No Brasil foi inicialmente detectado no município de Presidente Prudente, em 1957 (Amaral, 1957), dando início às campanhas de erradicação e exclusão da doença. No mesmo ano, também foi encontrado um foco no Paraná, no município de Lupianópolis (Leite-Júnior, Egels *et al.*, 1990).

A ocorrência desta doença no estado de São Paulo possui três marcos distintos: um primeiro entre 1957 e 1961, quando foram feitas as primeiras campanhas de erradicação do cancro cítrico; outro em 1979, após a identificação de focos da doença na grande região produtora do estado e um terceiro, a partir de 1996, com o aparecimento da lagarta minadora dos citrus (*Phyllocnistis citrella*) (Massari, 2001). Acredita-se que a introdução do cancro cítrico no Brasil tenha ocorrido alguns anos antes da detecção da doença, uma vez que, logo após o início da campanha de erradicação, a doença foi encontrada em 19 municípios (Massari e Belasque Júnior, 2006b).

Os primeiros métodos de erradicação adotados foram a eliminação das plantas com ou sem sintomas num raio de 12 metros das plantas contaminadas, a interdição do plantio de novos pomares e viveiros, a eliminação de todos os viveiros cítricos infectados ou não de 29 municípios e a restrição do comércio de frutas provenientes destes mesmos municípios, além de uma campanha de divulgação sobre o cancro cítrico no estado (Massari e Belasque Júnior, 2006b). Apesar destes esforços, novos casos da doença continuaram a ser encontrados no estado e, sendo assim, foi decidida a eliminação completa das plantas cítricas presentes nos municípios atingidos pela doença, levando a um total de 1,2 milhão de árvores eliminadas (Santos, 1991).

Devido à detecção de novos casos de cancro em municípios antes livres da doença, na região da Alta Sorocabana (Massari e Belasque Júnior, 2006b), a partir de 1962 foi adotada uma nova metodologia de erradicação que determinava a eliminação de todas as plantas cítricas, infectadas ou não, contidas na propriedade em que havia sido detectada a presença do cancro, além das plantas nas propriedades vizinhas num raio de 1000 metros,. Apesar destas medidas, novos focos continuaram a ser encontrados nos anos subsequentes, mas a doença se

manteve isolada ao sul do Rio Tietê, considerado então uma barreira natural para a disseminação da doença (Barbosa, Gimenes-Fernandes *et al.*, 2001).

Em 1979 foi encontrado o primeiro foco de cancro cítrico na região exportadora do estado de São Paulo, ao norte do Rio Tietê, em um pomar de Limão Galego (*Citrus aurantifolia*, Swingle) (Namekata, 1980) e, apesar da erradicação dos focos encontrados, a doença continuou a se espalhar pela região nobre de produção como em Taquaritinga e Fernando Prestes, em 1980; Itajobi em 1982; Araraquara em 1983 e Guapiaçu, Irapuã, Novo Horizonte, Borborema e Itápolis em 1986 (Santos, 1991).

Apesar dos novos casos detectados, em 1987 decidiu-se por abrandar a metodologia de erradicação, diminuindo para apenas 50 metros o raio de eliminação a partir das plantas doentes. Já em 1989 foi realizado um censo em 60 municípios da região de São José do Rio Preto e Ribeirão Preto, sendo encontradas três propriedades contaminadas pelo cancro. Ainda em 1989, apesar dos novos focos encontrados, a metodologia de erradicação foi mais uma vez abrandada e o raio de eliminação foi diminuído para 30 metros (Barbosa, Gimenes-Fernandes *et al.*, 2001; Massari e Belasque Júnior, 2006b).

Entre 1957 e 1995, predominou um padrão de dispersão da doença altamente agregado, passando para um intermediário, com a presença de focos longe do foco inicial detectado. Tal fato se deve à presença da lagarta minadora dos citros, que alterou o padrão de distribuição da doença, após sua introdução (Gottwald, Bassanezi *et al.*, 2007).

1

1.3. Etiologia, epidemiologia e danos causados pelo cancro cítrico

Já foram descritos alguns tipos de cancro cítrico, que se diferenciam, principalmente, pela virulência, sintomatologia características fenotípicas e genotípicas das linhagens. O cancro cítrico asiático, ou cancrose do tipo A, é o mais importante dos tipos de cancro, pois pode afetar um grande número de espécies, híbridos e variedades de gêneros e afins e é o tipo de cancro mais disseminado pelo mundo e mais agressivo. É causado pela bactéria Xac e se encontra dispersa por diversas áreas da Ásia e das Américas.

O cancro cítrico B, ou cancrose B, tem sua área de ocorrência restrita ao Paraguai, Uruguai e Argentina e afeta apenas limas ácidas “Galego” e limões verdadeiros, sendo assim um tipo de cancro de menor importância. É causada pela estirpe B de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e é facilmente diferenciada da cancrose do tipo A, porém pode ser confundida com a do tipo C. A cancrose do limoeiro “Galego”, ou cancrose C, até hoje só foi identificado no Estado de São Paulo, afetando apenas Lima ácida “Galego”; é causada pela

estirpe C de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e desde o seu isolamento em 1970 foi detectada poucas vezes mais. Outros tipos de cancro já foram relatados como a linhagem A* descoberta no Oman, Arábia Saudita, Irã e Índia, que causa sintomas como o da canrose tipo A apenas em limões mexicanos (Graham, Gottwald *et al.*, 2004; Kimati, Amorim *et al.*, 2005).

O cancro cítrico pode ser disseminado de várias formas, o que reflete no padrão de ocorrência da doença. Respingos de chuva levam a contaminação para outras partes da mesma planta ou, no máximo até plantas vizinhas e, quando estes respingos estão aliados ao vento, a disseminação pode se dar a distâncias de até 15m (Goto, 1990). Ventos de velocidades iguais ou superiores a 8m/s ainda ajudam a penetração da bactéria em estômatos e ferimentos (Graham, Gottwald *et al.*, 2004), permitindo que a doença adquira maior severidade (Stall e Seymour, 1983). A penetração por meio de estômatos é restrita a folhas novas, pois folhas maduras são resistentes a este tipo de infecção (Leite-Júnior, Egels *et al.*, 1990).

A chuva também é importante para a exsudação da bactéria do interior da planta para sua superfície, pois o filme de água formado sobre as folhas e ramos permite a sobrevivência e posterior dispersão das bactérias para novos pontos de infecção (Leite-Júnior, Egels *et al.*, 1990). Bactérias exsudadas para a superfície da folha morrem em poucas horas devido à dessecação e exposição ao sol (Graham, Gottwald *et al.*, 2000), porém podem sobreviver alguns dias no solo e entre 1 e 2 meses em folhas e frutos caídos no solo. Após este período, a população decai para níveis indetectáveis devido a antagonismo e competição com outros microrganismos saprófitas presentes no ambiente (Graham, Gottwald *et al.*, 1989; Leite-Júnior, Egels *et al.*, 1990). Assim, plantas infectadas constituem-se a principal fonte de inóculo da bactéria, já que sua sobrevivência é curta em qualquer outro substrato ou na ausência de plantas cítricas doentes (Rossetti, 2001).

A disseminação regional da bactéria ocorre por movimento humano de material cítrico infectado ou exposto e por equipamentos contaminados (Graham, Gottwald *et al.*, 2004). Assim, o próprio homem é um de seus principais vetores de disseminação a longas distâncias, podendo esta chegar à disseminação entre plantas doentes de dezenas a centenas de metros (Belasque Júnior, Fernandes *et al.*, 2009).

Outro fator que pode favorecer o aumento da incidência e severidade dos casos de cancro cítrico é a lagarta minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) (Belasque Júnior, Fernandes *et al.*, 2009), cuja constatação de sua existência no país se deu em março de 1996 na região de Limeira, SP e rapidamente se espalhou pelo país (Chagas, 1999).

Os sintomas típicos do cancro cítrico são lesões eruptivas, corticosas, levemente salientes e de cor parda, podendo estar circundadas por um halo amarelo nas folhas e nos frutos, sendo geralmente maiores e apresentando fissuras neste último (Figura 1). A infecção ocorre em tecidos jovens durante períodos de crescimento do hospedeiro (Das, 2003) por meio de lesões presentes na planta ou pelos estômatos, em ramos, frutos e folhas, preferencialmente em sua região abaxial, e a colonização se restringe à região infectada (Dalla-Pria, Christiano *et al.*, 2006). Em casos mais severos de infecção, a doença pode provocar a queda das folhas e frutos sintomáticos, levando ao depauperamento da planta e até sua morte, caso a infecção ocorra em áreas muito extensas (Kimati, Amorim *et al.*, 2005).

Como já citado, os sintomas do cancro diminuem o valor de mercado das frutas, por vezes impedindo a sua comercialização devido à queda de sua qualidade e à necessidade de quarentena (Graham, Gottwald *et al.*, 2004). Além disso, regiões infestadas com Xac são submetidas à regulações internacionais, o que restringe ainda mais o seu mercado econômico (Schubert, Rizvi *et al.*, 2001), levando a desastrosas consequências para os pólos produtores locais.

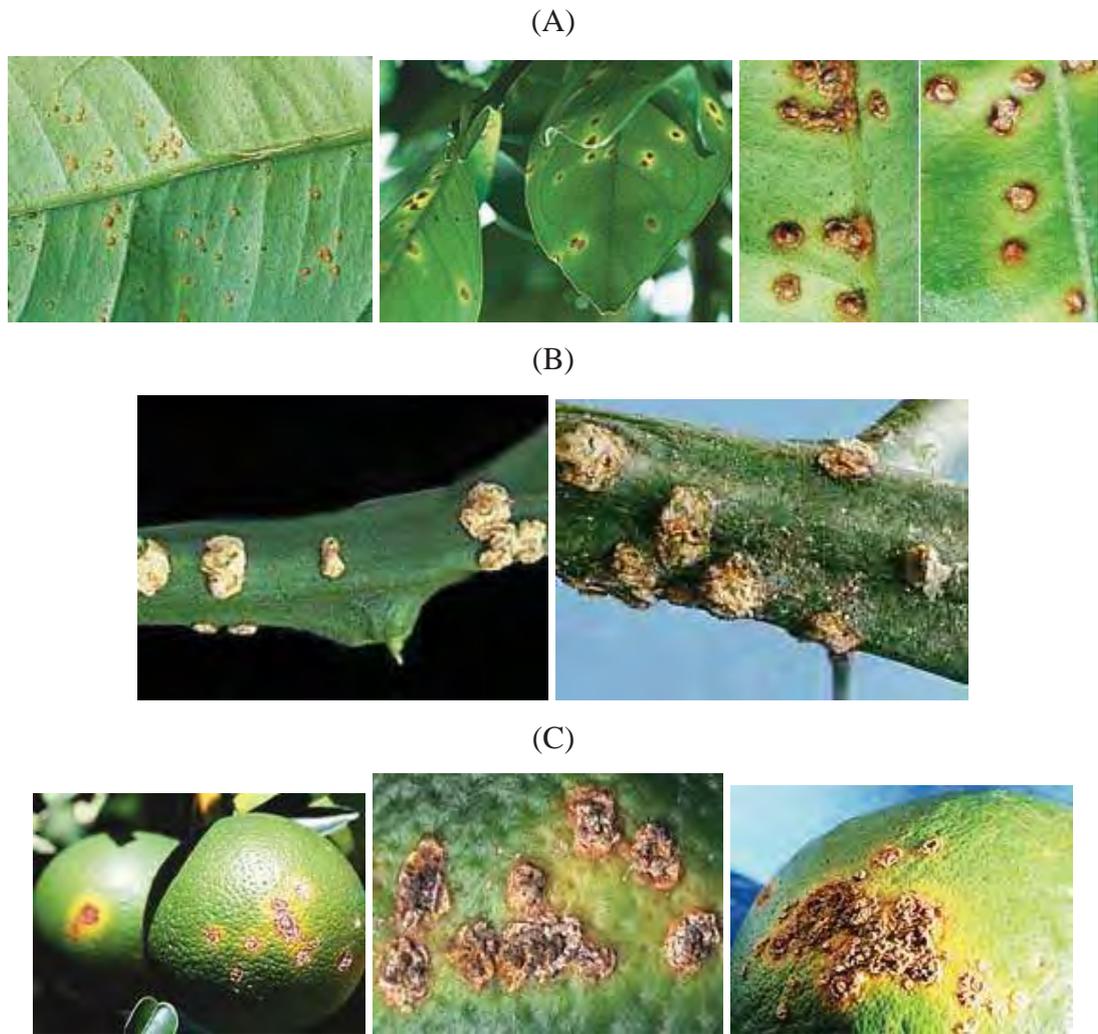


Figura 1: Lesões de cancro cítrico causadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Folhas (A), ramos (B) e frutos (C). Fotos extraídas de <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>.

1.4. Condições ambientais e a infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Água livre sobre as plantas (plantas molhadas) e altas temperaturas são os principais fatores ambientais que favorecem a infecção e o desenvolvimento do cancro cítrico, sendo que a temperatura tem influência predominante nestes eventos (Bergamin-Filho e Amorim, 1996; Dalla-Pria, Christiano *et al.*, 2006).

As temperaturas para infecção por Xac descritas na literatura podem variar de 15 °C a 39 °C, sendo a janela ótima de infecção de 30 °C a 35 °C (Civerolo, 1984; Vernière, Gottwald *et al.*, 2003; Dalla-Pria, Christiano *et al.*, 2006; Lopes, Barreto *et al.*, 2008). O conhecimento desta variável é de extrema importância para estudos da biologia do agente etiológico do cancro cítrico, bem como para um melhor entendimento do processo de infecção propriamente dito. Segundo (Dalla-Pria, Christiano *et al.*, 2006), temperaturas superiores a 40 °C e inferiores a 20 °C interferem no processo de infecção por Xac sendo que, quanto mais baixa a temperatura, maior é o período de incubação. Períodos de incubação tão longos quanto 60 dias já foram relatados por (Gottwald, Reynolds *et al.*, 1992) em condições adversas à infecção.

1.5. Influência de estresses ambientais na vida bacteriana

No ambiente natural, bactérias estão expostas a condições ambientais adversas, tais como mudanças na temperatura, na disponibilidade de nutrientes, na umidade, entre outros fatores. Estas alterações ambientais acarretam dificuldades para a sobrevivência bacteriana, uma vez que estas alterações mudam as condições ambientais para outras, longe de serem consideradas ótimas para o crescimento e desenvolvimento bacteriano (Ramos, Gallegos *et al.*, 2001).

Na escala de ecossistema, estresse é considerado um desafio que impõe custos fisiológicos para ser superado, enquanto distúrbio é um evento único que causa parada fisiológica e, diretamente, morte dos organismos envolvidos. Porém, para os microrganismos, tal divisão não é clara, uma vez que grandes mudanças no ecossistema são sentidas por eles em seu micro-clima e causam apenas alterações em seus recursos. Desta forma, são sentidos somente como um estresse ambiental.

