

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRUTURA DE POPULAÇÕES E INOCULAÇÕES
RECÍPROCAS DE *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* COM
OCORRÊNCIA EM CULTIVOS VIZINHOS DE *Citrus sinensis*
E *Coffea arabica* SOB CONDIÇÕES DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

Carolina Sardinha Francisco

Bióloga

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRUTURA DE POPULAÇÕES E INOCULAÇÕES
RECÍPROCAS DE *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* COM
OCORRÊNCIA EM CULTIVOS VIZINHOS DE *Citrus sinensis*
E *Coffea arabica* SOB CONDIÇÕES DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

Carolina Sardinha Francisco

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Co-orientador: Dr. Helvécio Della Coletta-Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2014

Francisco, Carolina Sardinha
F818e Estrutura de populações e inoculações recíprocas de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* com ocorrência em cultivos vizinhos de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* sob condições do estados de São Paulo / Carolina Sardinha Francisco. -- Jaboticabal, 2014
x, 96 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Paulo Cezar Ceresini

Coorientador: Helvécio Della Coletta Filho

Banca examinadora: Eduardo Seiji Gomide Mizubuti, Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Bibliografia

1. Laranja doce. 2. Café. 3. Estudo de populações. 4. Inoculações cruzadas. 5. Fluxo gênico. 6. Coevolução. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.35

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTRUTURA DE POPULAÇÕES E INOCULAÇÕES RECÍPROCAS DE *Xylella fastidiosa* subesp. pauca COM OCORRÊNCIA EM CULTIVOS VIZINHOS DE *Citrus sinensis* E *Coffea arabica* SOB CONDIÇÕES DO ESTADO DE SÃO PAULO

AUTORA: CAROLINA SARDINHA FRANCISCO

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

Departamento de Biologia Aplicada - À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. EDUARDO SEITÉ GOMIDE MIZUBUTI

Universidade Federal de Viçosa / Viçosa/MG

Data da realização: 25 de agosto de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAROLINA SARDINHA FRANCISCO – nascida em 28 de outubro de 1986, na cidade de Leme, SP. Licenciada e bacharel (2010) em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, cidade de Araras. De 2007 a 2010, estagiou como aluna de Iniciação Científica no Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ – IAC, recebendo durante todo período auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. No ano de 2011, realizou estágio de três meses na University of California – Berkeley, no Department of Environmental Science, Policy and Management. Desde março de 2012 é aluna de mestrado pelo programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista ‘Julio de Mesquita’ – UNESP.

Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.

Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa.

Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas te confiarás; a sua verdade será o teu escudo e broquel.

Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia,

Nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola ao meio-dia.

Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti.

Somente com os teus olhos contemplarás, e verás a recompensa dos ímpios.

Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio. No Altíssimo fizeste a tua habitação.

Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.

Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.

Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.

Pisarás o leão e a cobra; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.

Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei em retiro alto, porque conheceu o meu nome.

Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; dela o retirarei, e o glorificarei.

Fartá-lo-ei com longura de dias, e lhe mostrarei a minha salvação.

Salmos 91:1-16

Aos meus pais e irmão,

Pela compreensão da minha ausência e pelas doses diárias de amor, incentivo para que meu sonho pudesse ser realizado.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini pelo aceite de minha orientação e colaboração na redação dos manuscritos.

Ao Dr. Helvécio Della Coletta Filho por todo conhecimento a mim transmitido ao longo de oito anos como meu orientador, pela dedicação no desenvolvimento deste trabalho, pelas imensas contribuições para minha formação profissional e pessoal e pela grande amizade construída.

À Dra. Alessandra Alves de Souza, pesquisadora do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' – IAC, pelas inúmeras contribuições na minha formação profissional, pelas valiosas discussões científicas e pela amizade.

Aos alunos Nagela Gomes Safady, Henrique Augusto Bergamo e Daniele Rebelatto, membros do Laboratório de Biotecnologia, do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' – IAC, pelas colaborações na execução dos experimentos, pelo convívio e pelos momentos alegres durante o curso.

À Raquel Caserta Salviatto, pelos vários anos de amizade e pelas longas noites que passamos juntas trabalhando no laboratório. Jamais esquecerei os pães com mortadela, às discussões infinitas sobre ciência, política e religião. Mas principalmente, gostaria de agradecer pelas palavras de consolo e motivação que tanto me sustentaram em momentos de dificuldades.

A todo pessoal do alojamento e agregados: Simone, por sempre cuidar de mim mostrando quais os melhores caminhos que deveria seguir. Inaiara, pela sua alegria contagiante. Gabi, pela meiguice e simplicidade. Diogo e Lais, por mostrar que o amor verdadeiro supera tudo. Diogo, pelo seu jeito irresponsável de ser responsável. Rosinha, pela doçura de suas palavras. Willian, pela simplicidade e leveza em levar a vida. Gui e Dani, pelos incentivos diários para que saísse do sedentarismo. Marcus, por me mostrar que os quietinhos são os mais pentelhos. Fiotão, pela leveza de sua alma e pelo eterno olhar de menino. Eduardo, por mostrar que para ser irmão não é preciso ter o mesmo sangue. Léo, pelas longas noites nos animando com o violão. Ronaldo, por ser exemplo de responsabilidade, mas ao mesmo tempo completamente doido. Emylin, pela timidez misturada com loucura. Barbara, pelo

exemplo de sinceridade. Tatiane e Cintia, por terem aguentado meu mau humor matinal, por terem comido minhas “gororobas” e pela grande amizade construída.

À todos os meus amigos de trabalho, entre eles alunos de iniciação científica, alunos de pós-graduação, técnicos e pesquisadores, que tanto colaboraram para a execução deste trabalho, assim como pelas palavras de incentivos, conforto, compreensão e amizade.

À minha família, em especial aos meus pais Sebastião Herminio Francisco e Cleide Sardinha Francisco, pelo incentivo, pelas doses de amor diárias e exemplo de otimismo, compreendendo as minhas constantes ausências.

Às minhas amigas de infância Aline, Ariane, Amanda, Andressa e Juliana pelo companheirismo, por me apoiarem sempre nas minhas decisões, por estarem ao meu lado nas alegrias e tristezas, pelo amor de irmãs construído ao longo de mais de vinte anos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo no país durante todo o período do mestrado.

Aos agrônomos da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) das cidades de Jales, Marília, Tabatinga e Santo Antônio de Posse, que tanto nos ajudaram nas coletas de material vegetal utilizadas neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	x
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
CAPÍTULO 2 - ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Xylella fastidiosa</i> INFECTANDO PLANTAS DE CAFÉ EM SÃO PAULO, BRASIL.....	16
Resumo.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	20
Resultados.....	30
Discussão.....	39
Conclusões.....	44
Anexos.....	45
Referências.....	47
CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Xylella fastidiosa</i> DE LARANJEIRAS E CAFEEIROS EM INOCULAÇÕES RECÍPROCAS.....	54
Resumo.....	54
Introdução.....	55
Material e Métodos.....	58
Resultados.....	66
Discussão.....	79
Conclusões.....	87
Referências.....	88

ESTRUTURA DE POPULAÇÕES E INOCULAÇÕES RECÍPROCAS DE *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* COM OCORRÊNCIA EM CULTIVOS VIZINHOS DE *Citrus sinensis* E *Coffea arabica* SOB CONDIÇÕES DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - A pouco mais de uma década a bactéria *Xylella fastidiosa* passou de um organismo pouco conhecido a uns dos mais conhecidos, ao menos em termos de genômica. No Brasil esta bactéria afeta culturas de importância econômica como citros, causando a clorose variegada dos citros (CVC) e café, na qual causa a requeima da folha do cafeeiro (RFC), também conhecida como atrofia do ramo do cafeeiro (ARC). Em laranjeiras a bactéria acarreta os maiores danos econômicos, na ordem de 100 milhões de dólares anuais. Em relação às plantas de café, estudos demonstraram que a cada 1% de aumento na severidade da doença há perdas de rendimento de 1,22 a 1,34 sacos de 60kg por hectare. Ambas as culturas são afetadas pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* e transmitida pelos mesmo vetores, porém ainda são incertas as informações se o isolado que causa a CVC pode colonizar cafeeiros e causar doença e vice-versa. Além do mais, em contraste com os diversos estudos já realizados sobre populações de *X. fastidiosa* infectando laranjeiras, não se tinha informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional deste patógeno quando infectando cafeeiros. Um total de 618 estirpes de *X. fastidiosa* foi isolado de laranjeiras e cafeeiros de quatro regiões geográficas distintas do estado de São Paulo. Esses isolados foram genotipados através de 14 marcadores microssatélites. A alta diversidade genotípica e genética, os altos índices de clonalidade, o forte desequilíbrio gamético e o elevado grau de subdivisão populacional encontrados nas populações de *X. fastidiosa* amostradas de cafeeiros são consistentes com predominância de um modo de reprodução clonal. Os níveis de subdivisão observados poderiam ser explicados pela migração histórica assimétrica encontrada entre as populações, indicando as populações da região Noroeste e Central como as prováveis fundadoras. Também realizamos ensaios de inoculações recíprocas entre isolados de laranjeiras e cafeeiros em condições controladas. Os 99 isolados de laranjeiras e 127 isolados de cafeeiros, foram agrupados em 14 e 15 clusters genéticos, respectivamente. Um isolado representante de cada cluster genético foi selecionado e utilizado nos ensaios de inoculações recíprocas. As estirpes de laranjeiras infectam e colonizam cafeeiros, porém o contrário não é válido. Acreditamos que a não colonização de laranjeiras por estirpes de *X. fastidiosa* de cafeeiros seja em decorrência de um curto período de coevolução entre o patógeno e este hospedeiro. Desta maneira os isolados de cafeeiros ainda não conseguem driblar as barreiras genéticas impostas pelas laranjeiras.

Palavras-Chave: laranja doce, café, estudo de populações, inoculações cruzadas, fluxo gênico, coevolução.

STRUCTURE OF POPULATIONS AND RECIPROCAL INOCULATIONS OF *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* OCCURRENCE IN CROPS WITH NEIGHBOURS *Citrus sinensis* and *Coffea arabica* UNDER CONDITIONS OF SÃO PAULO STATE

ABSTRACT - A little over a decade the bacterium *Xylella fastidiosa* has gone from a little-known body to the most popular ones, at least in terms of genomics. In Brazil this bacterium affects economically important crops such as citrus, which causes citrus variegated chlorosis (CVC) and coffee, causing coffee leaf scorch (CLS), also known as coffee stem atrophy (CSA). In orange this bacteria causes major economic losses in the order of 100 million dollars annually. Regarding the coffee plants, studies have shown that every 1% increase in the severity of disease cause loss of 1.22 to 1.34 bags of 60kg per hectare. Both cultures are affected by subsp. *pauca* of *X. fastidiosa* and are transmitted by the same vectors, but informations are still uncertain if isolated causing CVC can colonize and cause disease in coffee plants and vice versa. Moreover, in contrast of many previous work on study about population of *X. fastidiosa* infecting orange, we had no information about genetic diversity and population structure of this pathogen infecting coffee plants. Thus a total of 618 strains of *X. fastidiosa* was isolated from orange and coffee in four distinct geographic regions (Central, Northwestern, Center-western and Eastern) of the São Paulo State. These isolates were typed by fourteen microsatellite markers. The high genotypic and genetic diversity, high levels of clonality, strong gametic disequilibrium, and the population subdivision found in *X. fastidiosa* population are consistent with the predominance of mode of clonal reproduction. The subdivision levels observed could be explained by the asymmetric historical migration between populations, indicating the populations of Central and Northwestern region as the probable founders. We also performed tests of reciprocal inoculations among isolates from orange and coffee plants under controlled conditions. The 99 isolates from orange and 127 isolates from coffee through Bayesian analysis, were grouped on 14 and 15 genetic cluster, respectively. One isolate representative of each cluster was selected and used in the reciprocal inoculations. The results showed that orange strains can infect and colonize coffee plants, but not vice versa. We believe that no colonization of sweet orange plants by strains of *X. fastidiosa* from coffee is a result of a short period of coevolution between the pathogen and this host. Thus isolates from coffee plants still can't dribble the genetic barriers imposed by orange trees.

Keywords: sweet orange, coffee, population study, artificial inoculations, gene flow, coevolution.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Figura 1: Unidade de produção agrícola – UPA no estado de São Paulo. A = mapa das UPAs da cultura de café. B = mapa das UPAs da cultura de laranja doce. C = sobreposição dos mapas das culturas de café e laranja doce. Fonte: <http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/>.

CAPÍTULO 2

Figura 1. Sintomas relacionados à presença de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. A = ramo assintomático, B e C = folhas dispostas somente na extremidade apical com formato lanceolado (setas indicativas) e exibindo encurtamento de internódios (setas indicativas); D = fruto do cafeeiro de tamanho reduzido, característicos em plantas infectadas pela bactéria.

Figura 2. Mapa do estado de São Paulo destacando as regiões geográficas amostradas. NW = região Noroeste; CE = região Central; CeW = região Centro-Oeste; EA = região Leste.

Figura 3. Distribuição das frequências alélicas dos 14 marcadores VNTR locos nas quatro diferentes populações de *Xylella fastidiosa* de café do estado de São Paulo, Brasil. Cada caixa representa um loco VNTR (ex: COSSR1, CISSR42, OSSR17, GSSR12). O eixo x representa o número de unidades repetitivas de cada loco. O eixo y corresponde às populações e cada cor corresponde a uma determinada população e estão identificados como: Pop1 (Região Central), Pop2 (Região Noroeste), Pop3 (Região Centro-Oeste) e Pop4 (Região Leste). O tamanho dos círculos é proporcional a frequência dos alelos.

Figura 4. Relação linear entre as distâncias genéticas (H_{Nei} e D_{est}) e geográficas das populações de *Xylella fastidiosa* amostradas no estado de São Paulo (Brasil). Círculos e linha sólida representam a relação entre as distâncias genéticas e geográficas através do índice de H_{Nei} ($P = 0,458$). Triângulos e linha tracejada representam a relação das distâncias genéticas e geográficas através do índice D_{est} ($P = 0,50$). O eixo x representa as distâncias geográficas em quilômetros.

Figure 5. A maior distribuição da probabilidade posterior para o número de clusters (K) presente nas populações de *Xylella fastidiosa* de plantas café. (A)

Valores de K clusters e média dos valores de verossimilhança ($L(K)$) determinados a partir de três corridas independentes pelo software STRUCTURE, indicam que $K = 3$, baseado nos valores de ΔK , de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O segundo eixo y (asterisco) indica os valores médios de verossimilhança ($L(K) + SD$) em relação a 10 corridas para cada valor de K . (B) Coeficiente de ‘parentesco’ dos isolados assumindo $K = 3$ clusters genéticos como estabelecido por Evanno et al. (2005). 1 (vermelho), 2 (verde) e 3 (azul) representam os clusters genéticos formados. Em parênteses são as porcentagem dos isolados das regiões Central (Ce), Noroeste (Nw), Centro-Oeste (CeW) e Leste (Ea) do estado de São Paulo.

Figura 6. Estimativa do coeficiente de ‘parentesco’ (Q) para cada genótipo multilocus de microssatélites nas populações de *Xylella fastidiosa* cafeeiro. Clusters de indivíduos baseados nas populações pré-definidas ($K = 4$) são representados pelas diferentes cores e a linha vertical representa os indivíduos. Indivíduos com múltiplas cores ou cores diferentes das populações pré-definidas são os genótipos que estão em mistura genética. O comprimento da barra indica o coeficiente de ‘parentesco’ (Q) para as populações distintamente coloridas. Linhas verticais tracejadas separam as diferentes populações baseado na área geográfica e os números mostram o início de cada população. O nome das populações é indicado acima da figura juntamente com as identificações dos locais geográficos de amostragem. Evento de mistura genética estatisticamente significativa para um genótipo multilocus é anotado com um asterisco na parte superior.

Figura 7. Estimativas dos parâmetros demográficos históricos da divergência entre as populações do patógeno *Xylella fastidiosa* infectando cafeeiro, baseado na variação nos 14 VNTR locos. As direções para inferir a migração entre as populações de origem e destino estão indicadas por setas coloridas (por exemplo, setas vermelhas à esquerda indicam uma migração a partir da população da região Central - Tabatinga, enquanto setas coloridas à direita indicam uma migração a partir das outras três populações para a região Central - Tabatinga). As barras indicam as estimativas Bayesianas das taxas de migração inferidas a 95% da distribuição posterior.

CAPÍTULO 3

Figura 1: Sintomas relacionados à presença de *Xylella fastidiosa* em laranjeiras. A e B = pontos cloróticos característicos de infecção por *X. fastidiosa* em folhas de laranjeiras (setas indicativas); C = fruto assintomático (esquerda) e frutos sintomáticos com tamanho reduzido (direita), conhecido popularmente como ‘frutos coquinhos’.

- Figura 2. Sintomas relacionados à presença de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. A = ramo assintomático, B e C = folhas dispostas somente na extremidade apical com formato lanceolado (setas indicativas) e exibindo encurtamento de internódios (setas indicativas); D = fruto do cafeeiro de tamanho reduzido, característicos em plantas infectadas por *X. fastidiosa*.
- Figura 3. Plântulas utilizadas nos ensaios de inoculação recíproca. A = plântulas de laranja doce cv. Pêra; B = plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. Havana; C = cafeeiro cv. Mundo Novo.
- Figura 4. Distribuição das freqüências alélicas de 14 marcadores VNTR locos em populações de *Xylella fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros. O eixo x representa o intervalo de números de repetições de cada locos. O eixo y corresponde às plantas hospedeiras, sendo os círculos azuis correspondente à população de *X. fastidiosa* de laranjeiras e os verdes à população de *X. fastidiosa* de cafeeiros. O tamanho dos círculos é proporcional as freqüências dos alelos em cada uma das populações.
- Figura 5. Resultados da análise de agrupamento genético das estirpes de *Xylella fastidiosa* isoladas de laranjas doce através do software BAPS. Cada *K* cluster genéticos (1 ao 14) é identificado com uma cor diferente. Os asteriscos identificam os clusters genéticos compostos por isolados de diferentes plantas.
- Figura 6. Resultados da análise de agrupamento genético das estirpes de *Xylella fastidiosa* de café através do software BAPS. Cada *K* cluster (1 ao 15) é identificado com uma cor diferente. Os asteriscos identificam os clusters genéticos compostos por isolados de diferentes plantas.
- Figure 7. Resultado da análise de agrupamento genético entre as estirpes de *Xylella fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros através do software BAPS, mostrando que trata-se de duas populações geneticamente distintas não sendo observado qualquer indício de migração entre os indivíduos destas duas populações. Cada *K* cluster (1 ao 14) é identificado com uma cor diferente. A barra preta indica a separação dos clusters de laranja doce e de café.
- Figura 8. Análise através do software STRUCTURE inferindo o coeficiente de parentesco ('*Q*') de multilocus dos VNTR para os genótipos de *Xylella fastidiosa* isolados de laranjeiras e cafeeiros da região Central (Tabatinga) do estado de São Paulo. Cada cor representa o ancestral mais provável do qual o genótipo (total ou parcial) foi derivado. Múltiplas cores indicam genótipos em mistura genética a partir das populações pré-definidas. Os comprimentos das barras indicam o coeficiente de parentesco ('*Q*').

Figura 9: Valores de K clusters e média dos valores de verossimilhança ($L(K)$) determinados a partir de uma corrida pelo software STRUCTURE, indicam que $K = 2$, baseado nos valores de ΔK , de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005).

Figura 10. Valores de C_T mostrando infecções de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro - Co (A) e laranjeira - Ci (B) com estirpes homólogas a ambos hospedeiros. Controle positivo equivale ao DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* utilizados como controle de amplificação das reações de qPCR. As barras são os desvios padrões da média dos valores de C_T das plantas consideradas positivas.

Figura 11. Valores de C_T mostrando infecções de *Xylella fastidiosa* da CVC (Ci) em cafeeiro nos diferentes tempos após a inoculação. CiC5, CiC9, CiC8, CiC13 e CiC12 são os diferentes clusters genéticos inoculados. Controle positivo equivale ao DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* utilizados como controle de amplificação das reações de qPCR. As barras são os desvios padrões da média dos valores de C_T das plantas consideradas positivas.

Figura 12. Valores de C_T mostrando infecções de *Xylella fastidiosa* de cafeeiro (Co) e de laranjeira (Ci) em seedlings de tabaco nos diferentes tempos após a inoculação. CoC14 a CiC3 são os diferentes clusters genéticos inoculados. Controle positivo equivale ao DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* utilizados como controle de amplificação das reações de qPCR. As barras são os desvios padrões da média dos valores de C_T das plantas consideradas positivas.

Figura 13. Sintomas ocasionados pela colonização de *Xylella fastidiosa* em tabaco. PBS – planta inoculada com tampão PBS (controle negativo); CiC12 – estirpe isolada de laranja doce; CoC11 - estirpe isolada de café. Os sintomas de *X. fastidiosa* em tabaco são caracterizados por pequenas lesões de coloração laranja escuro, que inicialmente aparecem nas folhas mais velhas e próximas ao ponto de inoculação, evoluindo para toda planta após o aparecimento dos primeiros sintomas.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Áreas e números de produção de café e laranja doce em quatro regiões agrícolas do estado de São Paulo em um período de 10 anos.

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Origem e composição das populações de *Xylella fastidiosa* de cafeeiros usados nesse trabalho.

Tabela 2. Informações genéticas sobre os primers VNTR e alelos privativos entre as populações de *Xylella fastidiosa* de café.

Tabela 3. Diversidade genotípica e genética de populações de *Xylella fastidiosa* isoladas de cafeeiros em diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo (Brasil).

Tabela 4. Testes de associação aleatória de alelos entre os pares de loco nas populações de *Xylella fastidiosa* infectantes de cafeeiros.

Tabela 5. Medida de diferenciação entre os pares de população baseado nos valores estatísticos de D_{est} (abaixo da diagonal) e R_{ST} (acima da diagonal).

Tabela 6. Distribuição hierárquica da diversidade genética entre as populações de *Xylella fastidiosa*.

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Populações de *Xylella fastidiosa* infectando laranjeiras e cafeeiros na região Central do estado de São Paulo e usada neste estudo.

Tabela 2. Informações gerais sobre MLVA utilizados na genotipagem de estirpes de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e café.

Tabela 3. Informações sobre os alelos privativos e polimorfismo dos marcadores VNTR usados para tipificação dos isolados de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e de café.

Tabela 4. Detalhamento sobre as plantas de tabaco infectadas por estirpes de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e café.

LISTA DE ANEXOS

CAPÍTULO 2

Anexo 1. Informações genéticas sobre os MLVA utilizados na genotipagem de populações de *Xylella fastidiosa* de café.

Anexo 2. Teste t estatístico comparando índices de diversidade genética de populações de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e café. Eixos Y são os valores dos índices e eixo X são a origem dos isolados (café - esquerda / laranja doce - direita). Os valores de laranja doce foram obtidos a partir do trabalho de Coletta-Filho et al. (2014), e os de café são deste trabalho. As barras indicam as estimativas Bayesianas inferido das taxas de migração de 95% da distribuição posterior.

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

A citricultura e a cafeicultura se destacam como importantes atividades do agronegócio brasileiro, com uma cadeia estruturada em segmentos representados por viveiristas, produtores, fornecedores de insumos e máquinas, prestadores de serviço, indústrias de processamento e cadeia de comercialização. Em ambas as atividades o Brasil é destaque sendo responsável por 57% da produção mundial de laranja doce e 36% da produção mundial de café (Ministério da Agricultura – Economia Brasileira em Perspectiva, disponível em <http://www.fazenda.gov.br/>). Na produção de laranja doce e de suco concentrado, no Brasil e no mundo, o estado de São Paulo têm sido o principal produtor, processador e exportador, responsável por 53% do total de suco produzido no mundo, sendo a matéria prima (laranja) cultivada numa área em torno de 600 mil hectares (NEVES, 2010). Atualmente o estado possui cerca de 310 milhões pés de laranja doce (Fonte: IEA/CATI - SAAESP). Na cafeicultura nacional, embora o estado de São Paulo tenha menor projeção quando comparado a citricultura, sendo responsável por 9,7% da produção de grãos e ocupando uma área de 200 mil hectares (VEGRO et al., 2010) com aproximadamente 4 milhões de pés de café (Fonte: IEA/CATI - SAAESP), esta está muito mais dispersas ao longo do estado quando comparada a citricultura (Figura 1).

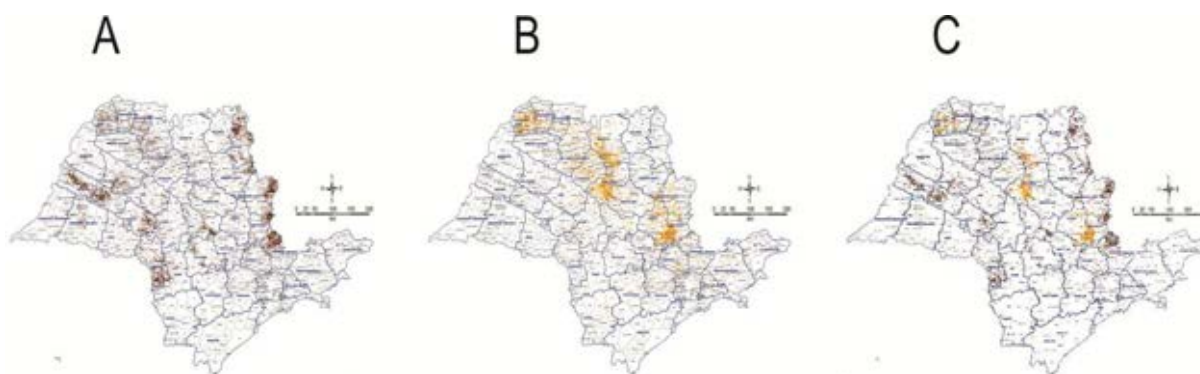


Figura 1: Unidade de produção agrícola – UPA no estado de São Paulo. A = mapa das UPAs com a cultura do café. B = mapa das UPAs com a cultura da laranja doce. C = sobreposição dos mapas das culturas do café e laranja doce. Fonte: <http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/>.

Com base nos mapas da Figura 1, pode-se inferir que ambas as culturas são cultivadas simultaneamente numa ampla gama de Unidade de Produção Agrícola (UPA) ao longo do estado de São Paulo. Isto pode ser evidenciado na Tabela 1 elaborada pelo Instituto de Economia Agrícola – IEA, cujo conteúdo na íntegra pode ser consultado no endereço http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancoiea/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1.

Tabela 1. Áreas e números de produção de café e laranja doce de quatro regiões agrícolas do estado de São Paulo em um período de 10 anos.

Ano	Cultura	Região	Novas Áreas (ha)	Áreas em Produção (ha)	Produção	Unidade
2003	Café	Araraquara	254	3732	45548	sc.60kg
2003	Café	Jales	407	4204	68500	sc.60kg
2003	Café	Marília	2525	23261,8	205810	sc.60kg
2003	Café	Mogi-Mirim	108	3349	48210	sc.60kg
2003	Laranja	Araraquara	2939000	24842106	45427789	cx.40,8kg
2003	Laranja	Jales	435400	2809060	5455880	cx.40,8kg
2003	Laranja	Marília	38464	224468	488750	cx.40,8kg
2003	Laranja	Mogi-Mirim	1553000	12445000	27270000	cx.40,8kg

Ano	Cultura	Região	Novas Áreas (ha)	Áreas em Produção (ha)	Produção	Unidade
2013	Café	Araraquara	39	1654,9	25484	sc.60kg
2013	Café	Jales	4	164,31	1763,88	sc.60kg
2013	Café	Marília	3889,56	23471,55	545377	sc.60kg
2013	Café	Mogi-Mirim	100	2812,9	36115	sc.60kg
2013	Laranja	Araraquara	1132114	14672367	20089099	cx.40,8kg
2013	Laranja	Jales	1008715	3551593	8529450	cx.40,8kg
2013	Laranja	Marília	278500	1320000	2513665	cx.40,8kg
2013	Laranja	Mogi-Mirim	1025565	12791000	20322899	cx.40,8kg

Fonte: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancoiea>

Se analisarmos a cultura do café, em dez anos houve redução na produção de grãos em todas as regiões, muito provavelmente em decorrência da expansão de outras culturas no estado, como cana-de-açúcar e eucalipto (VEGRO et al., 2010). A região de Marília é uma exceção para esta realidade, pois houve um aumento de 264% na produção de café nestes últimos dez anos e tem se destacado como um pólo da cafeicultura paulista. A distinção desta região pode estar associada com a

utilização de tecnologias agrícolas como: irrigação, mecanização das etapas de manejo e colheita, que vem sendo adotadas não somente por produtores empresariais, mas também por produtores familiares (VEGRO et al., 2010).

