

Seqüenciamento e Variabilidade do Fragmento Genômico de *Xylella fastidiosa* Amplificado pelos Iniciadores RST31/33*

Adriane Wendland^{1**}, Daniela Truffi¹, Rui P. Leite Júnior² & Luis E. A. Camargo¹

¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Cx. Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Fax: (19) 434-4839, e-mail: leacamar@carpa.ciagri.usp.br; ²Área de Proteção de Plantas, Instituto Agrônômico do Paraná, Cx. Postal 481, CEP 86001-970, Londrina, PR

(Aceito para publicação em 13/11/2001)

Autor para correspondência: Luis E. A. Camargo

WENDLAND, A., TRUFFI, D., LEITE JR., R.P. & CAMARGO, L.E.A. Seqüenciamento e variabilidade do fragmento genômico de *Xylella fastidiosa* amplificado pelos iniciadores RST31/33. Fitopatologia Brasileira 28:298-301. 2003.

RESUMO

Xylella fastidiosa é agente causal de diversas doenças de importância econômica como a clorose variegada dos citros (*Citrus* spp.) (CVC), mal de Pierce da videira (*Vitis vinifera*), escaldadura da ameixeira (*Prunus salicina*) e queima do cafeeiro (*Coffea arabica*). A seqüência nucleotídica do fragmento genômico, específico de *X. fastidiosa*, amplificado pelo par de iniciadores RST31/33 foi determinada para 38 isolados de citros e para isolados de videira, cafeeiro e ameixeira objetivando avaliar o nível de polimorfismo entre isolados e a identidade genômica do fragmento.

Não foi observado polimorfismo de seqüência nucleotídica entre isolados de citros, mas foi detectado polimorfismo entre isolados de citros e de videira, cafeeiro e ameixeira. A presença do sítio de clivagem *RsaI*, que distingue isolados de citros e videira de isolados de ameixeira e outras espécies arbóreas, foi identificada em um isolado de ameixeira proveniente dos EUA mas não em outro proveniente do Brasil.

Palavras-chave adicionais: CVC, polimorfismo de seqüência, seqüenciamento, genes *rpoD*.

ABSTRACT

Sequencing and variability of the *Xylella fastidiosa* - specific genomic fragment amplified by the primer pair RST 31/33

Xylella fastidiosa causes several plant diseases of economic importance such as citrus (*Citrus* spp.) variegated chlorosis (CVC), Pierce's disease of grapevine (*Vitis vinifera*) and leaf scorch of plum (*Prunus salicina*) and coffee (*Coffea arabica*). The nucleotide sequence of the genomic fragment, specific to *Xylella fastidiosa*, amplified by the pair of primers RST 31/33, was determined for 38 isolates from citrus and for isolates from

grapevine, coffee and plum in order to assess the level of sequence polymorphism of this fragment among isolates, as well as its genomic identity. Sequence polymorphism was not observed among isolates from citrus, but was detected among isolates from citrus and from grapevine, coffee and plum. The presence of a *RsaI* restriction site, which distinguishes isolates from citrus and grapevine from plum and other arboreal species, was identified in a North American isolate from plum but not in a Brazilian one.

A clorose variegada dos citros (*Citrus* spp.) (CVC) é uma doença de grande importância econômica para a citricultura brasileira devido à redução na produção e qualidade dos frutos (Laranjeira & Palazzo, 1999). A CVC é causada pela *Xylella fastidiosa*, bactéria limitada ao xilema, fastidiosa, Gram-negativa, não-móvel, aflagelada, baciliforme, com parede celular enrugada e estritamente aeróbia (Wells *et al.*, 1987). Detectada pela primeira vez em 1987 no Norte do Estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro (Rossetti & De Negri, 1990), a doença foi observada em todas as regiões citrícolas do Brasil.

Este patógeno também é responsável por doenças em diversas culturas, como Mal de Pierce em videira (*Vitis vinifera* L.), "phony peach" em pessegueiro [*Prunus persicae* (L.) Batsch], escaldadura das folhas em ameixeira (*Prunus salicina* Lindl) (Wells *et al.*, 1987) e cafeeiro (*Coffea arabica* L.) (Paradela *et al.*, 1995; Beretta *et al.*, 1996) e outros hospedeiros que englobam espécies de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (Freitag, 1951; Wells *et al.*, 1987; Hopkins, 1989).