Sendo assim, para bactérias, estresse não passa de um desafio fisiológico, que deve ser superado com aclimação imediata de realocação de seus recursos de vias de crescimento para as de sobrevivência (Schimel, Balsler *et al.*, 2007) e, por tais razões, microrganismos desenvolveram uma variedade de estratégias de aclimação para poderem superar períodos

adversos para o seu crescimento e, possivelmente mortais para a população bacteriana local (Ramos,Gallegos *et al.*, 2001).

Sabendo-se da capacidade das bactérias de alterar seu padrão genético para expressar traços ecologicamente condizentes com a realidade ambiental vigente, a existência de um subgrupo de genes expressos apenas em resposta a alterações ambientais é muito plausível (Knight,Zhang *et al.*, 2010). De fato, (Hebraud,Dubois *et al.*, 1994), mostrou que em *Pseudomonas fragi* alguns polipeptídeos eram sintetizados preferencialmente em determinadas temperaturas e (Regeard, Érieau *et al.*, 2000) acharam que aproximadamente 40 % de suas mais de 800 fusões transcricionais inseridas aleatoriamente no genoma de *Pseudomonas fluorescens* eram termicamente reguladas.

Genes reguladores respondem a sinais específicos, sejam eles ambientais ou provenientes do outras células, estimulando ou inibindo a transcrição, tradução ou algum outro evento genético, modificando assim as taxas de síntese dos genes adequados para lidar com a nova realidade ambiental. Assim, microrganismos são capazes de se adaptar com sucesso tanto fisiologicamente quanto bioquimicamente ao nicho em modificação (Ramos,Gallegos *et al.*, 2001).

Acredita-se que bactérias Gram-positivas sejam mais resistentes ao ressecamento que as Gram-negativas, devido à sua espessa parede celular. Porém, para outras situações ambientais desvantajosas para a bactéria, esta pode já não ser tão útil. Nestes casos, a aclimatação permitiria ao microrganismo se valer de outros mecanismos, os de tolerância, para lidar com as mudanças em seu micro-ambiente (Schimel, Balser *et al.*, 2007).

Este mecanismo exige a realocação de energia e nutrientes de vias de aquisição de mais recursos e crescimento para vias de sobrevivência, como a produção de chaperonas para a estabilização de proteínas (Yerbury,Stewart *et al.*, 2005). Sendo assim, pela modulação genética, bactérias podem se adaptar a estresses por longos períodos de tempo, tanto pela aclimatação quanto pelo seu aumento de desempenho após a execução destes mecanismos (Walker, Palmer *et al.*, 2006).

Especificamente falando da influência da temperatura sobre a vida bacteriana, pode-se dizer que este estresse acarreta problemas imediatos para a vida dos microrganismos, como a mudança da fluidez da membrana, na distribuição de proteínas e na conformação de ácidos nucléicos (Ramos,Gallegos *et al.*, 2001). Em *Escherichia coli*, por exemplo, ocorre a mudança na proporção de moléculas presentes nos isolados de Lipídeo A com a queda da temperatura de crescimento da cultura (Carty, Sreekumar *et al.*, 1999).

Esta bactéria também, quando tratada a 15 °C, para de crescer e suprime a expressão da maior parte de suas proteínas. Apesar disso, um grupo de aproximadamente 15 genes tem sua tradução aumentada, principalmente *CspA*, que representa aproximadamente 10 % das proteínas sintetizadas pela bactéria (Leeson, Gai *et al.*, 2000).

No caso do aumento excessivo da temperatura, grande parte dos microrganismos combatem com o aumento da síntese de diversas *heat shock proteins* (HSP), um grupo composto basicamente por chaperonas e proteases que trabalham no reparo e degradação de proteínas com problemas de dobramento. Para tal, o volume de tradução do gene *rpoH* determinará a abundância do fator σ^{32} que dirige a RNA polimerase para a tradução de mais de 20 genes HSP, podendo assim lidar com a mudança ambiental em nível celular (Ramos, Gallegos *et al.*, 2001). A proteólise durante o processo de aclimação também tem papel regulador, modulando a resposta das HSP em diferentes níveis, regulando a concentração celular do fator σ^{32} e alterando atividade das chaperonas. Sendo assim, tal processo atua não apenas modulando a resposta ao choque térmico, como também limitando esta resposta quando a célula retorna ao seu estado mais basal (Meyer e Baker, 2011).

1.6. Clima do Estado de São Paulo e influência da temperatura sobre as culturas cítricas

O estado de São Paulo é composto de sete tipos climáticos distintos, segundo a classificação climática de Koeppen, que se baseia em dados mensais pluviométricos e termométricos. A região central do Estado é considerada do tipo **Cwa**, com chuvas no verão e seca no inverno e temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C. A região Noroeste, mais quente, pertence ao tipo **Aw**, tropical chuvoso com inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18 °C (Miranda, Pinto *et al.*).

Como fornecedor de calor e umidade, o clima é o principal fator responsável pela dinâmica do meio ambiente pois, desta forma, tem influência direta nos processos físicos e biológicos num ecossistema (Bieras e Santos, 2003). Sendo assim, o clima é considerado a variável mais importante a ser levada em conta na agricultura, uma vez que seus elementos constituintes, como temperatura, precipitação, radiação solar, etc) influenciam diretamente todas as fases de desenvolvimento das plantas (Bieras e Santos, 2003).

Em plantas cítricas, o clima exerce grande influência sobre seu vigor e longevidade, influenciando também a qualidade e quantidade de frutos. Originários do sudoeste asiático, os citros desenvolvem-se melhor em regiões de clima mais ameno, o que foi o fator determinante

para a distribuição geográfica das plantas cítricas na grande faixa de 40° ao norte e sul do equador (Azevêdo, 2003). Levando-se em conta a citricultura para o mercado interno e externo foram definidas exigências climáticas dos principais cultivares cítricos de interesse comercial em São Paulo. Para o parâmetro temperatura, a média anual deve ser igual a 17 °C, temperatura mínima necessária para o cultivo da maior parte dos cultivares. Em relação à umidade, a deficiência hídrica anual deve ser igual a 0 mm, indicando ausência de estações com deficiência de umidade (Ciiagro, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Avaliar o efeito de diferentes temperaturas de cultivo sobre o crescimento e a fisiologia de Xac

2.2. Específicos

- Estudar o crescimento bacteriano em diversas temperaturas, inferiores, similares e superiores as consideradas ótimas para a infecção por Xac e determinar o ponto de parada de crescimento da bactéria e morte celular em meio líquido;
- Definir possíveis alterações em processos essenciais bacterianos como, por exemplo, nos mecanismos de segregação cromossômica e divisão celular, devido ao tratamento térmico.
- Determinar se a temperatura influi na perda de patogenicidade ou mecanismos de virulência em Xac

3. JUSTIFICATIVA

Os dados relatados em literatura sobre os fatores ambientais que influenciam o cancro cítrico baseiam-se, na maioria dos casos, na determinação das temperaturas limitantes para a ocorrência da doença. No entanto, não há dados correlacionando esses mesmos fatores ambientais com os aspectos da biologia e da fisiologia de *Xac*, os quais possam fornecer subsídios para um melhor entendimento do processo de infecção desta bactéria.

Sabe-se que o cancro cítrico ocorre em temperaturas entre 15 °C a 39 °C, porém, estudos preliminares mostraram que a bactéria pode crescer a temperaturas superiores a 39 °C. Sendo assim, quais são os efeitos da temperatura nos processos celulares essenciais desta bactéria? As temperaturas superiores a 39 °C limitam a ocorrência de infecção por *Xac*? Qual sua influência sobre a fisiologia bacteriana? Há morte celular bacteriana, ou apenas uma interrupção da dinâmica populacional do patógeno?

Consideramos que o melhor conhecimento dessas variáveis e da influência da temperatura no processo infeccioso de *Xac* seja de extrema importância para a caracterização de processos biológicos diversos desse patógeno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas e cultivo

A linhagem Xac 306 (WT – *wild type* ou linhagem selvagem), que foi utilizada como “tipo” no presente estudo, foi sequenciada por (Silva, Ferro *et al.*, 2002).

Xac foi cultivada a diversas temperaturas em meio NYG ou LB com ou sem ágar (Daniels, Barber *et al.*, 1984) e sob agitação de 200 rpm, quando em meio líquido. Ampicilina e Kanamicina, na concentração de 20mg/mL, foram utilizados na preparação de pré-inóculos e reativação das bactérias, quando necessário. Não foram utilizados durante as curvas de crescimento para evitar influência sobre o *doubling time* bacteriano.

Medição de crescimento foi realizada pela análise da alteração de densidade óptica a 600 nanômetros (600 nm) seguida e, em alguns casos, pela contagem de células viáveis em meio sólido por meio de plaqueador automático espiral (Autoplate 4000).

4.2. Curva de crescimento padrão

Para melhor padronizar a relação entre densidade óptica e número de células viáveis na cultura foi feita uma curva de crescimento padrão para Xac a temperatura ótima. Para isso, inoculou-se 2 a 3 colônias isoladas em meio NYG líquido contendo ampicilina, com posterior incubação destas por 14 horas a 30 °C e 200 rpm. Esta suspensão foi utilizada para inocular meio NYG ajustando-se a Densidade Óptica medida a 600 nm (D.O. _{600 nm}) para 0,05 em erlenmeyers de 125 mL. Frascos foram incubados por 14 horas a 30 °C sob agitação.

Após este período, a densidade óptica (D.O. _{600 nm}) foi medida e ajustada para D.O. inicial ~ 0,1 em meio NYG, em triplicata, seguindo-se o cultivo nas mesmas condições supracitadas. A partir deste ponto, as D.O. _{600 nm} foram medidas a cada 6 horas (com erros de 30 minutos) até a cultura atingir a fase de morte bacteriana.

A determinação das unidades formadoras de colônias (UFC) foi feita por diluição seriada plaqueada em meio NYG/Ágar e ampicilina contagem do número de células viáveis em placa.

4.2.1. Análise estatística

Para correlacionar as curvas de crescimento geradas pela densidade óptica e pelo número de células viáveis foi feita uma nova curva de regressão logarítmica dos dados no *software* Graphpad Prism 5.

4.3. Choque térmico *in vitro*

Para podermos determinar a temperatura de parada de crescimento e morte celular de Xac e o seu comportamento em diferentes temperaturas, foram-se utilizados choques térmicos em culturas bacterianas crescidas *in vitro*. Sendo assim, colônias bacterianas frescas foram inoculadas em meio NYG/Ampicilina líquido em tubos de ensaio, seguido de crescimento *over-day*.

Esta cultura foi utilizada para inocular as culturas analisadas, em triplicata, ajustadas para D.O. inicial ~ 0,01 meio NYG, e crescidos por 14 horas em agitador rotativo a 30 °C /200 rpm. Quando estas culturas atingiam D.O. ~ 0,4 os frascos eram colocados em diferentes temperaturas (20 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C e 45 °C) por 6 horas e, após este período, eram recolocadas à 30 °C. Eram feitas medições de D.O. a cada 6 horas a partir da D.O. ~ 0,4, até a cultura apresentar morte celular, após 36 horas.

4.4. Microscopia em contraste de fase

Determinadas condições de crescimento poderiam alterar a fisiologia bacteriana, sinalizando para defeitos de replicação cromossômica, divisão celular e/ou crescimento vegetativo (Ireton, Gunther *et al.*, 1994; Jones, Carballido-López *et al.*, 2001; Daniel e Errington, 2003; Lutkenhaus, 2007), tais fenótipos foram monitorados por microscopia em contraste de fase, no qual é possível detectar o aparecimento de morfologias discrepantes da padrão, como alongamentos do bastonete, formação de mini-células, distorções do eixo longitudinal das células, entre outros.

Para isto, colônias bacterianas crescidas por 48 horas em meio sólido foram inoculadas em meio NYG/ampicilina líquido em tubos de ensaio, seguido de crescimento 14 horas. Esta cultura foi utilizada para inocular os frascos analisados ajustados para D.O. inicial ~ 0,01 meio NYG, em triplicata, e crescidos por 14 horas em agitador rotativo a 30 °C/200 rpm, até atingir D.O. 600 nm ~ 0,4.

Células foram fotografadas para controle da amostra imediatamente antes do início do tratamento térmico. Após esta etapa inicial, a cultura foi submetida a choque térmico (20 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C e 45 °C; 200 rpm) por 6 horas e fotografadas novamente, para verificar alterações. O controle positivo do experimento foi feito com cultura crescida a 30 °C pelo mesmo período de tempo que os testes.

4.4.1. Análises estatísticas

Foram contadas pelo menos 200 células por amostra (triplicata) para cada temperatura e estas foram avaliadas pelo teste t de *Student* com nível de significância de 5 %. Estes testes foram executados por meio do *software* Graphpad Prism 5.

4.5. Microscopia de contraste de fase e fluorescência

Nos estudos de microscopia de fluorescência, as linhagens zapA e parB foram crescidas a partir de algumas colônias em meio de cultura LB/ampicilina/kanamicina e cultivadas por 6-8 horas. A partir deste primeiro inóculo, as culturas foram re-inoculadas em 10 mL de meio LB e cultivadas até atingir D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,4$, quando o choque térmico foi aplicado por 6 horas. A cultura era recolocada a 30 °C após o tratamento. Um controle positivo, mantido sempre a 30 °C, foi utilizado neste experimento.

Todas as culturas, inclusive o controle foram fotografadas por microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência imediatamente após o choque térmico em Microscópio BX-61 equipado com câmera monocromática XM-10. O software *Cell^F* foi utilizado na captura e análise de imagens.

4.6. Análise de virulência *in planta*

Para determinar se nenhuma alteração permanente nos mecanismos de patogenicidade de Xac ocorreu devido ao choque térmico e se ocorria a perfeita manutenção da virulência após o tratamento, culturas foram inoculadas *in planta* para avaliação dos sintomas de cancro cítrico.

Para isto, colônias bacterianas da linhagem WT de Xac foram crescidas por 48 horas em meio NYG sólido e inoculadas em meio NYG/ampicilina líquido em tubos de ensaio, seguido de crescimento de 14 horas. Esta cultura foi utilizada para inocular em meio NYG, em triplicata, os frascos analisados com D.O. $_{600\text{ nm}}$ inicial ajustadas para 0,01 e crescidos por 14 horas em agitador rotativo a 30 °C /200 rpm. Quando as culturas atingiram D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,4$, o choque térmico era aplicado durante 6 horas.

