

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LINHAGENS DE *Xylella fastidiosa* DE DIFERENTES HOSPEDEIROS BASEADA NA SEQUENCIA DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S-23S rDNA**

**JULIANA CAMARGO MARTINATI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Celular e Molecular)

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Julho de 2003**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LINHAGENS DE *Xylella fastidiosa* DE DIFERENTES HOSPEDEIROS BASEADA NA SEQUENCIA DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S-23S rDNA**

**JULIANA CAMARGO MARTINATI**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. SIU MUI TSAI**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular)*

**Rio Claro, SP  
Julho de 2003**

Aos meus pais por todo o esforço dedicado à minha educação, pelo apoio moral e financeiro que sem os quais seria impossível começar este trabalho e principalmente pelo amor incondicional.

Ao meu namorado Cássio que me fez enxergar a vida com olhares mais belos e singelos e pelos melhores momentos da minha vida com ele vividos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado a vida e inteligência para poder aprender;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Siu Mui Tsai pela confiança em mim depositada principalmente, pela orientação segura e também às palavras de incentivo profissional e intelectual;

À Dra. Flávia Teresa Hansen Pacheco pela dedicação e transmissão dos conhecimentos;

Ao Dr. David Henry Moon pelos valiosos ensinamentos e sempre com disponibilidade e bom humor para as explicações;

Ao técnico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP Elias pela solução de importantes questões durante os experimentos e também pela amizade;

Às amigas Fabi, Dani, Letícia (Suzi) pelas incessantes análises de sequenciamento de DNA;

À todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelas trocas de informações que nos fazem crescer a cada dia;

Ao Vitor Miranda pela crucial ajuda na condução das análises filogenéticas;

Aos amigos do laboratório Luciana Fedatto, Adriane Souza, Lea Chapaval, Fabiana Canavan, Sandra Myasawa pelos bate-papos diários que sempre tínhamos e que sempre nos mantinham de bom humor, além da ótima convivência.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE GRÁFICOS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
A problemática da CVC em citros no Brasil.....	4
3.1. O Gênero <i>Xylella</i> .....	5
3.2. Doenças causadas por <i>Xylella fastidiosa</i> .....	8
3.2.1 . Clorose Variegada dos Citros.....	8
3.2.2. Mal de Pierce em Videiras.....	11
3.2.3. Outros hospedeiros de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	12
3.3. Variabilidade Genética .....	13
3.4. O uso de rDNA como método de análise .....	16
3.5. Análise da região espaçadora rDNA 16S-23S.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.2. Perfil de crescimento dos isolados. ....	20
4.3. Extração do DNA genômico de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	20
4.3.1. Metodologia 1 .....	20
4.3.2. Metodologia 2.....	22
4.4. Construção dos primers .....	23
4.5. Condições de amplificação por PCR da região 16S-23S rDNA de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	23
4.6. Purificação dos fragmentos amplificados.....	26
4.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados .....	26
4.8. Análise das seqüências .....	27
4.9. Análises filogenéticas.....	27