Ao abordarmos a evolução da cultura cítrica no estado de São Paulo, houve uma expressiva redução de 95 mil Km² de área em produção entre 2003 e 2013, e também redução de 27 mil cx de 40,8 kg para as regiões analisadas na Tabela 1. Esta nova realidade para a citricultura está estritamente associada à expansão simultânea de pragas e doenças, com significativo reflexo nos custos de produção, associado ao fato de grande parte da produção situa-se em áreas não irrigadas, e à estreita base genética utilizada.

O surgimento de novas doenças associadas à patógenos, até então não descritos para uma determinada cultura ou unidade produtora (micro ou macro-regional), tem se tornado importante nas últimas décadas (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUEIRA, 2005). Mudanças climáticas, emprego de técnicas de produção agrícola e invasões biológicas dos próprios patógenos e de seus vetores são apontados como responsáveis pelo surgimento de doenças nas mais diversas plantas (ANDERSON et al., 2004). Somado a isto, pode-se afirmar que a introdução não controlada de materiais vegetais exógenos tem uma grande participação no surgimento destas novas doenças ou até então não descritas. Porém, quando do surgimento de uma nova doença, onde o hospedeiro preferencial é perene e o patógeno é transmitido naturalmente por meio de insetos vetores, é mais complexo de se manejar. Neste caso, além dos vértices ambiente, patógeno e hospedeiro (planta) classicamente conhecidos, tem-se o quarto vértice, vetor, que além de ser também um hospedeiro, interage diretamente com a planta e o patógeno. Dentro desta interação, tem-se a bactéria *Xylella fastidiosa* como representante clássico. Esta bactéria pode ser disseminada através de um inseto vetor polífago (cigarrinhas - Hemiptera, Cicadellidae) e é capaz de infectar mais de uma espécie hospedeira.

O primeiro relato de *Xylella fastidiosa* ocasionando problemas em culturas de interesse econômico data de 1887, em vinhedos na Califórnia, associando-se então esta bactéria à doença agora conhecida como doença de Pierce (Pierce's disease - PD) (HEWITT, 1958; DAVIS; PURCELL; THOMSON, 1978). Atualmente tem-se conhecimento de *X. fastidiosa* infectando diversas culturas como, pêssigo (WELLS;

RAJU; NYLAND, 1983), nozes (SANDERLIN; HEYDERICH-ALGER, 2000), ameixa (RAJU et al., 1983), pêra (LEU; SU, 1993), carvalho (BARNARD et al., 1998), oleandro (PURCELL et al., 1999), amêndoa (MIRCETICH et al., 1976), amora (HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 1976), magnólia (HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2006) e agora mais recente em oliveiras na Itália (CARLUCCI et al., 2013), sendo o primeiro relato de *X. fastidiosa* no continente europeu. Nos Estados Unidos, mais de 100 espécies vegetais, de exploração agrícola ou não, são conhecidas como hospedeiras desta bactéria e de seus vetores (HOPKINS; PURCELL, 2002; REDAK et al., 2004), com freqüentes relatos de novos hospedeiros (RANDALL et al., 2009).

Em cultivos agrícolas no Brasil, a *X. fastidiosa* é responsável por causar doenças como a escaldadura da folha da ameixeira - EFA (FRENCH; KITAJIMA, 1978), atrofia do ramo do cafeeiro – ARC, também conhecida como requeima da folha do cafeeiro - RFC (PARADELA-FILHO et al., 1995; LIMA et al., 1998) e a clorose variegada dos citros - CVC, afetando as variedades de laranjas doce (*Citrus sinensis*) (ROSSETI et al., 1990; DE SOUZA et al., 2009). Quanto aos hospedeiros alternativos, Lopes et al. (2003) identificaram cerca de 10 espécies de plantas daninhas presentes nos pomares cítricos como hospedeiras, porém de nenhuma delas foi possível isolar a bactéria, o que segundo o autor deixa dúvidas quanto a importância epidemiológica destes hospedeiros alternativos. Leite, Leite Junior e Ceresini (1997b) também identificaram 17 espécies de plantas daninhas que convivem de forma simpátrica com a cultura da ameixa e citros sendo hospedeiras de *X. fastidiosa*, porém nenhuma espécie apresentou qualquer tipo de sintoma, deixando evidências que esta bactéria pode se comportar como um endofítico em alguns hospedeiros.

Ao que se conhece em termos quantitativos, é em citros que a *X. fastidiosa* acarreta os maiores danos econômicos no Brasil, na ordem de 100 milhões de dólares anuais, na forma de replantio, poda de plantas infectadas, controle do vetor e perda de produtividade (BOVÉ; AYRES, 2009). Muito embora o setor tenha convivido com a CVC desde o seu surgimento, dentro do estado de São Paulo a doença tem ganhado intensidade em áreas onde não se tinha relato de grandes problemas, como é o caso da região citrícola Sul. Nesta região a porcentagem de talhões doentes passou de 1,57% em 2009, para 3,77% em 2012 (disponível em:

<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc/9>). A diminuição da doença nas regiões Norte e Noroeste provavelmente são decorrentes da eliminação de pomares velhos em virtude da Morte Súbita dos Citros, assim como pela própria migração da citricultura para outras áreas, como para a região Oeste de São Paulo. Nesta região houve um incremento de 89% no número de plantas nestes últimos cinco anos (NEVES, 2010) e não foi identificado nenhum talhão contaminado por *X. fastidiosa* em 2012 (disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc/9>). Já a diminuição da doença na região Leste, de 45,15% em 2011 para 40,78% em 2012, muito provavelmente seja em decorrência da eliminação das plantas cítricas devido à outra importante doença dos citros, o Huanglongbing (também conhecido como greening). É nesta região do estado de São Paulo, que em 2012, apresentou a maior porcentagem de plantas com sintomas da doença e, portanto, a região que mais tem eliminado plantas de citros (disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>). Fato é que a CVC ainda causa muitos prejuízos econômicos na citricultura paulista.

Em relação às plantas de café, pouco se sabe sobre os danos econômicos causados por *X. fastidiosa* nesta cultura. Rocha et al. (2010) verificaram que a cada 1% de aumento na severidade da doença há perdas de rendimento de 1,22 a 1,34 sacos de 60kg por hectare. Os mesmos autores também identificaram que, níveis de severidade acima de 12% no talhão, há necessidade de intervenções de práticas agrícolas como poda drástica, adubação e controle mais eficiente do inseto vetor. A ausência de investigação dos danos econômicos da ARC ou RFC, muito provavelmente seja em função que, por muitos anos, os sintomas causados por esta doença foram confundidos com deficiências nutricionais, estresse hídrico, infecção por nematóides e outras doenças (LI et al., 2001).

As informações sobre a biologia de *X. fastidiosa* estão muito mais alicerçadas quando estas bactérias estão colonizando laranjeiras que quando cafeeiros ou ameixeiras. Muito embora a ARC tenha sido relatada somente em 1995, pressupõe-se que esta doença esteja presente em cafeeiro há muito mais tempo, sendo inclusive responsável pelo cultivo nômade do café no estado de São Paulo (LIMA et al., 1998).

Em condições de campo muito pouco se conhece sobre a ecologia de *X. fastidiosa* associada a estas duas doenças (CVC e ARC). Dos trabalhos conduzidos em condições laboratoriais ou em casa de vegetação sabe-se que: (i) *X. fastidiosa* causadora da CVC e da ARC são geneticamente próximas e pertencem a subespécie *pauca* (ALMEIDA et al., 2008; RANDALL et al., 2009; YUAN et al., 2010); (ii) a diversidade genética encontrada para a *X. fastidiosa* da ARC é maior que para a da CVC (WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007; ALMEIDA et al., 2008); (iii) *X. fastidiosa* da ARC e CVC podem ser transmitidas pelas mesmas espécies de cigarrinhas que são encontradas indistintamente tanto em laranjeiras como em cafeeiros (MARRUCCI; LOPES; CAVICHIOLI, 2008; LARA; PERIOTO; DE FREITAS, 2007); (iv) os trabalhos de inoculações recíprocas (cruzadas) utilizando-se de estirpes pontuais de *X. fastidiosa* de café e laranja doce (LI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008; PRADO et al., 2008) mostram resultados contraditórios.

O conhecimento das informações de colonizações cruzadas entre estes dois hospedeiros é importante não só do ponto de vista do entendimento da biologia destes patossistemas, mas também pelo fato de que muitas unidades de produção agrícola nas regiões Noroeste, Central, Leste e Sudoeste do estado de São Paulo têm a cafeicultura e a citricultura como atividades econômicas ocorrendo simultaneamente (<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>).

A proximidade geográfica entre hospedeiros suscetíveis que são visitados por vetores comuns, sendo estes por sua vez não específicos às *X. fastidiosa* de laranjeiras ou cafeeiros, arquitetam uma condição onde inoculações cruzadas são potencialmente possíveis. Aliado a isto, Almeida et al. (2008) mostraram a ocorrência de recombinações entre estirpes de *X. fastidiosa* de café e laranja doce, o que segundo os autores teria levado a uma recente homogeneização genética entre ambas, mesmo tendo uma origem diversa. Também, são conhecidos que elementos genéticos móveis e transcricionalmente ativos como profagos, ilhas genômicas e plasmídeos compõem aproximadamente 18% do genoma desta bactéria (NUNES et al., 2003; DA SILVA et al., 2007), podendo atuar ativamente na transferência lateral de informações genéticas entre estirpes assim como explicar a ampla adaptabilidade desta bactéria nos mais diversos hospedeiros.

Previamente aos testes biológicos necessários ao esclarecimento da ecologia de *X. fastidiosa* em laranjeiras e cafeeiros, é imprescindível a caracterização genética destas populações, uma vez que, embora tenha se constatado recombinantes em *X. fastidiosa* de cafeeiros e laranjeiras, não houve congruência dos resultados de inoculações cruzadas já realizados por outros autores (LI et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008; PRADO et al., 2008). Portanto, selecionar grupos de indivíduos hospedeiro-específicos, variantes dentro de cada hospedeiro, haplótipos hospedeiros comuns e recombinantes serão necessários para se definir os grupos de estirpes que serão submetidas aos testes biológicos.

Complementando o conhecimento necessário sobre a caracterização genética de populações de *X. fastidiosa*, estudos de genética de populações de fitopatógenos podem oferecer excelentes oportunidades para entender os processos evolutivos envolvidos em patossistemas agroecológicos (MCDONALD; LINDE, 2002a). Além disso, esses estudos visam entender os processos evolutivos que moldam as variações genéticas dentro e entre as populações. Essas variações genéticas são consequência da interação entre cinco fatores que afetam a evolução de uma população, sendo elas: mutação, deriva genética, fluxo gênico, reprodução ou sistemas de acasalamento e seleção. O resultado final das interações entre os cinco fatores evolutivos é a estrutura genética observada nas populações do patógeno (MCDONALD; LINDE, 2002b), assim como a diversidade genética e genotípica geradas por essas forças. A extensão e os padrões de diversidade genotípica dentro de populações podem ser usados para inferir se essas populações são clonais ou recombinantes. Inferências sobre migrações restritas e/ou seleção, podem ser realizadas através da detecção de diferenças nas frequências alélicas entre subpopulações já que, na ausência de migrações recorrentes, as populações eventualmente divergem devido a alterações aleatórias nas frequências de alelos (mutações e deriva genética) (MILGROOM; PEEVER, 2003).

Desde 1980 estudos de variação genética (utilizando marcadores genéticos neutros, isto é, marcadores que não estão sob pressão de seleção) de fitopatógenos tem se tornado muito comum (MILGROOM; PEEVER, 2003). A combinação de marcadores moleculares, como por exemplo, os VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) e MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), já têm sido usados em estudos

aplicados ao entendimento da ecologia molecular, genética e evolução de *X. fastidiosa* em diversos patossistemas (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; LIN et al., 2005; Scally et al., 2005; MONTERO-ASTÚA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; YUAN et al., 2010; COLETTA-FILHO et al., 2011; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014) e, com certeza é a estratégia mais adequada para gerar dados para os estudos de ecologia molecular de *Xylella*. A maioria dos trabalhos citados acima estudou as variações genéticas em populações de *X. fastidiosa* de laranja doce, sendo poucos os que fazem essa investigação em populações de café.

Os marcadores moleculares microssatélites (VNTR locos) estão entre os mais utilizados em estudos de genética de populações devido à alta variabilidade e característica “*high-throughput*” de análise. Estes marcadores compreendem seqüências de nucleotídeos curtas (1 a 15 pares de bases), repetidas em *tandem* sendo frequentemente encontrados aleatoriamente dispersos nos genomas de eucariotos e procariotos. A variação genética de muitos microssatélites é caracterizada pela elevada heterozigosidade e pela presença de múltiplos alelos. Assume-se que microssatélites são marcadores moleculares neutros, portanto, sua frequência e distribuição devem refletir os processos mutacionais que ocorrem na população, livres de efeito de seleção, quando se encontram localizados em regiões não-codificantes do genoma (ELLEGREN, 2004). A evolução dos marcadores de microssatélites se dá pelo modelo de passos mutacionais (*Stepwise Mutation Model* - SMM) (KIMURA; OHTA, 1975), onde mutações dentro destes marcadores promovem alterações em seu tamanho total, por inserção ou deleção de unidades repetitivas (modelo de *slippage*), sob uma taxa na ordem de 10^{-4} (XU et al., 2000).

Por outro lado, os marcadores MLST são seqüências derivadas de genes “*housekeeping*” (conservados) e, portanto, possuem baixa taxa de evolução, sendo mais apropriados para elencar recombinantes (<http://www.mlst.net/>). Yuan et al. (2010) propuseram sete genes *housekeeping* para MLST de *X. fastidiosa*, tendo os locos *cysG*, *petC*, *leuA*, *gltT*, *holC*, *nuoL* e *lacF*, que geram polimorfismos entre as estirpes estudadas, inclusive com diferenciação entre isolados de *X. fastidiosa* subespécie *pauca*, como foi obtido por Almeida et al. (2008) para os locos *cysG*, *petC* e *leuA*.

Para complementar o entendimento sobre a ecologia de *X. fastidiosa* em hospedeiros potencialmente comuns, genes sob pressão de seleção poderiam ser usados como estratégia de análise. Nesta classe de genes existe uma maior possibilidade de se encontrar polimorfismos de nucleotídeos, fato este constatado também para *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007). Sequências de quatro genes potencialmente sob pressão de seleção (*copB* – Xf0132 e Xf0133, *fimA* – Xf0078, *pilA* – Xf0033 e *rpfF*– Xf1115), foram publicados para *X. fastidiosa* (PARKER et al. 2011).

Dentro desse contexto, as seguintes hipóteses foram testadas neste trabalho: (i) populações de *X. fastidiosa* isoladas de cafeeiro de quatro regiões geográficas do estado de São Paulo são heterogêneas, ou seja, são subdivididas e diferenciadas; (ii) laranjeiras e cafeeiros cultivados proximamente hospedam estirpes comuns de *X. fastidiosa* que podem estar sendo transmitidas naturalmente e reciprocamente pelos vetores; (iii) em condições controladas *X. fastidiosa* da CVC e da ARC são transmitidas reciprocamente nos hospedeiros testados; (iv) populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros são geneticamente semelhantes, porém hospedeiras específicas. Para que essas hipóteses fossem testadas, os objetivos específicos do presente estudo foram: a) estabelecer e analisar por meio de marcadores moleculares do tipo VNTR locos populações de *X. fastidiosa* de café do estado de São Paulo; b) mensurar a diversidade genética e genotípica em populações de *X. fastidiosa* infectando café; c) descrever hierarquicamente a estrutura genética dentro e entre populações de *X. fastidiosa* de café; d) detectar migrantes e as prováveis rotas migratórias do patógeno entre quatro regiões do estado de São Paulo; e) estabelecer e analisar por meio de marcadores moleculares do tipo VNTR locos populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros; f) selecionar haplótipos hospedeiros específicos e comuns de populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros; g) realizar ensaios de inoculações recíprocas de estirpes de *X. fastidiosa* envolvendo plantas de laranja doce e café. As informações geradas com esta pesquisa irão oferecer subsídios importantes para o manejo das doenças associadas a *X. fastidiosa* em laranjeiras e cafeeiros cultivadas simpatricamente, uma vez que pouco é conhecido sobre a necessidade de adoção

de medidas fitossanitárias para evitar a dispersão de *X. fastidiosa* entre ambos os hospedeiros.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. P. P., NASCIMENTO, F. E., CHAU, J., PRADO, S. S., TSAI, C. W., LOPES, S. A., LOPES, J. R. S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3690-3701, 2008.

ANDERSON, P., PATEL, C. N., MORALES, F., EPSTEIN, P., DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology and Evolution Journal**, v. 19, p, 535-544, 2004.

BARNARD, E. L., ASH, E. C., HOPHINS, D. L., MCGOVERN, R. J. Distribution of *Xylella fastidiosa* in oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis*. **Plant Disease**, v. 82, p. 569-572, 1998.

BRASIL. Ministério da Fazenda. **Brazilian Economic Outlook – Economia Brasileira em Perspectiva**: manual de orientação. Brasil, 2012. (Série Manuais – English Editions March/April). Disponível em: <[http://www.fazenda.gov.br/divulgacao/publicacoes/economia-brasileira-em-perspectiva/brazilian economy outlook eng ed15 apr2012.pdf](http://www.fazenda.gov.br/divulgacao/publicacoes/economia-brasileira-em-perspectiva/brazilian%20economy%20outlook%20eng%20ed15%20apr2012.pdf)>. Acesso em: 05 mai. 2014.

BOVÉ, J. M., AYRES, A. J. Etiology of three recent disease of citrus in São Paulo: Sudden Death, Variegated Chlorosis an Huanglongbing. **IUBMB Life**, v. 59, p. 346-354, 2007.

CARLUCCI, A., LOPS, F., MARCHI, G., MUGNAI, L., SURICO, G. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin? **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 3, p. 541–544, 2013.

COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. **Phytopathology**, v. 93, p. 28-34, 2003.

COLETTA-FILHO, H. D., BITTLESTON, L. S., ALMEIDA, R. P. P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2596-2601, 2011.

COLETTA-FILHO, H. D., FRANCISCO, C. S., ALMEIDA, R. P. P. Temporal and spatial scaling of the genetic structure of a vector-borne plant pathogen. **Phytopathology**, v. 104, n. 2 p. 120-125, 2014.

DA SILVA, V. S., SHIDA, C.S., RODRIGUES, F. B., RIBEIRO, D. C., de SOUZA, A. A., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A., NUNES, L. R., de OLIVEIRA, R. C. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. **BMC Genomics**, v. 8, p. 474, 2007.

DAVIS, M. J., PURCELL, A. H., THOMSON, S. V. Pierce's disease of grapevines isolation of the casual bacterium. **Science**, v. 199, p. 75–77, 1978.

DE SOUZA, A. A., TAKITA, M. A., AMARAL, A. M., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Citrus Tree and Forestry Science and Biotechnology: Citrus responses to the *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis. **Global Science Books**, v. 3, p. 73-80, 2009.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews**, v. 5, p. 435-445, 2004.

FRENCH, W. J., KITAJIMA, E. W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Report**, v. 62, p. 1035-1038, 1978.

HERNANDEZ-MARTINEZ, R., COSTA, H. S., COOKSEY, D. A., WONG, F. P. Documentation and characterization of *Xylella fastidiosa* strains in landscape hosts. In: **Pierce's Disease Research Symposium**. p. 191–197, 2006.

HERNANDEZ-MARTINEZ, R., PINCKARD, T. R., COSTA, H. S., COOKSEY, D. A., WONG, F. P. Discovery and characterization of *Xylella fastidiosa* strains in southern California causing mulberry leaf scorch. **Plant Disease**, v. 90, p. 1143–1149, 1976.

HEWITT, W. B. The probable home of Pierce's disease virus. **Plant Disease Reporter**, v. 42, p. 211-215, 1958.

HOPKINS, D. L., PURCELLI. A. H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, p. 1056-1066, 2002.

KIMURA, M., OHTA, T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 72, n. 7, p. 2761-2764, 1975.

LARA, R. I. R., PERIOTO, N. W., de FREITAS, S. Amostragem de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) através de armadilhas de Moericke em cafeeiro arábica. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**, v. 74, n. 3, p. 239-244, 2007.

LEITE, R. M. V. B. C., LEITE JUNIOR, R. P., CERESINI, P. C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha . **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 54-57, 1997.

LEU, L. S., SU, C. C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xyella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, v. 77, p. 642-646, 1993.

LI, W. B., PRIA Jr, W. D., TEIXEIRA, D. C., MIRANDA, V. S., AYRES, A. J., FRANCO, C. F., COSTA, M. G. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xyella fastidiosa* form citrus. **Plant Disease**, v. 85, p. 501-05, 2001.

LIMA, J. E. O., MIRANDA, V. S., HARTUNG J. S., BRLANSKY, R. H., COUTINHO, A., ROBERTO, S. R., CARLOS, E. F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 94-97, 1998.

LIN, H., CIVEROLO, E. L., HU, R., BARROS, S., FRANCIS, M., WALKER, M. A. Multilocus simple sequence repeat markers for differentiating strains and evaluating genetic diversity of *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4888-92, 2005.

LOPES, S. A., MARCUSSI, S., TORRES, S. C. Z., SOUZA, V., FAGAN, C., FRANÇA, S. C. Weeds as Alternative Hosts of the Citrus, Coffee, and Plum Strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 5, p. 544-549, 2003.

MARRUCCI, R. C., LOPES, J. R. S., CAVICHIOLI, R. R. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1114-1121, 2008.

MCDONALD, B. A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002a.

MCDONALD, B. A., LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 163-180, 2002b.

MILGROOM, M. G., PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens. **Plant Disease**, v. 87, n. 6, p. 608-617, 2003.

MIRCETICH, S. M., LOWE, S. K., MOLLER, W. J., Nyland, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the casual agent. **Phytopathology**, v. 66, p. 17-24, 1976.

MONTERO-AATÚA, M., HARTUNG, J. S., AGUILAR, E., CHACÓN, C., LI, W., ALBERTAZZI, F. J., RIVERA, C. Genetic Diversity of *Xylella fastidiosa* Strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States. **Phytopathology**, v. 97, p. 1338-1347, 2007.

NEVES, M. F. Impacto na Laranja Brasileira. **Agroanalysis (FGV)**, v. 30, p. 32-32, 2010.

NUNES, L. R., ROSATO, Y. B., MUTO, N. H., YANAI, G. M., da SILVA, V. S., LEITE, D. B., GONÇALVES, E. R., de SOUZA, A. A., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A., LOPES, S. A., de OLIVEIRA, R. C. Microarrays analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, v. 13, p. 570-578, 2003.

PARADELA-FILHO, O., SUGIMORI, M. H., RIBEIRO, I. J. A., GARCIA Jr, A., BERETTA, M. J. G., HAKAWA, R., MACHADO, M. A., LARANJEIRA, F. F., RODRIGUES NETO, J., BERIAM, L. O. S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

PARKER, J. K., HAVIRD, J. C., De La FUENTE, L. Differentiation of *Xylella fastidiosa* Strains via Multilocus Sequence Analysis of Environmentally Mediated Genes (MLSA-E). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1385-1396, 2011.

PRADO, S. S., LOPES, J. R. S., DEMÉTRIO, C. G. B., BORGATTO, A. F., ALMEIDA, R. P. P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 251-258, 2008.

PURCELL, A. H., SAUNDERS, S. R., HENDSON, M., GREBUS, M. E., Henry, M. J. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. **Phytopathology**, v.89, p. 53–58, 1999.

RAJU, B. C., WELLS, J. M., Nyland, G., Bransky, R. H., Lowe, S. K. Plum leaf scald isolation and culture and pathogenicity of the casual agent. **Phytopathology**, v. 72, p.1460–1466, 1982.

RANDALL, J. J., GOLDBERG, N. P., KEMP, J. D., RADIONENKO, M., FRENCH, J. M., OLSEN, M. W., HANSON, S. F. Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the southwestern United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5631-5638, 2009.

REDAK, R. A., PURCELL, A. H., LOPES, J. R. S., BLUA, M. J., MIZELL, R. F., ANDERSON, P. C. The biology of xylem-fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 243-270, 2004.

ROCHA, J. G., ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., DO VALE, F. X. R., JUNIOR, W. C. J., FILHO, A. B. Quantification of yield loss due to coffee leaf scorch. **Crop Protection**, v. 29, n. 10, p. 1100-1104, 2010.

ROSSETI, V., GARNIER, M., BREVE, J. M., BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R. R., QUAGGIO, J. A., de NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variéegé une nouvelle maladié des agrumes du Brésil. **C. R. Académie des Sciences**, Paris, v. 310, n. 3, p. 345-349, 1990.

SANDERLIN, R. S., HEYDERICH-ALGER, K. I. Evidence that *Xylella fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan. **Plant Disease**, v. 84, p. 1282–1286, 2000.

SCALLY, M., SHUENZEL, E. L., STOUTHAMER, R., NUNNEY, L. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8491-8499, 2005.

VEGRO, C. L. R., FRANCISCO, V. L. F. S., ANGELO, J. A., GHOBIL, C. N. Singularidades do cafeicultor paulista cooperado. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, 2010.

XU, X., PENG, M., FANG, Z., XU, X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nature Genetics**, v. 24, p. 396-399, 2000.

WELLS, J. M., RAJU, B. C., NYLAND, G. Isolation culture and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach *Prunus persica*. **Phytopathology**, v. 73, p. 859-862, 1983.

WICKERT, E., MACHADO, M. A., LEMOS, E. G. M. Evaluation of genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from citrus and coffee hosts by single-nucleotide polymorphism markers. **Phytopathology**, v. 97, p. 1543-1549, 2007.

WOOLHAUSE, M., GOWTAGE-SEQUEIRA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infections Diseases**, v. 11, p. 1842-47, 2005.

YUAN, X., MORANO, L. R., BROMLEY, S., SPRING-PEARSON, R., STOUTHAMER., NUNNEY, L. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. **Phytopathology**, v. 100, p. 601-611, 2010.

CAPITULO 2 – Estrutura genética de populações de *Xylella fastidiosa* infectando plantas de café no estado de São Paulo

RESUMO - Em estudos de estrutura de população focando em sistema de colonização dependente de vetores, a bactéria fitopatogênica e multi hospedeira, *Xylella fastidiosa*, tem fornecido informações notáveis sobre sua ecologia e biologia. Até o momento não se tinha informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional deste patógeno quando infectando cafeeiros. Um total de 519 estirpes de *X. fastidiosa* foram isoladas de cafeeiros no estado de São Paulo (Brasil), amostradas de quatro regiões geográficas distintas, sendo elas: região Central, Noroeste, Centro-Oeste e Leste. Em todas as regiões havia convívio simpátrico com plantações de laranja doce. Os isolados foram genotipados através de 14 marcadores de microssatélites, onde verificamos que as populações de *X. fastidiosa* de café são significativamente subdivididas assim como já previamente verificado para populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras. Uma exceção ocorre para as populações da região Central e Noroeste, que estão sob forte fluxo gênico. Devido às populações de *X. fastidiosa* de café possuírem características ecológicas particulares e práticas agrícolas específicas, acreditamos que estes fatores podem desempenhar um papel importante na estruturação dessas populações neste hospedeiro. Em geral, as populações apresentaram um elevado nível de “admixture” (mistura de genótipos), presentes em 38% dos indivíduos. As populações de *X. fastidiosa* associada ao café também apresentaram maior diversidade genética e riqueza alélica quando comparado com populações da bactéria associada à laranja doce, típico de populações evolutivamente mais velhas. O sistema reprodutivo predominantemente não-recombinante, não pôde ser descartado para todas as quatro populações de café associada à *X. fastidiosa*, evidenciando um possível sistema clonal de reprodução. Verificamos também que a população da região Central foi a que mais contribuiu com indivíduos imigrantes, enquanto que a população Noroeste a que recebeu a maioria dos genótipos migrantes. A migração histórica assimétrica e os altos níveis de mistura de genótipos detectados entre as populações analisadas podem explicar os altos níveis de subdivisão observados.

Palavras chaves: clonalidade, diversidade genética, estudo de populações, fluxo gênico, padrões de migração

INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores geram interações complexas que envolvem diversas espécies com diferentes papéis ecológicos (KEESING; HOLT; OSTFELD, 2006). Um exemplo de doença transmitida por vetor implica na interação entre um inseto vetor, um patógeno e uma espécie de planta. Patógenos sistêmicos de culturas agrícolas perenes são os únicos em que os hospedeiros são imóveis, tem longa vida e, constantemente estão expostos à visita de vários insetos vetores polípagos, que podem dispersar o patógeno de forma generalizada e posterior transmissão planta-a-planta (WOOLHOUSE; TAYLOR; HAYDON, 2001).