Após o tratamento, alíquotas das culturas tratadas e controle foram diluídas para uma concentração de 10^4 UFC/mL e inoculadas, em triplicata, em folhas de laranja Natal (*Citrus sinensis*), juntamente com meio de cultura NYG, como um controle negativo do experimento.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sem incidência direta de luz e foram regadas a cada dois dias, evitando molhamento foliar, a fim de evitar a contaminação cruzada entre as partes das plantas e entre árvores diferentes. Os sintomas foram analisados semanalmente para determinar quaisquer diferenças entre o tempo de aparecimento das pústulas e presença ou ausência do halo amarelo. Após 30 dias, as folhas foram retiradas da árvore para análise do aparecimento dos sintomas e comparados com os formados pela cultura de controle.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação do padrão de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* selvagem

Para que pudéssemos estudar a influência da temperatura no crescimento celular e na patogenicidade de Xac foi necessário preparar uma curva de crescimento deste patógeno. Como temperatura padrão de crescimento, foi utilizada a temperatura de 30 °C, considerada ótima para o cultivo de Xac (Dalla-Pria, Christiano *et al.*, 2006). A curva foi obtida pode ser observada na figura 2.

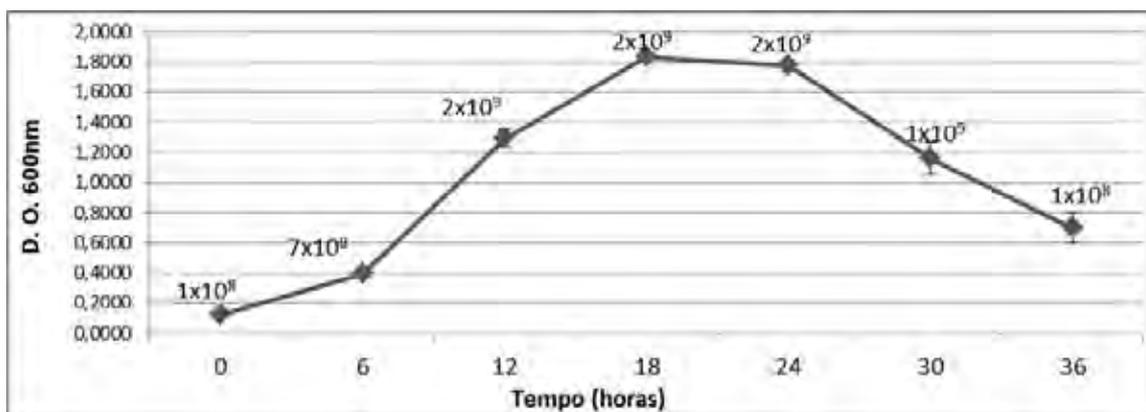


Figura 2: Curva de crescimento padrão *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Cultura selvagem foi cultivada por 36 horas a partir de D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,1$, com novas medições a cada 6 horas, associadas a contagem de UFC por diluição em série e plaqueamento.

A curva de crescimento obtida para Xac apresenta um padrão típico de crescimento bacteriano, no qual a fase log teve início em torno da D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,4$, estendendo-se até D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 1,8$, quando passa a uma curta fase estacionária, seguida de fase de morte. Note que a variação do número de unidades formadoras de colônias acontece, durante este perfil de crescimento, entre aproximadamente 10^8 a 10^9 , que é condizente com o crescimento lento desta bactéria.

Com os dados gerados a partir desta curva padrão de crescimento foi feita a regressão linear dos dados para relacionarmos D.O. $_{600\text{ nm}}$ com o número de células viáveis na cultura e gerada uma equação para estimar o valor de um dado em relação ao outro (Figura 3).

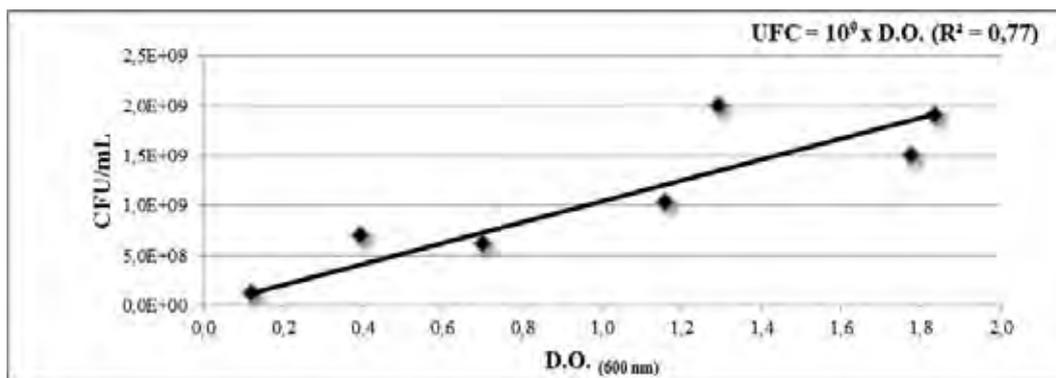


Figura 3: Relação entre densidade óptica e Unidades formadora de colônia por Mililitro para culturas crescidas a 30 °C. Gráfico foi gerado a partir da curva de crescimento padrão de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e analisados por meio do *software* Graphpad Prism 5.

A regressão linear apresentou um valor de r^2 de 0,77, um valor adequado, indicando correlação entre os dados, o que valida nossa curva como parâmetro para estimativas de número de células derivadas de medições de D.O. $_{600\text{ nm}}$.

5.2. Alterações no desenvolvimento da cultura de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadas pela temperatura

Sendo Xac um fitopatógeno, esta está submetida a estresses térmicos ambientais diários e sazonais, uma vez que seu hospedeiro não oferece proteção contra tais mudanças, variando sua temperatura de acordo com a do ambiente. Também pode-se inferir que as temperaturas encontradas no ambiente são bem diferentes dos 28-30 °C utilizados para o cultivo desta bactéria em laboratório. Desta forma, Xac necessita de meios para se proteger e evitar danos térmicos para manutenção de um *fitness* alto e otimizar a alocação de recursos para invasão e colonização da planta hospedeira.

Com o intuito de investigar o efeito das variações de temperatura sob a fisiologia de Xac, submetemos a bactéria a condições de cultivo controlado (em laboratório), utilizando choques de temperatura para avaliar mudanças em seu crescimento. Para tal, culturas foram crescidas até D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,4$ quando eram submetidas a choque térmico por 6 horas (período equivalente ao de maior irradiação solar no meio ambiente) e, em seguida, retornadas a temperatura ótima de crescimento. Medições de densidade óptica foram realizadas a cada 6 horas, até que todas as culturas entrassem na fase de declínio (Figura 4).

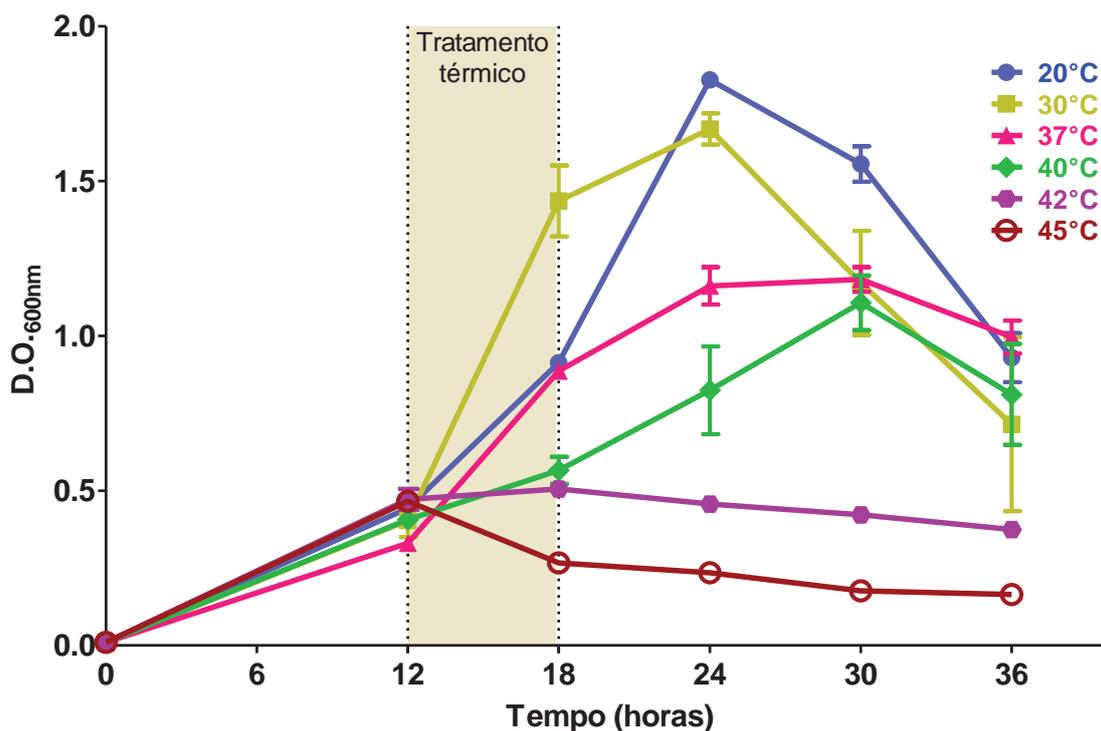


Figura 4: Curvas de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em diferentes temperaturas. Culturas de Xac foram propagadas até que atingissem D.O. _{600 nm} ~ 0,4, quando foram submetidas a choques térmicos por períodos de 6 horas; seguindo-se a alteração de temperatura, culturas eram retornadas a 30 °C por período necessário para que as mesmas apresentassem taxa de morte celular acentuada. Barras indicam desvio padrão. Os pontos em que a barra não aparece indicam desvios-padrão muito baixos.

Inicialmente, percebemos que as curvas derivadas das culturas tratadas a 20 °C e a 30 °C (cultura controle) mostram padrões similares de crescimento, uma vez que o único ponto de D.O. diferente entre ambas é o marcado logo após o final do tratamento (18 horas). Apesar da diferença na medição da D.O. _{600 nm}, esta é refutada pela contagem de UFC logo após o tratamento (Tabela 1), que aponta para concentrações bacterianas bem semelhantes em ambas as culturas após o final do estresse térmico (a 18 horas de crescimento, a cultura a 20 °C possui somente o dobro do número de células que a 30 °C). Ao final do tratamento, a cultura tratada a 20 °C foi capaz de retomar seu crescimento, atingindo um máximo de D.O. _{600 nm} ainda maior que o próprio controle. Após atingir este pico, a cultura entra em declínio, indicando o provável esgotamento do meio de cultivo.

Um comportamento semelhante foi observado para a cultura tratada a 37 °C, em que, após o tratamento térmico, a concentração de células viáveis atingiu a mesma faixa de aproximadamente 10⁹ UFC/mL observada para o tratamento a 20 °C (Tabela 1). Apesar disto,

a resposta desta cultura após a retomada da temperatura ótima é bem diferente das observadas anteriormente. Note que ao final do tratamento térmico, a cultura tratada a 37 °C não retoma plenamente seu crescimento e sua concentração máxima na curva, O.D. $_{600\text{ nm}} \sim 1,1$, é aproximadamente um terço menor que a atingida pelas outras duas culturas (D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 1,8$). Além disso, esta curva é a única que se mantém em um período estacionário por aproximadamente 6 horas (entre 24 e 30 horas de crescimento) antes de entrar em declínio e ocorrer a morte das células (Figura 1). Esta diferença na resposta após o choque térmico pode ser um indício de que, apesar da reação similar durante o tratamento, o calor poderia ter agido de forma a causar danos bioquímicos e fisiológicos nas células crescidas a 37 °C, levando à diminuição da capacidade de retomada de crescimento da cultura.

Temperaturas de tratamento	Células viáveis
20 °C	$2,86 \times 10^9$ UFC/mL
30 °C	$1,30 \times 10^9$ UFC/mL*
37 °C	$1,97 \times 10^9$ UFC/mL
40 °C	$3,51 \times 10^7$ UFC/mL
42 °C	$1,68 \times 10^4$ UFC/mL
45 °C	Indetectável

Tabela 1: Número de UFL/mL após tratamento térmico em diferentes temperaturas. Medições foram feitas após 18 horas de crescimento com as 6 horas finais de choque térmico. *Valor estimado a partir da curva de crescimento padrão de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Mudanças marcantes foram observadas durante o choque térmico a 40 °C. Ao final deste tratamento, a cultura apresenta D.O. $_{600\text{ nm}} \sim 0,6$ e concentração de células viáveis de 10^7 UFC/mL, mostrando que esta temperatura é capaz de afetar a fisiologia bacteriana de forma a inviabilizar a sobrevivência desta. Apesar da diminuição do crescimento bacteriano devido à temperatura, esta não pode ser considerada a temperatura de morte de Xac, pois observa-se ainda algum crescimento após o retorno das células para 30 °C.

Também, considerando que após o tratamento a cultura tratada a 40 °C apresenta uma concentração bacteriana menor que a tratada a 37 °C (Tabela 1) e que após 12 horas de crescimento ambas as culturas atingem a mesma D.O. $_{600\text{ nm}}$ (Figura 1), pode-se dizer que a velocidade total de crescimento de Xac tratada a 40 °C é ainda maior do que aquela a 37 °C,

evidenciando ainda mais a manutenção da capacidade de recuperação desta cultura, mesmo que não em seu máximo, após o choque térmico.

A partir dos 42 °C, a influência deletéria da temperatura sobre o crescimento de Xac se torna bem mais evidente. Apesar de a D.O. $_{600\text{ nm}}$ ~ 0,5 medida após o final do choque a 42 °C ser bem similar ao valor inicial de D.O. $_{600\text{ nm}}$ antes do tratamento (Figura 1), é notável a queda na concentração de células viáveis, após o tratamento, para aproximadamente 10^4 UFC/mL (Tabela 1). Os danos causados pela temperatura podem ser observados também pela reação da cultura após ser realocada em temperatura ótima. Apesar da manutenção de células viáveis na cultura, esta mantém o declínio mesmo quando realocada a 30 °C, mostrando que os possíveis danos celulares ocorridos não são passíveis de recuperação, levando a cultura à morte.

A 45 °C, a cultura foi totalmente inviabilizada após o choque térmico, não sendo possível a detecção de nenhuma célula viável após o tratamento.

5.3. Tratamento térmico promove alterações no tamanho de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Reconhecendo que o estresse térmico pode promover alterações fisiológicas diversas em células bacterianas ocasionando mudanças fenotípicas, das alterações passíveis de caracterização, optamos por investigar a morfologia celular como primeiro parâmetro para a determinação de desvios a norma.

Para isso, submetemos culturas WT de Xac novamente a choque térmico por 6 horas em variadas temperaturas (20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C e 45 °C) sendo as células resultantes analisadas por microscopia de contraste de para se verificar possíveis alterações na forma e tamanho das bactérias (Figura 5).