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Perfil de crescimento .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2. Extração do DNA.....</b>	<b>33</b>
<b>5.3. PCR da região intergênica 16S-23S rDNA de <i>Xylella fastidiosa</i> . .....</b>	<b>35</b>
<b>5.4. Seqüenciamento da região espaçadora 16S-23S rDNA.....</b>	<b>37</b>
<b>5.5. Análise da região intergênica 16S-23S.....</b>	<b>37</b>
<b>5.6. Filogenia.....</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café (6738, 6740, 6755); 5-7- Videira (6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745) ; 10-Amêndoa (6746); 11-Olmo (6748); 12- Ambrosia americana (6751); 13- Vinca (6749). ..... 33
- Figura 2. Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular pGEM; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café (6738, 6740, 6755); 5-7- Videira (6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745) ; 10-Amêndoa (6746); 11-Olmo (6748); 12- Ambrosia americana (6751); 13- Vinca (6749). ..... 34
- Figura 3. Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 1-12 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-3- Café (6738, 6740); 4-6 Videira (6068, 6752, 6753); 7-8 Amora (6744, 6745) ; 9-Amêndoa (6746); 10- Olmo (6748); 11- Ambrosia americana (6751); 12- Vinca (6749). ..... 34
- Figura 4 Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 1-8 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-Café (6755); 3- Videira (6753); 4- Amora (6744,) ; 5-Amêndoa (6746); 6-Olmo (6748); 7- Ambrosia americana (6751); 8- Vinca (6749). ..... 35
- Figura 5. Fragmentos amplificados da região espaçadora 16S-23S de *Xylella fastidiosa* com aproximadamente 650 bases. M<sub>1</sub>-Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café (6738, 6740, 6755) ; 5-7- Videira(6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745) ; 10-Amêndoa (6746); 11-Olmo (6748); 12- Ambrosia americana(6749); 13- Vinca (6751); M<sub>2</sub>- Marcador molecular pGEM. .... 36
- Figura 6. Fragmentos amplificados da região espaçadora 16S-23S rDNA de *Xylella fastidiosa* com os primers proposto por Honeycutt. M<sub>1</sub>-Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café ( 6738, 6740, 6755); 5-7- Videira (6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745); 10-Amêndoa (6746); 11-Elm (6748); 12- Ambrosia americana (6749); 13- Vinca (6751). ..... 37
- FIGURA 7. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região intergênica 16S-23S utilizando o programa EasyAlign. As seqüências em azul indicam o gene para tRNA<sup>ile</sup> e as seqüências em vermelho indicam o gene tRNA<sup>ala</sup>. O símbolo “-” indica os “gaps”.....45

Figura 8. Cladograma gerado com o algoritimo de Busca heurística no programa PAUP\* de linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de diferentes espécies vegetais, tendo como grupo externo a linhagem de *Xylella fastidiosa* isolada de pêra (PE.PLS). Índice de consistência (CI) =0.9063 ; Índice de retenção (RI) = 0.9432 ; Índice de Homoplasia (HI) = 0.0938. Índice de consistência otimizado (RC) = 0.8548. Os números acima dos galhos são valores *bootstrap* (em %) obtidos com 2000 replicações. Apenas valores acima de 50% estão ilustrados. .... 52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> adquiridos da Fundação André Tosello utilizados neste estudo. ....	20
Tabela 2. Seqüência dos “primers” desenhados em nosso laboratório para amplificar a região intergênica 16S-23S de <i>Xylella fastidiosa</i> . ....	25
Tabela 3. Seqüência dos “primers” proposto por Honeycutt para amplificação da a região intergênica 16S-23S de <i>Xylella fastidiosa</i> . ....	25
Tabela 4. Linhagens de <i>Xylella fastidiosa</i> disponíveis no GenBank utilizadas para comparação na análise filogenética da seqüência rDNA do espaço intergênico 16S-23S e seus respectivos números de acesso.....	28
Tabela 5. Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de <i>Xylella fastidiosa</i> isoladas de citros, café, videira, amêndoa, oleander, carvalho, ameixa, amora, pêssego, <i>Acer macrophila</i> , olmo, ambrosia americana, vinca e pêra. ....	46
Tabela 6. Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de <i>Xylella fastidiosa</i> isoladas de citros e café. ....	49
Tabela 7. Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de <i>Xylella fastidiosa</i> isoladas de citros, café e videira. ....	49
Tabela 8. Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de <i>Xylella fastidiosa</i> isoladas de olmo, carvalho e pêssego. ....	50
Tabela 9. Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de <i>Xylella fastidiosa</i> isoladas de amêndoa. ....	51

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 – GRÁFICO ILUSTRATIVO DOS PERFIS DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *Xylella fastidiosa* PROVENIENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS.....31

GRÁFICO 02 – GRÁFICO ILUSTRATIVO DOS TEMPOS DE DURAÇÃO NAS FASES DO CICLO BACTERIANO DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Xylella fastidiosa*.....32