Xylella fastidiosa é uma bactéria que se espalha sistemicamente pela planta, multi-hospedeira e transmitida principalmente por um vetor polífago, conhecido popularmente como cigarrinha (Hemiptera: Cicadellidae) e pode causar doenças e perdas econômicas em várias espécies de plantas cultivadas. Acreditava-se que a ocorrência da bactéria era restrita ao continente americano (HOPKINS; PURCELL, 2002). No entanto, recentemente foi diagnosticado *X. fastidiosa* como agente patogênico em oliveiras na Itália (CARLUCCI et al., 2013) e em videiras e amendoeiras no Irã (AMANIFAR et al., 2014). Atualmente são propostas cinco subespécies de *X. fastidiosa* intimamente relacionadas ao tipo de hospedeiro que colonizam, sendo elas: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (SCHAAD et al., 2004), *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (SCHAAD et al., 2004), *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (SCHUENZEL et al., 2005), *X. fastidiosa* subsp. *tashke* (RANDALL et al., 2009) e *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (SCHAAD et al., 2004). Dessas cinco, a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* é única relatada exclusivamente na América do Sul. No Brasil, essa bactéria infecta laranjeiras (citros) e cafeeiros, causando as doenças clorose variegada dos citros (CVC) e a atrofia do ramo do cafeeiro (ARC), também conhecido como queima do cafeeiro (CLS – *coffee leaf scorch*). Contrastando com os sintomas já bem caracterizados para CVC, na ARC, os sintomas resultantes da colonização dos ramos pela bactéria é o encurtamento dos entrenós, abscisão foliar com retenção de poucas folhas de formato estreito somente na extremidade mais distal e redução no tamanho dos frutos (LI et al., 2001) (Figura 1).

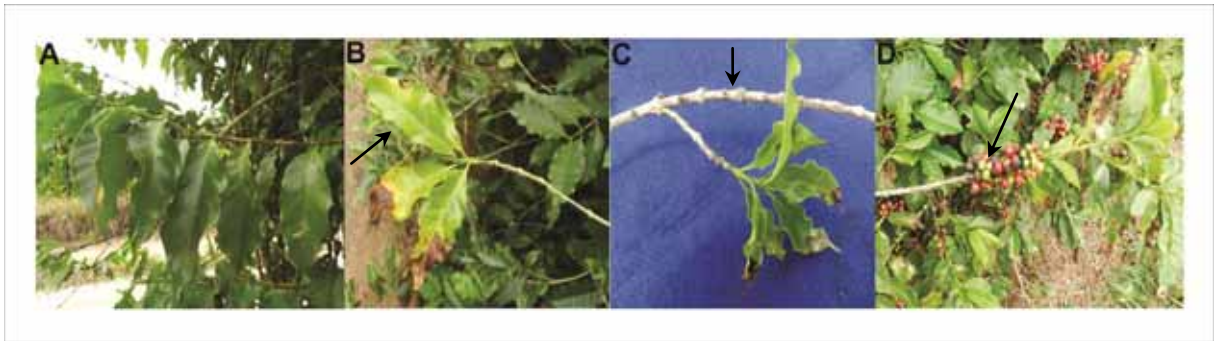


Figura 1. Sintomas relacionados à presença de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. A = ramo assintomático, B e C = folhas dispostas somente na extremidade apical com formato lanceolado (setas indicativas) e exibindo encurtamento de internódios (setas indicativas); D = fruto do cafeeiro de tamanho reduzido, característicos em plantas infectadas pela bactéria.

Ao que se conhece em termos quantitativos, é nos citros que a *X. fastidiosa* acarreta os maiores danos econômicos no Brasil, na ordem de 100 milhões de dólares anuais, na forma de replantio, poda das plantas infectadas, controle do vetor e perda na produtividade (BOVÉ; AYRES, 2009). Em relação ao cafeeiro, pouco se sabe sobre os danos econômicos causados por *X. fastidiosa* nesta cultura. Rocha et al. (2010) verificaram que a cada 1% de aumento na severidade da doença há perdas de rendimento de 1,22 a 1,34 sacos de 60kg por hectare. Os mesmos autores também identificaram que, quando os níveis de severidade estão acima de 12% no talhão, há necessidade de intervenções de práticas agrícolas como poda drástica, adubação e controle mais eficiente do inseto vetor. A ausência de investigação dos danos econômicos da ARC ou CLS, muito provavelmente seja em função que, por muitos anos, os sintomas causados por esta doença foram confundidos com deficiências nutricionais, estresse hídrico, infecção por nematóides e outras doenças (LI et al., 2001).

Isolados de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros são descritos como geneticamente relacionados (ROSATO et al., 1998), porém não há até o momento, nenhum estudo demonstrando que infecção cruzada pode ocorrer naturalmente entre essas estirpes. Além disso, ambas as estirpes podem ser transmitidas pelas mesmas espécies de cigarrinhas, como a *Acrogonia citrino*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Oncometopia facialis* e *Dilobopterus costalimai* (MARRUCI; LOPES;

CAVACHIOLI, 2008). Também já se sabe que plantações de café no Brasil são caracterizadas por uma alta diversidade de espécies de cigarrinhas altamente infectadas com *X. fastidiosa* (LARA; PERIOTO; FREITAS, 2007; SILVA et al., 2007), resultando em uma distribuição generalizada desta bactéria em grandes escalas espaciais (DE LIMA et al., 1998; TAKATSU; SANTOS; MALUF, 2001). Desta forma, espera-se que a ecologia das doenças provocadas pela *X. fastidiosa* subsp. *pauca* seja semelhantes para ambos os patossistemas presentes em plantações cítricas (laranja doce) e de cafeeiro. No entanto, a seleção imposta pelas duas espécies distintas de hospedeiros, juntamente com a dinâmica do inseto vetor e do patógeno e das práticas agrícolas únicas em cada cultura, podem desempenhar um papel importante na estruturação das populações bacterianas em laranja doce e café (SCORTICHINI, 2005). Por exemplo, comumente são aplicados inseticidas nas culturas de citros. Porém não é feita nenhuma recomendação para o controle dos vetores de *X. fastidiosa* nas plantações de café.

Populações de *X. fastidiosa* que infectam laranja doce apresentam alta diferenciação genética indicando uma forte estrutura espacial e limitado fluxo gênico entre as populações geográficas amostradas (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014). Em contraste, não há informações sobre a estruturação genética de populações da bactéria quando infectando plantas de café. Os poucos artigos que trabalharam com este tema se concentraram apenas na variabilidade genética de estirpes pontais de *X. fastidiosa* de café, amostradas ao longo do tempo (NUNNEY et al., 2012; QIN et al., 2001; WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007). Os principais objetivos da nossa pesquisa foram determinar a estrutura genética de populações de *X. fastidiosa* infectando cafeeiros para determinar a diversidade genética e genotípica das populações amostradas. Também buscamos entender a magnitude do fluxo gênico e o modo reprodutivo predominante desta bactéria, assim como comparar os resultados encontrados neste trabalho com estudos recentes de populações do patossistema da CVC. O nosso objetivo também é compreender como distintamente os hospedeiros de laranja doce e café tem moldado a ecologia e a biologia populacional de *X. fastidiosa*.

OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram: a) conhecer a diversidade genética e genotípica em populações de *Xylella fastidiosa* infectando cafeeiros em quatro regiões distintas do estado de São Paulo; b) descrever a estrutura genética hierárquica dentro e entre populações de *X. fastidiosa*; c) detectar indivíduos migrantes de *X. fastidiosa* entre as regiões amostradas e as prováveis rotas migratórias do patógeno. Neste estudo uma hipótese foi testada: (i) populações de *X. fastidiosa* de café são geograficamente estruturadas sem mistura de isolados entre as regiões. Para investigar essa hipótese, foi empregada uma estratégia de genotipagem usando marcadores microssatélites denominados aqui pelo Número Variável de DNA Repetitivo Aleatório (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTR locos), visando diferenciar genótipos de *X. fastidiosa* de café no estado de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem, isolamento de *Xylella fastidiosa* e extração de DNA. Um total de 519 isolados de *Xylella fastidiosa* foi obtido de cafeeiros (*Coffea arabica* cv. Mundo Novo) de quatro regiões geográficas do estado de São Paulo (Figura 2 e Tabela 1). Todas as plantas amostradas exibiam sintomas típicos de infecção por *X. fastidiosa* como encurtamento de internódio e retenção de poucas folhas na extremidade mais distal dos ramos (Figura 1). Para o isolamento foram usados pecíolos das folhas e ramos (de aproximadamente 3 mm de diâmetro), cujas superfícies foram desinfetadas em água sanitária comercial diluída em água (1:1 vol. / 2 min), álcool 70% (2 min), seguido de três lavagens em água esterilizada. O material desinfetado foi macerado em tampão PBS e diluído até 10^{-4} , sendo 80 μ L da última diluição plaqueada em meio sólido BCYE (WELLS et al., 1981) e mantidas a 28°C durante pelo menos 15 dias. As primeiras colônias a surgirem foram repicadas três vezes em placas de meio PWG (HILL; PURCELL, 1995) para garantia da pureza do isolado quanto a contaminantes. Na última repicagem, uma fração das

células foi armazenada a -80°C em meio PW líquido adicionado de 40% de glicerol para composição da coleção de isolados de *X. fastidiosa*. A outra fração foi crescida em meio PW líquido durante cinco dias e então submetida à extração de DNA através do kit comercial Wizard DNA extraction (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções do manual do fabricante. Embora os isolados apresentassem morfologia muito semelhante às descrições para colônias de *X. fastidiosa*, a identidade destes isolados foi verificada por amostragem de 10% das colônias através da PCR, utilizando o conjunto de primers RST 31/ RST 33 (MINSAVAGE et al., 1994), específicos para *X. fastidiosa*.

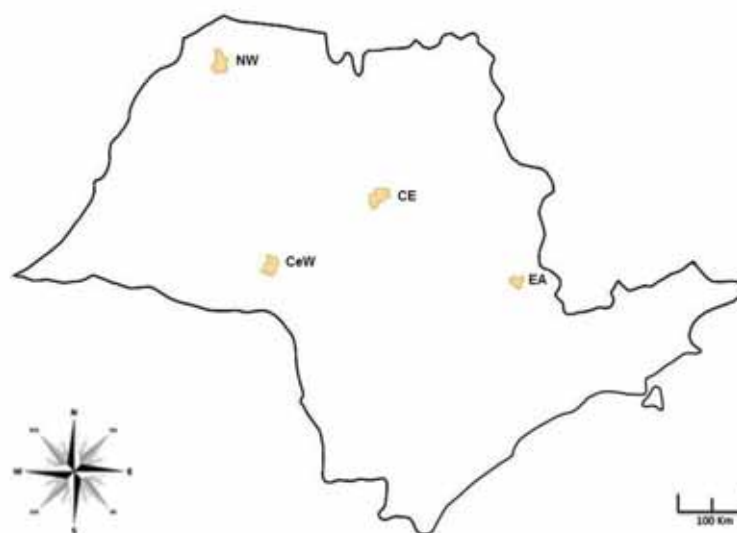


Figura 2. Mapa do estado de São Paulo destacando as regiões geográficas amostradas. NW = região Noroeste; CE = região Central; CeW = região Centro-Oeste; EA = região Leste.

Tabela 1. Origem e composição das populações de *Xylella fastidiosa* de cafeeiros usados nesse trabalho.

Cidades	Regiões geográficas	Coordenadas geográficas	Número de plantas	Média de isolados por planta	Total de isolados
Tabatinga	Central	-21°39'55.30"S -48°35'16.10"W	17	7	127
Jales	Noroeste	-20°14'25.00"S -50°29'61.00"W	9	7	60
Ocaçu	Centro-Oeste	-22°24'57.22"S -49°52'39.75"W	20	9	178
Santo Antônio de Posse	Leste	-22°36'21.75"S -46°58'19.61"W	12	13	154
TOTAL			58	9	519

Amplificação dos microssatélites (*Variable Number of Tandem Repeat – VNTR locos*) e genotipagem. Sete locos de VNTR descrito por Lin et al. (2005) e outros sete novos desenvolvidos neste trabalho foram utilizados para genotipagem dos isolados de *Xylella fastidiosa* (Anexo 1). As novas unidades repetitivas foram selecionadas através do software *Tandem Repeat Finder* versão 2.02 (BENSON, 1999), utilizando o genoma completo da estirpe 3124 de café (dados não publicados) e da estirpe de 9a5c de citros (disponibilizado no website da UNICAMP, no endereço <http://onsona.lbi.ic.unicamp.br/xf>). Os primers foram desenhados baseados nas regiões flaqueadoras das unidades repetitivas através do software Primer3 versão 0.4.0 (UNTERGRASSER et al., 2012) e testados em relação a sua especificidade através do *in silico* PCR amplification (disponível em <http://insilico.ehu.es>) baseado no genoma da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* de citros. Os marcadores foram amplificados através de PCR multiplex (Multi-Locus VNTR Analysis - MLVA) em cinco diferentes conjuntos de primers, variando de dois a quatro pares de primers para cada conjunto (Anexo 1). Os MLVA foram realizadas com volume final de 13,5 µl contendo 2 µl de DNA (25 a 50 ng), 6,50 µl de DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e concentrações variadas dos primers, sendo que todos os primers direto (*forward*) foram marcados com diferentes fluoróforos (Tabela 2). O seguinte programa foi utilizado para as amplificações: um estágio de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 45 seg e um ciclo final de extensão de 10 min a 72°C. A genotipagem dos fragmentos foi

realizada em eletroforese de capilar sendo as reações previamente diluídas 20x (MLVA 1) e 40x (MLVA 2, 3, 4, e 5) em água Milli-Q estéril. Para a eletroforese de capilar foram adicionados 0,7 µl do MLVA diluído, 10 µl Hi-Di™ Formamida e 0,1 µl de GeneScan 500-LIZ Size Standard (Life Technology, Foster City, CA) e desnaturados à 95°C por 5 minutos. As corridas foram realizadas no sequenciador ABI 3730 DNA (Life Technology) com a configuração padrão LIZ500-3730 no modulo GeneScan com conjunto de filtros G5. O tamanho dos picos gerados foram estimados através do software Peak Scanner versão 1.0 (Life Technology).

Tabela 2. Informações genéticas sobre os primers VNTR e alelos privados entre as populações de *Xylella fastidiosa* de café.

MLVA	VNTR locus	Fluoróforo ^a	Variação do tamanho do fragmento (pb) ^b	Variação do número de VNTR ^c	Número total de alelos	Alelos Privativos ^d			
						CE	NW	CeW	EA
1	COSSR1	FAM	248 – 332	36 – 45	13	0	0	3	1
	COSSR6	PET	280 – 504	30 – 45	16	0	1	1	7
	CSSR18	NED	272 – 322	34 – 60	11	0	0	1	2
	CSSR45	VIC	267 – 417	19 – 20	4	0	0	1	0
	Total				44	0	1	6	10
2	COSSR4	FAM	244 – 428	35 – 40	17	0	0	2	0
	COSSR5	VIC	172 – 300	33 – 50	13	3	2	0	0
	Total				30	3	2	2	0
3	COSSR3	FAM	278 – 406	35 – 63	15	0	2	2	4
	CSSR42	PET	287 – 392	39 – 53	8	0	1	0	6
	OSSR19	NED	222 – 478	29 – 34	10	0	0	1	5
	Total				33	0	3	3	15
4	GSSR6	FAM	221 – 286	78 – 89	12	0	0	1	0
	OSSR14	VIC	237 – 387	15 – 31	4	0	1	0	2
	Total				16	0	1	1	2
5	OSSR17	FAM	222 – 336	39 – 62	15	0	0	2	2
	GSSR4	PET	395 – 419	55 – 79	8	0	1	3	0
	GSSR12	VIC	336 – 441	48 - 59	7	0	0	0	6
	Total				30	0	1	5	8
TOTAL GERAL					153	3	8	17	35

^a Em cada MLVA utilizaram primers direto marcados com fluoróforos. FAM = azul; NED = amarelo; PET = vermelho; VIC = verde.

^b Variação do tamanho do fragmento, quantificado em pares de base (pb), apresentado pelos isolados de *X. fastidiosa* de café.

^c Número de unidades repetitivas geradas pelos loci VNTR e determinados pelo tamanho, em pares de base, de cada unidade repetitiva.

^d Número de alelos privados de cada população de *X. fastidiosa* de café. CE (Região Central - Tabatinga), NW (Região Noroeste – Jales), CeW (Região Centro-Oeste – Ocaçu) e EA (Região Leste – Santo Antonio de Posse), regiões onde foram realizadas as coletas de material vegetal.

Perfil dos VNTR. A distribuição da frequência alélica, a variação do tamanho das unidades repetitivas e o número de alelos por loco para todos os locos de VNTR estão disponíveis na Tabela 2 e na Figura 3. O tamanho dos alelos foi convertido em número de unidades repetitivas para melhor visualização da dinâmica das VNTR dentro das populações. Considerando a observação do aumento das unidades repetitivas, onde as mutações são geradas pelas mudanças de uma única pequena sequência (inserção ou deleção de uma unidade repetitiva) para a maioria dos locos de VNTR, nós assumimos o modelo de passos mutacionais (*Stepwise Mutation Model* - SMM) para todas as análises, confirmando os resultados já anteriormente encontrados para *X. fastidiosa* de videira (COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011) e laranjeiras (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014). Parâmetros como variação do tamanho dos alelos, média do número de unidades repetitivas e identificação de alelos privados foram determinados através do software CONVERT versão 1.3.1 (GLAUBITZ, 2004).

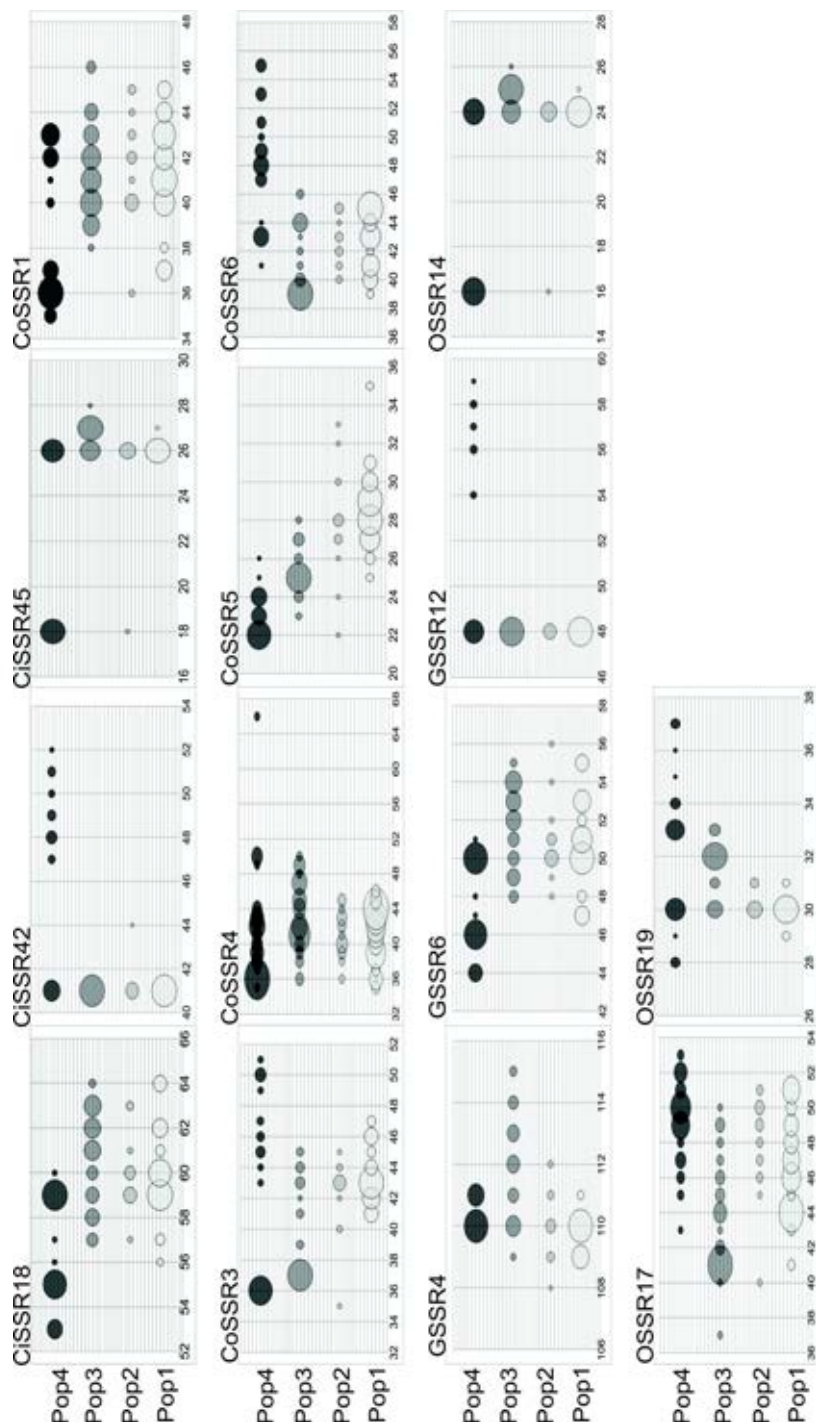


Figura 3. Distribuição das frequências alélicas dos 14 marcadores VNTR nas quatro diferentes populações de *Xylella fastidiosa* de café do estado de São Paulo, Brasil. Cada caixa representa um loco VNTR (ex: COSSR1, CISSR42, OSSR17, GSSR12). O eixo x representa o número de unidades repetitivas de cada loco. O eixo y corresponde às populações e cada cor corresponde a uma determinada população e estão identificados como: Pop1 (Região Central), Pop2 (Região Noroeste), Pop3 (Região Centro-Oeste) e Pop4 (Região Leste). O tamanho dos círculos é proporcional a frequência dos alelos.

Diversidade clonal. Isolados mostrando o mesmo MLMG (*Multi-locus Microsatellite Genotype*) foram considerados como clones ou haplótipos, determinados através do software GENODIVE (MEIRMANS; VAN TIENDEREN, 2004). Somente um clone representante de cada MLMG foi selecionado por população para construção de um novo conjunto de dados, sendo então usados em todas as análises subsequentes. Vários indicadores de diversidade genotípica foram estimados como: (i) número de genótipos por população; (ii) genótipos específicos de cada população; (iii) fração clonal, calculado por $(1 - [\text{número de diferentes genótipos}]/[\text{total de números de isolados}])$ (ZHAN et al., 2003); (iv) índice de diversidade de Simpson (S_i), que é estimado como $S_i = 1 - \sum P_r^2$, ($r = 1$ to s), onde P_r é a abundância relativa de r th genótipos na população (1 representa a diversidade infinita e 0 quando não há diversidade) (HE; HU, 2005) e, (v) *evenness*, que é um indicador de quão uniformemente os genótipos estão divididos sobre as populações (STODDART; TAYLOR, 1988). Essas medidas foram calculadas através programa GENODIVE. A significância estatística das diferenças na diversidade genotípica entre pares de populações foram testadas usando *bootstrap* (reamostragem com substituição), onde indivíduos de cada população foram reamostrados e os índices de diversidade foram recalculados e comparados após cada rodada (MANLY, 1991) em 1.000 permutações, com sub-amostragens para equiparar ao tamanho da menor população (GRUNWALD et al., 2003).

Diversidade genética. O nível de variação genética nas populações foi estimado pela diversidade genética de Nei (H_{Nei}), corrigido pelo número de indivíduos (n) na população através da formula $H_{Nei} = [(1 - \sum p_i^2) \times (n/n-1)]$, onde p_i é a frequência do alelo i no loco p (NEI, 1978) e também pela riqueza alélica dentro de cada população geográfica. Ambos os parâmetros foram estimados pelo software FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). A significância estatística entre os pares de comparação foi obtida através de 1.000 aleatorizações no FSTAT.

Análise de desequilíbrio de ligação. A hipótese nula desta análise é que todos os locos estão em equilíbrio entre todas as populações. Essa hipótese pode ser testada através do índice de associação (I_A) (SMITH et al., 1993), uma medida tradicional de desequilíbrio de ligação de multilocos, onde é calculada a distância entre todos os pares de indivíduos da população (número de locos em que eles diferem), comparando a variância dessas distâncias com àquelas esperadas se não houvesse desequilíbrio gamético entre os pares de locos. O desequilíbrio de ligação também foi estimado através do índice alternativo r_{barD} , que é menos sensível à variação do número de locos (AGAPOW; BURT, 2001). Ambos os índices foram estimados pelo programa Multilocus versão 1.3 (disponível em: <http://www.bio.ic.ac.uk/envolve/software/multilocus/>). Valores de I_A ou r_{barD} significativamente diferente de zero indica que os locos estão em desequilíbrio de ligação, sendo estes testados através de 1.000 randomizações.

Diferenciação entre populações. A hipótese nula de não diferenciação genética entre as populações amostradas foi testada pelo índice D_{est} (JOST, 2008), utilizando o pacote DEMETics do programa R e pelo valor de R_{ST} (SLATKIN, 1995), gerado através do software ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). Ambos os índices são análogos ao índice de diferenciação de população amplamente utilizado - F_{ST} (WRIGHT, 1951), porém esses são mais adaptados para marcadores altamente polimórficos como os VNTR. Segundo Gerlach et al. (2010), o índice de diferenciação D_{est} é baseado no número efetivo de alelos, resultando em uma percepção mais significativa da diferenciação genética. Para ambos os índices (D_{est} e R_{ST}), o P -values, que atestam a significância da diferenciação e os 95% do intervalo de confiança, foram estimados através da reamostragem de 1.000 *bootstrapping*. A diferenciação genética entre pares de populações foi considerada significativa quando a probabilidade (P) foi inferior a 5 % ao nível nominal. Além das análises de estrutura de população, realizamos a análise de variância molecular (AMOVA) para avaliar e quantificar a diferenciação entre as subpopulações (regiões geográficas) através do software ARLEQUIN versão

3.11. Análises da soma dos quadrados das diferenças de tamanho (Φ_{STAT}) entre dois haplótipos foi utilizada como uma medida de distância (SLATKIN, 1995), com significância ($P < 0.05$) testada por meio de 1.023 testes de permutações.

O software GENODIVE também foi usado para realizar o teste de Mantel. Este teste estima a correlação entre as matrizes de distâncias geográficas (quilometragem linear extraída da latitude e longitude entre as populações) e as distâncias genéticas, sendo que a última utiliza-se dos valores dos índices D_{est} e H_{Nei} . A hipótese nula de não relação linear entre as distâncias geográficas e genéticas, entre todos os pares de população, foi testada pelo MCMC através de 1.000 randomizações assumindo $P < 0,05$.

O número de agrupamentos (*clusters*) genéticos nas populações foi gerado através do software STRUCTURE usando o modelo de mistura (*admixture*) e assumindo um número desconhecido de populações. Para isso, três corridas foram realizadas com 10 repetições para cada valor de K (número de populações), variando de 2 a 16. Para essas corridas, as seguintes condições foram adotadas: um período de aquecimento (*burn-in*) de 30.000 gerações e simulações de MCMC (Monte Carlo via Cadeias de Markov) de 300.000 interações a cada corrida. O valor de K com a máxima verossimilhança foi determinado de acordo com Evanno, Regnaut e Goudet (2005). STRUCTURE foi também executado assumindo $K = 4$ populações geográficas, usando as mesmas configurações mostradas, para definir o coeficiente de parentesco 'Q'. Coeficiente de parentesco é uma proporção da participação de cada isolado pré-definido dentro da sua própria população em que cada um dos K clusters formados, tendo como objetivo identificar os indivíduos em "admixture".

Parâmetros demográficos e histórico de migração. O tamanho efetivo populacional e as taxas de migrações históricas entre as populações de *Xylella fastidiosa* infectando café foram inferidas usando uma estimativa Bayesiana baseada nas simulações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) implementado no software MIGRATE versão 3.0.3 (BEERLI;

FELSENTEIN, 2001) (Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Flórida, Tallahassee, FL). Este método permite estimar o tamanho efetivo populacional das populações (θ) (que para haplóides é igual a $2N_e\mu$, onde N_e = tamanho efetivo da população e μ = taxa de mutação para cada locos), além das taxas de migração entre os pares de populações ($M = 2N_e m$, o número de migrantes trocados por geração). O tipo de dados escolhido foi os dados de microssatélites com “*Brownian motion*”, assumindo o modelo de passos mutacionais (SMM). Foram realizadas 10 corridas distintas. As corridas consistiam de uma longa cadeia de Markov e regime de aquecimento estático com quatro temperaturas (1.0, 1.3, 2.6 e 3.9). A cadeia de Markov foi realizada com 5.000 amostras, num intervalo de amostragem de 100 (500.000 passos), período de *burn-in* de 10.000 e 5.000 árvores analisadas. Distribuição *a priori* para parâmetro de *teta* e $2N_e m$ foi uniforme com um mínimo = 0,0, média = 10,0 e o máximo = 20,0. O intervalo de confiança aproximado para os parâmetros *teta* e M foram calculados usando a abordagem de percentis.