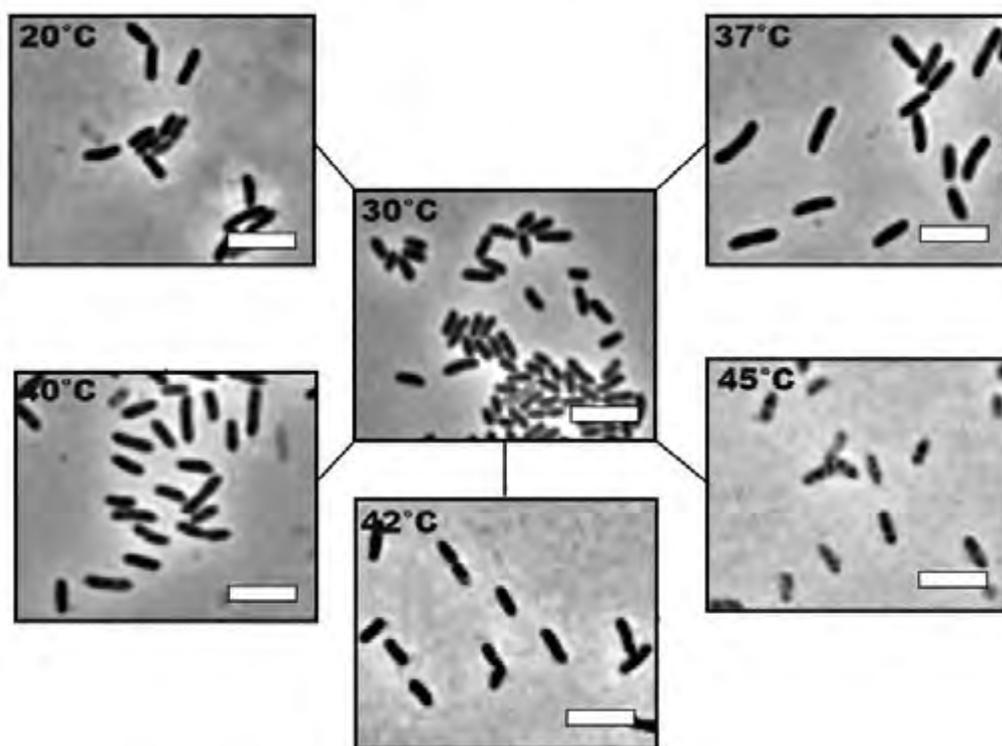


Figura 5: Morfologia celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* crescida em diversas temperaturas. Células foram analisadas por microscopia de contraste de fase. Barra = 4 µm

Nestas análises não observamos nenhuma alteração grave na morfologia bacteriana mediante tratamento térmico, porém, a temperatura de 45 °C promoveu uma desestruturação de conteúdo celular, que se deve provavelmente à desnaturação de proteínas. Pode-se notar também um aparente aumento no tamanho das células após o crescimento em temperaturas diferentes de 30 °C. Para confirmar esta suspeita, análises estatísticas foram realizadas a partir dos tamanhos celulares medidos nas imagens obtidas com a microscopia de contraste de fase (Tabela 2).

Temperaturas		Mínimo (µm)	Máximo (µm)	Média (µm) ± D.P.
20 °C	Tratamento	1,02	2,72	1,802 ± 0,285*
	Controle	0,92	2,08	1,373 ± 0,212
37 °C	Tratamento	1,34	3,59	2,208 ± 0,411*
	Controle	0,75	2,22	1,379 ± 0,295
40 °C	Tratamento	1,16	3,81	2,069 ± 0,441*
	Controle	1,03	3,05	1,606 ± 0,297
42 °C	Tratamento	1,14	2,91	1,836 ± 0,354*
	Controle	1,05	2,99	1,681 ± 0,362
45 °C	Tratamento	1,09	2,68	1,782 ± 0,328*
	Controle	0,93	2,38	1,512 ± 0,293

Tabela 2: Comprimento celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cultivada em diferentes temperaturas. Comprimento das células bacterianas foi obtido a partir de imagens capturadas em microscopia de contraste de fase e medidas por meio do *software* Cell[^] F. Estatística foi realizada com a análise de 200 células por tratamento utilizando-se o *software* Graphpad prism 5. *Todos os tratamentos apresentam médias significativamente diferentes das médias de seus respectivos controles.

Em todas as medições realizadas, observamos diferenças significativas entre o tamanho médio das células das culturas tratadas comparadas com os seus respectivos controles, demonstrando um aumento de tamanho celular após os tratamentos térmicos. A média de tamanho das células das culturas controle (crescidas por 6 horas a 30 °C) foi calculada em torno de 1,51 µm, enquanto a média dos tratamentos a 37 °C e 40 °C ficaram acima dos 2,0 µm, um aumento de mais de 33 % no tamanho celular. A diferença de tamanho nas bactérias tratadas a 20 °C, 42 °C e 45 °C são menos conspícuas e apesar se serem estatisticamente maiores que as controle, não chegam aos 2,0 µm de comprimento (Figura 6).

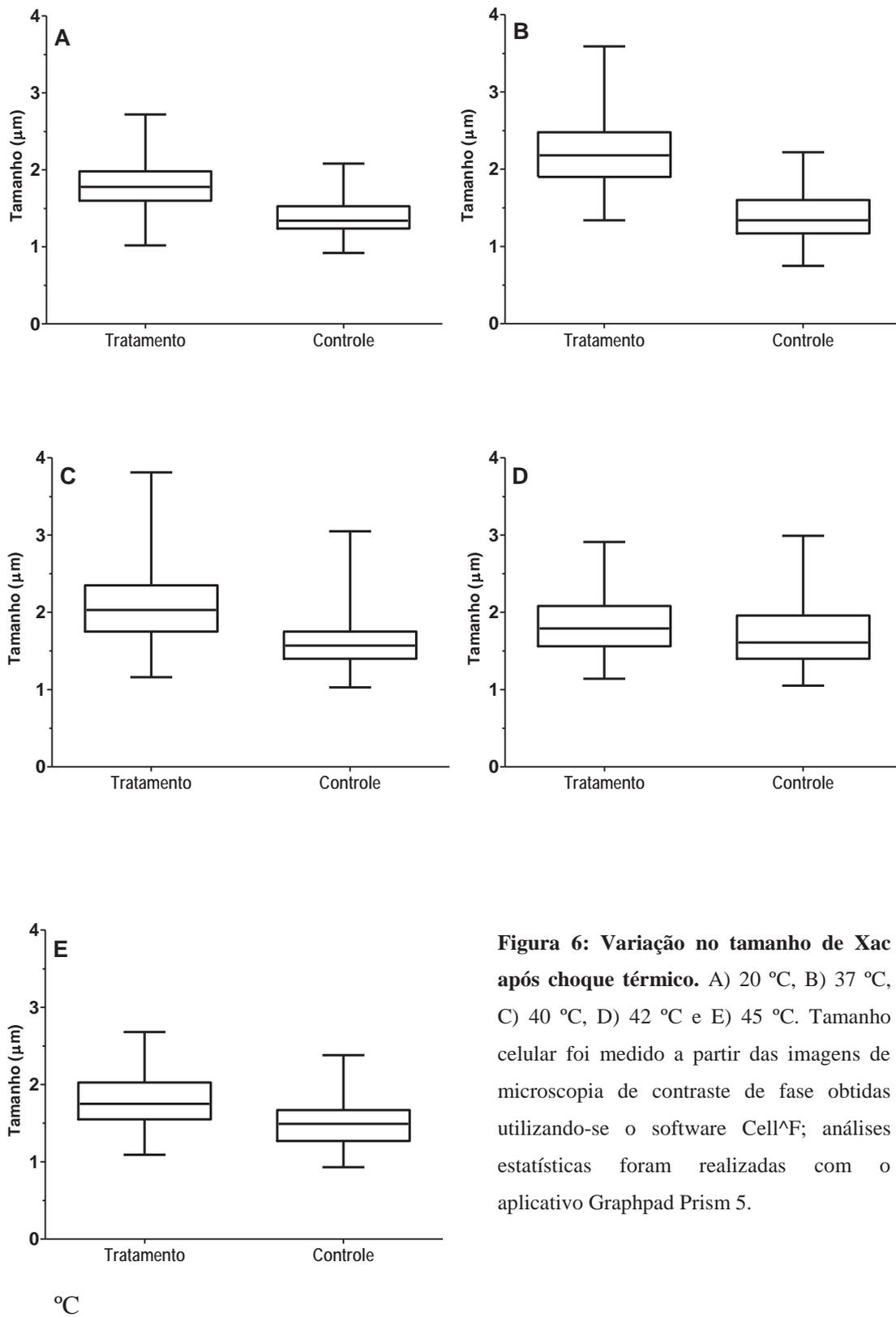


Figura 6: Variação no tamanho de Xac após choque térmico. A) 20 °C, B) 37 °C, C) 40 °C, D) 42 °C e E) 45 °C. Tamanho celular foi medido a partir das imagens de microscopia de contraste de fase obtidas utilizando-se o software Cell[^]F; análises estatísticas foram realizadas com o aplicativo Graphpad Prism 5.

5.4. Influência da temperatura sobre processos essenciais bacterianos

Sendo o aumento do tamanho celular um importante indício de alterações em processos essenciais como segregação cromossômica e divisão celular (Lutkenhaus, Wolf-Watz *et al.*, 1980; Mohl e Gober, 1997; Bartosik, Mierzejewska *et al.*, 2009; Donovan, Schwaiger *et al.*, 2010), o próximo passo deste estudo foi determinar a influência da temperatura sobre tais atividades celulares.

Para isso, duas linhagens mutantes diferentes de Xac foram utilizadas: a primeira, Xac *parB::pPM7g-parB^{Xac}*, possui um marcador para segregação cromossômica, expressando a proteína nativa ParB associada a proteína fluorescente verde GFP (A.P. Ucci e H. Ferreira, em preparação), permitindo a visualização do centrômero bacteriano. A outra, Xac *amy::pPM2a-zapA^{Xac}* (Martins, Lau *et al.*, 2010), expressa GFP-ZapA, uma proteína que se associa a FtsZ permitindo a visualização do anel-Z (septo bacteriano), que é formado na bactéria durante a fase pré-divisional (Gueiros-Filho, F. J., and R. Losick. 2002).

ParB-GFP se liga a um elemento *cis* da divisão celular (*parS*), que se localiza ao redor da origem de replicação dos cromossomos, formando o centrômero bacteriano (exemplificado pelo modelo *Bacillus subtilis* (Lin e Grossman, 1998)). Em Xac (A.P. Ucci e H. Ferreira, em preparação), a localização celular de ParB-GFP se assemelha ao observado para *Bacillus subtilis* e *Caulobacter crescentus* (Glaser, Sharpe *et al.*, 1997; Lin, Levin *et al.*, 1997; Mohl e Gober, 1997).

Ao se ligar em regiões em torno das origens de replicação do cromossomo bacteriano, ParB-GFP é observado em microscopia de fluorescência como 2 foci localizados nas extremidades do nucleóide e ocupando polos celulares opostos (Figura 8 – 30 °C, controle). Este padrão de localização ocorre, pois ParB funciona, em conjunto com outros fatores celulares, na segregação do cromossomo, auxiliando na orientação de cada origem de replicação para um polo celular (Sharpe e Errington, 1996; Marston e Errington, 1999; Thanbichler e Shapiro, 2006). O mesmo fenótipo pode ser observado para as células tratadas a 20 °C, onde duas marcações são observadas por compartimento celular, próximas a pólos celulares opostos (Figura 8 – 20 °C).

Após o tratamento a 37 °C, este padrão se mostra alterado em uma sub-população de bactérias, nas quais 3 ou 4 centrômeros marcados podem ser observados por compartimento celular (Figura 7). Apesar desta diferença, tal fenótipo não indica nenhuma alteração no processo de segregação cromossômica, mas um atraso no processo de divisão celular, uma

vez que, com a duplicação dos centrômeros bacterianos sem a divisão celular acarreta o acúmulo de origens de replicação em um mesmo compartimento não dividido.

Nas culturas que passaram por tratamento a 40 °C e 42 °C, é bem conspícua a desestruturação do centrômero bacteriano e, possivelmente da maquinaria de replicação cromossômica como consequência da alta temperatura sobre as proteínas celulares.

A 40 °C e 42 °C também é possível notar o início da desestruturação celular e da possível formação de corpos de inclusão, relacionados à perda proteica por desnaturação. Note que em microscopia de fluorescência, é possível observar brilho relativo a GFP dentro dos corpúsculos, levantando a possibilidade da presença de ParB-GFP em seu interior.

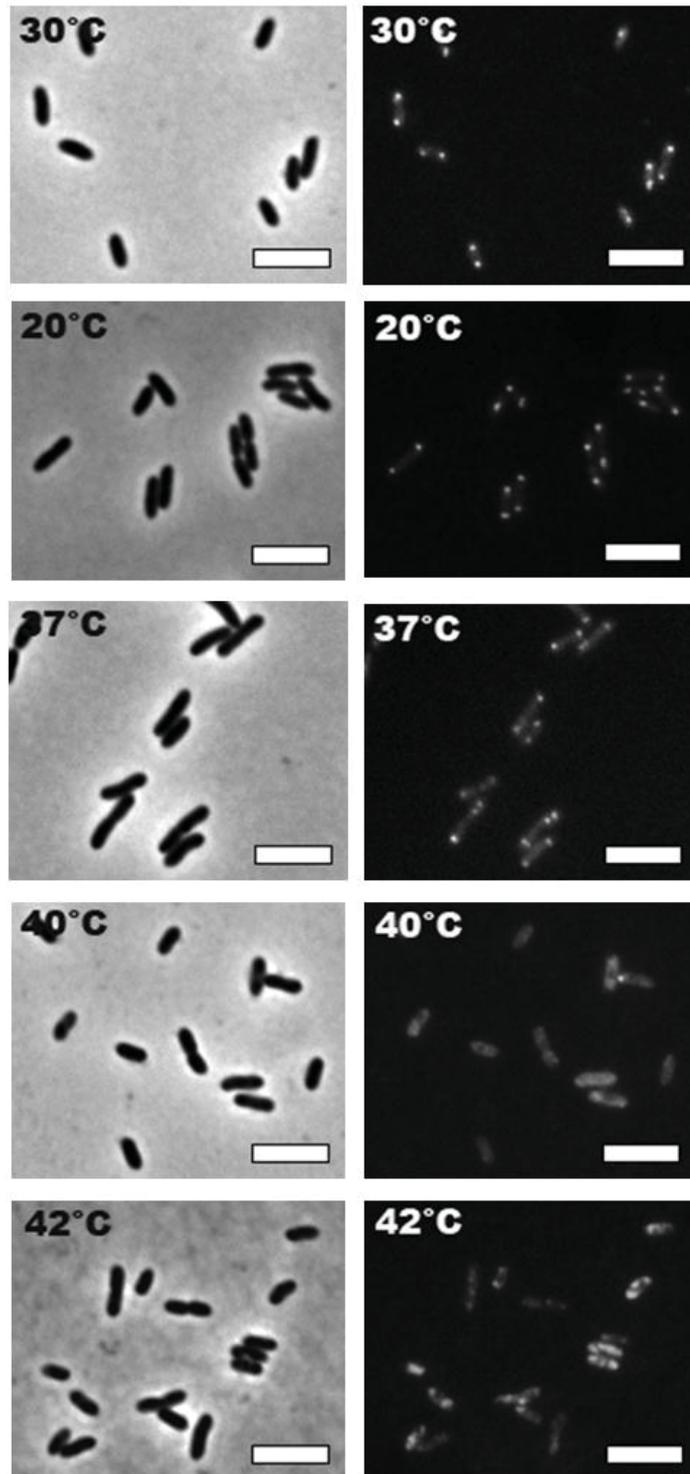


Figura 7: Microscopia de fluorescência do mutante *Xac parB::pPM7g-parB^{Xac}*. Linhagem mutante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* expressando ParB-GFP foi submetida a microscopia de contraste de fase (coluna esquerda) e Microscopia de fluorescência (coluna à direita) após tratamento térmico a diferentes temperaturas. Notar a presença de mais de 2 foci por compartimento celular na temperatura de 37 °C. Barra = 4 μ m.