## LISTA DE ABREVIATURAS

BOX - Box element  
cm – centímetros  
CIA – clorofórmio-álcool isoamílico  
CTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio  
DNA – ácido desoxiribonucleico  
EDTA – ácido etilodiaminotetraacético  
ERIC- Enterobacterial repetitive intergenic consensus  
g - grama  
IGS – espaço intergênico  
Kb – Kilobase (1000 bases)  
M - molar  
mg - miligrama  
ml - mililitro  
mm - milímetro  
mM - milimolar  
min - minuto  
NCBI – National Center of Biotechnology Information  
nm - nanômetros  
pb – pares de base  
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia  
PW – Periwinkle Wilt  
PVP - Polivinilpirrolidona  
RAPD – Random Amplified Polymorphism Detection  
rDNA – DNA ribossomal  
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism  
RNA – ácido ribonucléico  
RNase - ribonuclease  
rpm – rotação por minuto  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
TA – Temperatura ambiente  
TE – tampão Tris EDTA  
TBE – tampão Tris-EDTA ácido bórico  
tRNA – RNA transportador  
Tris – Tris (hidroximetil aminometano)  
UV – ultra violeta  
V – volts  
*X.f.- Xylella fastidiosa*  
µg - microgramas  
µl - microlitros

## RESUMO

Linhagens de *Xylella fastidiosa* de diferentes hospedeiros, incluindo citros, café, pêsego, videira entre outros, foram utilizadas para construir uma relação filogenética a partir da análise de seqüências completas de nucleotídeos do espaço intergênico 16S-23S rDNA. Dadas as dificuldades encontradas frente ao uso dos primers utilizados para o sequenciamento da região genômica em questão, fez-se necessária a construção de novos primers baseada em dados após alinhamento e comparação com as seqüências disponibilizadas pelo NCBI e com as obtidas neste trabalho. Os “primers” propostos previamente para amplificação da região 16S-23S em *Xylella fastidiosa*, foram também testados sem muito sucesso uma vez que produzem fragmentos muito extensos e, para a obtenção de seqüências adequadas seria necessário o uso de outras técnicas moleculares mais dispendiosas para obtenção da seqüência completa, o que levaria tempo e custo maiores. Os métodos utilizados tanto para alinhamento de seqüências bem como a construção da árvore filogenética são baseados no princípio cladístico.

As seqüências completas do espaço intergênico obtidas, revelaram um nível de variação de bases maior do que a encontrada em seqüências do gene 16S do mesmo organismo (99,0 a 100%), com valores de similaridade que variam em torno de 80 a 100%. A linhagem originada de plantas de pêra, que apresentou uma maior discrepância nos valores, foi tomada como um grupo externo aos dos outros hospedeiros.

Baseado no cladograma apresentado, os resultados revelaram que as linhagens de citros e café puderam ser separadas quando se usa o método cladístico de análise, já pela metodologia baseada em princípios fenéticos esta separação não foi possível. Foi possível também agrupar os isolados em três cladogramas principais : Grupo 01 inclui algumas estirpes de videira, olmo, amora, e um isolado de ameixa, citros, e café; Grupo 02 inclui as estirpes ambrosia americana e vinca e o Grupo 03 onde se encontram as demais estirpes. Dentro de cada um dos 3 grandes grupos ainda foi possível subdividi-los em sub-grupos menores onde as divisões tornaram-se mais claras separando alguns isolados onde previamente não conseguiam serem separados.

Com os dados obtidos não é possível dizer que isolados de um mesmo hospedeiro pertencem a um mesmo grupo filogenético, portanto outros estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar as relações existentes entre as linhagens de *Xylella fastidiosa*.

## SUMMARY

The phylogenetic relationships among *Xylella fastidiosa* isolates from different hosts were studied, using primers specific for the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. Strains isolated from a wide range of host plants were studied - citrus, coffee, grapevine, elm, periwinkle, and others.

Current methods for sequencing the 16S-23S spacer regions are laborious because of the large fragment obtained when using the specific primers. Nevertheless, the sequences obtained with this primers did not contribute with significant information, as only partial sequences were obtained. It's necessary other methods to complement in order to obtain a complete sequence of the spacer region. This methods include cloning and the use of internal primers. In order to establish an easier method to sequencing the spacer region, were constructed a new primer pair to facilitated the sequencing and the sequences obtained was complete.

The 16S-23S intergenic spacer region analysis showed a higher level of variation than that found in 16S sequences, with similarity values ranging from 80% to 100%. The pear strain, that showed the most variable values, was used as the outgroup.