RESULTADOS

Novos conjuntos de primers VNTR. O uso de primers VNTR locos entre subespécies de *X. fastidiosa*, em alguns casos, resultam em produtos de amplificação que não correspondem a uma unidade repetitiva (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014). Por este motivo, nós sintetizamos novos primers de VNTR com base no genoma da estirpe 3124 de *X. fastidiosa* infectantes de plantas de café e também dois outros conjuntos baseado no genoma da estirpe 9a5c de citros. Além destes primers, nós também selecionamos outros oito conjuntos de primers, já descritos anteriormente, baseados no número de unidades repetitivas nos “motifs” e no seu potencial uso para a maioria das subespécies de *X. fastidiosa* (LIN et al., 2005; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014). Dos primers previamente selecionados do trabalho de Lin et al. (2005), não foi obtido amplificação para o loco CiSSR13 (baseado no genoma da estirpe 9a5c de citros) em todas as estirpes de café (dados não mostrados), sendo este excluído das análises.

Para o loco COSSR4 (baseado no genoma da estirpe 3124 de café) verificamos que ocorre a amplificação de um fragmento genômico que não correspondeu a uma região repetitiva nas estirpes de *X. fastidiosa* de laranjeiras. Estas análises foram feitas *in silico* usando o genoma da estirpe 9a5c como referência (dados não mostrados). Porém como estamos trabalhando apenas com isolados de *X. fastidiosa* de café, este conjunto de primers foi mantido nas análises. No final um total de 14 locos VNTR foi usado para genotipagem das populações de *X. fastidiosa* de cafeeiros (Anexo 1 e Tabela 2).

Diversidade genotípica e genética. O número de alelos por loco variou de quatro a 17, totalizando 153 alelos referentes aos 14 locos VNTR utilizados (Tabela 2). Não houve uma correlação entre o número de alelos e a origem do loco em relação à estirpe. A média do número de alelos por loco obtido com os marcadores VNTR sintetizados com base no genoma das estirpes de *X. fastidiosa* de café, foi levemente maior ($n = 15$) do que para aqueles baseados no genoma das estirpes de laranjeiras ($n = 8$), videira ($n = 10$) e oleandro ($n = 9$). Alelos privados ($n = 63$) estavam distribuídos aleatoriamente em todas as populações analisadas. Estirpes da bactéria da região Leste (Santo Antônio de Posse) possuem 55% do total de alelos privados, ao contrário da população da região Central (Tabatinga) que possuem apenas 4,7% de alelos privados.

Do total de 519 isolados de *X. fastidiosa* analisados, 185 MLMG (37,2%) foram selecionados como sendo estirpes geneticamente distintas. Diferentes regiões possuem índices distintos de diversidade genotípica e genética (Tabela 3). A fração clonal variou de 0,56 (região Leste) a 0,72 (região Noroeste). O índice de diversidade genotípica de Simpson foi significativamente menor para a população da região Noroeste (0,86) em comparação com todas as demais populações (Leste, Central e Centro-Oeste) (Tabela 3). Altos índices de diversidade genética (H_{Nei} e riqueza alélica) foram observados para a população de *X. fastidiosa* da região Leste (Tabela 3). Ambos os índices de diversidade genotípica e genética não foram significativamente diferentes para as populações da região Noroeste e Central (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidade genotípica e genética de populações de *Xylella fastidiosa* isoladas de cafeeiros em diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo (Brasil).

População	Tamanho amostral (n)	Número de genótipos	Fração clonal ^a	Evenness	Índice de Simpson	H _{Nei}	Riqueza Alélica
Central	127	44	0,65	0,49 a ^b	0,96 a	0,54 c	5,06 c
Noroeste	60	17	0,72	0,39 c	0,86 b	0,57 c	5,07 c
Centro-Oeste	178	61	0,64	0,49 a	0,97 a	0,60 b	5,52 b
Leste	154	63	0,56	0,41 b	0,97 a	0,69 a	5,77 a
TOTAL	519	185	0,64	0,44	0,94	0,60	5,35

^a Detalhes de como este índice foi estimado, favor verificar nos Materiais e Métodos.

^b Valores dos índices seguidos por diferentes letras foram significativamente diferentes ($P \leq 0,05$), baseado no teste dos pares de comparação através de 1.000 *bootstrap*.

Análise de desequilíbrio de ligação. A associação não aleatória entre os diferentes alelos foi detectada em todas as populações de *X. fastidiosa*, como observado pelos índices de associação (I_A e r_{barD}) que foram significativamente diferentes de zero ($P \leq 0,01$), indicando um desequilíbrio de ligação - LD (Tabela 4). Valores de I_A variaram de 0,91 a 4,29, significando um desequilíbrio extremamente forte, sendo estes resultados confirmados também pelo índice r_{barD} , que variaram de 0,08 a 0,33. Como consequência, uma porcentagem significativa de pares de alelos em significativo desequilíbrio de ligação foi observada em todas as populações (15,4 a 84,6%). O menor valor observado foi para a população da região Noroeste (Jales) e maior valor foi detectado na população Leste (Santo Antônio de Posse) (Tabela 4). O forte desequilíbrio de ligação e os valores dos índices de associação (I_A e r_{barD}) significativamente diferentes de zero são indicadores de uma população bacteriana clonal.

Tabela 4. Testes de associação aleatória de alelos entre os pares de locos nas populações de *Xylella fastidiosa* infectantes de cafeeiros.

População	Estimativas de equilíbrio gamético				
	I_A^a	r_{barD}^b	P	Pares de loci em desequilíbrio significativo	% ^c
Central	0,9109	0,0793	<0.001	24 em 66	36,4
Noroeste	2,6070	0,2253	<0.001	12 em 78	15,4
Centro-Oeste	2,6225	0,2188	<0.001	52 em 66	78,8
Leste	4,2992	0,3363	<0.001	77 em 91	84,6

^a I_A e r_{barD} são índices de desequilíbrio gamético multilocos.

^b r_{barD} é uma modificação do índice I_A , porém com baixa dependência do número de locos.

^c Porcentagem de pares de alelos em desequilíbrio de ligação.

Diferenciação genética entre as populações. A hipótese H0 de não diferenciação genética entre as populações foi testada por duas estatísticas (D_{est} e R_{ST}), sendo estas análogas ao índice F_{ST} de diferenciação genética descrita por Wright (1951), onde ambos os índices apresentaram resultados similares (Tabela 5). A exceção ocorre entre as populações da região Central e Noroeste ($D_{est} = 0.02$; $R_{ST} = 0.01$ – ambos com $P > 0.05$). Todas as demais combinações mostraram diferenças significativas para ambos os índices de diferenciação genética ($D_{est} =$ de 0,36 a 0,63; $R_{ST} =$ de 0,31 a 0,50 – ambos com $P < 0.05$), cujos altos valores desses indicam diferenciação genética entre as populações. Os valores de D_{est} obtidos foram muito próximos aos obtidos para populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014). Pelo AMOVA, do total de diversidade genética, 56% das variações observadas ocorrem dentro das populações e 44% entre as populações, refletindo um alto valor de diferenciação genética em nível populacional ($\Phi_{STAT} = 0.44$, $P \leq 0.01$) (Tabela 6). Similarmente a outros estudos realizados com populações de *X. fastidiosa* de laranjeira (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014) e videira (COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011), nenhuma correlação foi obtida entre o índice de distância genética (D_{est} e R_{ST}) e as distâncias geográficas entre as populações, pelo teste de Mantel ($r = 0.012$, $P = 0.50$) (Figura 4).

Tabela 5. Medida de diferenciação entre os pares de população baseado nos valores estatísticos de D_{est} (abaixo da diagonal) e R_{ST} (acima da diagonal).

População	Central	Noroeste	Centro-Oeste	Leste
Central	-	0.01 ^{NS}	0.37*	0.41*
Noroeste	0.02 ^{NS}	-	0.34*	0.31*
Centro-Oeste	0.42*	0.42*	-	0.50*
Leste	0.42*	0.36*	0.63*	-

^{NS} Não significativo ou * significativamente diferente ($P < 0.05$), testados através de 1.000 aleatorizações e corrigidos pelo teste de Bonferroni.

Tabela 6. Distribuição hierárquica da diversidade genética entre as populações de *Xylella fastidiosa*.

Fonte de variação	gl ^a	Soma dos quadrados ^b	Componentes da variância	Porcentagem de variação	Índices de fixação	P
Entre as populações	3	9,553.9	70.6529 Va	44.00	$\Phi_{STAT} = 0.4399$	≤ 0.001
Dentro das populações	181	16,276.6	89.9260 Vb	56.00		
TOTAL	184	25,830.5	160.5789			

^a Graus de liberdade.

^b Método de distância baseado na soma do quadrado das diferenças em tamanho (R_{ST}).

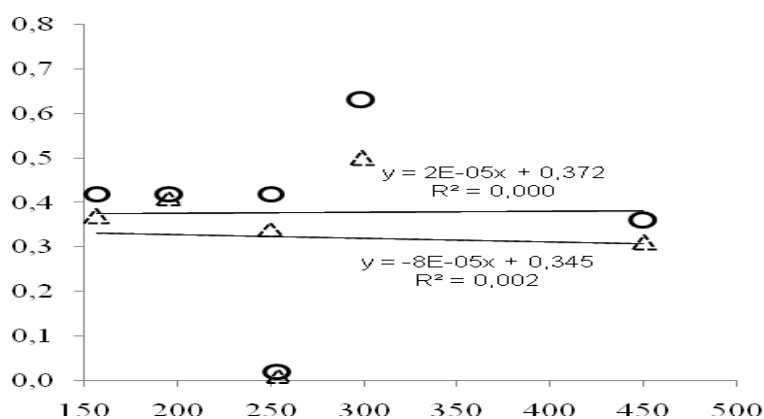


Figura 4. Relação linear entre as distancias genéticas (H_{Nei} e D_{est}) e geográficas das populações de *Xylella fastidiosa* amostradas no estado de São Paulo (Brasil). Círculos e linha sólida representam a relação entre as distancias genéticas e geográficas através do índice de H_{Nei} ($P = 0,458$). Triângulos e linha tracejada representam a relação das distancias genéticas e geográficas através do índice D_{est} ($P = 0,50$). O eixo x representa as distâncias geográficas em quilômetros.

Nós também usamos a análise de agrupamento (*clusters*) genético pelo método Bayesiano para inferir o número de grupos geneticamente homogêneos ou subpopulações (K) entre os isolados amostrados. Com o software STRUCTURE (HUBISZ et al., 2009), identificamos $K = 3$ clusters (Figura 5). A observação de $K = 3$ clusters, inferior ao número geográfico de populações ($n = 4$), está de acordo com os valores de D_{est} e R_{ST} que não indicaram subdivisão entre as populações de *X. fastidiosa* da região Central e Noroeste. Todos os genótipos destas duas populações foram agrupados no cluster $K-1$, juntamente com alguns genótipos das populações Centro-Oeste (37,7%) e Leste (46%) (Figura 5). O cluster $K-2$ formou-se unicamente com genótipos da região Leste (56,9%), enquanto o cluster $K-3$ agrupou a maioria dos genótipos da população Centro-Oeste (62,3%) (Figura 5).

Como o número de K clusters genéticos foi menor do que os clusters geográficos pré-estabelecidos, nós realizamos outra análise no software STRUCTURE assumindo $K = 4$ populações geográficas para identificar os genótipos em “admixture”. Baseado na análise do STRUCTURE com $K = 4$ populações, uma significativa porcentagem dos genótipos (38,3%) apresentou coeficientes de parentesco ‘ Q ’ não relacionados com a sua população geográfica de origem (por exemplo, indivíduos em admixture ou migrantes). Especificamente para cada população, 82,3% (14/17) dos genótipos da região Noroeste estavam em admixture, seguidos de 49,2% (31/61) dos genótipos da região Leste, 37,7% (23/61) da região Centro-Oeste e, apenas 6,8% (3/44), da população da região Central do estado de São Paulo (Figura 6).

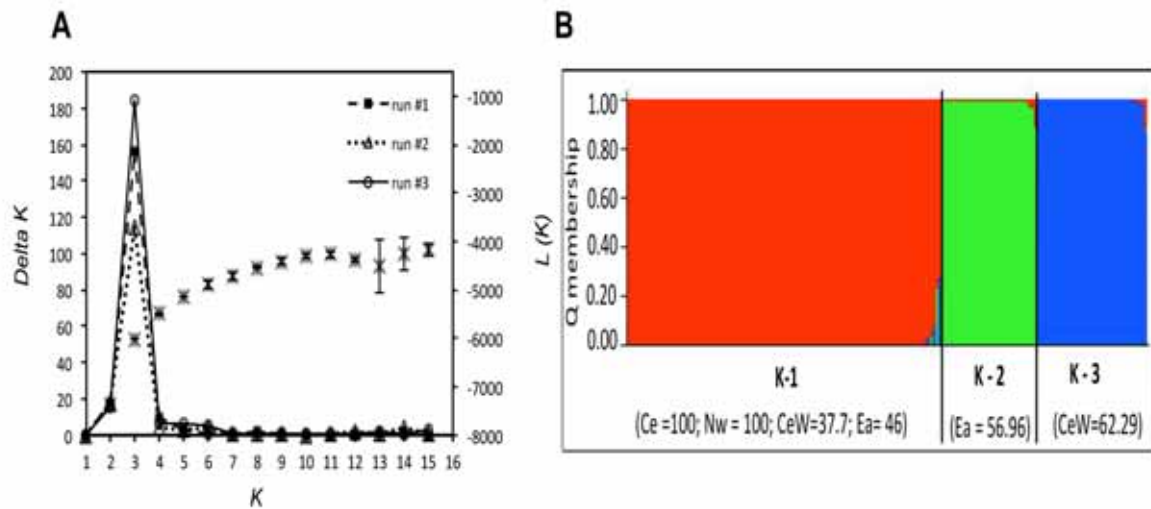


Figure 5. A maior distribuição da probabilidade posterior para o número de clusters (K) presente nas populações de *Xylella fastidiosa* de cafeeiros. (A) Valores de K clusters e média dos valores de verossimilhança ($L(K)$) determinados a partir de três corridas independentes pelo software STRUCTURE, indicam que $K = 3$, baseado nos valores de ΔK , de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005). O segundo eixo y (asterisco) indica os valores médios de verossimilhança ($L(K) + SD$) em relação a 10 corridas para cada valor de K . (B) Coeficiente de 'parentesco' dos isolados assumindo $K = 3$ clusters genéticos como estabelecido por Evanno et al. (2005). 1 (vermelho), 2 (verde) e 3 (azul) representam os clusters genéticos formados. Em parênteses são as porcentagem dos isolados das regiões Central (Ce), Noroeste (Nw), Centro-Oeste (CeW) e Leste (Ea) do estado de São Paulo.

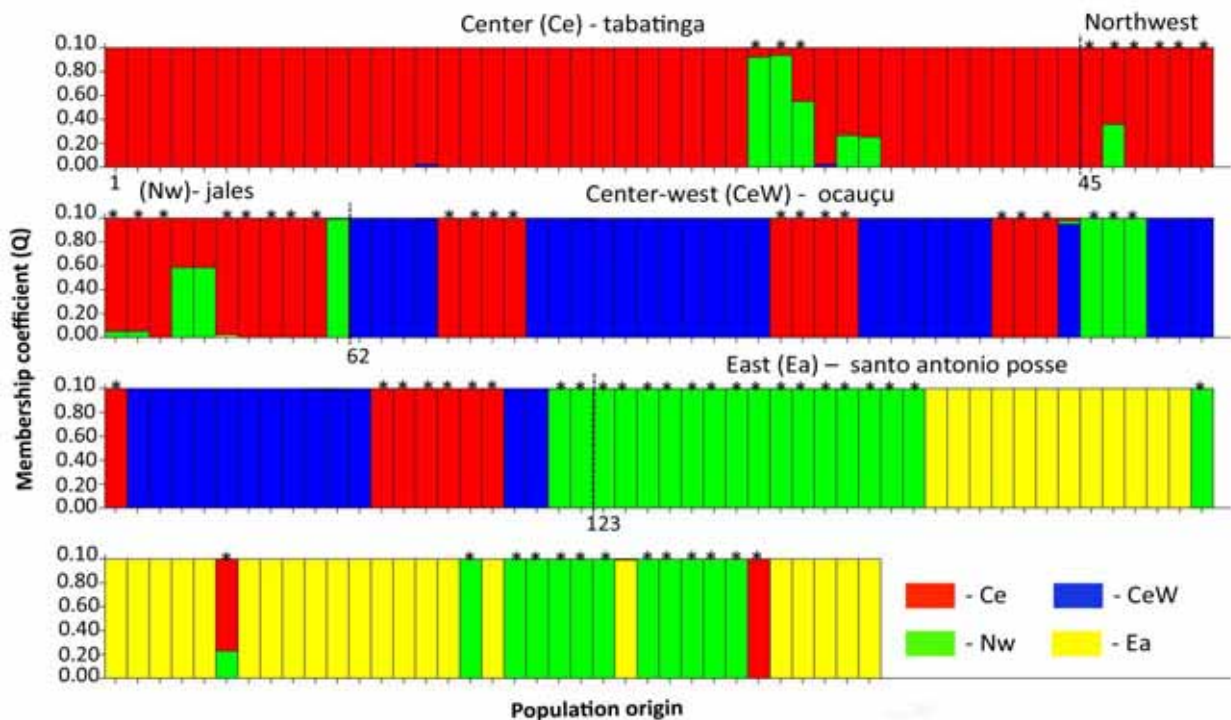


Figura 6. Estimativa do coeficiente de ‘parentesco’ (Q) para cada genótipo multilocus de microssatélites nas populações de *Xylella fastidiosa* de cafeeiros. Clusters de indivíduos baseados nas populações pré-definidas ($K = 4$) são representados pelas diferentes cores e a linha vertical representa os indivíduos. Indivíduos com múltiplas cores ou cores diferentes das populações pré-definidas são os genótipos que estão em admixture. O comprimento da barra indica o coeficiente de ‘parentesco’ (Q) para as populações distintamente coloridas. Linhas verticais tracejadas separam as diferentes populações baseado na área geográfica e os números mostram o início de cada população. O nome das populações é indicado acima da figura juntamente com as identificações dos locais geográficos de amostragem. Evento de admixture estatisticamente significativo para um genótipo multilocus é anotado com um asterisco na parte superior.

Migração histórica. As estimativas do tamanho da população de *X. fastidiosa* infectando café ($\Theta = 0,18 - 0,55$) não foram significativamente diferentes. No entanto, as taxas de migração entre as populações geográficas foram assimétricas. Por exemplo, a população Ce - Tabatinga contribuiu com um elevado número de migrantes para a população Ea - Santo Antônio da Posse ($2Nem_{Ce \rightarrow Ea} = 13,0$ migrantes / geração, intervalo de 95% = 12,3 - 14,7), que foi seis vezes maior do que o número de migrantes recebidos da região Leste ($2Nem_{Ea \rightarrow Ce} = 2,2$ migrantes / geração, intervalo de 95% = 1,2 - 3,5).

Apesar de uma tendência assimétrica, observou-se que as populações da região Central e Noroeste trocaram a maior quantidade de migrantes entre qualquer um dos pares de populações ($2Nem_{Ce \rightarrow Nw} = 14,4$ migrantes / geração; $2Nem_{Nw \rightarrow Ce} = 8,3$), o que pode explicar o atual fluxo gênico detectado entre essas duas populações. Em média, a população infectando café da região Central - Tabatinga tem contribuído o maior número de migrantes/geração (M mode = 10,7; 95 percentil Bayesiano = 8,7 - 13,4). Em contraste, a população Noroeste - Jales recebeu o maior número de migrantes (M mode = 10,5; 95 percentil Bayesiano = 7,6 - 13,4) (Figura 7).

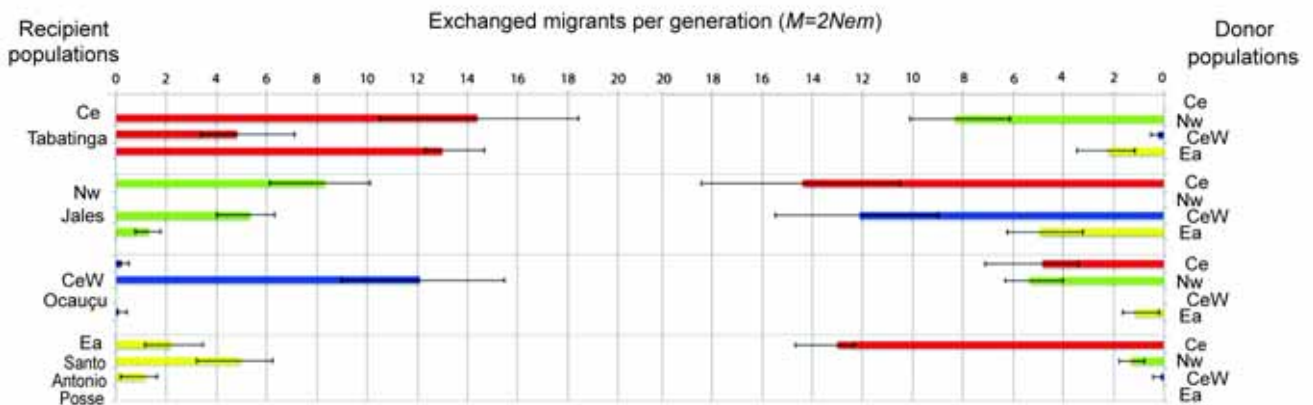


Figura 7. Estimativas dos parâmetros demográficos históricos da divergência entre as populações do patógeno *Xylella fastidiosa* infectando café, baseado na variação nos 14 VNTR locos. As direções para inferir a migração entre as populações de origem e destino estão indicadas por setas coloridas (por exemplo, setas vermelhas à esquerda indicam uma migração a partir da população da região Central - Tabatinga, enquanto setas coloridas à direita indicam uma migração a partir das outras três populações para a região Central - Tabatinga). As barras indicam as estimativas Bayesianas das taxas de migração inferidas a 95% da distribuição posterior.

DISCUSSÃO

Em contraste com a abundância de estudos sobre diversidade e genética de população de *X. fastidiosa* de laranjeiras (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014), basicamente não há informações sobre a estrutura populacional de *X. fastidiosa* quando infectando cafeeiros. Os poucos estudos que fizeram essa investigação enfatizaram a possibilidade de recombinações intra ou interespecífica entre populações de *X. fastidiosa* de laranja doce e café, sem investigar de forma ampla a diversidade dessa bactéria em cafeeiros (ALMEIDA et al., 2008; NUNNEY et al., 2012). Neste artigo, nós promovemos o primeiro estudo amplo sobre genética de populações de *X. fastidiosa* infectando café no estado de São Paulo, Brasil. Nós também descobrimos novos locos de VNTR para *X. fastidiosa* de café e o uso destes marcadores hipermutáveis para abordar questões sobre a ecologia deste patógeno a nível de população. Como relatado anteriormente (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014), quando se utiliza marcadores VNTR, deve ser verificado se realmente ocorre amplificação de regiões repetitivas para os genomas de *X. fastidiosa* de diferentes hospedeiros. A intensa atividade de elementos móveis transferidos horizontalmente, já encontrados nos genomas desta bactéria (DA SILVA et al., 2007; NUNES et al., 2003), pode ser o responsável pela não amplificação de uma unidade repetitiva conservada entre as diferentes subespécies de *X. fastidiosa*. Apesar do uso de diversos marcadores VNTR na genotipagem de populações de *X. fastidiosa* de diferentes hospedeiros, estes marcadores podem resultar na não amplificação de uma unidade repetitiva quando utilizados para amplificação de genomas diferentes daquele que o marcadores foi sintetizado. Assim, devem ser verificados individualmente os distintos alelos para cada loco para assegurar se unidades repetitivas foram amplificadas. Os novos conjuntos de marcadores VNTR, juntamente com os marcadores selecionados do trabalho de Lin et al. (2005) utilizadas neste trabalho, resultaram em 185 haplótipos distintos (37,2%) dos 519 isolados de *X. fastidiosa* de café inicialmente

utilizados. Esses resultados são proporcionalmente semelhantes aos obtido para as populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras (36%) amostradas nas mesmas regiões geográficas em 2009 (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014).

Primeiramente, nós testamos a hipótese de que as populações de *X. fastidiosa* de café são geograficamente estruturadas sem mistura de isolados entre as regiões. Neste trabalho, a maioria das populações geográficas de *X. fastidiosa* infectando cafeeiros foram geneticamente subdivididas, apesar da detecção de migração histórica e mistura significativa de genótipos entre as populações (Figura 4 e 5). A contrastante observação de alta subdivisão entre cinco dos seis pares de populações de *X. fastidiosa* de café, mesmo sob a abundante ocorrência de insetos vetores altamente infecciosos (SILVA et al., 2007), foi um indicativo de que os vetores não são um importante fator de estruturação da população entre as regiões, apesar de sua capacidade de voar por longas distâncias. Por outro lado, estes dados reforçam a hipótese de que genótipos bem adaptados localmente podem competir com genótipos invasores e manter a estrutura espacial desta bactéria (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014).

Somente um dos seis pares de populações não foi subdividido: as populações da região Central (Ce) e Noroeste (Nw) (Tabela 5 e Figura 4). Este par de populações também trocou o maior número de migrantes, embora a taxa de migração histórica fosse assimétrica, com a população da região Central contribuindo com a maioria dos migrantes (Figura 6). Historicamente, a região Noroeste foi à última região do estado de São Paulo onde fazendas de café foram estabelecidas. Assim, uma explicação da migração assimétrica e o elevado número de migrantes trocados entre as populações da região Central e Noroeste é que, mudas de café assintomáticas e infectadas com *X. fastidiosa* foram adquiridas na região Central e posteriormente introduzidas na região Noroeste para o estabelecimento de novas plantações de café. Outra explicação poderia ser que as duas populações geográficas estejam compartilhando migrantes com um reservatório de inóculo comum a estas populações (por exemplo, com espécies de plantas daninhas nativas ou

invasoras) (LOPES et al., 2003; PURCELL; SAUNDERS, 1999). Estas duas populações de *X. fastidiosa* também podem trocar migrantes com uma terceira população, não amostrada neste estudo.

Um alto nível de subdivisão também já foi detectado, em trabalhos anteriores, entre populações geográficas da *X. fastidiosa* infectando laranjeiras no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014) e, estão em concordância com as nossas observações para as populações da bactéria infectando cafeeiros. De fato, os valores estatísticos de D_{est} , que medem o nível de subdivisão entre as populações de *X. fastidiosa* infectando laranjeiras ou cafeeiros no estado de São Paulo, não foram significativamente diferentes ($D_{est (café)}$ total = 0,378; $D_{est (citros)}$ total = 0,438; $t_{(café vs. citros)} = -0,71 \pm 0,19$, $P = 0,48$) (Anexo 2). Acreditamos que a similaridade da estrutura genética detectada em ambas as populações de *X. fastidiosa* são resultantes da biologia comum do patógeno e do ciclo da doença, que inclui: (a) mecanismo muito semelhante de curto alcance no interior do pomar para a dispersão de inóculos da bactéria pelo vetor, mediada por uma multiplicidade de espécies cigarrinhas altamente infectadas (LARA; PERIOTO; FREITAS, 2007; LARANJEIRAS; BERGAMIN; AMORIM, 1998; MARRUCI; LOPES; CAVACHIOLI, 2008; REDAK et al., 2004; SILVA et al., 2007); (b) ineficiência de dispersão a longas distâncias de ambas as estirpes do patógeno pelos vetores, levando à populações geneticamente subdivididas e, muito provavelmente, à populações do patógeno geograficamente bem adaptados (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014); (c) sobreposição de agroecossistemas, de onde tanto as populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros foram amostradas (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014).

Pela primeira vez relatada para qualquer patossistema de *X. fastidiosa*, este estudo também nos deu conhecimento sobre o modo reprodutivo da bactéria associada a café. A alta fração clonal (64%) e as evidências de um forte desequilíbrio de ligação entre pares de locos apontaram para a predominância de uma estrutura clonal para todas as quatro populações de *X. fastidiosa*. Como já descrito anteriormente, *X. fastidiosa* que infectam cafeeiros

são bactérias potencialmente recombinogênicas (ALMEIDA et al., 2008; NUNNEY et al., 2012). Desta forma, o forte distanciamento do equilíbrio de ligação observado neste trabalho, provavelmente não seja devido à ausência de recombinação, mas ao efeito da mistura genética entre os genótipos, detectado pelas análises do software STRUCTURE e pela migração histórica. Uma total de 38% de “admixture” e uma alta taxa de migração histórica assimétrica foi detectada entre as populações (Figura 5 e 6). O histórico de misturas genéticas entre indivíduos de populações mais antigas, que um dia se recombinaram, poderia mascarar os efeitos de recombinações na estrutura das populações atuais (FALCONER; MACKAY, 1996). Sob uma reprodução sexual, o efeito de “admixture” pode decair após alguns ciclos (FALCONER; MACKAY, 1996). Contrariamente em populações isoladas e fortemente sub-estruturadas, como é o caso de *Xylella fastidiosa* da CVC (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014), o sistema de reprodução sexual pode ser perceptivo dentro dos limites de uma única planta. Uma alta sub-estruturação genéticas de população é conhecido por gerar um forte desequilíbrio de ligação em populações bacterianas, mesmo quando estas são altamente recombinogênicas, como *Neisseria meningitidis* (FEIL; SPRATT, 2001; FEIL, 2010). Não há muitas informações sobre este sistema em população de patógenos de plantas o que nos limita a uma discussão mais profunda sobre o modo de reprodução dos fitopatógenos.