Embora tenhamos observado que o complexo centromérico destes mutantes tenha permanecido intacto a temperaturas de 37 °C, a presença de duas ou mais origens de replicação marcadas por célula tratada pode ser um indicativo de atraso no processo de divisão celular. Para investigarmos tal hipótese, submetemos o mutante de Xac com septo marcado aos tratamentos de temperatura e observamos se esta estrutura fundamental no processo de divisão celular poderia ser perturbada (Figura 9).

Xac cultivada a 30 °C apresentou uma estrutura em forma de barra perpendicular ao eixo longitudinal do bastonete e posicionada na região central do mesmo (Figura 8 – 30 °C; Martins et al. 2010). Esta imagem foi utilizada como padrão de localização e número de septos marcados na célula. Uma vez que as células na cultura não estão sincronizadas na mesma etapa do ciclo bacteriano, a observação do anel Z só é possível naquelas células que estão passando pelo processo de divisão celular no momento da fotografia.

Assim como observado anteriormente com relação à segregação cromossômica, o padrão de divisão celular apresentado pela cultura tratada a 20 °C é bem similar ao da cultura controle e, sendo assim, nem a concentração de septos marcados nem a localização dos mesmos diferem em inspeção visual.

No tratamento a 37 °C, é possível perceber o aumento em número de células com septo marcado e na fluorescência emitida pelas marcações quando comparada ao controle. Este aumento na presença de anéis Z marcados poderia indicar a desaceleração ou até mesmo parada do processo de divisão celular, levando à sincronização da cultura em uma mesma fase do ciclo celular.

As culturas que sofreram choque térmico a 40 °C e a 42 °C apresentaram perda da estrutura proteica relacionada à divisão celular, assim como ocorreu com a linhagem ParB-GFP. Uma vez que a célula ainda apresenta alguma fluorescência, infere-se que a proteína ZapA-GFP esteja presente na bactéria, porém esta não se localiza na região central da célula como o esperado, mostrando a desestruturação da maquinaria celular de divisão.

Apesar de ambos os experimentos terem sido efetuados com linhagens mutantes de Xac, nas imagens também é claro o aumento no tamanho destas células, assim como ocorria com a linhagem WT, indicando que é plausível que as alterações fisiológicas observadas nos mutantes também estejam ocorrendo nas bactérias selvagens.

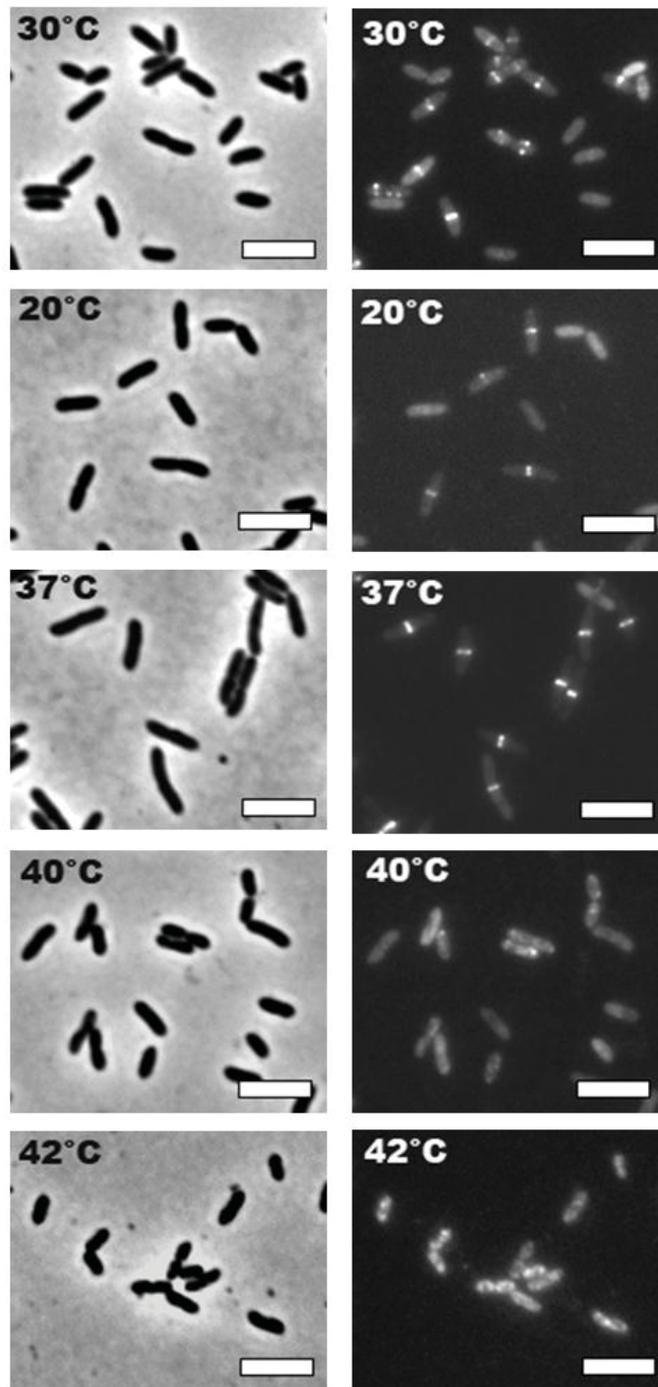


Figura 8: Microscopia de fluorescência do mutante *Xac amy::pPM2a-zapA^{Xac}*. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* expressando GFP-ZapA foi submetida a microscopia de contraste de fase (coluna esquerda) e Microscopia de fluorescência (coluna à direita) após tratamento térmico a diferentes temperaturas. Barra = 4 μm

5.5. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* mantém sua virulência após tratamentos térmicos

“Patógeno” é um termo atribuído a qualquer parasita que dá origem a doenças (Begon, Townsend *et al.*, 2006). Sendo assim, Xac é uma parasita de citros não obrigatória apesar de sua sobrevivência fora da planta não ser duradoura (Graham, Gottwald *et al.*, 2004). Desta forma, seria vantajoso para a bactéria “desligar” seus mecanismos de patogenicidade como forma de poupar energia em períodos menos favoráveis ao seu crescimento?

Sabendo-se que a 40 °C já existe uma queda significativa na taxa de crescimento da cultura, avaliamos a manutenção da virulência pela bactéria após tratamento com diferentes temperaturas. Para isto, submetemos Xac selvagem a tratamentos térmicos, onde logo após tratamento, ajustamos o número de UFC/mL e inoculamos estas células em folhas de laranja Natal por infiltração para determinar o aparecimento de sintomas e a consequente manutenção da virulência (Figura 9).

Para os inóculos das culturas controle e tratamentos a 20 °C e 37 °C a resposta à presença do patógeno *in planta* foi semelhante. Pode ser observada a presença de aproximadamente a mesma quantidade de sintomas em todos os inóculos. Tais sintomas se apresentam como lesões marrons e corticosas presentes na região abaxial da folha, sem coalescência entre as pústulas. Halo clorótico não foi detectado.

A formação destas pústulas indica a presença de Xac no mesófilo foliar sem modificações em sua virulência. Assim, apesar da temperatura influenciar na divisão celular, ela não implica em alteração na patogenicidade bacteriana, mantendo a capacidade infectiva das células na cultura após choque térmico.

Apesar da padronização da concentração do inóculo infiltrado nas folhas após o tratamento térmico, aparentemente os inóculos que sofreram choque térmico a 40 °C apresentaram maior quantidade de bactérias infiltradas do que foi possível contar em meio de cultura. Tal fenômeno pode ser observado pela maior quantidade de pústulas presentes neste inóculo.

Além disso, os sintomas surgiram da mesma forma em que nos tratamentos antes expostos: pústulas corticosas e amarronzadas na região abaxial da folha, porém com grande coalescência entre os cancos, devido a maior quantidade de erupções. Em uma das réplicas é possível observar a formação do halo amarelo ao redor da lesão. Note que o encharcamento foliar foi mais evidente neste caso.

Sintomas não foram observados nas regiões inoculadas com as culturas tratadas a 42 °C e 45 °C. Sabendo-se que a cultura entra em declínio logo após o início do tratamento térmico em ambas as temperaturas, a ausência de sintomas provavelmente se deve à morte das células inoculadas na planta a 42 °C ou à total ausência de células na cultura tratada a 45 °C.

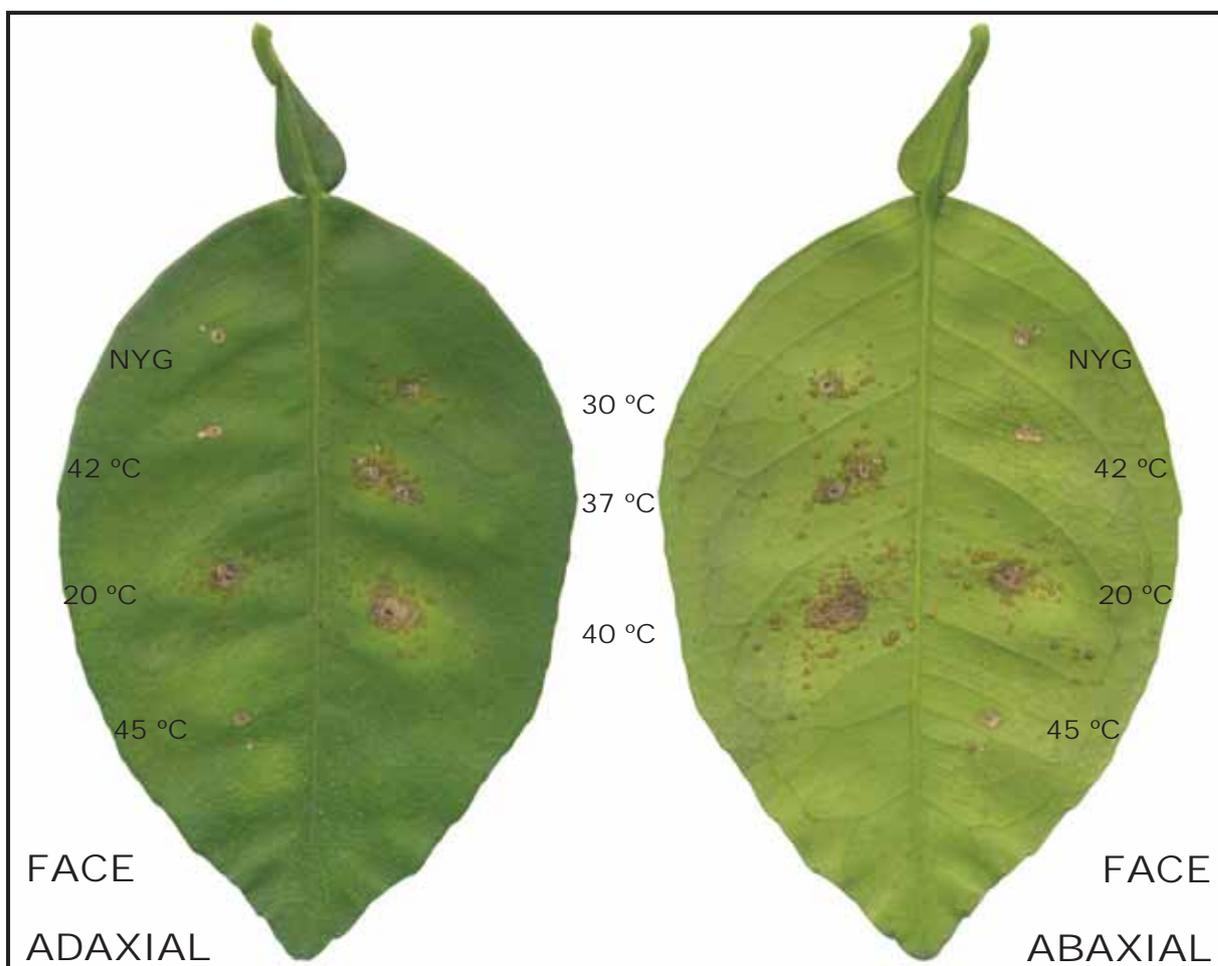


Figura 9: Sintomas de cancro cítrico causados por bactérias tratadas com diferentes temperaturas. Após tratamento térmico por 6 horas a diferentes temperaturas, as culturas tiveram sua concentração ajustadas para 10^4 UFC/mL e foram inoculadas em folhas de laranja “Natal”, em triplicata, por infiltração.

6. DISCUSSÃO

Com 50 % da produção mundial de suco de laranja e 85 % de participação no mercado mundial, o Brasil é hoje o maior produtor de laranjas do mundo. Apenas na safra 2009/2010 a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg, levando a um faturamento total dos elos da cadeia produtiva de citros da ordem de US\$14,6 bilhões. Flórida e São Paulo detêm 81 % da produção mundial de suco, sendo que apenas o Estado de São Paulo possui 53 % do total. Em 2009, o PIB do setor citrícola foi de US\$ 6,5 bilhões, sendo US\$ 4,3 bilhões no mercado interno e US\$ 2,1 bilhões no mercado externo (Neves,Trombin *et al.*, 2010). Tal pujança na produção citrícola foi alcançada por meio de diversas vantagens produtivas que o Brasil possui, como mão de obra barata e clima e solo favoráveis à produção (Belasque Júnior, Fernandes *et al.*, 2009).

Apesar disso, tal setor vem sendo constantemente ameaçado pela presença de diversas doenças, como o cancro cítrico, que diminui a qualidade dos frutos, gera a necessidade de quarentena, além de restrições à importação da fruta e diminuição na sua negociabilidade, em razão da prevenção de contaminação ou novas introduções de Xac nos países importadores (Graham,Gottwald *et al.*, 2004; Gottwald,Bassanezi *et al.*, 2007).

Esta situação foi agravada em 2009, quando foram revogadas simultaneamente a Portaria CDA 28/2007 e a Resolução CEE-CANECC/SP 01/2000, levando ao abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo (Belasque Júnior, Fernandes *et al.*, 2009). Anteriormente a estas mudanças, a incidência da doença nos pomares paulistas era baixíssima, em torno de 0,14 %. Já em 2011, esta incidência aumentou para 0,99 % do cinturão citrícola, um índice alarmante, por ser o maior encontrado em todos os levantamentos feito pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Na região Noroeste do estado foi encontrada a maior incidência, em torno de 7,0 % (Fundecitrus, 2012).