The cladogram constructed by using cladistic methods allowed the grouping of three major clusters: the citrus-coffee-some grapevines- mulberry, the periwinkle-ambrosia, and the others hosts. The citrus and coffee strains could be phylogeneticly separated from this method while by the 16S sequences and the 16S-23S by the phenetic method they couldn't. A phenogram based on similarity data is useful for observing relationships based on share characters. However, its does not necessarily represent the evolutionary histry of the taxa. With the cladistic approach, hypothetical genealogical relationships among *Xylella fastidiosa* strains may be inferred

## 1. INTRODUÇÃO

*Xylella fastidiosa* é uma fitobactéria gram-negativa (Well *et al.*, 1987), responsável por doenças em culturas economicamente importantes como videiras, ameixeiras, citros, café, entre outras. Nutricionalmente fastidiosa, esta bactéria possui uma grande variedade de hospedeiros incluindo algumas espécies de mono e dicotiledôneas. Pode ser transmitida de uma planta doente para uma sadia através de insetos vetores da família *Cicadellidae*, subfamília *Cicadellinae*. Foi primeiramente identificada em 1973 causando a Doença de Pierce em videiras.

No Brasil, *X. fastidiosa* está associada com doenças em cafeeiros e ameixeiras, mas a mais importante economicamente é a Clorose Variegada dos Citros (CVC). A CVC foi primeiramente diagnosticada no Nordeste do estado de São Paulo, mas atualmente ela se encontra em vários outros estados do país causando grandes perdas na economia citrícola.

Está atualmente classificada como sendo uma única espécie, porém apresenta diferenças em aspectos importantes como hospedeiros, patogenicidade, velocidade de crescimento. Dentro de um mesmo hospedeiro, as características genômicas podem variar de acordo com a região geográfica em que foi isolada a linhagem estudada. Até hoje, ainda não foram classificados, se existem, diferentes patovares.

A fim de elucidar as relações genéticas entre as linhagens, vários estudos com análises de RAPD, RFLP, ERIC-BOX, DNA-DNA hibridização, entre outras, foram utilizadas com sucesso. Porém dados sobre as relações filogenéticas entre as linhagens ainda são muito limitados. Alguns estudos foram realizados, porém com alguns aspectos a desejar.

Os genes rDNA são fundamentais para todos os organismos e o gene 16S é tido como um marcador molecular para muitos estudos sobre filogenia (Woese, 1987). Análises das

seqüências do gene 16S rDNA são realizadas para este propósito, porém quando se trata de linhagens muito próximas, este não funciona como um bom marcador, uma vez que as diferenças nas bases não nos oferecem boas informações (Rogall *et al.*, 1990). Em vista disto, o espaço entre os genes 16S e 23S têm sido uma boa alternativa para estes estudos em organismos relativamente próximos devido a sua variação em extensão e seqüência de bases. Pode também ser utilizado na identificação de organismos e, dependendo do grau de variação encontrado o polimorfismo pode ser usado para diferenciação de gênero e espécie.

Neste estudo foi seqüenciada a região 16S-23S de diferentes linhagens de *Xylella fastidiosa* com o intuito de determinar uma relação filogenética entre as linhagens.

## 2. OBJETIVOS

Os estudos sobre diferenciação entre linhagens de *Xylella fastidiosa* vêm sendo conduzidos com a finalidade de estabelecer métodos capazes de caracterizar as principais linhagens da bactéria e possivelmente o estabelecimento de patovares. A escassez de informações sobre filogenia entre as principais linhagens incentivou à realização de estudos mais aprofundados. Geralmente para tal se faz uso de seqüências de DNA de genes conservados para organismos de espécies diferentes, porém para organismos de uma mesma espécie este não nos traz informações sendo necessário o uso de seqüências alternativas. O gene 16S, muito usado, além de ser muito conservado para estudos de uma mesma espécie, possui uma seqüência de bases muito longa, o que dificulta o sequenciamento completo de suas bases a ponto de obter alguma informação. Para isto foi sequenciado a região intergênia 16S-23S através de um novo design de “primers” que facilitou a leitura das bases no sequenciamento. Uma vez que não foram comparados os principais grupos de *Xylella fastidiosa* em um mesmo estudo sobre filogenia, foi proposta a realização de uma análise filogenética com as principais linhagens causadoras da doença.