Este estudo também nos permitiu fazer comparações entre as diferenças nos índices de diversidade genética das populações de *X. fastidiosa* infectando plantas de laranja doce e café (recentemente publicado pelo nosso grupo (COLETTA-FILHO; FRANCISCO; ALMEIDA, 2014)), reunindo dados dos dois estudos. Os índices de diversidade genética nas populações de *X. fastidiosa* infectando café (Média total - $H_{NEI} = 0,60$ e riqueza alélica = 5,82) foram maiores do que os já descritos para *X. fastidiosa* causando CVC (Média total - $H_{NEI} = 0,43$ e riqueza alélica = 2,82). Os valores de t (café vs. citros) para as diferenças nos valores de H_{NEI} ($t = 2,34 \pm 0,13$, $P = 0,038$) e riqueza alélica ($t = 7,00 \pm 0,64$, $P = 0,001$) foram significativos (Anexo 2). A alta diversidade genética é associada com populações mais antigas, estando estas em

equilíbrio entre as mutações e derivas genéticas (HAAG et al., 2005). Em contraste, a menor diversidade genética tem sido relacionada com populações mais jovens, recentemente formadas (BALLOUX, 2010; HAAG et al., 2005).

Historicamente, o cultivo de café se tornou significativo por volta de 1820 no estado de São Paulo, enquanto a intensificação do cultivo de citros deu-se em 1930. No entanto, a comercialização em grande escala de laranja doce (variedade suscetível a CVC) somente começou em 1960. Sob este cenário, é possível que *X. fastidiosa* tornou-se co-adaptada primeiramente às plantas de café, aumentando o seu tamanho efetivo populacional pelos quase 140 anos de diferença de cultivos das culturas, até que evoluiu para infectar laranjeiras (NUNNEY et al., 2012). Na verdade, o primeiro relato da doença CVC em citros somente aconteceu no início de 1990 (ROSSETTI et al., 1990), cerca de 30 anos após o início da grande expansão do cultivo de laranja doce na região Sudeste do Brasil. Com base nessas afirmações, acreditamos que, ao longo de quase dois séculos, as populações de *X. fastidiosa* de café podem ter acumulado uma maior diversidade genotípica e genética do que as populações que infectam laranjeiras. Como consequência dessa maior riqueza genética, populações de *X. fastidiosa* de cafeeiros têm passado por processo evolutivos a mais tempo. Patógenos com grande tamanho efetivo da população (com alta diversidade genética) são esperados que evoluam mais rapidamente sob a seleção natural e, conseqüentemente, representam um risco maior de contornar os efeitos de genes de resistência do hospedeiro (MACDONALD; LINDE, 2002).

Portanto, com base nos resultados obtidos conclui-se que, populações de *X. fastidiosa* infectando cafeeiros no Brasil são geneticamente subdividida e estruturadas geograficamente, muito semelhante ao que já foi relatado para as populações de *X. fastidiosa* que causam a CVC. No entanto, as populações de *X. fastidiosa* de café mostraram valores de diversidade genética e riqueza alélica superiores aos encontrados em populações desta bactéria em laranjeiras, típico de população evolutivamente mais antigas. Um predominate sistema reprodutivo não recombinante não pôde ser excluído de todas as quatro populações da *X. fastidiosa* associada ao café.

CONCLUSÕES

- A maior diversidade genética e riqueza alélica encontrada nas populações de *X. fastidiosa* de café possivelmente seja resultado de uma população mais antiga e que está passando por processos evolutivos a mais tempo do que as populações da bactéria em citros.
- Em decorrência das altas taxas de fração clonal e do forte desequilíbrio de ligação detectado em todas as populações de *X. fastidiosa* de café amostradas neste trabalho, foi proposto um sistema de reprodução clonal.
- Populações de *X. fastidiosa* infectando plantas de café são altamente subdividida e portanto, acredita-se que são populações bem adaptadas localmente competindo com genótipos invasores, mantendo assim a estruturação geográfica.
- Os altos níveis de subdivisão encontrados entre os pares de populações (com exceção das populações da região Central e Noroeste) podem ser explicados pela migração histórica assimétrica e pelos eventos de admixture detectados entre os indivíduos de *X. fastidiosa* de café analisados.
- As populações da região Central e Noroeste mostraram ser estruturadas com forte fluxo gênico e com troca de um grande número de indivíduos migrantes.

Anexo 1. Informações genéticas sobre os MLVA utilizados na genotipagem de populações de *Xylella fastidiosa* de café.

MLVA ^a	VNTR locus ^b	Sequencia dos primers (5' - 3') ^c	Unidade Repetitiva (motif)	Informações genéticas ^d	Concentração dos primers (µM)	Descrito em
1	COSSR1	F - GAAACAAGATGGCGGTTGC R - CATTAAACGGCGGCATA	(ATTGCTG) ¹⁵	Hypothetical protein	0.4	Neste trabalho
	COSSR6	F - TGCTGGCGGATAACCAAGT R - GCATCCAATCAGCCCATAACCT	(GTGATGCG) ¹⁰	Hemolysin-type calcium binding protein	0.7	Neste trabalho
	CISSR18	F - GTGCTTCCAGAAGTTGTG R - GACTGTCTCTTCGTTCCAG	(GCCAA) ¹²	Hypothetical protein	0.5	Lin et al., 2005
	CISSR45	F - ACAGACATCACCGGCATTG R - AATGTCGCTGCCAATCCAT	(CACACCGAGATGGAC) ⁸	Copper resistance protein B	0.3	Neste trabalho
	COSSR4	F - CAAGGTGACCGCTAGCCTAT R - GCTGTCAATGGGTGATGC	(CAATACAC) ¹³	Hypothetical protein	0.1	Neste trabalho
	COSSR5	F - ACACCTGACACAACAGCCACCA R - AATGGTGGGTGATGGTTTC	(CATAACAG) ⁹	Hypothetical protein	0.1	Neste trabalho
2	COSSR3	F - AAGTATTCGCTACGCTACGC R - GTGTGTTATGTGCCATTCGT	(CTGATGTG) ¹⁰	Hydroxyacylglutathione hydrolase	0.3	Neste trabalho
	CISSR42	F - ATTACGCTGATTGGCTGCAT R - GTTTCATTACGCGGAACAC	(TGTTATC) ²¹	Intergenic sequence	0.5	Neste trabalho
	OSSR19	F - GCTGTGAACTCCATCAATCC R - GCAAGTAGGGTAAATGTGAC	(CAGGATCA) ¹⁰	Adenylosuccinate lyase	0.3	Lin et al., 2005
3	GSSR6	F - TGTTCTCTTCGTTACGCCAAGC R - CGCAGCAGAGCAGCAGTG	(CTTGT) ¹²	Hypothetical protein	0.3	Lin et al., 2005
	OSSR14	F - GGCGTAACGGAGGAAACG R - ATGAACACCCGTACCTGG	(TGATCCATCCCCTGTG) ¹¹	Copper resistance protein A and protein B	0.3	Lin et al., 2005
	OSSR17	F - AGTACAGCGAACAAGGCATTG R - AGCAACCAGGACGGGAAC	(TGCCTG) ¹⁰	Hypothetical protein and cell cycle protein	0.3	Lin et al., 2005
	GSSR4	F - GCGTTACTGGCGACAAAC R - GCTCGTTCCTGACCTGTG	(ATCC) ⁷	Intergenic sequence	0.7	Lin et al., 2005
4	GSSR12	F - TTACGCTGATTGGCTGCATTG R - GTCAAACTGCCTATAGAGCG	(TATCTGT) ²⁰	Intergenic sequence	0.4	Lin et al., 2005

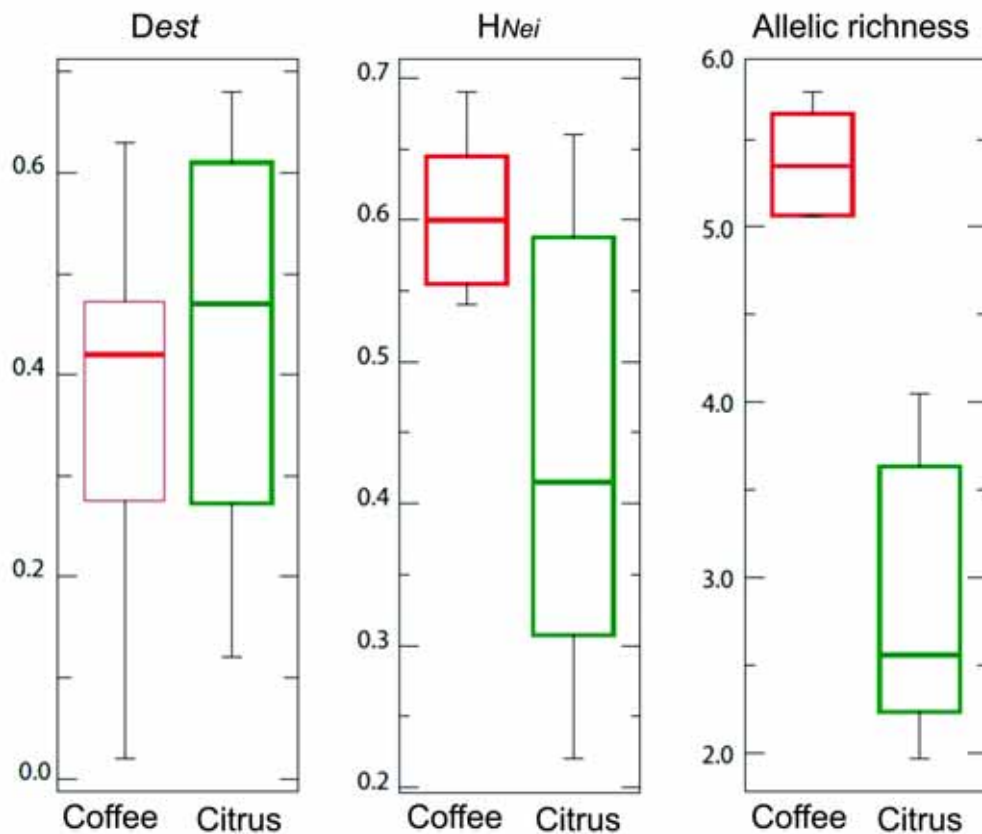
^a Multi Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

^b Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) loci. COSSR, CISSR, OSSR, GSSR = regiões de microsátélites baseados em estirpes de *X. fastidiosa* de café, citros, oleandro e videiras, respectivamente.

^c Para cada VNTR diferentes fluoróforos (6FAM, NED, PET e VIC) foram usados como marcação nos primers direto (forward).

^d Gene ou região em que o loco de VNTR está localizado, baseado no genoma da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* de citros.

Anexo 2. Teste *t* estatístico comparando índices de diversidade genética de populações de *Xylella fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros. Eixos Y são os valores dos índices e eixo X são a origem dos isolados (café - esquerda / laranja doce - direita). Os valores de laranja doce foram obtidos a partir do trabalho de Coletta-Filho et al. (2014), e os de café são deste trabalho. As barras indicam as estimativas Bayesianas inferido das taxas de migração de 95% da distribuição posterior.



REFERENCIAS

AGAPOW, P. M., BURT, A. Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 101-102, 2001.

ALMEIDA, R. P. P., NASCIMENTO, F. E., CHAU, J., PRADO, S. S., TSAI, C. W., LOPES, S. A., LOPES, J. R. S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3690-3701, 2008.

AMANIFAR, N., TAGHAVI, M., IZADPANA, K., BABAEI, G. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, 2014.

BALLOUX, F. Demographic influences on bacterial population structure. In Robinson D. A., Falush D., Feil E. J. (Ed). **Bacterial Population Genetics in Infectious Disease**, 1st ed. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey, NJ, 2010. p. 103-120.

BEERLI, P., FELSENTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population size in n subpopulation by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 98, n. 8, p. 4563-4568, 2001.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Oxford University Press Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 573-580, 1999.

BOVÉ, J. M., AYRES, A. J. Etiology of three recent disease of citrus in São Paulo: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. **IUBMB Life**, v. 59, p. 346-354, 2007.

CARLUCCI, A., LOPES, F., MARCHI, G., MUGNAI, L., SURICO, G. Has *Xylella fastidiosa* "chosen" olive trees to establish in the Mediterranean basin? **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, p. 541-544, 2013.

COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3731-3736, 2002.

COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. **Phytopathology**, v. 93, p. 28-34, 2003.

COLETTA-FILHO, H. D., BITTLESTON, L. S., ALMEIDA, R. P. P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2596-2601, 2011.

COLETTA-FILHO, H. D., FRANCISCO, C. S., ALMEIDA, R. P. P. Temporal and spatial scaling of the genetic structure of a vector-borne plant pathogen. **Phytopathology**, v. 104, n. 2 p. 120-125, 2014.

DA SILVA, V. S., SHIDA, C.S., RODRIGUES, F. B., RIBEIRO, D. C., de SOUZA, A. A., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A., NUNES, L. R., de OLIVEIRA, R. C. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. **BMC Genomics**, v. 8, p. 474, 2007.

DE LIMA, J. E. O., MIRANDA, V. S., HARTUNG, J. S., BRLANSKY, R. H., COUTINHO, A., ROBERTO, S. R., CARLOS, E. F. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v. 82, p. 94-97, 1998.

EVANNO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FALCONER, D. S., MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**, 4th ed. London, Prentice Hall, 1996.

FEIL, E. J., SPRATT, B. G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 561-590, 2001.

FEIL, E. J. Linkage, selection, and clonal complex. In Robinson D. A., Falush D., Feil E. J. (Ed). **Bacterial Population Genetics in Infectious Disease**, 1st ed. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New Jersey, NJ, 2010. p. 19-35.

GERLACH, G., JUETERBOCK, A., KRAEMER, P., DEPPERMAN, J., HARMAND, P. Calculation of population differentiation based on G_{ST} and D: forget G_{ST} but not all of statistics! **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3845-3852, 2010.

GLAUBITZ, J. C. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 309-310, 2004.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRUNWALD, N. J., GOODWIN, S. B., MILGROOM, M. G., FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, v. 93, n. 6, p. 738-746, 2003.

HAAG, C. R., RIEK, M., HOTTINGER, J. W., PAJUNEN, V. I., EBERT, D. Genetic diversity and genetic differentiation in *Daphnia* metapopulations with subpopulations of known age. **Genetics**, v. 170, p. 1809-1820, 2005.

HE, F., HU, S. X. Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the Simpson diversity index. **Ecology Letters**, v. 8, p. 386-390, 2005.

HILL, B. L., PURCELL, A. H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v. 85, p. 209-212, 1995.

HOPKINS, D. L., PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, p. 1056-1066, 2002.

HUBISZ, M. J., FALUSH, D., STEPHENS, M., PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Genetics**, v. 9, p. 1322-1332, 2009.

JOST, L. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4015-4026, 2008.

KEESING, F., HOLT, R. D., OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecology Letters**, v. 9, p. 485-498, 2006.

LARA, R. I. R., PERIOTO, N. W., DE FREITAS, S. Amostragem de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) através de armadilhas de Moericke em cafeeiro arábica. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**, v. 74, p. 239-244, 2007.

LARANJEIRA, F. F., BERGAMIN, A., AMORIM, L. Dynamics and structure of citrus variegated chlorosis (CVC) foci. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 36-41, 1998.

LI, W. B., PRIA Jr, W. D., TEIXEIRA, D. C., MIRANDA, V. S., AYRES, A. J., FRANCO, C. F., COSTA, M. G. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* form citrus. **Plant Disease**, v. 85, p. 501-05, 2001.

LIN, H., CIVEROLO, E. L., HU, R., BARROS, S., FRANCIS, M., WALKER, M. A. Multilocus simple sequence repeat markers for differentiating strains and evaluating genetic diversity of *Xylella fastidiosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4888-4892, 2005.

LOPES, S. A., MARCUSSI, S., TORRES, S. C. Z., SOUZA, V., FAGAN, C., FRANÇA, S. C., FERNANDES, N. G., LOPES, J. R. S. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 87, p. 544-549, 2003.

MANLY, B. F. J. **Randomization and Monte Carlo methods in biology**. London, Chapman & Hall, 1991.

MARRUCI, R. C., LOPES, J. R. S., CAVACHIOLI, R. R. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1114-1121, 2008.

MCDONALD, B. A., LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MEIRMANS, P. G., VAN TIENDEREN, P. H. GenoType and GenoDive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 792-794, 2004.

MISANVAGE, 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**, v. 84, p. 446-461, 1994.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 538-590, 1978.

NUNES, L. R., ROSATO, Y. B., MUTO, N. H., YANAI, G. M., DA SILVA, V. S., LEITE, D. B., GONÇALVES, E. R., DE SOUZA, A. A., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A., LOPES, S. A., DE OLIVEIRA, R. C. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, v. 13, p. 570-578, 2003.

NUNNEY, L., YUAN, X., BROMLEY, R. E., STOUTHAMER, R. Detecting Genetic Introgression: High Levels of Intersubspecific Recombination Found in *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4702-4714, 2012.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PURCELL, A. H., SAUNDERS, S. R. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, v. 83, p. 825-830, 1999.

QIN, X., MIRANDA, V. S., MACHADO, M. A., LEMOS, E. G. M., HARTUNG, J. S. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 91, p. 599-605, 2001.

RANDALL, J. J., GOLDBERG, N. P., KEMP, J. D., RADIONENKO, M., FRENCH, J. M., OLSEN, M. W., HANSON, S. F. Genetics analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the Southwestern United State. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5631-5638, 2009.

REDAK, R. A., PURCELL, A. H., LOPES, J. R. S., BLUA, M.J., MIZELL, R. F., ANDERSEN, P. C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 243-270, 2004.

ROCHA, J. G., ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., DO VALE, F. X. R., JUNIOR, W. C. J., FILHO, A. B. Quantification of yield loss due to coffee leaf scorch. **Crop Protection**, v. 29, n. 10, p. 1100-1104, 2010.

ROSATO, Y. B., NETO, J. R., MIRANDA, V. S., CARLOS, E. F., MANFIO, G. P. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. **System Applied Microbiology**, v. 21, p. 593-598, 1998.

ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J. M., BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R. R., QUAGGIO, J. A., DE NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégué, une nouvelle maladie des agrumes au Bresil. **Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie**, v. 30, p. 345-349, 1990.

SCHAAD, N. W., LACY, P. E. G., FATMI, M., CHANG, C. J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. piercei, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. multiplex subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. pauca subsp. nov. **System Applied Microbiology**, v. 27, p. 290-300, 2004.

SCHUENZEL, E. L., SCALLY, M., STOUTHAMER, R., NUNNEY, L. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3832-3839, 2005.

SCORTICHINI, M. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. **Journal of Plant Pathology**, v. 87, p. 5-12, 2005.

SILVA, M. R. L., MENEGUIM, A. M., PAIÃO, F. G., MENEGUIM, L., CANTERI, M. G., LEITE JR, R. P. Infectividade Natural por *Xylella fastidiosa* Wells et al. de Cicadelineos (Hemiptera: Cicadellidae) de Lavouras Cafeeiras do Paraná. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 274-281, 2007.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.

SMITH, M. J., SMITH, N. H., O'ROURKE, M., SPRATT, B. G. How clonal are bacteria? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 4384-4388, 1993.

STODDART, J. A., TAYLOR, J. F. Genotype diversity: Estimation and prediction in samples. **Genetics**, v. 118, p. 705-711, 1988.

TAKATSU, A., SANTOS, M. R., MALUF, R. C. *Xylella fastidiosa* do cafeeiro no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: Proceedings of the 2th Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2001, Vitória, Espírito Santos. **Resumos...** Sistema Brasileiro de Informação do Café, Brasília, DF, Brazil, 2001. p. 1234-1241.

UNETERGRASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., ROZEN, S. G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, pe. 115, 2012.

WELLS, J. M., RAJU, B. C., NYLAND, G., LOWE, S. W. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 357-363, 1981.

WICKERT, E., MACHADO, M. A., LEMOS, E. G. M. Evaluation of genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from citrus and coffee hosts by single-nucleotide polymorphism markers. **Phytopathology**, v. 97, p. 1543-1549, 2007.

WOOLHOUSE, M. E. J., TAYLOR, L. H., HAYDON, D. T. Population biology of multihost pathogens. **Science**, v. 292, p. 1109-1112, 2001.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1949.

ZHAN, J., PETTWAY, R. E., MCDONALD, B. A. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 286-297, 2003.

CAPÍTULO 3 – Eficiência de infecção e colonização de estirpes de *Xylella fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros em inoculações recíprocas

RESUMO - A pouco mais de uma década a bactéria *Xylella fastidiosa* passou de um organismo pouco conhecido a uns dos mais conhecidos, ao menos em termos de genômica. Muito se tem avançado no conhecimento molecular desta bactéria. Por outro lado, o acúmulo de conhecimento sobre a ecologia desta bactéria multi hospedeira, cuja disseminação se dá por um vetor polífago, tem sido limitado. No Brasil esta bactéria afeta culturas de importância econômica como citros, onde causa a Clorose Variegada dos Citros (CVC). A bactéria também ocorre em cafeeiros, causando a Requeima do Café (RC), também conhecida como Atrofia do Ramo do Cafeeiro (ARC), além de infectar ameixeiras. Como ambas as culturas (laranjeiras e cafeeiros) são afetadas pela *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, ainda são incertas as informações se o isolado que causa a CVC pode colonizar café e causar doença e vice versa. A principal razão para estas incertezas, segundo apontado pelos trabalhos já publicados, foi o baixo número de isolados utilizados nos ensaios, assim como as discrepâncias nas concentrações dos inóculos utilizados naqueles trabalhos. A ocorrência de inoculações recíprocas, sob condições naturais, entre plantas de laranja doce e de café cultivadas proximamente é a hipótese H_0 que será testada neste trabalho. A hipótese alternativa, H_1 , é que inoculações recíprocas destes isolados nos hospedeiros testes terão sucesso, em condições controladas, somente quando suspensões de altas concentrações bacterianas forem usadas nos experimentos. Coleções de isolados de *X. fastidiosa* com ocorrência em cultivos próximos de laranja doce e café na região Central do estado de São Paulo foram estabelecidas em meio axênico. Após analisadas por meio de marcadores moleculares de microsatélite, agrupamentos genéticos (*clusters*) foram estabelecidos e estirpes representantes destes clusters foram usadas em ensaios de inoculações recíprocas, em condições de casa de vegetação. Verificamos que somente a maior concentração de inóculo resultou em plantas infectadas com *X. fastidiosa*. As inoculações recíprocas mostraram que estirpes de *X. fastidiosa* isoladas de laranjeiras colonizam cafeeiros, porém o inverso não é válido. Acreditamos que a não colonização de laranjeiras por estirpes de cafeeiros estaria então, associado a uma dificuldade natural de colonização desse hospedeiro e pelo pouco tempo de coevolução entre o patógeno e o hospedeiro.

Palavras chaves: inoculações recíprocas, clorose variegada dos citros, atrofia do ramo do cafeeiro, coleções de isolados, estudo de população.

INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram-negativa, obrigatoriamente aeróbia, com formato de bastonetes com 0,25 a 0,35 µm de largura por 0,9 a 3,5 µm de comprimento, apresentando parede celular enrugada, com crescimento ótimo entre 26°C a 28°C, em pH entre 6,5 a 6,9 e fastidioso em meios de cultura (WELLS et al., 1987). A bactéria é limitada aos vasos do xilema das plantas, sendo capaz de colonizar um grande número de plantas cultivadas, ornamentais e silvestres, podendo ou não ocasionar sintomas nestas (WELLS et al., 1987; DE NEGRI; GARCIA JUNIOR, 1993; HARTUNG; BERETTA; BRLANSKY, 1994; NEWMAN et al., 2004). Os mecanismos de virulência ainda não são totalmente entendidos, mas sabe-se que a obstrução dos vasos de xilema pelos agregados da bactéria diminui a disponibilidade de água e nutrientes para as partes aéreas da planta, levando ao aparecimento de sintomas (HOPKINS; PURCELL, 2002).

No Brasil são conhecidas três doenças causadas pela bactéria *X. fastidiosa*: a escaldadura da folha da ameixeira (EFA) (KITAJIMA et al., 1975), que tem sido o principal entrave para o desenvolvimento da cultura, limitando ou inviabilizando o cultivo em diversas áreas do país (DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008); a clorose variegada dos citros (CVC) (ROSSETTI et al., 1990), que tem comprometido a produção de laranja doce no estado de São Paulo desde sua descoberta, causando enormes prejuízos econômicos (BOVÉ; AYRES, 2007) para os citricultores e, a atrofia do ramo do cafeeiro (ARC) (LIMA et al., 1998) ou também conhecida como requeima da folha do cafeeiro (RFC) (PARADELA-FILHO et al., 1995), que está presente em todas as regiões produtoras de café do Brasil (LIMA et al., 1996; PARADELA-FILHO; SUGIMORI, 1997; TAKATSU; SANTOS, 2001; LEITE JÚNIOR, 2002; UENO; UESUGI, 2002; BARBOSA, 2003).

A transmissão de *X. fastidiosa* se dá por meio de material vegetal contaminado como mudas e borbulhas e naturalmente por meio de cigarrinhas infectadas (Hemiptera: Cicadellidae). Cigarrinhas são insetos polípagos e, portanto, se alimentam de uma ampla gama de plantas, sendo atraídas principalmente pelo fluxo vegetativo das plantas. Plantas de café e laranja doce são hospedeiros comuns

de espécies de cigarrinhas transmissoras de *X. fastidiosa*. De acordo com Marrucci et al. (2008), as espécies dos reinos Cicadellini [*Bucephalagonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* Young], Proconiini [*Homalodisca ignorata* Melichar e *Oncometopia facialis* (Signoret)] são hábeis em transmitir *X. fastidiosa* para ambas as espécies vegetais em condições controladas. Em campo, levantamentos amostrais mostraram que estas espécies são regularmente encontradas em cafeeiros (LARA; PERIOTO; DE FREITAS, 2007) e em laranjeiras (YAMAMOTO et al., 2000, MENEGATTI; GARCIA; SAVARIS, 2008). Portanto, cafeeiros poderiam ser fonte de infecções primárias para laranjeiras ou vice-versa, o que também levaria a necessidade do controle de cigarrinhas em cafeeiros, uma vez que o manejo de cigarrinhas em citros já é difundido entre os citricultores.

Ao que se conhece em termos quantitativos, é em laranjeiras que a *X. fastidiosa* acarreta os maiores danos econômicos no Brasil, na ordem de 100 milhões de dólares anuais, na forma de replantio, poda de plantas infectadas, controle do vetor e perda de produtividade (BOVÉ; AYRES, 2007). Muito embora o setor tenha convivido com a CVC desde o seu surgimento, dentro do estado de São Paulo, a doença tem ganhado intensidade em áreas, estando presente em aproximadamente 35% dos talhões no estado de São Paulo (BOVÉ; AYRES, 2007). Em relação às plantas de café, pouco se sabe sobre os danos econômicos causados por *X. fastidiosa* nesta cultura. Rocha et al. (2010) verificaram que a cada 1% de aumento na severidade da doença há perdas de rendimento de 1,22 a 1,34 sacos de 60kg por hectare. Os mesmos autores também identificaram que, níveis de severidade acima de 12% no talhão, há necessidade de intervenções de práticas agrícolas como poda drástica, adubação e controle mais eficiente do inseto vetor. A ausência de investigação dos danos econômicos da ARC ou RFC, muito provavelmente seja pelo fato de que, por muitos anos, os sintomas causados por esta doença foram confundidos com deficiências nutricionais, estresse hídrico, infecção por nematóides e outras doenças (LI et al., 2001).