Este aumento considerável na incidência de cancro cítrico acarreta o risco de que a doença se torne endêmica no Brasil, como ocorreu no estado da Flórida (EUA) (Bock,Parker *et al.*, 2011). Esta ocorrência em nosso país traria desastrosas consequências para este mercado, uma vez que a existência do cancro no estado de São Paulo exigiria maior controle da doença, elevando os custos de produção, diminuindo a eficiência desta produção, devido à queda de frutos e folhas em plantas infectadas por Xac, e ocasionaria grandes sanções à exportação da fruta *in natura* pelos países importadores (Belasque Júnior,Barber *et al.*, 2010).

Apesar de existirem formas de manejo do cancro cítrico, como a aplicação de *sprays* cúpricos mensalmente nos pomares, tal estratégia não é eficaz, uma vez que estes não levam a um controle completo da doença e não impede a queda de folhas e frutos, sintoma comum

desta doença (Behlau, Belasque Jr *et al.*, 2010). Além disso, linhagens de Xac resistentes a cobre já foram encontradas (Canteros, 1999).

Sabendo-se desta problemática visamos, com este trabalho, melhor entender a biologia e fisiologia de Xac, tendo em vista suas respostas a um dos principais fatores abióticos no seu micro ambiente, a temperatura. O conhecimento desta variável é de grande importância para o entendimento de sua interação com o ambiente, seu crescimento em situações de estresse e para estudos futuros sobre sua modulação gênica como mecanismo de sobrevivência. Também, sabendo de todas as questões que giram em torno do controle do cancro cítrico e a falta de mecanismos para se atingir eficientemente esta meta, visamos com nossos estudos vislumbrar formas de controle físico para a doença e como forma de prevenção da disseminação da doença.

Primeiramente, observamos os efeitos da temperatura sobre o crescimento de Xac em condições de laboratório. Notamos que o crescimento de Xac foi, de forma geral, mais lento em temperaturas acima daquela considerada ótima para cultivo (exemplo a 37 °C, Figura 4). Tal observação levou a sugestão da ocorrência de alterações fisiológicas seguindo-se os tratamentos de estresse térmico. Tais alterações parecem irreversíveis a temperaturas ao redor de 42 °C, onde após expostas a este estresse, células de Xac não foram capazes de se recuperar e demonstrar crescimento em cultivo, o que declaramos temperatura de morte. A rigor, alterações irreversíveis como estas, e que se refletem em crescimento alterado conforme relatado acima, deveriam estar ocorrendo já a 40 °C.

Entretanto, mostramos também que o tempo de exposição à dada temperatura tem papel fundamental sobre o efeito deletério que ela possa causar. Muito provavelmente, uma exposição prolongada a 40 °C levaria a morte celular, mas propositadamente, nossas experimentações tentaram mimetizar a janela de maior exposição ao calor a que plantas cítricas estariam submetidas no campo em regiões como o estado de São Paulo e que seria de 6 horas.

Observamos assim que o tratamento a 40 °C por 6 horas não acarreta morte completa, mas promove uma diminuição considerável na velocidade de crescimento da população bacteriana exposta ao estresse (vide a contagem menor de UFC/mL após tal tratamento) e independente das alterações fisiológicas causadas há recuperação da cultura com células ainda capazes de infectar o hospedeiro citros.

Neste trabalho não medimos a temperatura do mesófilo foliar, que é o ambiente colonizado pela bactéria. Especulamos, entretanto, que neste local, a temperatura seja sempre

inferior ao da superfície foliar. Derivamos de nossas análises que a população de Xac passe por ciclos diários de morte (período de maior insolação) e expansão (período de menor irradiação solar); nos períodos de maior calor, em temperaturas variando por exemplo em torno de 40 °C, sempre teremos células viáveis provenientes das colônias de Xac no mesófilo foliar e considerando-se que células submetidas a tal estresse não perdem sua capacidade infectiva e nem virulência, teremos progressão da infecção.

Também, bactérias são células diretamente expostas aos reveses do meio que habitam e devem desta forma, responder e se ajustar a novas condições de forma muitíssimo rápida. Este ajuste nem sempre é perfeito ou possível, mostrando que alterações de crescimento como as observadas aqui podem desenvolver para modificações fenotípicas. Dentre estas, concentramos nossas análises nos processos de replicação/segregação cromossômica e divisão celular de Xac por serem estes essenciais para a vida bacteriana e por sabermos que perturbação de tais processos promove perda de virulência deste microrganismo (A.P. Ucci e H. Ferreira, em preparação; (Martins,Lau *et al.*, 2010)).

Mostramos que Xac exposta a diferentes tratamentos térmicos apresenta aumento de tamanho celular. Este aumento foi sutil, porém comprovadamente significativo em análises estatísticas. Se considerarmos a janela de temperatura variando de 20-37 °C, não observamos aí alterações substanciais ou comprometimento dos processos de replicação e segregação cromossômica de Xac.

Com base em modelos de replicação-segregação para *E. coli* e *B. subtilis* (Lemon e Grossman, 2001; Lau,Filipe *et al.*, 2003), sabemos que tais processos em bactérias acontecem concomitantemente e que se marcarmos as origens de replicação bacterianas como aqui mostrado para Xac, utilizando-se ParB-GFP (*E. coli* não possui as proteínas ParABS e nem utiliza tal sistema para segregar seus cromossomos), vemos normalmente dois centrômeros (dois foci de ParB-GFP/DNA) por compartimento celular no decorrer de um ciclo (espaço de tempo compreendido entre dois eventos de início de replicação cromossômica).

Nesta janela de 20-37 °C (Figura 8) vemos que replicação-segregação estão operando normalmente, entretanto, a 37 °C está ocorrendo um atraso do ciclo bacteriano com um aumento detectável do número de foci de ParB-GFP por compartimento celular. Mostramos que este atraso ocorreu por parada do processo de divisão celular, onde detectamos um acúmulo de células com septo divisional marcado por GFP-ZapA, uma proteína que atua estimulando a formação no anel Z em bactérias (Gueiros-Filho e Losick, 2002). Se Xac para de se dividir a 37 °C, ou o faz de forma bem mais lenta que quando a temperatura ótima de

crescimento (30 °C), esta cultura está na realidade sendo sincronizada com implicações bastante interessantes se considerarmos a propagação das colônias em processo de infecção. Acima discutimos que entre 40-42 °C haveria morte em função do tempo. Aos 42 °C já é uma temperatura que promove alterações fisiológicas irreversíveis e que se células forem expostas a elas por períodos prolongados, teríamos seguramente a morte completa de células na cultura. Vemos, em suma, que a 42 °C a cultura está praticamente inerte.

Como ParB é uma proteína presente na célula durante praticamente todo o ciclo celular (Sharpe e Errington, 1998), pode-se dizer que ela é uma proteína de grande estabilidade. A verificação de alteração na maquinaria na qual ela está inclusa é um bom indicativo de desestruturação de vários outros complexos proteicos, o que acarreta a alteração na fisiologia bacteriana.

Tal parada pode indicar também uma modulação da expressão gênica e, conseqüentemente, do metabolismo celular por parte de Xac frente a condições adversas. Este comportamento é observado em microorganismos em geral, que desenvolveram uma variedade de estratégias de aclimatação para superar dificuldades ambientais e condições contrárias ao seu crescimento e possivelmente mortais para a população bacteriana (Ramos, Gallegos *et al.*, 2001).

Em temperaturas acima de 40 °C pôde-se observar o início da desestruturação celular tanto pela presença de corpos de inclusão (Figuras 7 e 8) como pelo desaparecimento das estruturas marcadas nos mutantes expressando ParB-GFP e GFP-ZapA. Tal comportamento pode ocorrer devido à desnaturação de proteínas causadas diretamente pela temperatura na célula. Esta desestruturação também tem suas conseqüências observadas na curva de crescimento, onde em tratamento com temperaturas acima de 40 °C a concentração de células viáveis presentes na cultura decai drasticamente quando comparada à curva padrão a 30 °C (Tabela 1).

Por fim, decidimos avaliar a manutenção da capacidade infectiva da bactéria após o estresse causado pela temperatura, pois, sendo Xac um fitopatógeno exclusivo de citros com sobrevivência epifítica pouco duradoura, a colonização do hospedeiro é uma necessidade vital (Graham, Gottwald *et al.*, 2000). Somente bactérias cultivadas abaixo da temperatura de morte (42 °C) mantiveram a capacidade infectiva. As bactérias crescidas nas temperaturas mais altas não foram capazes de gerar sintomas nas folhas. Este fato é condizente com a curva de crescimento a 42 °C e 45 °C. Nesta temperatura, Xac não consegue manter o crescimento

durante o choque térmico nem se recuperar após o fim do mesmo e reflete a ocorrência de alterações irreversíveis e a ausência de células viáveis após tratamento.

Finalmente, os resultados aqui apresentados podem servir como base para o desenvolvimento de métodos de controle físico bacteriano para desinfecção de ramos e frutos cítricos, além de ter contribuído na determinação precisa das temperaturas de morte de *Xac*, temperatura de parada de divisão celular, que fornece subsídios para estudos moleculares deste processo neste fitopatógeno e mais, mostramos que a bactéria não perdeu sua capacidade infectiva frente a nenhuma condição térmica adversa a que foi submetida em nossas análises.

7. CONCLUSÃO

Temperaturas entre 37-40 °C promovem parada do ciclo celular de Xac por interferir no processo de divisão bacteriana. Esta parada no ciclo não interfere com a capacidade infectiva de Xac. O número de células viáveis em uma cultura ou colônia mediante exposição a temperaturas variando de 40-42 °C depende do tempo. Tratamento térmico a 42 °C afeta a capacidade de colonizar o hospedeiro e já constituem temperaturas de morte celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, S. F. Providências para erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 112-123, 1957.

AMORIM, L.;BERGAMIN-FILHO, A. A epidemiologia do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 1, p. 151-156, 2001.

AZEVÊDO, C. L. L. Sistema de Produção de Citros para o Nordeste. 2003. Acesso em: 20/06/2012.

BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A.;J., A. A. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 1, p. 30-35, 2001.

BARTOSIK, A. A.; MIERZEJEWSKA, J.; THOMAS, C. M.;JAGURA-BURDZY, G. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. **Microbiology**, n. 155, p. 1080-1092, 2009.

BASSANEZI, R. B.; BELASQUE JÚNIOR, J.;MASSARI, C. A. **Current situation, management and economic impact of cutrus canker in São Paulo and Minas Gerais, Brazil** 2009.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.;HRPER, J. L. **Ecology: From individuals to ecosystems**. 4a. edição. Blackwell Publishing, 2006.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J.; GRAHAM, J. H.;LEITE JR, R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, n. 3, p. 300-305, 2010.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BARBER, C. J.; BERGAMIN-FILHO, A.;MASSARI, C. A. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35 n. 5, p. 314-317 2010.

BELASQUE JÚNIOR, J.; FERNANDES, N. G.;MASSARI, C. A. O Sucesso da Campanha de Erradicação do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.

BERGAMIN-FILHO, A.;AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996.

BIERAS, A. R.;SANTOS, M. J. Z. Comportamento climático e incidência do cancro cítrico, na cultura de citros, nos municípios de limeira e bebedouro (SP). **Estudos Geográficos**, v. 1, n. 1, p. 41-53, 2003.

BOCK, C. H.; PARKER, P. E.; COOK, A. Z.; GRAHAM, J. H.;GOTTWALD, T. R. Infection and decontamination of citrus canker-inoculated leaf surfaces. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 259-264, 2011.

BRUNINGS, A. M.;GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141–157, 2003.

CANTEROS, B. I. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: MAHADEVAN, A., Proceedings of the International Society of Bacteriology 1999. Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras, Chennai, India. p.455-459.

CARTY, S. M.; SREEKUMAR, K. R.; RAETZ, C. R. H. Effect of Cold Shock on Lipid A Biosynthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 14, p. 9677-9685, April 2, 1999.

CHAGAS, M. C. M. das. *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae): Bioecologia e relação com o cancro cítrico. p. 67, 1999.

CIAGRO. Zoneamento macro - Aptidão ecológica da cultura da citrus. 2009. Acesso em: 20/06/2012.

CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus. **Rio Grande Val. Hort. Soc.**, v. 37, p. 127-146, 1984.

DALLA-PRIA, M.; CHRISTIANO, R. C. S.; FURTADO, E. L.; AMORIM, L.; FILHO, A. B. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. **Plant Pathology**, v. 55, n. 5, p. 657-663, 2006.

DANIEL, R. A.; ERRINGTON, J. Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 767-776, 2003.

DANIELS, M. J.; BARBER, C. E.; AL., E. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **Embo J.**, v. 3, n. 13, p. 3323-3328, 1984.

DAS, A. K. Citrus Canker - A review. **J Appl Hort**, v. 5, p. 52-60, 2003.

DONOVAN, C.; SCHWAIGER, A.; KRAMER, R.; BRAMKAMP, M. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. **J Bacteriol** n. 192, p. 3441-3451, 2010.

FUNDECITRUS. Cancro cítrico atinge 0,99% dos talhões do parque citrícola 2012. Acesso em: 09/07/2012.

GLASER, P.; SHARPE, M. E.; RAETHER, B.; PEREGO, M.; OHLSEN, K.; ERRINGTON, J. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. **Genes Dev**, v. 11, p. 1160-1168, 1997.

GOTO, M. . In: PRESS, A. (Ed.). **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego, 1990.

GOTTWALD, T. R.; BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. Spatial Pattern Analysis of Citrus Canker-Infected Plantings in São Paulo, Brazil, and Augmentation of Infection Elicited by the Asian Leafminer. **Phytopathology**, v. 97, n. 6, p. 674-683, 2007.

GOTTWALD, T. R.; REYNOLDS, K. M.; CAMPBELL, C. L.;TIMMER, L. W. Spatial and spatiotemporal autocorrelation analysis of citrus canker epidemics in citrus nurseries and groves in Argentina. **Phytopatology**, v. 82, n. 8, p. 843-851, 1992.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CIVEROLO, E. L.;MCGUIRE, R. G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**, v. 73, p. 423-427, 1989.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.;ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; CUBERO, J.;DROUILLARD, D. L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker. **Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop**, 2000.

GUEIROS-FILHO, F. J.;LOSICK, R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes & Development**, v. 16, n. 19, p. 2544-2556, October 1, 2002 2002.

HEBRAUD, M.; DUBOIS, E.; POTIER, P.;LABADIE, J. Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 13, p. 4017-4024, 1994.

IRETON, K.; GUNTHER, N. W. T.;GROSSMAN, A. D. spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol** v. 176, n. 17, p. 5320-5329, 1994.

JONES, L. J. F.; CARBALLIDO-LÓPEZ, R.;ERRINGTON, J. Control of Cell Shape in Bacteria: Helical, Actin-like Filaments in *Bacillus subtilis*. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 913-922, 2001.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A.;CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 4a. Ed. São Paulo: 2005.