Seqüências de DNA específicas têm sido utilizadas para detecção de *X. fastidiosa* por reação de polimerase em cadeia (PCR) em material vegetal (Minsavage *et al.*, 1994, Pooler & Hartung, 1995, Beretta *et al.*, 1997). O par de iniciadores RST

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. ESALQ/USP

** Bolsista da FAPESP

31/33, por exemplo, produz um fragmento de 733 pb específico para *X. fastidiosa* e tem sido utilizado rotineiramente em exames diagnósticos dessa bactéria (Minsavage *et al.*, 1994). No entanto, a sequência completa deste fragmento é, até o momento, desconhecida. Segundo os autores, a existência de um sítio de restrição *RsaI* neste fragmento possibilita distinguir isolados de citros e videira de isolados de ameixeira e outras espécies arbóreas. Assim, este trabalho objetivou determinar a sequência deste fragmento e avaliar o nível de polimorfismo de sequência encontrado entre isolados de citros, videira, ameixeira e cafeeiro.

Coleção de isolados de *Xylella fastidiosa*

Folhas de laranjeira (*Citrus sinensis* L.) 'Pêra' com sintomas de CVC foram coletadas em pomares localizados nas regiões citrícolas do Noroeste (Neves Paulista), Centro (Gavião Peixoto) e Sul (Santa Rita do Passa Quatro) do Estado de São Paulo. O isolamento de *X. fastidiosa* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hill & Purcell (1995). Placas contendo meio PWG (Hill & Purcell, 1995) foram mantidas a 28 ± 1 °C até o surgimento das colônias bacterianas. Após o crescimento, foi realizada a purificação dos isolados através da retirada de uma colônia individual para cada isolado com auxílio de alça de platina e distribuição em nova placa contendo meio PWG. Os isolados foram conservados em criotubos contendo meio PW e 30% glicerol e armazenados a -70 °C. Isolados de cafeeiro, videira e ameixeira (Tabela 1) pertencentes à Coleção Bacteriológica da Área de Proteção de Plantas do Instituto Agrônomo do Paraná estavam armazenados a -70 °C e foram recuperados em placas contendo meio PWG.

Obtenção de DNA genômico de *Xylella fastidiosa*

A extração do DNA genômico dos isolados de citros e de outros hospedeiros foi realizada conforme descrito por Ausubel *et al.* (1992) e a sua concentração foi determinada com fluorômetro DyNA 200 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, EUA).

Confirmação da identidade dos isolados

A amplificação do DNA por PCR para confirmação da identidade dos isolados de *X. fastidiosa* (Minsavage, 1994) foi realizada em reações de 25 µl contendo tampão de amplificação (1X), 100 µM de cada dNTP, 50 µM dos iniciadores RST31 (5'-GCG TTA ATT TTC GAA GTG ATT CGA TTG C-3') e RST33 (5'-CAC CAT TCG TAT CCC GGT G-3'), 1,25 U *Taq* DNA polimerase e 3 µl de DNA (aproximadamente 30-50 ng). A amplificação por PCR foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, Alameda, CA, EUA), inicializada com desnaturação a 95 °C por 1 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 45 s. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml de gel) à 5V/cm. O peso molecular foi comparado ao padrão 1 Kb (Pharmacia, San Francisco, CA, EUA) e o gel foi fotografado após a corrida com fotodocumentador

ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV.

Avaliação da frequência de polimorfismo de sequência da região amplificada pelos iniciadores RST31 e RST33

O sequenciamento dos fragmentos amplificados pelos iniciadores RST31/RST33 foi feito por meio de PCR utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). Os fragmentos foram previamente retirados do gel de agarose de baixo ponto de fusão (Promega, Madison, WI, EUA) e purificados por meio do kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). Para cada reação foi preparada