Em condições de campo muito pouco se conhece sobre a ecologia de *X. fastidiosa* associada a estas duas doenças. Dos trabalhos conduzidos em condições laboratoriais ou em casa de vegetação sabe-se que: (i) *X. fastidiosa* causadora da CVC e da ARC são geneticamente próximas e pertencem à subespécie *pauca*

(SCHAAD et al., 2004; YUAN et al., 2010); (ii) A diversidade genética encontrada em *X. fastidiosa* da ARC foi maior que a da CVC (ALMEIDA et al., 2008); (iii) *X. fastidiosa* da ARC e da CVC são transmitidas pelas mesmas espécies de cigarrinhas que são encontradas indistintamente tanto em laranjeiras como em cafeeiros (MARRUCCI et al., 2008); (iv) Foram realizados alguns trabalhos de inoculações cruzadas (recíprocas) utilizando-se de apenas algumas estirpes de *X. fastidiosa* de cafeeiros e laranjeiras. Em relação aos trabalhos de inoculações cruzadas, partindo-se de altas concentrações de inóculo (10^8 - 10^9 UFC/mL com 20 inoculação por planta teste) Li et al. (2001) mostraram que *X. fastidiosa* de laranjeira foi capaz em infectar e induzir sintomas em cafeeiro semelhantes aos produzidos por isolados de café. Neste trabalho, os autores não testaram o oposto, ou seja, plantas de laranja doce sendo inoculadas com estirpes de café. Ainda utilizando-se de altas concentrações de inóculo (5 μ L da suspensão bacteriana a 10^9 UFC/mL), porém menores que as utilizadas por Li et al. (2001), Prado et al. (2008) também observaram *X. fastidiosa* da CVC colonizando cafeeiros, embora sem a presença de sintomas. Eles verificaram que essa infecção ocorre apenas temporariamente, atingindo populações muito baixas ou mesmo não sendo recuperáveis doze meses após as inoculações, sugerindo uma baixa sobrevivência neste hospedeiro após as infecções primárias. Almeida et al. (2008) também utilizando altas concentrações de inóculo (7 μ L da suspensão bacteriana a 10^7 UFC/mL), mais uma vez mostraram que *X. fastidiosa* de laranja doce coloniza cafeeiros, porém também sem a presença de sintomas. Nestes dois últimos trabalhos foram relatados que *X. fastidiosa* de café não coloniza laranjeiras. Para condução dos testes biológicos envolvendo inoculações recíprocas, cada autor utilizou estirpes distintas de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros, com poucos ou somente um isolado representativo de cada propriedade amostrada. Fica evidente que o conhecimento da biologia e ecologia de *X. fastidiosa* em ambos os hospedeiros ainda é extremamente limitado. Populações de *X. fastidiosa* da CVC e ARC isoladas de plantas cultivadas proximamente e, utilizadas em experimentos de inoculações recíprocas em condições controladas, é uma estratégia interessante para estudos da biologia destes dois patossistemas, principalmente utilizando-se de isolados representativos de grupos geneticamente definidos.

Buscando avançar no conhecimento destes dois patossistemas e visando elucidar a ocorrência de inoculações recíprocas entre ambos hospedeiros, este trabalho teve como objetivo isolar um número significativo de estirpes de *X. fastidiosa* causadores da CVC e ARC de cultivos próximos de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica*, numa mesma propriedade agrícola, caracterizá-los molecularmente por meio de marcadores de microssatélites e então, avaliar a capacidade de infecção de grupos de isolados geneticamente distintos através de inoculações recíprocas em plantas de laranja doce e café.

OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram: a) estabelecer um número significativo de isolados de *Xylella fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros cultivados proximamente no estado de São Paulo; b) estabelecer estes isolados em condições criogênicas; c) analisar estas populações por meio de marcadores de microssatélite; d) selecionar haplótipos hospedeiros comuns e específicos entre os isolados de laranjeiras e cafeeiros; e) realizar ensaios de inoculações recíprocas com haplótipos selecionados envolvendo plantas de laranja doce e café; f) acompanhar a taxa de infecção e colonização por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Neste estudo duas hipóteses foram testadas: (i) laranjeiras e cafeeiros cultivados proximamente hospedam estirpes comuns de *X. fastidiosa* que podem estar sendo transmitidas naturalmente e reciprocamente pelos vetores; (ii) inoculação recíproca de *X. fastidiosa* da CVC e da ARC está relacionada à concentração de bactéria inoculada. Para investigar essas hipóteses foi conduzido isolamento de *X. fastidiosa* de várias plantas de laranjas doce e de café cultivadas em uma mesma propriedade agrícola. Após obtenção dos isolados, estes foram genotipados usando marcadores microssatélites, visando identificar haplótipos hospedeiros comuns e específicos de *X. fastidiosa* e então condução dos ensaios de inoculações recíprocas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem, isolamento de *Xylella fastidiosa* e extração de DNA da bactéria. Foi selecionada uma unidade de produção agrícola (UPA) no estado de São Paulo, na região Central - cidade de Tabatinga. Diversas UPAs ao longo do estado têm a citricultura e a cafeicultura como atividades agrícolas sendo conduzidas proximamente. A região Central do estado de São Paulo é uma das regiões citrícolas com maior incidência de CVC (disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cvc/9>). Esta UPA especificamente foi escolhida pelo fato de possuir cultivos econômicos de laranja e café, sendo que as laranjeiras apresentavam-se, em sua maioria, infectadas por *Xylella fastidiosa*. Materiais vegetais de plantas exibindo sintomas característicos de infecção por *X. fastidiosa* em laranjeiras (ROSSETI et al., 1990; DE SOUZA et al., 2009) (Figura 1) e cafeeiros (PARADELA-FILHO et al., 1995; LIMA et al., 1998; QUEIROZ-VOLTAN et al., 1998) (Figura 2) foram coletados, totalizando 15 plantas de laranja doce e 17 plantas de café (Tabela 1). Para o isolamento utilizou pecíolos das folhas e ramos, ambos sintomáticos, cujas superfícies foram desinfetadas em hipoclorito de sódio (2% / 2 min), álcool (70% / 2 min), seguido de três lavagens em água esterilizada. O material desinfetado foi macerado em tampão PBS e diluído serialmente até 10^{-4} , sendo 80 µl da última diluição plaqueado em meio sólido BCYE (WELLS et al., 1981) e mantidas a 28 °C durante pelo menos 15 dias. Colônias isoladas foram repicadas três vezes em intervalos de aproximadamente 20 dias em placas de meio PWG (HILL; PURCELL, 1995) para certificação da não existência de contaminantes. Na última repicagem, uma fração de células foi armazenada a -80 °C em meio líquido PWG adicionado de 40% de glicerol e a outra parte destinada a extração de DNA. Um total de 226 isolados de *X. fastidiosa* foram obtidos, sendo 99 de laranjeiras e 127 de cafeeiros (Tabela 1). Para extração de DNA dos isolados bacterianos, utilizou-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI), seguindo as instruções contidas no manual do fabricante.



Figura 1: Sintomas relacionados à presença de *Xylella fastidiosa* em plantas de laranja doce. A e B = pontos cloróticos característicos de infecção por *X. fastidiosa* em folhas de laranjeiras (setas indicativas); C = fruto assintomático (esquerda) e frutos sintomáticos com tamanho reduzido (direita), conhecido popularmente como 'frutos coquinhos'.

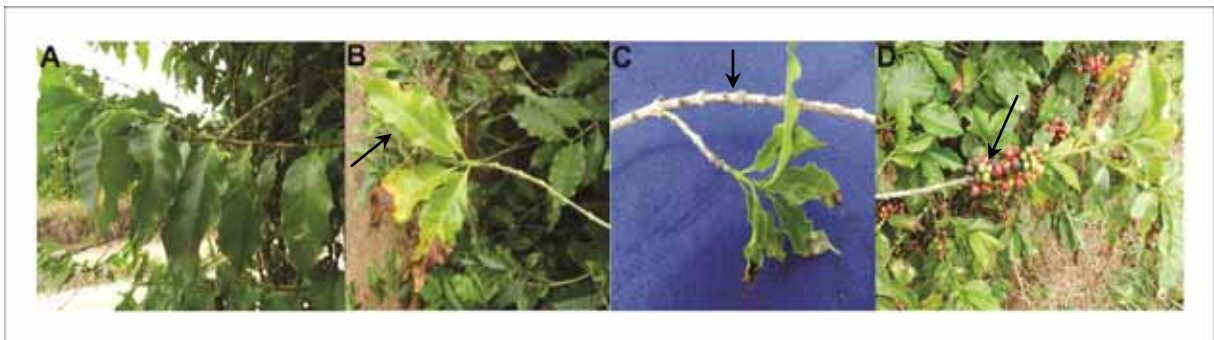


Figura 2. Sintomas relacionados à presença de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. A = ramo assintomático, B e C = folhas dispostas somente na extremidade apical com formato lanceolado (setas indicativas) e exibindo encurtamento de internódios (setas indicativas); D = fruto do cafeeiro de tamanho reduzido, característicos em plantas infectadas por *X. fastidiosa*.

Tabela 1. Populações de *Xylella fastidiosa* infectando laranjeiras e cafeeiros na região Central do estado de São Paulo e usadas neste estudo.

Cidade	Região geográfica	Coordenada geográfica	Hospedeiros	Número de plantas	Média de isolados por planta	Total de isolados
Tabatinga	Central	-21°39'55.3" S 48°35'16.1" W	Laranja doce	15	7	99
			cv. Valencia Cafeeiro cv. Mundo Novo	17	7	127
Total				32	7	226

Novos VNTR locos e amplificação dos microssatélites. Sete marcadores de microssatélite (*Variable Number Tandem Repeat* – VNTR locos) descritos por Lin et al. (2005) e outros sete novos VNTR locos, desenvolvidos neste trabalho, foram utilizados para genotipagem das populações de *Xylella fastidiosa* (vide Anexo 1 no Capítulo 2). As novas regiões de microssatélite no genoma de *X. fastidiosa* foram selecionadas através do software *Tandem Repeat Finder* versão 2.02 (BENSON, 1999), utilizando o genoma completo da estirpe 3124 de café (dados não publicados) e da estirpe de 9a5c de citros (disponibilizado no website da UNICAMP <http://onsona.lbi.ic.unicamp.br/xf>). Os primers foram desenhados baseados nas regiões flaqueadoras das unidades repetitivas através do software Primer3 versão 0.4.0 (UNTERGRASSER et al., 2012) e testados em relação à especificidade por meio do PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es>) usando como referência o genoma da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* de citros. As amplificações foram realizadas por meio de PCR multiplex (*Multi-Locus VNTR Analysis* - MLVA) em cinco diferentes conjuntos de primers, variando de dois a quatro primers cada conjunto (Tabela 2). As amplificações multiplex foram realizadas com volume final de 13,5 µl contendo 2 µl de DNA (25 a 50 ng), 6,50 µl de DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), e concentrações variadas dos pares de primers, onde os primers diretos (forward) são marcados com fluoróforos (Tabela 2). As seguintes etapas foram utilizadas para as amplificações: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 45 seg e um ciclo final de extensão de 10 min a 72°C. A genotipagem dos fragmentos foi realizada em eletroforese de capilar sendo as reações previamente diluídas 20x (MLVA 1) e 40x (MLVA 2, 3, 4, e 5) em água Milli-Q estéril. Do produto diluído, um volume de 0,7 µl foi misturado a 10 µl Hi-Di™ Formamida juntamente com 0,1 µl de GeneScan 500-LIZ Size Standard (Life Technology, Foster City, CA), sendo em seguida denaturados à 95°C por 5 minutos. A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador ABI 3730 DNA (Life Technology) com a configuração padrão LIZ500-3730 no modulo GeneScan com conjunto de filtros G5.

Tabela 2. Informações gerais sobre MLVA utilizados na genotipagem de estirpes de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e café.

MLVA	Locus	Fluoróforo ^a	Unidade Repetitiva (motif) ^b	Varição do tamanho do fragmento (pb) ^c	Concentração primer (µM) ^d
1	COSSR1	FAM	(ATTGCTG)15	248 – 332	0.4
	COSSR6	PET	(GTGATGCG)10	280 – 504	0.7
	CSSR18	NED	(GCCAA)12	272 – 322	0.5
2	CSSR45	VIC	(CACACCCGAGATGGAC)8	267 – 417	0.3
	COSSR4	FAM	(CAATACAC)13	244 – 428	0.1
	COSSR5	VIC	(CATACAGA)9	172 – 300	0.1
3	COSSR3	FAM	(CTGATGTG)10	278 – 406	0.3
	CSSR42	PET	(TGTATC)21	287 – 392	0.5
	OSSR19	NED	(CAGGATCA)10	222 – 478	0.3
4	GSSR6	FAM	(CTTGT)12	221 – 286	0.3
	OSSR14	VIC	(TGATCCATCCCTGTG)11	237 – 387	0.3
	OSSR17	FAM	(TGCCTG)10	222 – 336	0.3
5	GSSR4	PET	(ATCC)7	395 – 419	0.7
	GSSR12	VIC	(TATCTGT)20	336 – 441	0.4

^a Em cada MLVA utilizaram-se primers diretos (forward) marcados com fluoróforos. FAM = azul; NED = amarelo; PET = vermelho; VIC = verde.

^b Os VNTRs motifs foram identificados através do software TRF (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), configurado para os parâmetros de alinhamento de match (2), mismatch (3) e indels (5).

^c Variação do tamanho do fragmento, quantificado em pares de base (pb), apresentados pelos isolados de *X. fastidiosa* de laranja doce e café.

^d Valores de concentração utilizados dos primers direto e reverso (forward e reverse).

Conteúdo informativo dos microssatélites. O tamanho dos amplicons, quantificados em pares de base – pb, forão estimados pelo software Peak Scanner (disponível em <http://www.appliedbiosystems.com>), sendo seus valores absolutos convertidos para número de unidades repetitivas baseado no '*motif*' de cada VNTR locos, de forma manual. Assim como já descrito em trabalhos anteriores com *X. fastidiosa* (COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011), neste trabalho também foi observado que as alterações nos tamanhos das unidades repetitivas foram decorrentes da inserção ou deleção de toda uma unidade repetitiva. Este é conhecido como modelo de passos mutacionais (*Stepwise Mutation Model - SMM*), e supõe que alelos que diferem em apenas algumas unidades repetitivas tem um ancestral comum mais recente do que aqueles que diferem por muitas unidades repetitivas (POKHRIYAL et al., 2012). Este modelo foi adotado para todas as análises estatísticas. Para determinação da variação no tamanho dos alelos, a média do número de unidades repetitivas, o total e média do número de alelos por loco e a identificação de alelos privados, nós utilizamos o programa CONVERT versão 1.3.1 (GLAUBITZ, 2004), que gera os dados baseado nas informações da frequência alélica.

Seleção haplótipos hospedeiros comuns e específicos entre os isolados de *Xylella fastidiosa* da CVC e ARC. Para determinação do número de subpopulações geneticamente homogêneas (K) foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) e, para identificação dos indivíduos que compõe as subpopulações foi utilizado o programa BAPS (CORANDER; WALDMANN; SILLANPAA, 2003). Ambos os programas utilizam os principio Bayesiano em suas análises. O STRUCTURE faz o uso de randomizações baseados nas simulações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (*Markov Chain Monte Carlo – MCMC*) usando o algoritmo de Gibbs enquanto que o BAPS utiliza-se do algoritmo baseado em Metropolis-Hastings, cujo requerimento computacional é cerca de 300 a 400 vezes menor. Além disso, o programa BAPS assume que as populações alvos são geneticamente estruturadas, porém essa estruturação é desconhecida em populações naturais e poderia ser uma forma limitante para o fluxo gênico. No programa BAPS 5.2 foram realizadas corridas

independentes utilizando a função “*clustering of individuals*” como recomendado por Waples e Gaggiotti (2006), com número de subpopulações (K) variando de 1 a 40, dependendo da população analisada. Uma vez identificado o melhor valor de K , nós novamente rodamos os BAPS utilizando o “Fixed- K module”, através de 1000 corridas para identificação dos indivíduos que compunha cada um dos clusters genéticos. Esse valor representa o número de vezes que os indivíduos são analisados usando simulações de diferentes frequências alélicas. No programa STRUCTURE, utilizamos o modelo “*admixture*” com valor de K variando de acordo com resultado de subpopulações do programa BAPS. Nas corridas nós adotamos um período de “*burn-in*” de 30000, seguindo-se de 300000 replicatas de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), alpha (inicial valor = 1.0, max = 10.0, SD = 0.025) e a frequência alélica correlacionada entre as subpopulações (prior mean = 1.0, prior SD = 0.05, λ = 1.0).

Inoculações recíprocas entre os isolados da CVC e ARC. Um isolado representante de cada cluster genético, estabelecido com base nas análises Bayesianas, foi selecionado para a condução dos ensaios. Além das plantas de laranja doce e café, também inoculamos plantas de tabaco como controle das inoculações, uma vez que essa planta é altamente suscetíveis à infecção por *X. fastidiosa* (LOPES et al., 2000). Outro motivo pelo qual inoculamos plantas de tabaco foi para acentuar diferenças sintomatológicas entre as plantas inoculadas com estirpes isoladas de laranjeiras e cafeeiros. As inoculações foram conduzidas em plântulas de laranja doce cv. Pêra, plantas de cafeeiro cv. Mundo Novo e em plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. Havana (Figura 3), todas obtidas de sementes. Para cada isolado selecionado, foram inoculadas cinco plantas do hospedeiro de origem (controle das inoculações) e cinco plantas do hospedeiro contrastante (inoculações recíprocas). Para tabaco, inoculamos três plantas para cada isolado selecionado. Outras cinco plantas de cada hospedeiro foram inoculadas com tampão PBS e com a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* de citros, sendo estes os controles negativos e positivos das inoculações, respectivamente. Em cada planta foi depositado 10 μ L de suspensão do inóculo contendo 10^8 UFC/mL em dois pontos distintos dos ramos e feito furos com auxílio de agulha entomológica (n° 2) para que

a suspensão fosse absorvida pela planta, conforme metodologia descrita por Almeida et al. (2001). Três isolados foram selecionados aleatoriamente e usados para inoculações com baixa concentração de inóculo (10 µL de suspensão de inóculo contendo 10⁴ UFC/mL), testando a hipótese de que infecções cruzadas ocorrem somente quando as plantas são inoculadas com alta concentração da bactéria. As plantas de tabaco foram inoculadas somente com concentração alta do inóculo.



Figura 3. Plântulas utilizadas nos ensaios de inoculação recíproca. A = plântulas de laranja doce cv. Pêra; B = plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. Havana; C = cafeeiro cv. Mundo Novo.

Avaliação da colonização nos hospedeiros. Todas as plantas inoculadas com *Xylella fastidiosa* foram avaliadas semanalmente para detecção de sintomas. Em relação às taxas de colonização, as plantas foram avaliadas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) aos 120, 210 e 300 dias após as inoculações (dai). Segundo Fry e Milholland (1990), *X. fastidiosa* causadora da doença de Pierce em videiras colonizam primeiramente folhas próximas ao ponto de inoculação. Desta forma, foram feitas extrações de DNA das folhas mais próximas a este ponto, onde as folhas foram lavadas e, com auxílio de tesoura esterilizada, retiraram-se a nervura central e o pecíolo. Aproximadamente 250 mg do material fresco (nervura foliar e pecíolo), foi triturado com auxílio do aparelho TissueLyser II (Qiagen, Venlo,

Netherlands) por 2 minutos a 30 Hz (1800 oscilações/minuto) para obtenção de um pó bem fino. O restante do protocolo de extração de DNA seguiu de acordo com a metodologia descrita por Murray e Thompson (1980). As avaliações das infecções de *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce, café e tabaco foram feitas por meio de qPCR (sistema TaqMan) utilizando-se primers e sondas descritos por Oliveira et al. (2002). Consideraram-se plantas hospedeiras de *X. fastidiosa* aquelas que, ao longo das avaliações, apresentaram sinal de fluorescência menor do que na avaliação anterior e, na última avaliação (300 dai), valor de Threshold Cycle (C_T) ≤ 31 , depois de 40 ciclos da PCR. Esse valor é a quantidade detectável do amplicon gerado durante a fase exponencial da reação. Além disso, o valor de C_T é inversamente proporcional a quantidade de DNA amplificado, ou seja, quanto mais cópias do DNA alvo, neste caso DNA de *X. fastidiosa*, menor será o valor de C_T . Além do mais, Oliveira et al. (2002) verificaram que para este conjunto de primers houve uma forte relação linear entre o valor logarítmico inicial da concentração de *X. fastidiosa* e o valor de C_T .

RESULTADOS

Análise das populações de *Xylella fastidiosa* através de marcadores VNTR. Os 14 VNTR locos analisados geraram de um a 14 alelos por loco, num total de 105 alelos (Tabela 3). Destes, 85 são alelos privativos das duas populações, sendo a população de café a que mais possui alelos privativos (n=57) (Tabela 3). De uma forma geral, populações de *X. fastidiosa* de café apresentaram maior polimorfismo nos locos analisados do que as populações de laranjeiras. Os marcadores VNTR amplificados com os primers desenhados a partir do genoma de *X. fastidiosa* de café foram mais polimórficos quando amplificando isolados obtidos deste hospedeiro, porém o mesmo não é válido para os locos VNTR amplificados com os primers desenhados com base no genoma da estirpe causadora da CVC. Para estes marcadores não houve uma diferença no número de alelos quando amplificando isolados de laranjeiras ou de cafeeiros (Tabela 3). Interessantemente, o loco OSSR19, cujos primers foram desenhados usando o genoma de *X. fastidiosa* isolada de oleandro (*Nerium oleander* – Apocynaceae) e cuja unidade repetitiva

('motif') é intragênica a *adenylosuccinate lyase*, responsável pela conversão de adenylosuccinato a monômeros de adenosina e fumarato como parte do ciclo de purina, gerou muito mais alelos nas populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras que na de cafeeiros (Tabela 3). O mesmo acontece para o loco GSSR4, porém este está localizado numa região intergênica. Já o loco OSSR17, também baseado no genoma da estirpe de *X. fastidiosa* patogênica de oleandro, gerou muito mais alelos nas populações de *X. fastidiosa* de café em comparação com as de laranjeiras. A unidade repetitiva deste loco se localiza entre uma *hypothetical protein* e *cell cycle protein* (Tabela 3). Por outro lado, os locos GSSR12 e CISSR42 vindo de *X. fastidiosa* causadora da doença de Pierce e CVC, respectivamente e, localizados em sequencias intergênica, geraram pouco polimorfismo para as populações de laranjeiras e cafeeiros (Tabela 3). Analisando a distribuição dos alelos em cada uma das populações, podemos observar uma clara distinção das populações de *X. fastidiosa* de laranja doce e café para a maioria dos locos, tendo-se como exceção os locos CISSR18, CISSR42, GSSR4, GSSR6 e GSSR12, que foram monomórficos (Figura 4).

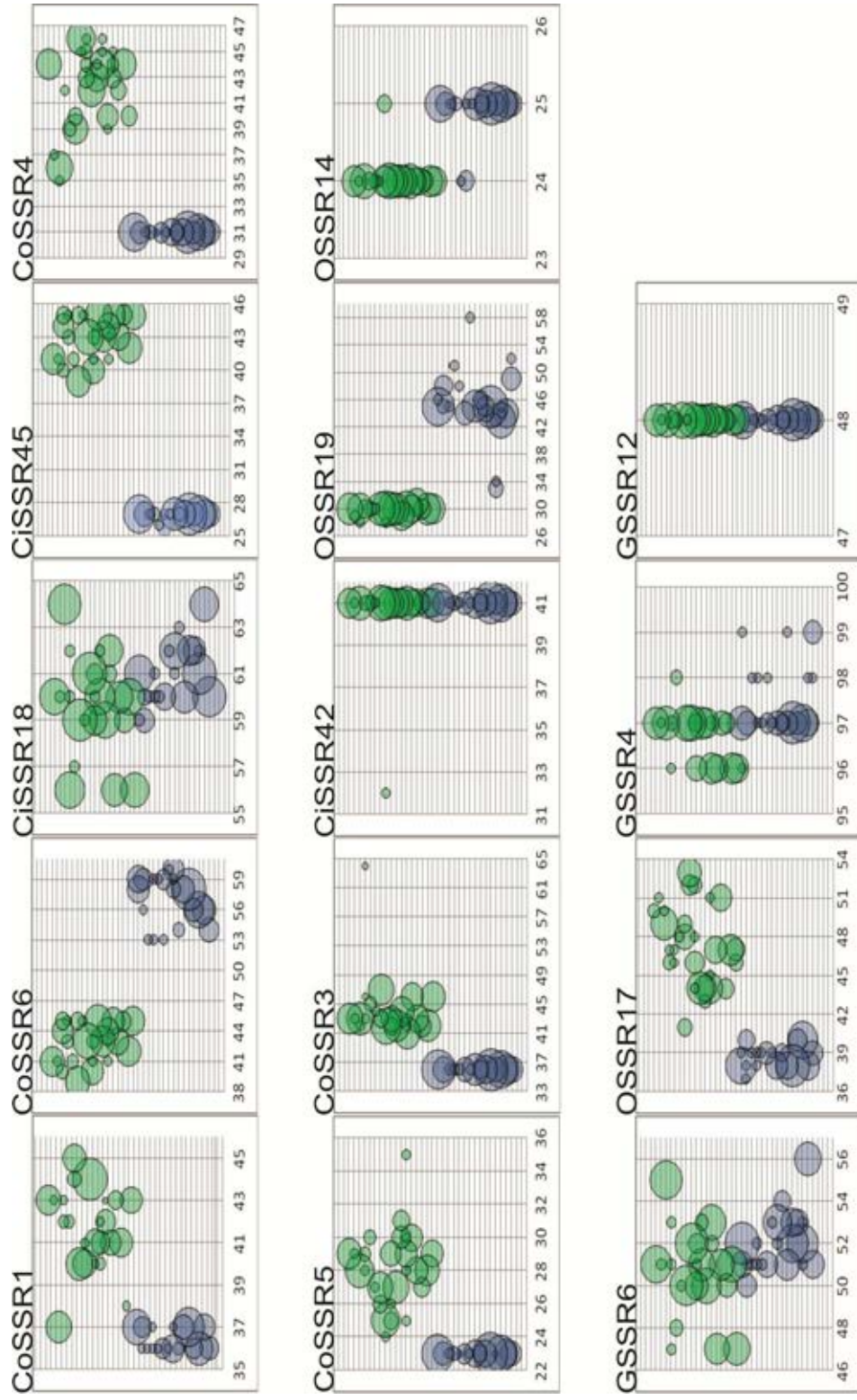


Figura 4. Distribuição das frequências alélicas de 14 marcadores VNTR locos em populações de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e café. O eixo x representa o intervalo de repetições de cada loco. O eixo y corresponde às plantas hospedeiras, sendo os círculos azuis correspondente à população de *X. fastidiosa* de laranjeiras e os verdes à população de *X. fastidiosa* de cafeeiros. O tamanho dos círculos é proporcional as frequências dos alelos em cada uma das populações.

Tabela 3. Informações sobre os alelos privativos e polimorfismo dos marcadores VNTR usados para tipificação dos isolados de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e de café.

VNTR locus ^a	Unidade Repetitiva (motif)	Informações genéticas ^b	Número total de alelos	Número de alelos por população		
				Citros	Café	Alelos Privativos
COSSR1	(ATTGCTG) ₁₅	Hypothetical protein	9	2	8	7
COSSR3	(CTGATGTG) ₁₀	Hydroxyacylglutathione hydrolase	8	1	7	7
COSSR4	(CAATACAC) ₁₃	Hypothetical protein	12	1	11	11
COSSR5	(CATACAGA) ₉	Hypothetical protein	9	1	8	8
COSSR6	(GTGATGCG) ₁₀	Hemolysin-type calcium binding protein	13	6	7	7
CISSR18	(GCCAA) ₁₂	Hypothetical protein	8	6	7	2
CISSR42	(TGTTATC) ₂₁	Intergenic sequence	1	1	1	0
CISSR45	(CACACCGAGATGGAC) ₈	Copper resistance protein B	2	2	2	0
OSSR14	(TGATCCATCCCTGTG) ₁₁	Copper resistance protein A and protein B	2	2	2	0
OSSR17	(TGCCTG) ₁₀	Hypothetical protein and cell cycle protein	14	4	10	10
OSSR19	(CAGGATCA) ₁₀	Adenylosuccinate lyase	13	10	3	3
GSSR4	(ATCC) ₇	Intergenic sequence	5	5	3	0
GSSR6	(CTTGT) ₁₂	Hypothetical protein	8	6	7	2
GSSR12	(TATCTGT) ₂₀	Intergenic sequence	1	1	1	0
			105	48	77	57

^a Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) locos. COSSR, CISSR, OSSR, GSSR = regiões de microsatélites baseados em estirpes de *X. fastidiosa* de café, laranja doce, oleandro e videiras, respectivamente.

^b Gene ou região em que o loco de VNTR está localizado, baseado no genoma da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* de citros.

Seleção dos haplótipos de *Xylella fastidiosa*. Para a seleção dos isolados usados nos estudos de inoculações recíprocas, populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros foram analisadas na busca por agrupamentos ('clusters') genéticos, onde um genótipo representante de cada cluster foi utilizado nos ensaios de inoculação recíproca. Pela análise Bayesiana utilizando o software BAPS, os 99 isolados bacterianos provenientes de 15 plantas de laranja doce agruparam-se em 14 clusters genéticos, sendo que em seis desses clusters foram observados agrupamento de isolados oriundos de diferentes plantas. Para os sete outros clusters houve a manutenção das estirpes obtidas da mesma planta fonte e um único cluster foi composto por apenas uma única estirpe (cluster vermelho) (Figura 5). Em relação à população de *X. fastidiosa* de cafeeiro, os 127 isolados provenientes de 17 plantas foram agrupados em 15 clusters genéticos (Figura 6), sendo seis desses clusters compostos por isolados de diferentes plantas, assim como ocorreu para laranjeiras. Todos os demais clusters são formados por estirpes da mesma planta fonte de onde foram isolados.