KNIGHT, C. G.; ZHANG, X. X.; GUNN, A.; BRENNER, T.; JACKSON, R. W.; GIDDENS, S. R.; PRABHAKAR, S.; ZITZMANN, N.;RAINEY, P. B. Testing temperature-induced proteomic changes in the plant-associated bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 396-402, 2010.

LAU, I. F.; FILIPE, S. R.; SØBALLE, B.; ØKSTAD, O.-A.; BARRE, F.-X.;SHERRATT, D. J. Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 731-743, 2003.

LEESON, D. T.; GAI, F.; RODRIGUEZ, H. M.; GREGORET, L. M.;DYER, R. B. Protein folding and unfolding on a complex energy landscape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2527-2532, 2000.

LEITE-JÚNIOR, R. P.; EGELS, D. S.;STALL, R. E. **Cancro Cítrico. Prevenção e controle no Paraná**. Londrina: Fundação Instituto Agrinômico do Paraná: 51 p. 1990.

LEMON, K. P.;GROSSMAN, A. D. he extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. **T. Genes Dev**, n. 15, p. 2031-2041, 2001.

LIN, D. C.-H.;GROSSMAN, A. D. Identification and Characterization of a Bacterial Chromosome Partitioning Site. **Cell**, v. 92, n. 5, p. 675-685, 1998.

LIN, D. C.-H.; LEVIN, P. A.;GROSSMAN, A. D. Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4721-4726, April 29, 1997 1997.

LOPES, M. V.; BARRETO, M.; SCALOPPI, E. A. G.; BARBOSA, J. C.;O., B. Mapas de zonas de risco de epidemias e zoneamento agroclimático para o Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 349-353, 2008.

LUTKENHAUS, J. F. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 539-562, 2007.

LUTKENHAUS, J. F.; WOLF-WATZ, H.;DONACHIE, W. D. Organization of Genes in the *ftsA-envA* Region of the *Escherichia coli* Genetic Map and Identification of a New *fts* Locus (*ftsZ*). **Journal of Bacteriology**, v. 142, n. 2, p. 615-620, 1980.

MARSTON, A. L.;ERRINGTON, J. Dynamic Movement of the ParA-like Soj Protein of *B. subtilis* and Its Dual Role in Nucleoid Organization and Developmental Regulation. **Molecular cell**, v. 4, n. 5, p. 673-682, 1999.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE JÚNIOR, J.; DO AMARAL, A. M.; R., T. S.;FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, 2010.

MASSARI, C. A. Cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 248, 2001.

MASSARI, C. A.;BELASQUE JÚNIOR, J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de são paulo – situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja**, v. 27, n. 1, p. 41-55, 2006a.

MASSARI, C. A.;BELASQUE JÚNIOR, J. A erradicação de focos rurais e urbanos de cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 108-171, 2006b.

MEYER, A. S.;BAKER, T. A. Proteolysis in the *Escherichia coli* heat shock response: a player at many levels. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 194-199, 2011.

MIRANDA, M. J.; PINTO, H. S.; ZULLO JÚNIOR, J.; FAGUNDES, R. M.; FONSECHI, D. B.; CALVE, L.;PELLEGRINO, G. Q. A classificação climática de Koeppen para o Estado de São Paulo. 2012. Acesso em: 20/06/2012.

MOHL, D. A.;GOBER, J. W. Cell Cycle Dependent Polar Localization of Chromosome Partitioning Proteins in *Caulobacter crescentus*. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 675-684, 1997.

NAMEKATA, T. ancro cítrico: erradicação ou convivência? **Jornal do agrônomo**, v. 103, p. 9-10, 1980.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.;KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. ed. Ribeirão Preto 2010. 137 p.

RAMOS, J. L.; GALLEGOS, M.; MARQUÉS, S.; RAMOS-GONZÁLEZ, M. I.; ESPINOSA-URGEL, M.;SEGURA, A. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. **Current Opinion in Microbiology**, n. 4, p. 166-171, 2001.

REGEARD, C.; ÉRIEAU, A. M.;GUESPIN-MICHEL, J. F. A bioluminescence assay for screening thermoregulated genes in a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 183-189, 2000.

ROSSETTI, V. **Manual ilustrado de doenças de citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, 2001.

SANTOS, C. F. O. **Cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu combate**. 2ed. Campinas: 1991.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.;VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.

SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.;WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, 2007.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.;DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida - again. **Plant Disease**, v. 85, n. 4, p. 340-356, 2001.

SHARPE, M. E.;ERRINGTON, J. The *Bacillus subtilis* *soj-spo0J* locus is required for a centromere-like function involved in prespore chromosome partitioning. **Mol Microbiol**, n. 21, p. 501-509, 1996.

SHARPE, M. E.;ERRINGTON, J. A fixed distance for separation of newly replicated copies of *oriC* in *Bacillus subtilis*: implications for co-ordination of chromosome segregation and cell division. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 981-990, 1998.

SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.;

FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. **Plant Disease**, v. 67, n. 5, p. 581-585, 1983.

THANBICHLER, M.; SHAPIRO, L. MipZ, a Spatial Regulator Coordinating Chromosome Segregation with Cell Division in *Caulobacter*. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 147-162, 2006.

VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease Development and Symptom Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in Various Citrus Plant Tissues. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 832-843, 2003.

WALKER, V. K.; PALMER, G. R.; VOORDOUW, G. Freeze-Thaw Tolerance and Clues to the Winter Survival of a Soil Community. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1784-1792, March 1, 2006 2006.

YERBURY, J. J.; STEWART, E. M.; WYATT, A. R.; WILSON, M. R. Quality control of protein folding in extracellular space. **EMBO Rep**, v. 6, n. 12, p. 1131-1136, 2005.

Capítulo 2

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

**“Temperature influence over physiology and growth of
Xanthomonas citri subsp. *citri*”**

Sumares J.A.P.¹; Belasque Júnior J.²; Ferreira H.¹; Martins, P.M.M.^{3*}

¹Depto. de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Campus Araraquara, Rodovia Araraquara/Jau Km 1, Araraquara, SP, Brasil, 14801-902. ²Fundecitrus, Centro de Pesquisas Citrícolas, Departamento Científico, Avenida Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201 - Vilha Melhado, Araraquara, SP, Brasil, 14807-040. ³Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia/CEIS, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Campus Rio Claro, Avenida 24 A 1515, 13506-900

*email: pmmm@rc.unesp.br

Keywords: Citrus canker, Bacterial physiology, Segregation, cell division

Abstract

Asiatic citrus canker is the most important citrus disease caused by *Xanthomonas*. It is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). This disease constitutes a great risk to Brazilian citriculture as canker symptoms decrease fruits market value, sometimes preventing its commercialization. Moreover regions infested by Xac may be subjected to international regulations, restricting even more its economic market and leading to disastrous consequences for local production poles. In this work we've tried to determine the influence of temperature in Xac growth, with special attention to death temperature, and its influence over infective competence in different temperatures. We found that Xac growth rate is indeed influenced by high temperatures, but with special and interesting features. Under thermic stressful conditions, Xac slightly modifies its size, becoming considerably longer than under lab culture standard growing, a clue for modifications on bacterial basic mechanisms. We found that the temperature effect goes beyond the culture development, reaching Xac cellular division process. Xac grown at 37 °C suffers a division arrest in the pre-divisional phase, leading to the synchronization of the culture cell in this stage, although no influence over chromosome segregation was found.

Introduction

Brazil is the greatest citrus producer, with a participation of 50% of the world's production of orange juice and 85% in the citrus world market in the 2009/2010 harvest. Indeed, one of each five orange juice cups consumed in the world was produced in a Brazilian factory (Neves, Trombin *et al.*, 2010).

Besides those great numbers, citrus crops are constantly endangered by several diseases. One of them is the Asiatic citrus canker (ACC), the most important disease caused by *Xanthomonas*. It is spread over most of the citrus producing areas over the world (Vernière, Gottwald *et al.*, 2003).

This disease is caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (Schaad, Postnikova *et al.*, 2006), a Gram-negative bacteria, rod-shaped, aerobic and motile by one polar flagellum (Brunings e Gabriel, 2003), (Graham, Gottwald *et al.*, 2004). It is capable of inducing symptoms over any species of *Citrus* plants and some genus of the Rutaceae family (Massari e Belasque Júnior, 2006a).

ACC's typical symptoms are raised, necrotic and eruptive brown lesions that may be surrounded by an yellow chlorotic halo in leaves and fruits. In severe cases, it may cause defoliation and premature fruit drop leading, inclusively, to general debilitation and premature death of the plant (Brunings e Gabriel, 2003), (Graham, Gottwald *et al.*, 2004; Kimati, Amorim *et al.*, 2005).

Due to those symptoms and the potential of disease spreading by infected tissues, Citrus canker grounds for fruit's importation restrictions and negotiability reduction, as a form to prevent contamination of importing areas (Gottwald, Bassanezi *et al.*, 2007). It also reduces fruit quality and generates the necessity of quarantine (Graham, Gottwald *et al.*, 2004), complicating the importation processes.

As a phytopathogen, Xac depends on the plant's environment temperature. Infection temperature may vary from 15 °C to 39°C, being the optimum temperature between 30°C and 35°C (Vernière, Gottwald *et al.*, 2003); (Lopes,Barreto *et al.*, 2008);(Civerolo, 1984); (Dalla-Pria,Christiano *et al.*, 2006). For (Dalla-Pria,Christiano *et al.*, 2006), the importance of temperature is shown in the northwest region on São Paulo state, where Citrus canker is commonly found. Even though these occurrences are related to the disease focus in the area, temperature also plays a role.

The objective of this work was to study the effect of the temperature stress over growth, pathogenicity and physiology of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in order to better understand its influence over vital processes of the bacteria, providing new data to upcoming studies and future development of new disinfection techniques based on temperature stress.

Material and Methods

The lineages used in this work were the sequenced strain of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (previous *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) and two mutants strains previously constructed in our laboratory: Xac amy::pPM2a-zapA^{Xac} (Martins, Lau *et al.*, 2010) that expresses the cell division protein zapA fused with the fluorescence protein GFP and Xac amy::pPM7g-parB^{Xac}, likewise expressing the segregation protein ParB-GFP (Ucci, A. P., unpublished data). grown in NYG or LB media under a constant rotation of 200 rpm. The antibiotic ampicilin was used at a final concentration of 20µg/ml

For *in vitro* growth curve, in a triplicate experiment, Xac was inoculated in 40mL of NYG media in 250ml erlenmeyers and grown until reached optical density (O.D. 600nm) ~ 0,4; proceeded by thermal shock for 6 hours. The temperatures tested were 20°C, 37°C, 40°C, 42°C e 45°C, for 6 hours (the control was maintained continuously at 30°C), time estimated to have the greatest solar incidence over plants in citric crops.

The O.D. reads were measured each and every 6 hours summing up 30 hours of data collecting. This time was enough to see the stabilization and death of all the cultures assessed. Right before and after the thermal treatment the number of colony forming units (CFU) was counted in an automated spiral plater (Autoplate 4000) in NYG solid media.

The phase contrast and fluorescence microscopy, was performed in an Olympus microscope and data were analyzed on the Imaging software Olympus Cell*F.

The bacteria length was estimated by the counting of 200 cells from each point assessed at the curve and further analyzed into the Olympus Cell F imaging software. Statistics related with cell length values were analyzed by Graphpad Prism 5 software using *t test*, at a 5% significance level for a validation of the data obtained.

In the fluorescence microscopy studies, zapA and parB mutant strains were grown on 10mL of LB media until reached O.D. ~ 0,4, when the thermal shock was applied during 6 hours, returning the culture to 30°C afterwards. The 30°C test control was also used in this experiment. The bacteria from the control culture and the ones that passed by heat shock right after the end of the 6 hours of treatment. Pictures were evaluated to determine the marked proteins characteristics of each analyzed strains.

Results

Temperature does influence over the growth rate of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Growth curves were used to analyze the bacterial fitness and physiological response to the different temperatures in which Xac was grown.

First of all, it is possible to recognize that that the curves arised from the treatment at 20°C and the control curve, at 30°C are basicaly the same, as the CFU/ml concentration right after the end of the treatment is the same at 20° and 30°C (Table 1), reaching the same bacterial concentration after the end of the treatment and the same maximum density after 24 hours of growth, heading to the culture death right after that .

It is also a possibility in here that the differences between those two curves at 24 and 30 hours of treatment may be also caused by the presence of bacterial biopolymers produced by Xac, as after 18 hours the cultures were realocated at a 30°C ambient temperature and the Xantham gum production after that may be increased in the 20°C treatment culture (figure 1).

At the 37°C treatment it is possible to notice that, even thought by table 1 it is possible to see that the cell concentration right after the treatment is the same, the curve pattern after the 30°C temperature is retaken is different from the curves previously cited.

The 37°C grown culture does not retake its growth and its top concentration, $O.D._{600nm} \sim 1,1$, is around one third smaller than the maximum reached by the control culture and the 20°C treatment ($O.D._{600nm} \sim 1,8$). Besides, this curve is the only one that keeps itself in a stationary phase for a period of 6 hours (between 24 – 30 hours) before starts to decline the cell concentration, indicating the death of the bacteria in the culture (figure 1).

This different reaction to the thermal shock after it ended may be an indication that, despite the simillar reaction during the treatment, biochemical and physiological injuries may have already been caused by the high temperature in the bacterial cell.

The first changes during the thermal shock start to appear during the 40°C treatment. By the end of it, this culture presents $O.D._{600nm} \sim 0,6$ and a concentration of 10^7 CFU/ml, showing that this temperature already affects the cell in a way capable of inactivating it, starting to cause death in the culture. Although it started dying, this is not properly the death temperature for Xac, once it is still able to retake its growth after returning to a 30°C environmental temperature.

Also, the total speed of growth after the end of the treatment is higher in the cultures that passed by the 40°C treatment than the ones that passed by 40°C between 18-30 hours, revealing its full capability of retaking its growth after the end of the thermal shock.

The real damage to Xac's physiology starts from the 42°C ahead. Even though the $O.D._{600nm} \sim 0,5$ measured after the end of the treatment (Figure 1) do not represent a big difference from the $O.D._{600nm}$ measured at the start, it is already noticeable the decline in the culture concentration, as it declines to 10^4 CFU/ml after the heat shock (Table 1).

The great damage caused by the temperature can be shown by the reaction of the curve from the 18 hour and on, where the culture does not recover its growth after returned to 30°C, entering in an immediate decline.

At 45°C, the cells in the culture are totally inactivated by the temperature and no colony forming unit are detected after the plating of this treated population, an indication that this is a lethal temperature to this bacteria.

Cell length differences induced by temperature

Determined that temperature was influencing bacterial physiology and/or biochemistry, contrast phase microscopy was used to search for possible modifications in treated bacteria morphology, giving new clues to the influence of temperature over Xac's growth (Figure 2).

Considering the time taken to the culture media to match the environmental temperature and the 2 hours doubling-time of *Xac*, it is possible to say that although the bacterial population did not spend the 6 hours in the treatment temperature, it did spend, at least two doubling times in thermal shock. As so, the final population contained in the treated cultures is a mixture of cells in different phases of cell cycle but all of them have passed by a different temperature, having specific phenotypes related to the time spent in treatment. Those phenotypes are able to be Analyzed in the pictures obtained by the contrast phase microscopy.