1. Caracterização dos perfis de crescimento das diferentes linhagens da bactéria *Xylella fastidiosa* através de curvas de crescimento “*In vitro*” ;
2. Análise da região intergênica 16S-23S (IGS) e genes adjacentes de *Xylella fastidiosa* isolado 9a5c depositado no Banco de Dados, para construção dos “primers” para amplificação da região escolhida;
3. Estabelecer condições adequadas para a amplificação e sequenciamento da região IGS;
4. Através das seqüências de DNA obtidas, analisar a diversidade genética de *X.f.* de distintos hospedeiros comparando com seqüências IGS depositadas no NCBI-EUA de linhagens de *X.f.*, redefinindo um novo agrupamento;
5. Estabelecer as relações filogenéticas entre as principais linhagens de *Xylella fastidiosa*.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### A problemática da CVC em citros no Brasil

A citricultura responde por uma relevante porção econômica no país. O Brasil é o segundo maior produtor de laranjas, cultura que ocupa o segundo lugar em termos de importância econômica. A área de maior concentração está no Estado de São Paulo com uma média de 370 milhões de caixas/ ano. Essa produção movimenta uma quantia aproximadamente de US\$ 4 bilhões em transações financeiras e gera aproximadamente 400 mil empregos diretos (Oliveira, 1999).

Nos últimos anos a Clorose Variegada dos Citros (CVC) se tornou uma das principais doenças do setor citrícola do país limitando a produção e o comércio. O que mais tem preocupado os produtores é a alta incidência da CVC chegando a índices de 34% da produção paulista dos frutos, afetando mais de um terço dos 200 milhões de pés de laranja do estado e tornando improdutivas cerca de 6 milhões delas a cada ano, provocando perdas estimadas em R\$650 milhões no ano de 2000 (FUNDECITROS). Todas as variedades de laranja doce são suscetíveis a CVC (Lee *et al.*, 1992), enquanto que a maioria das demais espécies de citros é tolerante ou resistente. Essa doença está gerando perdas significativas na produção e afeta principalmente a qualidade dos produtos e a economia do país.

A principal responsável pela doença foi relacionada como sendo a bactéria *Xylella fastidiosa*. É considerada um fitopatógeno restrito aos vasos xilemáticos da planta (Wells *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1993). Recentemente teve seu genoma completamente seqüenciado através de um ambicioso projeto feito por grandes laboratórios paulistas com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) mostrando-nos seus genes com características que podem nos auxiliar na prevenção e controle das doenças por ela causada.

Após toda a seqüência ter sido revelada à comunidade científica, entrou em vigor o projeto Genoma Funcional da *Xylella fastidiosa* cujo objetivo principal é contribuir ainda mais na descoberta de funções desses genes, como fator de virulência e genes que possuem características que nos levam a crer que a bactéria possui certo grau de resistência a determinadas substâncias ajudando também no seu controle biológico. Fica também em aberto a possibilidade de manipulação genética dos genes de virulência e avirulência.

Como a citricultura é uma das principais atividades agrícolas do estado, torna-se prioritário o desenvolvimento de novas pesquisas visando o estabelecimento de procedimentos que permitam um controle efetivo da doença. Dadas às dificuldades para se realizar melhoramento genético tradicional em citros, o desenvolvimento de novas variedades através da transformação genética, visando resistência a *X. fastidiosa*, poderia se constituir em uma alternativa atrativa para responder às necessidades dessa cultura.

Com o avanço de técnicas moleculares sofisticadas está sendo possível a transformação da bactéria cuja finalidade seria anular os prováveis genes de função patogênica. Outra abordagem consiste na perspectiva de controle da doença pela ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, através da aplicação de produtos bióticos ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência.

Apesar da grande importância econômica desta bactéria para a indústria citrícola, poucos estudos são feitos tendo em vista a dificuldade de crescimento "in vitro". A maioria destes estudos diz respeito às diferenças genéticas encontradas em linhagens isoladas de diferentes hospedeiros. Apesar de pertencerem à mesma espécie, elas diferem entre si quanto a composição das bases em seu cromossomo principal, bem como outras características fisiológicas que nos levam a crer que possam surgir diferentes patovares futuramente.