TABELA 1 - Identificação e origem dos isolados de *Xylella fastidiosa*

Isolado	Hospedeiro	Data de Isolamento	Localização
9715 (755/95)	<i>Vitis vinifera</i>	1990	Austrália
8935	<i>V. vinifera</i>	1989	EUA
9777	<i>Prunus salicina</i>	1992	EUA
12304	<i>P. salicina</i>	1997	Santa Catarina
11752	<i>Coffea arabica</i>	1996	São Paulo, SP
11782	<i>C. arabica</i>	1996	Londrina, PR
12373	<i>C. arabica</i>	1999	Brasília, DF
02.01	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
02.02	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
02.06	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
02.07	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
02.08	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
07.01	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
07.09	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
07.25	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
07.26	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
22.11	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
10.06	<i>Citrus</i> spp.	1999	Neves Paulista, SP
09.26	<i>Citrus</i> spp.	1999	Bebedouro, SP
09.34	<i>Citrus</i> spp.	1999	Bebedouro, SP
09.37	<i>Citrus</i> spp.	1999	Bebedouro, SP
01.31	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
05.01	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
05.56	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
05.24	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
05.84	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
05.95	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.05	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.07	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.23	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.41	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.44	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.45	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
08.46	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
15.13	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
22.24	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
22.42	<i>Citrus</i> spp.	1999	Gavião Peixoto, SP
01.10	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
01.51	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
02.50	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
03.05	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
09.11	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
10.04	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
12.10	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP
13.15	<i>Citrus</i> spp.	1999	Santa R. P. Quatro, SP

uma mistura contendo 8 µl de TRR mix (terminator ready reaction mix), 3,2 pmol do iniciador RST31 para o sentido anverso ou 3,2 pmol do iniciador RST33 para o sentido reverso, 2,5 µl do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 30-50 ng de DNA e 8,5 µl de água. A amplificação para seqüenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA). Foi feita nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das amostras a 95 °C por 3 min foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™ (PE Applied Biosystem, Norwalk, CT, EUA)

As seqüências foram alinhadas e comparadas com auxílio do software Sequencher™ 3.0 (Gene Code Corporation, Michigan, EUA) com a finalidade de identificar polimorfismo nas seqüências nucleotídicas. A seqüência dos isolados de *X. fastidiosa* de citros foi comparada às seqüências de outras espécies bacterianas depositadas em banco de dados para identificação de homologia.

A amplificação por PCR do DNA dos isolados de *X. fastidiosa* realizada com os iniciadores RST31/RST33 foi positiva para todas as amostras testadas (dados não apresentados). A seqüência consenso parcial de 587 pb foi obtida através da sobreposição e alinhamento da seqüência de cada um dos isolados em ambos os sentidos. Entre os 38 isolados de citros incluídos neste estudo, não foi observado polimorfismo de seqüência nucleotídica.

As seqüências dos isolados de videira e ameixeira apresentaram polimorfismo quando comparadas às seqüências dos isolados de citros (Tabela 2): os isolados 8935 e 9715 de videira apresentaram um total de sete e três bases distintas, respectivamente; os isolados de ameixeira 9777 (EUA) e 12304 (Brasil) apresentaram polimorfismo (de 8 a 6) em relação aos isolados de citros, mas também apresentaram quatro bases diferentes entre si. O isolado 11782 de cafeeiro apresentou apenas uma única base que o distinguiu dos isolados de citros. Os demais isolados de cafeeiro incluídos neste estudo apresentaram seqüência idêntica à dos isolados de citros.

Minsavage *et al.* (1994) observaram que a digestão do fragmento RST31/33 com enzima de restrição *RsaI* gerou

produtos que permitiram diferenciar os isolados em dois grupos distintos de *X. fastidiosa*: um grupo correspondente a isolados do mal de Pierce e CVC, cujo fragmento não foi digerido pela enzima, e um outro grupo que inclui isolados de ameixeira e espécies arbóreas, onde a digestão resultou em dois fragmentos de aproximadamente 600 pb e 100 pb. Os resultados obtidos a partir do seqüenciamento do fragmento RST31/33 demonstraram que o isolado 9777 de ameixeira procedente dos EUA apresenta o sítio de clivagem *RsaI* (GT↑AC/CA↑TG) na posição 87 (Tabela 2). Por outro lado, em isolados de citros e videira esse sítio não foi identificado, concordando com os resultados obtidos pelos referidos autores. O isolado 12304 de ameixeira procedente do Brasil, ao contrário, não apresentou o sítio de clivagem *RsaI*, indicando a existência de variabilidade genética entre isolados deste hospedeiro, a necessidade de se avaliar mais isolados de ameixeira do Brasil para compará-los a outros grupos e que a ausência/presença deste sítio não é um bom indicador para agrupar isolados segundo os hospedeiros em que foram coletados. Costa *et al.* (2000), observaram, também, diferenças entre isolados de ameixeira provenientes dos EUA e Brasil devido ao seu agrupamento com isolados de outros hospedeiros do seu respectivo país de origem.