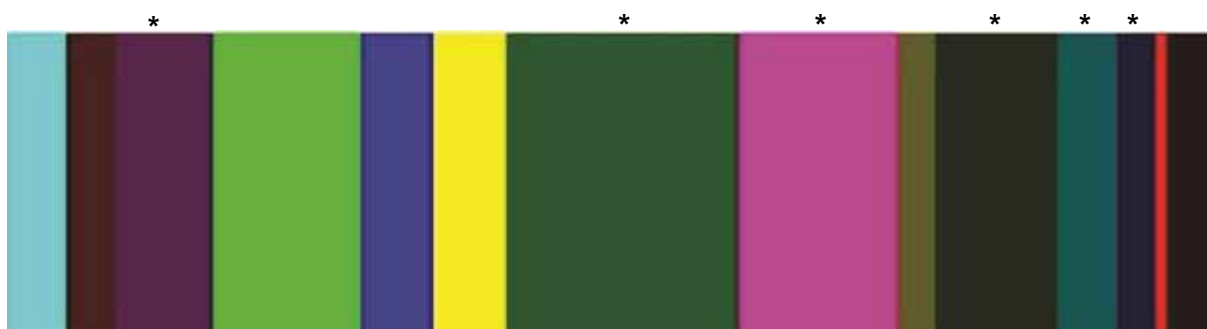


Figura 5. Resultados da análise de agrupamento genético das estirpes de *Xylella fastidiosa* isoladas de laranjas doce através do software BAPS. Cada *K* cluster genéticos (1 ao 14) é identificado com uma cor diferente. Os asteriscos identificam os clusters genéticos compostos por isolados de diferentes plantas.



Figura 6. Resultados da análise de agrupamento genético das estirpes de *X. fastidiosa* de café através do software BAPS. Cada *K* cluster (1 ao 15) é identificado com uma cor diferente. Os asteriscos identificam os clusters genéticos compostos por isolados de diferentes plantas.

Para avaliar ocorrência de eventos de mistura genética (*'admixture'*) entre os entre os isolados de *X. fastidiosa* de laranjeira e cafeeiros, ou seja, se há migração de estirpes desta bactéria entre ambas as culturas, analisou-se o conjunto de dados informando ao programa que tratava-se de somente duas grandes populações, respectivas ao hospedeiro de origem. A análise mostrou que, as 226 estirpes previamente isoladas de laranja doce e café, agruparam-se em 14 clusters genéticos. Analisando cada um dos clusters verificou-se que não há evidências de indivíduos migrantes entre as populações de laranja doce e café, sendo, portanto, duas populações distintas (Figura 7). Esta estratégia de análise reforçou ainda mais a maior diversidade genética observada em *X. fastidiosa* de café quando comparada com a de laranja doce, pois dos 14 clusters genéticos formados, 10 (71,4%) são compostos por isolados oriundos de cafeeiros (Figura 7).

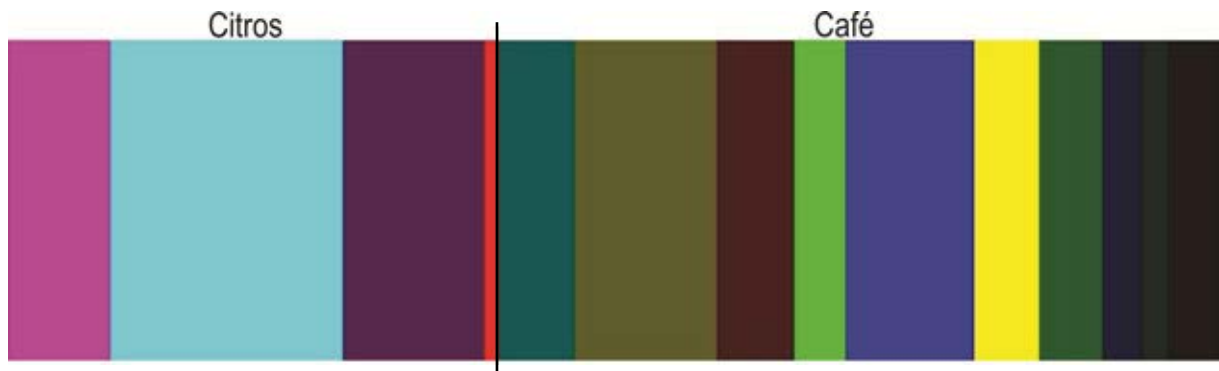


Figure 7. Resultado da análise de agrupamento genético entre as estirpes de *X. fastidiosa* de laranja doce e café através do software BAPS, mostrando que trata-se de duas populações geneticamente distintas não sendo observado qualquer indício de migração entre os indivíduos destas duas populações. Cada K cluster (1 ao 14) é identificado com uma cor diferente. A barra preta indica a separação dos clusters de laranja doce e de café.

Outro teste de “*admixture*” foi realizado através do software STRUCTURE, assumindo $K=2$ populações genéticas. Neste programa os indivíduos são atribuídos probabilisticamente as populações ou para conjuntos de duas ou mais populações, se os genótipos forem migrantes e estiverem em “*admixture*”. Com base nos valores absolutos fornecido pela análise do STRUCTURE e seguindo o que foi descrito por Evano, Regnaut e Goudet (2005), realizou-se a decomposição dos valores para verificar se $K=2$ (duas populações) era um valor real. Conforme demonstrado na Figura 9, verificou-se que realmente se trata de duas populações distintas com poucos eventos de “*admixture*” entre elas, confirmando os resultados obtidos pelo software BAPS. Potenciais eventos de “*admixture*” (estirpes migrantes) ocorrendo entre ambas às populações de *X. fastidiosa* foram observados. Cinco estirpes da população de laranja doce e três de café estão em potencial “*admixture*”, apresentando coeficiente de parentesco ‘ Q ’ de 28% e 19%, respectivamente (Figura 8). Diante desta situação, escolhemos aleatoriamente oito haplótipos de laranjeiras (Figura 5) e sete haplótipos de cafeeiros (Figura 6), cada um sendo representante de um determinado cluster genético, para serem utilizados nos ensaios de inoculações recíprocas. Em laranja doce, os clusters e isolados representativos escolhidos foram: CiC3 (cluster 3), CiC5 (cluster 5), CiC8 (cluster 8), CiC9 (cluster 9), CiC11 (cluster 11), CiC12 (cluster 12), CiC13 (cluster

13) e CiC14 (cluster14). Para café, foram: CoC1 (cluster 1), CoC7 (cluster 7), CoC10 (cluster 10), CoC11 (cluster 11), CoC13 (cluster 13), CoC14 (cluster 14) e CoC15 (cluster 15).

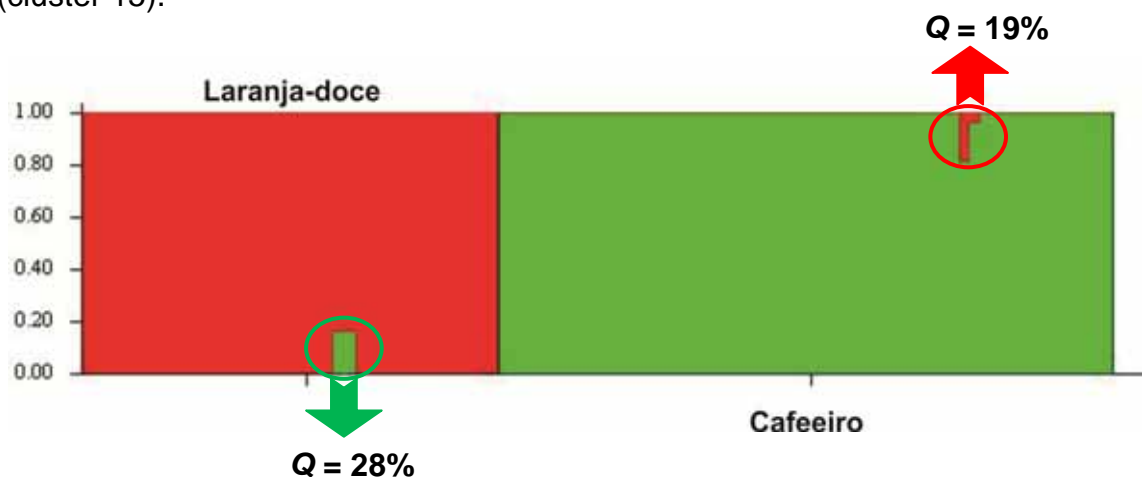


Figura 8. Análise através do software STRUCTURE inferindo o coeficiente de parentesco ('Q') de multilocus dos VNTR para os genótipos de *Xylella fastidiosa* isolados de laranjeiras e cafeeiros da região Central (Tabatinga) do estado de São Paulo. Cada cor representa o ancestral mais provável do qual o genótipo (total ou parcial) foi derivado. Múltiplas cores indicam genótipos em "admixture" a partir das populações pré-definidas. Os comprimentos das barras indicam o coeficiente de parentesco ('Q').

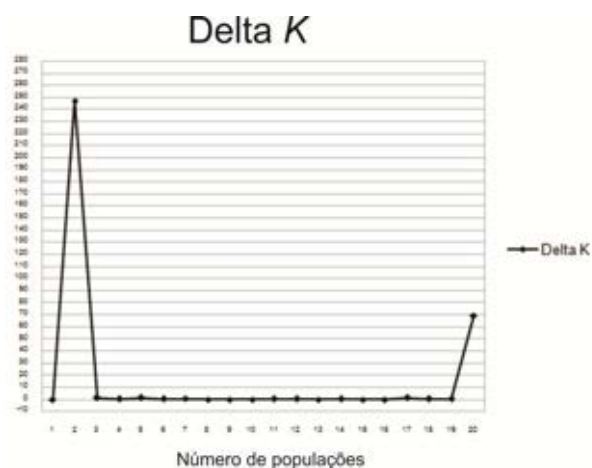


Figura 9: Valores de K clusters e média dos valores de verossimilhança ($L(K)$) determinados a partir de uma corrida pelo software STRUCTURE, indicam que $K = 2$, baseado nos valores de ΔK , de acordo com o proposto por Evanno et al. (2005).

Testes de inoculações recíprocas e colonização. Neste estudo, todas as plantas inoculadas com baixas concentrações de inóculo (10^4 UFC/mL), não foram colonizadas por *X. fastidiosa*. Desta forma, a hipótese de que infecções recíprocas ocorrem somente quando as plantas são inoculadas com alta concentração da bactéria, não foi rejeitada. Prado et al. (2008) também verificaram que, para se obter altas taxas de infecção em plantas de laranja doce e café, é necessário inoculá-las com altas concentrações de *X. fastidiosa*. A maior concentração de inóculo (10^8 - 10^9 UFC/mL) foi a que resultou em maiores proporções de plantas infectadas tanto para as inoculações homólogas (estirpes isoladas de um hospedeiro infectando seedlings do mesmo hospedeiro), quanto heterólogas (estirpe isolada de uma espécie de hospedeiro e inoculada em outra). Neste último caso não houve sucesso de inoculação quando estirpes da ARC foram utilizadas para infectar laranjeiras. As plantas foram avaliadas quanto à presença da bactéria através PCR quantitativo (qPCR) aos 120, 210 e 300 dias após as inoculações – dai.

Para as inoculações homólogas (estirpes isoladas de um hospedeiro infectando seedlings do mesmo hospedeiro), obtiveram-se números próximos de plantas infectadas para ambos os hospedeiros. Em cafeeiro, após 300 dai, somente o haplótipo CoC15 foi eficaz na colonização de plantas do próprio hospedeiro (Figura 10A). Em laranjeiras, dois haplótipos (CiC3 e CiC14) foram hábeis em infectar com sucesso plantas de laranja doce (Figura 10B). Assim como para cafeeiro, somente uma baixa porcentagem das laranjeiras foram colonizadas pela bactéria da CVC (7,5%). Sintomas característicos de CVC e ARC não foram visualizados em nenhuma das plantas até a avaliação aos 300 dai.

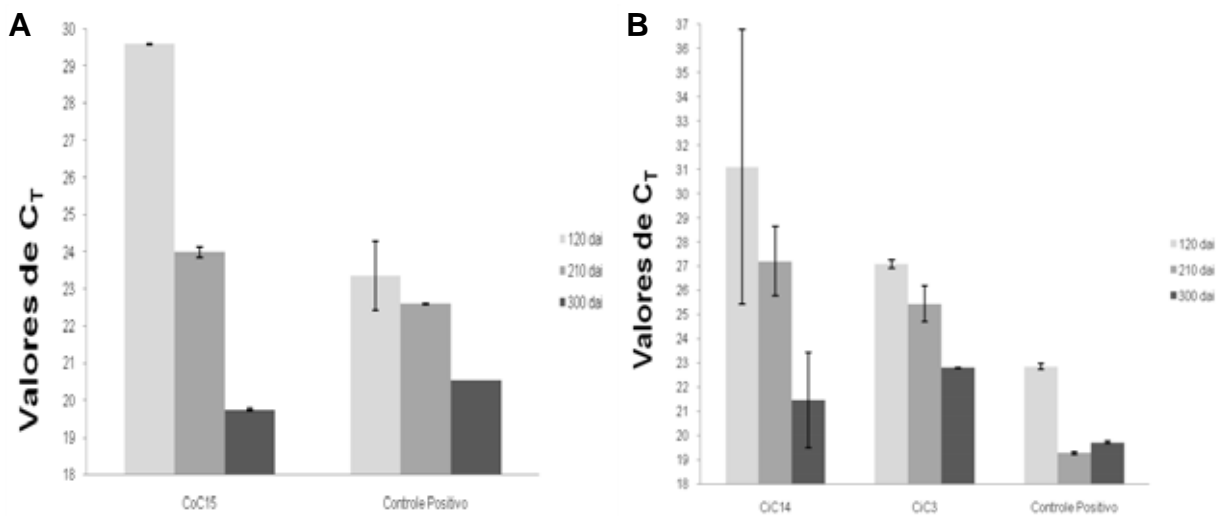


Figura 10. Valores de C_T mostrando infecções de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro - Co (A) e laranjeira - Ci (B) com estirpes homólogas a ambos hospedeiros. Controle positivo equivale ao DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* utilizados como controle de amplificação das reações de qPCR. As barras são os desvios padrões da média dos valores de C_T das plantas consideradas positivas.

Para as inoculações heterólogas (estirpes de *X. fastidiosa* obtida de laranjeiras com CVC inoculadas em cafeeiro e estirpes obtidas de cafeeiro inoculadas em laranjeiras), somente as estirpes de *X. fastidiosa* da CVC inoculadas em cafeeiro evoluíram em colonização do hospedeiro. Aos 300 dai, os haplótipos CiC5, CiC8, CiC9, CiC12 e CiC13 infectaram sete plantas de café (Figura 11). Interessantemente, a porcentagem de estirpes de *X. fastidiosa* de cafeeiro infectando seu próprio hospedeiro (2,85%) foi muito menor do que para as infecções de *X. fastidiosa* da CVC infectando cafeeiro (17,5%). Nenhum sintoma característico de infecção por *X. fastidiosa* da CVC ou ARC foram visualizados nestas plantas até a avaliação aos 300 dai.

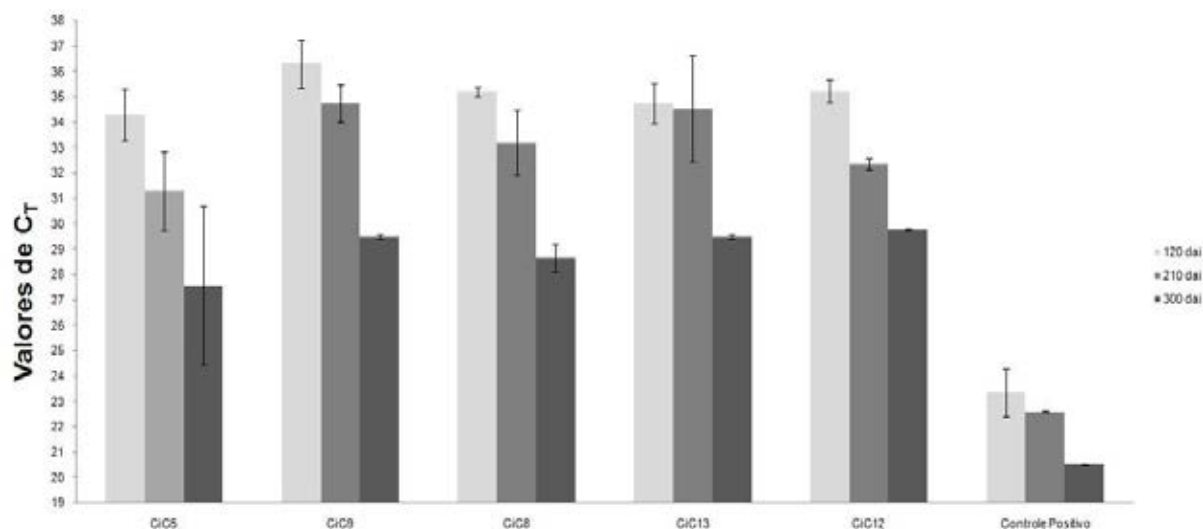


Figura 11. Valores de C_T mostrando infecções de *Xylella fastidiosa* da CVC (Ci) em cafeeiro nos diferentes tempos após a inoculação. CiC5, CiC9, CiC8, CiC13 e CiC12 são os diferentes clusters genéticos inoculados. Controle positivo equivale ao DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* utilizados como controle de amplificação das reações de qPCR. As barras são os desvios padrões da média dos valores de C_T das plantas consideradas positivas.

Seis estirpes representantes de diferentes clusters genéticos da população de *X. fastidiosa* de laranjeiras (CiC3, CiC5, CiC9, CiC12, CiC13 e CiC14) e seis de cafeeiros (CoC1, CoC10, CoC11, CoC13, CoC14 e CoC15), resultaram em infecções positivas e colonização em plantas de tabaco (Figura 12 e Tabela 4). A eficiência média de inoculação de tabaco com estirpes de *X. fastidiosa* obtidas de laranjeiras foi de 89% enquanto que com as estirpes obtidas de cafeeiro foi de 62%. Estes números foram muito maiores que os obtidos para as inoculações em seedlings de laranjeiras e cafeeiros, como mostrados anteriormente. Esta alta taxa de infecção garante a viabilidade das células bacterianas usadas nos ensaios, assim como ressalta mais uma vez, no uso de tabaco como planta modelo para estudos de *X. fastidiosa* (LOPES et al., 2000). Sintomas típicos da infecção começaram aparecer três meses após as inoculações somente nas plantas inoculadas com estirpes de laranja doce (Figura 13 – CiC12). Tanto o tipo de sintoma quando ao tempo de aparecimento estão de acordo aos descrito por Lopes et al. (2000). Sintomas provocados por estirpes de *X. fastidiosa* da ARC em tabaco ainda não são bem definidos devido à falta de investigação nesta

área. Na literatura, existe somente um trabalho publicado no Sistema Brasileiro de Informação do Café (disponível em <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/922>), onde Lopes et al. (2003) relatam que, sintomas de infecção por estirpes de café em tabaco são cloroses tardias acompanhadas de necrose. As plantas inoculadas com estirpes de *X. fastidiosa* de café apresentaram sintomas somente 300 dai. Porém, estes sintomas foram muito semelhantes aos descritos por Lopes et al. (2000) para isolados da CVC e também observados neste trabalho (Figura 13 – CoC11).

Tabela 4. Detalhamento sobre as plantas de tabaco infectadas por estirpes de *Xylella fastidiosa* de laranja doce e café.

Avaliação Plantas de Tabaco				
Inoculadas com estirpes de café				
Haplótipos	Plantas infectadas/ total de plantas	Dias após as inoculações		
		120	210	300
CoC14	(3/3) ^a	30.74 ^b (4.88) ^c	25.74 (3.20)	23.74 (4.69)
CoC1	(3/3)	26.23 (6.39)	26.46 (0.16)	20.71 (0.85)
CoC11	(3/3)	30.63 (4.86)	20.45 (2.91)	19.29 (0.95)
CoC15	(3/3)	21.73 (0.75)	22.05 (4.98)	19.85 (0.39)
CoC10	(1/3)	22.42 (0.09)	33.99 (0.11)	22.72 (0.03)
CoC13	(3/3)	35.42 (0.75)	30.42 (1.31)	19.56 (1.67)
Inoculadas com estirpes de citros				
Haplótipos	Plantas infectadas/ total de plantas	Dias após as inoculações		
		120	210	300
CiC14	(3/3) ^a	25.50 ^b (1.47) ^c	23.80 (0.53)	22.11 (2.34)
CiC9	(3/3)	22.47 (1.77)	22.85 (7.14)	19.83 (2.52)
CiC13	(1/3)	23.55 (0.17)	23.18 (0.12)	17.85 (0.14)
CiC12	(2/3)	32.62 (5.69)	30.15 (3.02)	20.41 (1.65)
CiC3	(3/3)	26.15 (7.79)	27.96 (6.03)	20.29 (1.02)

^a Número de plantas de tabaco positivas para *X. fastidiosa* em relação ao total de plantas utilizadas no experimento.

^b Média dos valores de C_T de duas repetições técnicas da reação de qPCR para cada plantas de tabaco inoculada com *X. fastidiosa*.

^c Desvio padrão da média dos valores de C_T de cada planta de tabaco inoculada com *X. fastidiosa*.

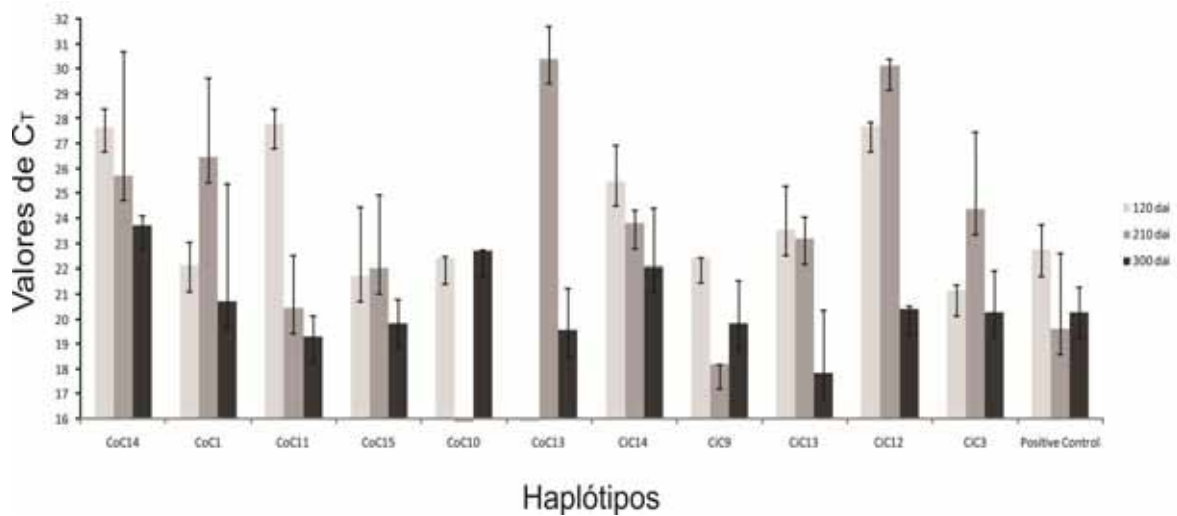


Figura 12. Valores de C_T mostrando infecções de *Xylella fastidiosa* de cafeeiro (Co) e laranjeira (Ci) em seedlings de tabaco nos diferentes tempos após a inoculação. CoC14 a CiC3 são os diferentes clusters genéticos inoculados. Controle positivo equivale ao DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* utilizados como controle de amplificação das reações de qPCR. As barras são os desvios padrões da média dos valores de C_T das plantas consideradas positivas.

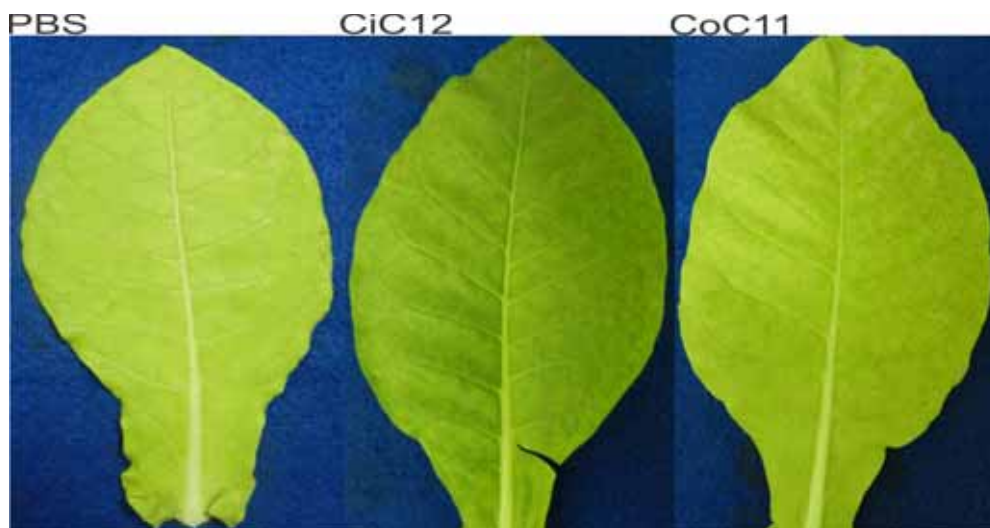


Figura 13. Sintomas ocasionados pela colonização de *Xylella fastidiosa* em tabaco. PBS – planta inoculada com tampão PBS (controle negativo); CiC12 – estirpe isolada de laranja doce; CoC11 - estirpe isolada de café. Os sintomas de *X. fastidiosa* em tabaco são caracterizados por pequenas lesões de coloração laranja escuro, que inicialmente aparecem nas folhas mais velhas e próximas ao ponto de inoculação, evoluindo para toda planta após o aparecimento dos primeiros sintomas.

Discussão

Nós utilizamos marcadores VNTR locos para genotipagem das populações de *Xylella fastidiosa* obtidas de plantas de laranja doce e café, com objetivo de obter clusters genéticos e então, utilizar estirpes representantes destes clusters, em ensaios de inoculações recíprocas envolvendo ambos hospedeiros. Em concordância com trabalhos anteriores (ALMEIDA et al., 2008; NUNNEY et al., 2012) as populações de *X. fastidiosa* provenientes das plantas de café foram geneticamente mais diversas que as obtidas de plantas de laranja doce. Analisando o perfil de distribuição dos alelos em ambas as populações, observamos uma clara distinção das populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros para a maioria dos locos (Figura 4)

Esta clara segregação de alelos mostrando duas populações distintas foi ainda mais evidente quando análises Bayesianas foram realizadas. Independente do software utilizado (BAPS ou STRUCTURE), as populações de *X. fastidiosa* agruparam-se em dois clusters genéticos distintos (Figuras 7 e 8), confirmando as observações das frequências alélicas. Dentro de cada cluster hospedeiro-específico houve a formação de sub-clusters agrupando os isolados geneticamente relacionados. Os 99 isolados bacterianos de laranja doce e 127 de café, formaram 14 e 15 sub-clusters genéticos, respectivamente (Figuras 5 e 6). Em ambos os patossistemas (laranjeiras e cafeeiros), 40% os sub-clusters foram compostos por isolados oriundos de diferentes plantas, enquanto que para 60% dos clusters houve a manutenção da população de origem da planta fonte (Figura 5 e 6). Em plantas perenes, como citros e café, é comum a infecção por múltiplos patógenos, incluindo múltiplas espécies ou estirpes do mesmo patógeno (SHARMA et al., 2011). Por outro lado a condição de manutenção parcial da estrutura de populações em função da planta de origem denota uma situação semelhante à discutida no trabalho de Coletta-Filho, Francisco e Almeida (2014). Neste trabalho, os autores discutiram com base nos dados de estrutura de populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras que, uma vez estabelecida a população deste patógeno, tendo como origem uma estirpe comum, poderia dificultar a introdução de novas populações, ou seja, inoculações *de novo*, por meio de cigarrinhas contaminadas. Essa condição teria pouca

chance de sucesso. Esta hipótese vem de encontro com os relativos sucessos de controle biológico de *X. fastidiosa* em videira usando estirpes não virulentas desta bactéria (Hopkins, 2011). Porém, como relatado por Hopkins, o controle pela planta ao estabelecimento de populações de patógeno por meio de infecções *de novo* ainda é pouco conhecido quanto a sua funcionalidade. Possivelmente falhas nesta proteção podem abrir possibilidades para o estabelecimento destas novas populações, o que explicaria os 40% dos sub-clusters compostos por estirpes oriundas de diferentes plantas. Neste caso, diferentes eventos de inoculações pelos vetores podem ter sido bem sucedidos. Ainda dentro deste contexto, Coletta-Filho, Francisco e Almeida (2014) isolaram populações de *X. fastidiosa* de plantas com 4 a 5 anos, enquanto que neste trabalho as plantas utilizadas para isolamento eram mais velhas, ao redor de 10 anos. Portanto, no presente trabalho, as plantas em análise podem ter passado por eventos múltiplos de infecções bem sucedidas. Lembrando que a atuação dos vetores é o único método conhecido de disseminação natural de *X. fastidiosa* planta a planta (LOPES, 1996; LARANJEIRAS; BERGAMIN; AMORIM, 1998).