### **3.1. O Gênero *Xylella***

Inicialmente quando pesquisadores diagnosticaram a causa de doenças como o mal de Pierce's em videiras, ameixeiras, entre outras plantas, identificaram uma bactéria limitada ao xilema que foi classificada na família *Rickettsiaceae* levando o nome de *Xylemella fastidiosum*, e somente mais tarde é que se verificou que ela não pertencia a esse grupo. O que levou a comprovação desta tese foram estudos moleculares realizados que mostravam que o conteúdo Citosina-Guanina da *Xylella fastidiosa* varia em torno de 49.5 e 53.1 moles % e o conteúdo da *Rochalimaea quintana* da família *Rickettsiaceae* calcula-se por volta de 38.5 moles % (Hopkins *et al.*, 1989). Foi então essa diferença de porcentagem que demonstrou claramente que a *Xylella* não pertencia a família *Rickettsiaceae*. Mais tarde, estudos de caracterização envolvendo métodos bioquímicos, sorológicos, enzimáticos, concluíram que as linhagens

formavam um grupo homogêneo, apesar de algumas diferenças encontradas. Em razão destes estudos Wells *et al.* (1987) propuseram a nomeação de *Xylella fastidiosa* sp Nov.. A partir desta descoberta estudos foram conduzidos a fim de se desvendar características próprias da “nova” bactéria. Atualmente ela é considerada como membro da subdivisão gamma, ordem Lysobacterales, família Lysobacteriaceae, grupo Xanthomonas, gênero *Xylella* com uma única espécie.

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria do tipo bastonete, atríquio, aeróbio, apigmentado, gram-negativa (Minsavage *et al.* 1994; Hill & Purcell *et al.* 1995; Wells *et al.* 1987; Timmer *et al.* 1983;) que foi estabelecida como causadora da Doença de Pierce em uva (Davis *et al.*, 1978) e outras doenças em plantas economicamente importantes como alfafa (Goheen *et al.*, 1973), pêssego (Willis *et al.*, 1983), citros (Chang *et al.*, 1993), ameixa (Raju *et al.*, 1982), café (Lima *et al.*, 1998), amêndoa (Mircetich *et al.*, 1976) e outras plantas (Hartung *et al.*, 1994; McCoy *et al.*, 1978; Leu *et al.*, 1993; Hearon *et al.*, 1980; Kostka *et al.*, 1986; Sherald *et al.*, 1987; Timmer *et al.*, 1983).

Em testes sorológicos e bioquímicos, possuem a capacidade de hidrolisar gelatina, utilizar hipurato, não fermentar a glicose, e apresentam reação negativa para os testes de indol, H<sub>2</sub>S, β galactosidase, lipase, coagulase e fosfatase. Apresenta teste para catalase positivo, são nutricionalmente fastidiosas e estritamente aeróbias e seu crescimento pode ser inibido com uma concentração de 2,5% de CO<sub>2</sub> (Wells *et al.*, 1987).

Medem cerca de 0,2 a 0,53μm de largura por 0,9 a 3,5μm de comprimento (Wells *et al.* 1984). Revelaram-se dois tipos de colônias, opalescentes lisas e opalescentes rugosas em diferentes linhagens (Wells, *et al.*, 1987). O meio líquido com culturas de *Xylella fastidiosa* geralmente possui aspecto disperso com células únicas, porém, algumas linhagens formam agregados (Wells *et al.*, 1987).

A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é de 28°C sendo portanto considerada uma bactéria mesófila. Temperaturas extremas como 5°C e 32°C bloqueiam o crescimento da bactéria (Feil *et al.*, 2001).