Embora os isolados de citros e videira sejam considerados do mesmo grupo por Minsavage *et al.* (1994), devido ao perfil eletroforético semelhante após digestão de DNA com a enzima de restrição *RsaI*, estudos recentes de variabilidade genética de *X. fastidiosa* evidenciam a sua separação em grupos distintos. Pooler & Hartung (1995) por exemplo, descrevem uma região específica com inserção de 28 nucleotídeos encontrada no genoma de isolados de citros diferenciando-os de isolados de videira. Leite Jr. *et al.* (1998) diferenciaram isolados de citros e videira com base na sua similaridade genética obtida por eletroforese de campo pulsado com as endonucleases *Not I* e *Sfi I*. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com estes dois últimos relatos pois, embora tenha demonstrado a ausência de polimorfismo no sítio de restrição de *Rsa I* entre isolados de videira e de citros, demonstrou a existência de polimorfismos entre isolados destes hospedeiros em outras regiões da seqüência analisada. Assim, um estudo abrangendo mais isolados de cada hospedeiro pode

TABELA 2 - Seqüências parciais do fragmento genômico amplificado pelo par de iniciadores RST 31/33 obtida de isolados de *Xilella fastidiosa* de citros (*Citrus* spp.) (0206), videira (*Vitis vinifera*) (8935, 9715), ameixeira (*Prunus salicina*) (9777, 12304) e cafeeiro (*Coffea arabica*) (11782) indicando polimorfismos nucleotídicos em negrito e o sítio de restrição GTAC (sublinhado).

Isolado	Base														
	87	90	141	146	150	152	196	226	295	304	466	513	515	543	
0206	TC GCAC	C	C : ATG	C	At	T	A	A	G	A	T	C	:	:	
8935	TC GCAC	C	C CATG	G	C	C	G	A	T	G	T	C	:	:	
9715	TC GCAC	C	C : ATG	C	A	T	A	A	G	A	C	A	C	:	
9777	TC <u>GTAC</u>	T	C : CATG	C	C	T	G	G	T	C	T	C	:	:	
12304	TC GCAC	C	C : ATG	C	C	C	G	G	T	G	T	C	:	:	
11782	TC GCAC	C	C : ATG	C	A	T	G	A	T	A	T	C	:	C	

resultar na identificação de outros sítios de restrição que distingam isolados destes dois hospedeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology, New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1992.
- BERETTA, M.J.G., BARTHE, G.A., CECCARDI, T.L., LEE, R.F. & DERRICK, K.S. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Disease* 81:1196-1198. 1997.
- BERETTA, M.J.G., HAKAKAVA, R., CHAGAS, C.M., DERRICK, K.S., BARTHE, G.A., CECCARDI, T.L., LEE, R.F., PARADELA, O., SUGIMORI, M. & RIBEIRO, I. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Disease* 80:821. 1996 (Note).
- da COSTA, P.I., FRANCO, C.F., MIRANDA, V.S., TEIXEIRA, D.C. & HARTUNG, J.S. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed-PCR. *Current Microbiology* 40:279-282. 2000.
- FREITAG, J.H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology* 41:920-934. 1951.
- HILL, B.L. & PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85:209-212. 1995.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27:2711-3290. 1989.
- LARANJEIRA, F.F. & PALAZZO, D.A. Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. *Laranja*. 20:77-91. 1999.
- LEITE JR., R.P., MEHTA, A., CARVALHO, F.M.S. & UENO, B. Genetic diversity of brazilian strains of *Xylella fastidiosa* associated with citrus and coffee. Abstracts, XIV, Conference of IOCV, Campinas, SP. 1998. p.156.
- MINSAVAGE, G.V., THOMPSON, C.M., HOPKINS, D.L., LEITE, R.M.V.B.C. & STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84:456-461. 1994.
- PARADELA FILHO, O., SUGIMORI, M.H., RIBEIRO, I.J.A., MACHADO, M.A., LARANJEIRA, F.F., GARCIA JR., A. & BERETA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja* 16:135-136. 1995.
- POOLER, M.R. & HARTUNG, J.S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381. 1995.
- ROSSETTI, V. & DE NEGRI, D. Clorose variegada dos citros: revisão. *Laranja* 11:1-14. 1990.
- WELLS, J.M., RAJU, B.C., HUNG, H.Y., WEINSBERG, W.G., MANDELCO-PAUL, L. & BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143. 1987.