Ainda investigando sobre a estrutura da população, não foram encontradas evidências sobre indivíduos migrantes entre as populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros. Baseado nos valores absolutos obtidos das análises do software STRUCTURE e seguindo a decomposição dos valores de probabilidades tal como proposto por Evano, Regnaut e Goudet (2005), obteveram-se duas populações distintas, como mencionado acima.

Diversos estudos conduzidos anteriormente demonstraram que estirpes de laranjeiras e cafeeiros de *X. fastidiosa* são geneticamente semelhantes (QIN et al., 2001; WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007; ALMEIDA et al., 2008; NUNNEY et al., 2012), possivelmente tendo o mesmo ancestral comum. Porém, mesmo essas estirpes sendo geneticamente relacionadas, ensaios de inoculações recíprocas conduzidas até o momento, evidenciaram que se trata de estirpes biologicamente distintas. Almeida et al. (2008), verificaram que estirpes de *X. fastidiosa* de laranjeiras são capazes de colonizar cafeeiros, não sendo válido o oposto. Tem sido proposto, inclusive que, as diferenças biológicas entre as estirpes de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros é

responsável por ocasionar diferenças sintomatológicas nesses hospedeiros (ALMEIDA et al., 2008), sugerindo inclusive que essas estirpes são hospedeiras-específicas (WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007; NUNNEY et al., 2012).

As inoculações homólogas e recíprocas deste trabalho foram conduzidas utilizando-se de oito haplótipos (estirpes representantes de sub-cluster genético) da população de *X. fastidiosa* da CVC e sete haplótipos da população da ARC. As plantas inoculadas com altas concentrações de *X. fastidiosa* (10^8 - 10^9 UFC/mL) resultam em uma maior taxa de infecção quando comparadas às realizadas com inóculo a 10^4 - 10^5 UFC/mL, independente da combinação haplótipo-hospedeiro. Nos estudos de inoculações recíprocas entre os patossistemas de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros conduzidas por Prado et al. (2008), os autores também verificaram que altas concentrações de inóculo da bactéria resultaram em uma maior porcentagem de plantas infectadas entre todas as combinações de estirpe e hospedeiro.

Mesmo nas inoculações homólogas, em ambos os hospedeiros (laranja doce e café), somente um número baixo das plantas foi colonizado por seus isolados de origem. É conhecido que inoculações mecânicas de *X. fastidiosa* por meio de células cultivadas em meio de cultura é um processo sujeito a variações e baixa repetitividade, sendo a concentração inicial do inóculo um dos variantes, como foi demonstrado neste trabalho. A flutuação na taxa de infecção também é uma variável comum, uma vez que condições ambientais como temperatura e umidade influenciam neste processo. Períodos quentes e secos são excelentes para que a bactéria *X. fastidiosa* colonize o hospedeiro, enquanto períodos mais frios desfavorecem sua colonização. A relação da bactéria com temperatura e regimes pluviométricos é claramente vista nos níveis de severidade da CVC em diferentes regiões do estado de São Paulo (BOVÉ; AYRES, 2007). Na região Norte e Noroeste onde as temperaturas são constantemente mais quentes ao longo do ano em comparação com outras regiões (ex: região Sul), há uma maior incidência da doença (COLETTA-FILHO et al., 2013). Uma vez que as inoculações aconteceram no final da estação de outono, normalmente um período do ano com temperaturas mais amenas, este pode ter sido um fator limitante do baixo

número de plantas infectadas. Interessantemente, as inoculações recíprocas mostraram que isolados de laranjeiras colonizam cafeeiros, porém o inverso não ocorreu.

Os resultados das inoculações recíprocas foram muito semelhantes aos obtidos por ALMEIDA et al., (2008) e PRADO et al., (2008), onde somente *X. fastidiosa* obtidas de laranjas doce foram capazes de colonizar e multiplicar em cafeeiros, porém sem o desenvolvimento de sintomas, como também observado no presente trabalho. No entanto, Li et al. (2001) relataram uma alta porcentagem de plantas de café (70%) sendo colonizadas por estirpes isoladas de laranjeiras, inclusive com aparecimento de sintomas seis meses após as inoculações. Estes resultados contraditórios de Li e colaboradores (2001) podem ser decorrentes da concentração de inóculo usado naquelas plantas teste (10^8 - 10^9 UFC/mL com 20 inoculações por planta teste). Os dados aqui apresentados mostraram que, ainda aos 300 dias após as inoculações, *X. fastidiosa* da CVC estavam se multiplicando em cafeeiros (Figura 12) o que demonstra uma capacidade de colonização deste hospedeiro por estirpes de *X. fastidiosa* de laranjeira. Por outro lado, neste mesmo período, Almeida et al. (2008) e Prado et al. (2008), relataram não mais encontrar *X. fastidiosa* da CVC colonizando cafeeiros, mesmo após sido constatado uma infecção inicial, que levaram aqueles autores a afirmarem não ocorrer inoculações recíprocas entre estes dois hospedeiros. Avaliações temporais com relação à colonização de *X. fastidiosa* da CVC em cafeeiro serão mantidas para certificar se a bactéria manterá se multiplicando em cafeeiro ou desaparecerá com o tempo, como obtido por Almeida et al. (2008) e Prado et al. (2008).

O motivo da não colonização de laranjeiras por isolados de *X. fastidiosa* da ARC, ainda é pouco entendido. Nunney et al. (2012) propuseram que no curso da evolução, *X. fastidiosa* era incapaz de colonizar tanto laranjeiras quanto cafeeiros. Esses autores acreditam que devido às altas taxas de recombinações entre isolados de *X. fastidiosa* infectando uma planta hospedeira natural hipotética, novas variantes genéticas surgiram e tornaram-se capazes de infectar esses dois hospedeiros, especializando-se a estes. De acordo com essa hipótese, a possibilidade alternativa que estamos propondo é que, os isolados de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros, surgiram evolutivamente de um mesmo ancestral comum e que através de recombinações se

adaptaram em seus respectivos hospedeiros, assim como já previamente proposto (WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007; NUNNEY et al., 2012). Porém, atribuímos a não infecção das plantas de laranja doce pelas estirpes de café à dificuldade natural de colonização imposta por este hospedeiro.

A geração de novas variantes de *X. fastidiosa* ainda é um processo em curso baseado em três importantes fatores: recombinações entre isolados de hospedeiros naturais, condições ambientais e dinâmica populacional do inseto vetor. A pressão seletiva exercida pela junção desses fatores, principalmente pelos eventos constantes de recombinações, leva ao surgimento de novas variantes da bactéria, incluindo as variantes patogênicas. Associado aos eventos de recombinações, processos de irradiação adaptativa acontecem e aconteceram, levando em um curto espaço de tempo, a adaptação dessas estirpes patogênicas a infectarem e se espalharem por uma ampla gama de hospedeiros e nichos ecológicos. Em *X. fastidiosa* já foi identificado que a maior contribuição na geração de diversidade genética é em decorrência de recombinações. Scally et al. (2005) verificaram para isolados de diferentes subespécies de *X. fastidiosa* da América do Norte, que o ganho de novos alelos ocorrem três vezes mais por processos de recombinações do que por mutações pontuais. O mesmo foi verificado para estirpes de laranja doce e café, onde Almeida et al. (2008) e Nunney et al. (2012) verificaram que o grau de recombinações de homólogos intersubspecífico é extremamente alto entre isolados de *X. fastidiosa* de laranjeira e cafeeiro, muito embora no presente trabalho não foi possível encontrar estirpes comuns aos dois hospedeiros .

Por outro lado, o papel das plantas hospedeiras naturais na epidemiologia e ecologia de *X. fastidiosa* e a contribuição dessas plantas como hospedeiros de isolados recombinantes, ainda é pouco estudado. Muitos autores discutem que essas plantas seriam extremamente importantes em patossistemas envolvendo *X. fastidiosa*, pois funcionariam como um reservatório de variantes genéticas e de seus insetos vetores, contribuindo para recombinações entre isolados e disseminação de estirpes patogênicas, além de ser fonte de infecções primárias em diferentes culturas (HOPKINS; PURCELL, 2002; COLETTA-FILHO; MACHADO, 2003; WICKERT; MACHADO; LEMOS, 2007; COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011). Assim

como apontado por Nunney et al., 2012, acreditamos que variantes patogênicas de *X. fastidiosa* que hoje infectam laranjeira e cafeeiro no Brasil, surgiram nessas plantas. O convívio simpátrico entre cultura de citros e café com plantas hospedeiras naturais de *X. fastidiosa* (LOPES et al., 2003; LEITE; LEITE JUNIOR; CERESINI, 1997b), reforça essa hipótese e facilitaria o fluxo de migração da bactéria entre plantas naturais e cultivadas.

Atualmente sabemos que diferentes estirpes de *X. fastidiosa*, que ocupam diferentes nichos ecológicos, possuem grupos de genes específicos a estes nichos, sendo adquiridos em sua maioria por transferência horizontal e profagos (GAL-MOR; FINLAY, 2006; NUNES et al., 2003). Isso denota a influencia ambiental moldando a epidemiologia dentro de locais geográficos. MCARTHUR et al. (1988), relatou que cada nicho tenderá a ter clones adaptados a um conjunto particular de condições ambientais. Essa adaptação a diferentes condições ambientais claramente pode ser vista quando se tenta estabelecer a relação entre estirpes de *X. fastidiosa* da América do Norte e da América do Sul (*X. fastidiosa* subsp. *pauca*), onde estas sempre agrupam-se em clados completamente distintos (SCHUENZEL et al., 2005; ALMEIDA et al., 2008), sugerindo um longo período de isolamento entre essas bactérias associados a condições ambientais completamente distintas. Pensando em uma escala menor, isolados de laranjeiras e cafeeiros serão melhores adaptados em colonizar seus respectivos hospedeiros. Porém em virtude dos processos de recombinações intersubespecíficos entre esses isolados, características adaptativas poderiam ser herdadas reciprocamente, o que possibilitaria as infecções recíprocas como as que foram visualizadas neste trabalho entre os isolados de laranjeiras colonizando cafeeiros.

A não colonização de laranjeiras por estirpes de cafeeiros estaria então associada a uma dificuldade natural de colonização desse hospedeiro em condições controladas, assim como pelo pouco tempo de coevolução entre o patógeno e o hospedeiro, e não pelo fato das estirpes de laranjeiras terem sido originadas de populações infectantes de café, como muitos autores têm hipotetizado (LI et al., 2001; QIN et al., 2001; PRADO et al., 2008). A difícil colonização das plantas cítricas por isolados de *X. fastidiosa* possivelmente seja devido a características fisiológicas,

morfológicas ou até mesmo químicas dessas plantas. Alves (2003) verificou que a migração vaso a vaso pela bactéria entre os vasos xilemáticos é dificultada em citros devido à presença mais intensa de células do parênquima no xilema deste hospedeiro, do que em cafeeiros. A baixa titulação de *X. fastidiosa* nos vasos do xilema de um determinado hospedeiro acarretaria em outro problema, a baixa eficiência de transmissão pelos insetos vetores. Essa relação foi identificada em laranjeiras, onde valores muito baixos de vasos colonizados por isolados da CVC (entre 9,7% e 13,5%) (ALVES, 2003), refletem em uma baixa eficiência de transmissão por espécies de cigarrinhas vetoras, variando de 0,3% a 11% (LOPES, 1999; YAMAMOTO et al., 2002). Se compararmos com o patossistema de videira, 40% de vasos colonizados por *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, gera uma eficiência de transmissão pela cigarrinhas de 90% a 100% (HILL; PURCELL, 1995b). Hill e Purcell (1997) verificaram também que, quanto maior a titulação bacteriana no hospedeiro, maiores são as chances de sucesso na transmissão pelos vetores. Uma vez que são as mesmas espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* da CVC e ARC (YAMAMOTO et al., 2000; LARA; PERIOTO; DE FREITAS, 2007; MENEGATTI; GARCIA; SAVARIS, 2008; MARRUCCI et al., 2008), laranjeiras não seriam uma boa fonte de aquisição da bactéria pelas cigarrinhas em relação a cafeeiros, que possuem 8x mais vasos colonizados do que as laranjeiras (ALVES, 2003). Partindo-se desta melhor condição natural de aquisição, esperava-se ter uma melhor infecção de *X. fastidiosa* de café em laranjeiras, mas o que se encontra em experimentos de inoculação artificial é o contrário, levantando mais uma vez evidências sobre a importância das plantas hospedeiras naturais como fontes de inóculo e variabilidade genéticas.

Patógenos generalistas como *X. fastidiosa*, variam quanto aos hospedeiros que colonizam. Woolhouse, Taylor e Haydon (2001) descrevem inclusive, diferentes níveis de severidade produzidos por um mesmo patógeno em diferentes hospedeiros. Isso deve ocorrer devido a barreiras naturais ou de defesa impostas por esses hospedeiros em decorrência do ataque do patógeno, que fazem com o que o patógeno torne-se menos virulento ou até mesmo não consiga colonizar a planta por muito tempo. Woolhouse, Taylor e Haydon (2001) também discutem que os patógenos tentam, a todo

o momento, driblar essas barreiras, produzindo variantes genéticas adaptadas aos hospedeiros. Provavelmente estirpes de *X. fastidiosa* cafeeiro, ainda não co-evoluíram o suficiente com laranjeiras, ao ponto de driblar por completo as barreiras impostas por este hospedeiro.

Historicamente, o cultivo de café se tornou significativo por volta de 1820 no estado de São Paulo, enquanto a intensificação do cultivo de citros deu-se em 1930. No entanto, a comercialização em grande escala de laranjas doce (variedade suscetível a CVC) somente começou em 1960. Sob este cenário, é possível que *X. fastidiosa* tornou-se co-adaptada primeiramente às plantas de café, aumentando o tamanho efetivo populacional pelos quase 140 anos de diferença de cultivos das culturas, até se tornar evolutivamente capaz em infectar laranjeiras (NUNNEY et al., 2012).

A maior dificuldade em se entender a ecologia de *X. fastidiosa* está no número reduzido de isolados representativos de diferentes populações e diferentes hospedeiros utilizados nos estudos desta bactéria. Na maioria, se não em todos os trabalhos, utilizam-se somente alguns isolados patogênicos para uma ou algumas determinadas culturas de interesse econômico. Para maior compreensão das relações entre ecologia e epidemiologia de *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, acreditamos ser necessário um maior número de experimentos utilizando-se de estirpes de plantas hospedeiras naturais, assim como de isolados patogênicos de todas culturas afetadas por esta subespécie em diferentes localidades do Brasil.

CONCLUSÕES

- A segregação dos alelos e as análises Bayesianas evidenciaram que as populações de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros são populações distintas.
- Não foi encontrado evidências sobre indivíduos migrantes entre as populações de *X. fastidiosa* de laranja doce e café.
- As plantas inoculadas com altas concentrações de *X. fastidiosa* (10^8 - 10^9 UFC/mL) resultam em uma maior taxa de infecção quando comparadas as realizadas com inóculo a 10^4 - 10^5 UFC/mL, independente da combinação haplótipo-hospedeiro.
- Somente *X. fastidiosa* obtidas de laranjas doce foram capazes de colonizar e multiplicar em cafeeiros, porém sem o desenvolvimento de sintomas.
- A não colonização de laranjeiras por estirpes de cafeeiros estaria associado a uma dificuldade natural de colonização desse hospedeiro e pelo pouco tempo de coevolução entre o patógeno e o hospedeiro, e não pelo fato das estirpes de laranjeiras terem sido originadas de populações infectantes de café.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. P. P., NASCIMENTO, F. E., CHAU, J., PRADO, S. S., TSAI, C. W., LOPES, S. A., LOPES, J. R. S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3690-3701, 2008.

ALMEIDA, R. P. P., PEREIRA, E. F., PURCELL, A. H., LOPES, J. R. S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v. 85, p. 382-386, 2001.

ALVES, E. ***Xylella fastidiosa* – adesão e colonização dos vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro e ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestileno.** 2003. 146f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

BARBOSA, J. F. **Ocorrência e padrão espacial da atrofia dos ramos do cafeeiro (*Xylella fastidiosa*) nas regiões Sul e Zona da Mata de Minas Gerais.** 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Oxford University Press Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 573-580, 1999.

BOVÉ, J. M., AYRES, A. J. Etiology of three recent disease of citrus in São Paulo: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. **IUBMB Life**, v. 59, p. 346-354, 2007.

CASTRO, L. A. S., NAKASU, B. H., PEREIRA, J. F. M. Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, 2008. 10 p. (Circular Técnica, 70).

COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3731–3736, 2002.

COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. **Phytopathology**, v. 93, p. 28-34, 2003.
COLETTA-FILHO, H. D., BITTLESTON, L. S., ALMEIDA, R. P. P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2596-2601, 2011.

COLETTA-FILHO, H. D., GONÇALVES, L. A., DE SOUZA, A. A., MACHADO, M. A. Survey of *Xylella fastidiosa* and citrus variegated chlorosis in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 3, p. 493-498, 2013.

COLETTA-FILHO, H. D., FRANCISCO, C. S., ALMEIDA, R. P. P. Temporal and spatial scaling of the genetic structure of vector-borne plant pathogen. **Phytopathology**, v. 104, p. 120-125, 2014.

CORANDER, J., WALDMANN, P., SILLANPAA, M. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. **Genetics**, v. 163, p. 367-374, 2003.

DE NEGRI, J. D., GARCIA JUNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 14, p. 255-268, 1993.

DE SOUZA, A. A., TAKITA, M. A., AMARAL, A. M., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A. Citrus Tree and Forestry Science and Biotechnology: Citrus responses to the *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis. **Global Science Books**, v. 3, p. 73-80, 2009.

DUCROQUET, J-P. H. J., ANDRADE, E. R., HICKEL, E. R. A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina. Florianópolis: **EPAGRI**, 2001. 55 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 118).

EVANO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FRY, S. M., MILHOLLAND, R. D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, v. 80, p. 61-65, 1990.

GAL-MOR, O., FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cell Microbiology**, v. 8, p. 1707-1719, 2006.

GLAUBITZ, J. C. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 309-310, 2004.

HARTUNG, J. S., BERETTA, M. J. G., BRLANSKY, R. H. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationship with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v. 84, n. 6, p. 591-597, 1994.

HILL, B. L., PURCELL, A. H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v. 85, p. 209–212, 1995.

HILL, B. L., PURCELL, A. H. Multiplication and movement of *Xyella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, v. 85, n. 11, p. 1968-1372, 1995b.

HILL, B. L., PURCELL, A. H. Population of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. **Phytopathology**, v. 87, n. 10, p. 1197-1201, 1997.

HOPKINS, D. L., PURCELLI. A. H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, p. 1056-1066, 2002.

HOPKINS, D. L. Biological control of Pierce's disease of grapevine with benign strains of *Xylella fastidiosa*. **Pierce's Disease Research Symposium Proceedings**, p. 128-131, 2011

KITAJIMA, E. W., BAKARCIC, M., FERNANDEZ-VALIEGA, M. V. Association of rickettsia like bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathology**, v. 65, p. 476-479, 1975.

LARA, R. I. R., PERIOTO, N. W., DE FREITAS, S. Amostragem de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) através de armadilhas de Moericke em cafeeiro arábica. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**, v. 74, n. 3, p. 239-244, 2007.

LARANJEIRAS, F. F., BERGAMIN, A., AMORIM, L. Dynamics and structure of citrus variegated chlorosis (CVC) foci. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 36-41, 1998.

LI, W. B., PRIA Jr, W. D., TEIXEIRA, D. C., MIRANDA, V. S., AYRES, A. J., FRANCO, C. F., COSTA, M. G. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* form citrus. **Plant Disease**, v. 85, p. 501-05, 2001.

LIMA, J. E. O. D., MIRANDA, V. S., COUTINHO, A., ROBERTO, S. R., CARLOS, E. F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras e seu isolamento in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.3, p.392-393, 1996

LIMA, J. E. O., MIRANDA, V. S., HARTUNG J. S., BRLANSKY, R. H., COUTINHO, A., ROBERTO, S. R., CARLOS, E. F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 94-97, 1998.

LIN, H., CIVEROLO, E. L., HU, R., BARROS, S., FRANCIS, M., WALKER, M. A. Multilocus simple sequence repeat markers for differentiating strains and evaluating genetic diversity of *Xylella fastidiosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4888-4892, 2005.

LEITE, R. M. V. B. C., LEITE JUNIOR, R. P., CERESINI, P. C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 54-57, 1997.

LEITE JÚNIOR, R. P. Ocorrência de *Xylella* em café no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.1, p.122-124, 2002.

LOPES, J. R. S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* dos citros por cigarrinhas e biologia dos vetores. **Laranja**, v. 17, p. 240-245, 1996

LOPES, J. R. S. Estudo com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 20, n. 2, p. 329-344, 1999.

LOPES, S. A., RIBEIRO, D. M., ROBERTO, P. G., FRANÇA, S. C., SANTOS, J. M. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant–*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, v. 84, p. 827-830, 2000.

LOPES, S. A., MARCUSSI, S., TORRES, S. C. Z., SOUZA, V., FAGAN, C., FRANÇA, S. C., FERNANDES, N. G., Lopes, J. R. S. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, v. 87, p. 544-549, 2003.

LOPES, S. A., TEIXEIRA, D. C., FERNANDES, N. G., AYRES, A. J., TORRES, S. C. Z., BARBOSA, J. C., LI, W. B. An experimental inoculation system to study citrus–*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, v. 89, p. 250-254, 2005.

LOPES, S. A., BERIAM, L. O. S., GRABERT, E., TORRES, S. C., CAMPERONI, G., GARCIA, A. L., SOUZA, V., FRANÇA, S. C. Sintomatologia em fumo diferencia sintomatologia de *Xylella fastidiosa* de citros e cafeeiro e sugere especificidade de hospedeiros. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 3., 2003, Porto Seguro. **Anais eletrônicos...** Porto Seguro: SPCB, 2003. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/922>>. Acesso em: 23 mai. 2014.

MARRUCCI, R. C., LOPES, J. R. S., CAVACHIOLI, R. R. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1114-1121, 2008.

MCARTHUR, J. V., KOVACIC, D. A., SMITH, M. H. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 9621-9624, 1988.

MENEGATTI, A. C. O., GARCIA, F. R. M., SAVARIS, M. Análise faunística e flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em pomar cítrico no município de Chapecó, Santa Catarina. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 53-58, 2008.

MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NEWMAN, K. L., ALMEIDA, R. P. P., PURCELL, A. S., LINDOW, S. E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 6, p. 1737-1742, 2004.

NUNES, L. R., ROSATO, Y. B., MUTO, N. H., YANAI, G. M., DA SILVA, V. S., LEITE, D. B., GONÇALVES, E. R., DE SOUZA, A. A., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A., LOPES, S. A., DE OLIVEIRA, R. C. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. **Genome Research**, v. 13, p. 570-578, 2003.

NUNNEY, L., YUAN, X., BROMLEY, R. E., STOUTHAMER, R. Detecting Genetic Introgression: High Levels of Intersubspecific Recombination Found in *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4702–4714, 2012.

OLIVEIRA, A. C., VALLIM, M. A., SEMIGHINI, C. P., ARAÚJO, W. L., GOLDMAN, G. H., MACHADO, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v. 92, p. 1048-1054, 2002.

PARADELA-FILHO, O., SUGIMORI, M. H., RIBEIRO, I. J. A., GARCIA Jr, A., BERETTA, M. J. G., HARAKAWA, R., MACHADO, M. A., LARANJEIRA, F. F., RODRIGUES NETO, J., BERIAM, L. O. S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

PARADELA FILHO, O., SUGIMORI, M. H., RIBEIRO, I. J. A., GARCIA JUNIOR, A., BERETTA, M. J. G., HARAKAWA, R., MACHADO, M. A., LARANJEIRA, F. F., RODRIGUES NETO, J., BERIAM, L. O. S. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.1, p.46-49, 1997.

POKHRIYAL, B., THORAT, K., LIMAYE, D. A., JOSHI, Y. W., KADAM, V. J., DUBEY, R. Microsatellite markers – a novel tool in molecular genetics. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 2231-2781, 2012.

PRADO, S. S., LOPES, J. R. S., DEMÉTRIO, C. G. B., BORGATTO, A. F., ALMEIDA, R. P. P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 251-258, 2008.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics Research**, v. 155, p. 945–959, 2000.

QIN, X., MIRANDA, V. S., MACHADO, M. A., LEMOS, E. G. M., HARTUNG, J. S. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 91, p. 599-605, 2001.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B., PARADELA-FILHO, O., CARELLI, M. L. C., FAHL, J. I. Structural aspects in infected coffee plant with *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, v. 57, p. 23-33, 1998.

RANDALL, J. J., GOLDBERG, N. P., KEMP, J. D.; RADIONENKO, M., FRENCH, J. M., OLSEN, M. W., HANSON, S. F. Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the southwestern United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5631-5638, 2009.

REDAK, R. A., PURCELL, A. H., LOPES, J. R. S., BLUA, M. J., MIZELL III, R. F., ANDERSEN, P. C. The biology of xylem fluid feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 243-270, 2004.

ROCHA, J. G., ZAMBOLIM, L., ZAMBOLIM, E. M., DO VALE, F. X. R., JUNIOR, W. C. J., FILHO, A. B. Quantification of yield loss due to coffee leaf scorch. **Crop Protection**, v. 29, n. 10, p. 1100-1104, 2010.

ROSSETI, V., GARNIER, M., BREVE, J. M., BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R. R., QUAGGIO, J. A., de NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d' orangers atteints de chlorose variéegé une nouvelle maladié des agrumes du Brésil. **Compters Rendus de l' Académie des Sciences**, Paris, v. 310, n. 3, p. 345-349, 1990.

SCALLY, M., SCHUENZEL, E. L., STOUTHAMER, R., Nunney, L. Multilocus Sequence Type System for the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa* and Relative Contributions of Recombination and Point Mutation to Clonal Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8491–8499, 2005.

SCHAAD, N. W., LACY, P. E. G., FATMI, M., CHANG, C. J. *Xylella fastidiosa*

subspecies: *X. fastidiosa* subsp. piercei, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. multiplex subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. pauca subsp. nov. **System Applied Microbiology**, v. 27, p. 290-300, 2004.

SCHUENZEL, E. L., SCALLY, M., STOUTHAMER, R., NUNNEY, L. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3832-3839, 2005.

SHARMA, A. M., WANG, J., DUFFY, S., ZHANG, S., WONG, M. K., RASHED, A., COOPER, M. L., DAANE, K. M., ALMEIDA, R. P. P. Occurrence of grapevine leafroll-associated virus complex in Napa Valley. **Plos One**, v.6, pe. 26227, 2011.

TAKATSU, A., SANTOS, M. R., MALUF, R. C. *Xylella fastidiosa* do cafeeiro no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória: EMBRAPA Café. **Anais eletronicos...** Vitória: EMBRAPA Café, 2001. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/490>>. Acesso em: 25 mai. 2014.

UENO, B.; UESUGI, C. H. Levantamento da ocorrência de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro do Distrito Federal e entorno. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.2, p.223, 2002.

UNETERGRASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., Ye, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., [ROZEN, S. G. Primer3 - new capabilities and interfaces](#). **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, pe. 115, 2012.

WAPLES, R. S., GAGGIOTTI, O. E. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 1419-1439, 2006.

WELLS, J. M., RAJU, B. C., NYLAND, G., LOWE, S. W. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, p. 357-363, 1981.

WELLS, J. M., RAJU, B. C., HUNG, H. Y., WEINSBERG, W. G., MANDELCO PAUL, L., BREINNERD, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: gram-negative, xylem-limited

fastidiosa bactéria related to Xanthomonas spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 136–143, 1987.

WICKERT, E., MACHADO, M. A., LEMOS, E. G. M. Evaluation of genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from citrus and coffee hosts by single-nucleotide polymorphism markers. **Phytopathology**, v. 97, p. 1543-1549, 2007.

WOOLHOUSE, M. E. J., TAYLOR, L. H., HAYDON, D. T. Population Biology of Multihost Pathogens. **Science**, v. 292, p. 1109-1112, 2001.

YAMAMOTO, P. T., ROBERTO, S. R., DALLA PRIA JR, W., FELIPPE, M. R., MIRANDA, V. S., TEIXEIRA, D. C., LOPES, J. R. S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescens* e *Molomea cincta* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 1, p. 284, 2000.

YAMAMOTO P. T., ROBERTO, R. S., DALLA PRIA JUNIOR, W. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homolodisca ignorata* (Hemiptera:Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathology**, v. 28, n. 2, p. 178-181, 2002.

YUAN, X., MORANO, L. R., BROMLEY, S., SPRING-PEARSON, R., STOUTHAMER., NUNNEY, L. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. **Phytopathology**, v. 100, p. 601-611, 2010.