By those observations, no rough modification was found in the bacterial shape even though, at 45°C, it is noticeable the loss of cellular structure, process that had already started at 42°C, probably due to generalized protein denaturation related to high temperature (Figure 2).

It is also noticeable the enlargement of cells mainly in 37°C and 40 °C treatments (Figure 2). To test this idea, cell's sizes were measured from the pictures obtained by microscopy and a descriptive statistic analysis was made.

The mean size of control cells was 1,51µm, while the mean size of cells treated at 37°C and 40°C were above 2,0µm. The size of bacteria treated at 20°C, 42°C and 45°C are not so outstanding, being inferior to those 2,0µm, but still bigger than the control cells (Table 2). To evaluate if those differences in length were in fact valid, a *t test* was conducted with size data charts acquired from microscopy comparing mean control size with mean sizes obtained from the several different temperature treatments.

Significant statistical differences in the mean cell length were found between all treatments when compared with the mean length of control culture, pointing to the enlargement of cell, owing to the differences in the temperature available during the growth of the cultures (Table 2).

Therefore, we can conclude that even though no outstanding morphological changes are noticed in the treated cultures, the increase in the cell length is a clue to some physiological alteration, probably in the processes of segregation or cellular division, due to the change in the environmental temperature in which the culture is grown.

Segregation process throughout different temperatures

Being the cell elongation a clue for some problems in essential and important processes of the bacteria, the next step of this work was to study if the temperature was affecting any cellular process. For so, Xac mutants gfp-labelled for bacterial segregation and division processes were used to determine if temperature was influencing any of those mechanisms.

In figure 3, parB mutant strain was analyzed in order to check the chromosome segregation process. At 30°C, the standard localization of the centromere, in the cell poles, indicating a healthy cell, following with its segregation process as expected. The same phenotype occurs at 20°C, where two marked centromeres can be observed per cellular compartment, each one located at opposite cell poles.

After the treatment at 37°C, this pattern changes and cellular compartments with three or four centromeres can be seen. The presence of a higher number of cell centromeres is an indicative of not a segregation problem, but a delay in the division process hence the duplication of chromosome origin is still happening.

Even though this experiment was preceded with a mutant strain, it is also possible to notice the increase in cell length after this treatment, as happened with the WT strain, indicating the continuation of cell growth process even under thermal stress.

In the treatments made at 40°C and 42°C, the structuration loss of the centromere is conspicuous, showing the influence of temperature over Xac's proteins.

As ParB is a very stable protein, its possible disassembly from the bacterial chromosome is a strong indicative that the of the heat over the rest of the cell has already been settled.

It is also visible the possible presence of inclusion corpuscles in the bacteria after the thermal shock, indicating the presence of denatured proteins in the cytoplasm. In the phase contrast microscopy pictures the corpuscles are visible as well, guiding to the possibility of the presence of ParB in it.

Cell division arrestment related to temperature

Despite the lack of alteration in the chromosome segregation process, the presence of two or more marked origins per cell is a good indicative of a delay in the cell division process. For so, the ZapA mutant strain, with a GFP labeled ZapA protein, was used to see any alterations in the formation of the Z-ring during the cellular cycle.

At figure 4, the 30°C shots were used as a comparative base. As the formation of the Z-ring is a continuous process, being this assembled and disassembled each cellular cycle, hence it is not possible to see this structure in all the cells, once they are not synchronized in the same step of cellular division throughout the culture.

As already seen in other results, the bacterial performance during the treatment at 20°C do not suffer great changes when compared with the 30°C cultures. Thus, the concentration of marked septa is not changed by the treatment. Despite the lack of changes in cell division process, the cell growth is not affected once the cell size is increased in cells after the treatment, just as the WT culture (figure 4).

After the treatment at 37°C, it is possible to perceive the increase in the presence of cells with Z-ring assembled when compared to the 30°C, showing the deceleration or stopped cell division at 37°C, leading to the synchronization of the culture at this temperature.

This delay in the division process is more likely to happen at the end of the thermal shock and, as the culture at 20°C and 30°C and 37°C grows at the same rate during the treatment, the delay in the beginning of the treatment would interfere in the bacterial growth (table 1). Despite the stop in the division process, the cell growth is not affected, as the cell gets longer by the end of the treatment at 37°C when compared to the cells measured at 30°C.

Also, the division arrest at 37°C might have a long lasting consequence, once, after the end of the treatment the cell are not able to fully recover its growth rate and its total growth is reduced after 18 hours (figure 1).

The cultures treated at 40°C and 42°C present loss of structure of the Z-ring, as this structure is not visualized but the cells still present fluorescence.

It is also visible the presence of inclusion corpuscles, as a result of the thermal treatment. It is not possible the state that it is due to denaturation of the proteins after the 40°C treatment since after the culture is returned to 30°C, it is still capable of retaking its growth.

At each temperature treatment. Even though these cares were taken, the inoculum of 40°C treated bacteria presented more viable cells than it was possible to count in a media plate, leading to a much more concentrated amount of pustules.

Therefore, the appearance of the same brown and corky pustules in the abaxial region of the leaf was observed in the 40°C treated bacteria inoculation region, but this time with a great coalescence of the pustules. In one of the replicates it is possible to see a chlorotic halo forming in between the eruptions. The wetness of the tissue is also more preeminent in this case.

No symptoms were observed in the region inoculated with the 42°C and 45°C treated cultures. It is likely that the bacteria treated at 42°C had the same response that it had after the end of the treatment in liquid media (figure 1), not being able to recover this growth and, thus,

not having time to form the canker symptoms. At 45°C, as before the inoculation no CFU was detected in the culture, the lack of symptoms is attributed to the absence of cells to colonize the plant.

Discussion

The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is usually submitted to harsh environmental conditions such as drought, UV exposure, nutrient shortage and temperature fluctuation. Since those conditions generally cannot be avoided, specific tools must be available promptly, so that the cell can stand and be capable of growing and spreading itself again.

The experimental design of this work showed for the first time how Xac behaves when exposed to a fundamental stress: the daily peaks of elevated temperatures. This is a major problem epiphytic bacteria have to overcome during quite a large part of the year – specially in the citrus farming conditions required by these plants. Nevertheless, being Xac an exclusive – and successful - citrus pathogen, it is expected that it can easily survive and multiply under such environment. However, the main question lasts: why does this bacterium manage to grow under these extreme field conditions while at the lab we can barely see any growth above the standard 30°C condition?

We showed that *in vitro* cultures of temperature-challenged Xac showed a substantial difference concerning to the maximum OD achieved just at the end of the shift. Interestingly, the CFU counting showed no difference between the control and cultures submitted to growth at 20°C and 37°C. Although the density reads may not reflect the real cellular mass, a possible explanation to this puzzling fact can be understood as a simple answer to this stress condition faced by the cell: an excessive xanthan gum production. This compound, due to its chemical composition, may rise the $_{600\text{nm}}$ OD reads, leading to an over-estimated result to the cultures grown at 20°C and 37°C, and possibly protecting the integrity and survival of *Xanthomonas* (figure 1).

The 20°C growth culture also showed another interesting post-treatment behaviour, reaching an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ read even higher than that of the 30°C treatment. This may have

occurred due to a better culture broth condition, since the halted growth during the shift resulted in a lesser depleted medium, when compared to the well-grown control experiment. c

The “after-shift” growth curves showed other interesting clues about what may be happening into the cell exposed to temperature stress. Despite the similar behaviour during and just after the 20°C and 37°C treatment, the OD reads at 24h and 30h showed a different picture. Since both cultures were virtually at the same stage when the stress ended, it was surprising that these cells couldn't reach the same density. This result suggests that the higher temperature seems to have caused some slight physiological disturbance otherwise these reads should be similar.

We could also see that at 37°C, the cells were 60% bigger than the control ones (30°C) (table 2). Besides, an astonishing number of cells had its septum marked when the mutant strain carrying the GFP-tagged ZapA protein was exposed against the same stress condition. Since the septum apparatus assembly is highly specific to a particular cell moment, these cells seemed to be “synchronized” into this specific phase. Corroborating these observations, the ParB-GFP showed an extra focus located at mid-cell, indicating a novel chromosomal duplication – and therefore an delay in the division termination. These data suggest for the first time that Xac may stop its growth at specific steps of the cell circle, being the division process a possibly crucial event under stress conditions (figure 1).

As the temperature got higher, we could see that during the shift the growth started to be slower (40°C), almost inexistent (42°C) or clearly death-related (45°C). At 40°C, despite the clear cellular dismantle evidenced by the GFP tagged proteins ZapA and ParB, the cell could still recover its growth at considerable growth rate when the stress stopped, reaching a density similar to that of the 37°C. The same definitely doesn't happen above this critical temperature.

At 42°C, not only we cannot see any growth but the cell culture clearly declines just after the shift. The subcellular complexes of division septum and segregation, highlighted by the GFP-tagged constructs, showed a completely disarranged cell content structure – and therefore functioning (figures 3 and 4). Surprisingly at this point we were able to count CFU, despite the complete absence of growth seen in liquid media. A possible explanation for this apparent paradox may rely on particularities of the solid medium concerning to different aeration, temperature stability/homogeneity after the shift or even a chemical disturbance that the shift may have caused to the medium itself within the flasks.

At 45°C, despite the intracellular structures disarrangements are apparently the same as seen since the 40°C treatments, no cell could be recovered for a CFU counting and the density reads stabilize, indicating death. So, the 40°C treatment seems to be the biologically active limit for an epiphytic life of *Xanthomonas citri*. Beyond this point, the cell disarrangement is irreversible, probably due to a generalized protein denaturation.

It is possible to point that the temperature rise may itself imply into a permanent physiological alteration into the cell since the rate of cell growth is never recovered. If this behavior is maintained in field condition remains to be elucidated by future studies. Nevertheless this study shows undoubtedly that the temperatures stress indeed has a substantial physiological reflect within the biology of this bacterium.

Acknowledgements

The authors thank CAPES for financial support, Dr. Clesley F. Zanelli and Sandro Valentin at Laboratorio de de biologia celular e molecular de microrganismos for equipment supplies and Amanda P. Ucci, for the mutant strain parB used in this study.

References

- Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4, 141–157.
- Civerolo, E.L. (1984) Bacterial canker disease of citrus. *Rio Grande Val. Hortic. Soc.* 37, 127-146.
- Dalla-Pria, M., Christiano, R.C.S., Furtado, E.L., Amorim, L. and Filho, A.B. (2006) Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathology* 55, 657-663.
- Gottwald, T.R., Bassanezi, R.B., Amorim, L. and Bergamin-Filho, A. (2007) Spatial Pattern Analysis of Citrus Canker-Infected Plantings in São Paulo, Brazil, and Augmentation of Infection Elicited by the Asian Leafminer. *Phytopathology* 97, 674-683.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J. and Achor, D.S. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* 5, 1-15.
- Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin-Filho, A. and Camargo, L.E.A. (2005) *Manual de Fitopatologia*. São Paulo.
- Lopes, M.V., Barreto, M., Scaloppi, E.A.G., Barbosa, J.C. and O., B. (2008) Mapas de zonas de risco de epidemias e zoneamento agroclimático para o Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 34, 349-353.
- Martins, P.M.M., Lau, I.F., Bacci, M., Belasque Júnior, J., do Amaral, A.M., R., T.S. and Ferreira, H. (2010) Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiology Letters*.

Massari, C.A. and Belasque Júnior, J. (2006) A campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de são paulo – situação atual e contaminação em viveiros. *Laranja* 27, 41-55.

Neves, M.F.T., V. G., Milan, P., Lopes, F. F., Cressoni, F., Kalaki, R. (2010) O Retrato da Citricultura Brasileira. ed. Ribeirão Preto Vol. v. 1, pp. 137 p.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. and Vidaver, A.K. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 690-695.

Vernière, C.J., Gottwald, T.R. and Pruvost, O. (2003) Disease Development and Symptom Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Various Citrus Plant Tissues. *Phytopatology* 93, 832-843.

Concentration of viable cells after heat treatment

	Viable cells
30°C	1,30 x10 ⁹ CFU/mL
20°C	2,86 x10 ⁹ CFU/mL
37°C	1,97 x10 ⁹ CFU/mL
40°C	3,51 x10 ⁷ CFU/mL
42°C	1,68 x10 ⁴ CFU/mL
45°C	Undetectable

Table 1: Number of colony forming units per milliliter after thermal treatments with different temperatures. After thermal treatment made as the growth graph, culture was inoculated in solid NYG media for calculating the number of viable cells per milliliter.

Xanthomonas citri subsp. citri length difference after heat treatment

		Minimum (µm)	Maximum (µm)	Mean (µm) ± S.D.
20°C	Treatment	1,02	2,72	1,802 ± 0,285*
	Control	0,92	2,08	1,373 ± 0,212
37°C	Treatment	1,34	3,59	2,208 ± 0,411*
	Control	0,75	2,22	1,379 ± 0,295
40°C	Treatment	1,16	3,81	2,069 ± 0,441*
	Control	1,03	3,05	1,606 ± 0,297
42°C	Treatment	1,14	2,91	1,836 ± 0,354*
	Control	1,05	2,99	1,681 ± 0,362
45°C	Treatment	1,09	2,68	1,782 ± 0,328*
	Control	0,93	2,38	1,512 ± 0,293

Table 2: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cell size values through different thermal treatments. Bacterial lengths were obtained from cells images captured from Phase Contrast Microscopy and measured by Cell[^]f software. Means were acquired measuring at least 200 cells and statistic was made using Graphpad prism 5 software. *All the treatments significantly differs from its respective control by t test of *Student*

Figure 1: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* growth curve at different temperatures. Cultures were propagated until reached $O.D._{600nm} \sim 0,4$, when were submitted to thermal shock for the next 6 hours. Re-incubation at 30 Celcius degrees followed the treatment, until the end of the curve, at 36 hours of growth. Observe the variance of culture optical density development after 18 hours of progression. Each point represents the mean of three separated experiments.

Figure 2: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cell morphology grown at different temperatures. After thermal treatment, cultures were submitted to Phase Contrast Microscopy for the analysis of some possible morphological modification due to stress caused by distinct temperatures. Scale bar= 5 μ m

Figure 3: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* parB mutant fluorescence microscopy. parB mutant strain was submitted to phase contrast microscopy and fluorescence microscopy after thermal treatment at different temperatures. Note the possible disassemble of the replication machinery when cells were treated at 40°C and 42°C. Error bar = 5 μ m

Figure 4: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* zapA mutant fluorescence microscopy. zapA mutant strain was submitted to phase contrast microscopy and fluorescence microscopy after thermal treatment at different temperatures. Note the possible disassemble of the division ring at 40°C and 42°C. Also notice the prevalence of marked cells at 37°C related to the increase of cells lenth. Error bar = 5 μ m