A *Xylella fastidiosa* necessita de meios um tanto complexos para seu crescimento e desenvolvimento (Wells *et al.*, 1984). Um composto comum aos meios XF -26 e PD2 é o Citrato trissódico e Succinato dissódico utilizados como fontes de energia da bactéria. O suplemento em Ferro foi observado como tendo papel numa melhor promoção do crescimento. Os sais inorgânicos desempenham funções como componentes de proteínas, como o ferro que participa da composição de várias proteínas enzimáticas ou não, de citocromos; cofatores de enzimas, como o magnésio, potássio, molibdênio; componentes de estruturas e

osmorreguladores (Barbosa & Torres, 1999). Porém as variabilidades de meio a serem usados dependem da linhagem de bactéria usada, pois cada linhagem pode diferir quanto as suas exigências nutricionais, mas conservando alguns componentes comuns necessários ao crescimento da bactéria. O conhecimento das composições dos meios auxilia na compreensão das exigências nutricionais e metabolismo da bactéria.

A *Xylella fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter o seu genoma seqüenciado por completo. Sabe-se que ela possui quase 2,7 milhões de pares de bases em seu cromossomo circular, um terço maior do que esperavam os pesquisadores e o quinto mais extenso, dos quais 52.7% é rico em GC (Simpson *et al.*, 2000). Dentro desse pares de bases estão cerca de 2.900 genes dos quais muitos já possuem funções precisamente descritas (Simpson *et al.*, 2000). Apresenta também dois plasmídeos com, 51.158pb e 1285pb (Simpson *et al.*, 2000).

Dentro destes 2.900 genes, foram detectados vários deles com função conhecida em outros organismos que devido à homologia encontrada na *Xylella* sugerem que apresentem função similar. Dos genes encontrados alguns foram associados a patogenicidade (Revista Citricultura Atual 2000), porém testes “*in vivo*” devem ser realizados para que se possa afirmar se estes genes estão envolvidos na patogenicidade e se são expressos.

Embora todas as espécies de *Xylella fastidiosa* estejam agrupadas em um único grupo, elas diferem entre si com relação a hospedeiros, patogenicidade, nutrição, velocidade de crescimento em meios de cultura e homologia de DNA. Segundo Wells *et. al* (1987) o “doubling time” entre as linhagens variam entre 0,45 dias a 1,98 dias em meio PW, já em meio BCYE este tempo é aumentado. As linhagens isoladas de videira, amêndoa, olmo e amora são as que possuem um crescimento mais rápido em meio de cultura PW e o seu “doubling time” varia entre 0,5 a 1,6 dias. Foi relatado o “doubling time” do isolado da Doença de Pierce’s em 9 horas (Davis *et. al.*, 1981). Os isolados de pêssogo e ameixa apresentam dificuldades para se desenvolverem em meio de cultura sintéticos (Wells *et. al*, 1987).

A importância da *Xylella fastidiosa* está no fato dela estar associada à infecção de populações de frutos economicamente importantes como café, videira e citros, afetando a produção e o desenvolvimento destas culturas causando um prejuízo anual considerável para os produtores. Esse prejuízo somente na área citrícola é estimado em aproximadamente US\$100 milhões anuais para o Brasil (Revista Pesquisa FAPESP JULHO 2000).

A infecção causada pela *Xylella* apresenta sintomas variados dependendo do tipo de planta ela ataca, mas os sintomas mais comuns são escaldadura das folhas, requeima, nanismo, enfezamento que resulta em frutos pequenos e Clorose Variegada dos Citros (CVC) (Beretta *et al.*, 1996).

É considerada como uma bactéria limitada ao xilema ficando restrita a esse canal de seiva, multiplicando-se e apenas colonizando-o, bloqueando o fluxo normal de fluido pelos vasos da planta, e ainda não se tem especificado se ela produz algum tipo de reação patógena. O modo como ela se fixa ao xilema das plantas é citado por Hopkins (1989) como sendo uma adesão no interior dos vasos xilemáticos conferindo a bactéria uma situação vital para sua existência e sobrevivência no local por ela infectado.

O termo “xylem limited bacteria” (XLB) é usado para descrever as bactérias que são difíceis de serem isoladas por procedimentos bacteriológicos padrões (Xylella. htm). Sabe-se ainda que ela não é capaz de infectar o interior dos tecidos das plantas infectadas (Purcell & Hopkins 1996). O conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade da *Xylella fastidiosa* é ainda desconhecido, mas grandes pesquisas estão sendo feitas neste aspecto.

### **3.2. Doenças causadas por *Xylella fastidiosa***

#### **3.2.1 . Clorose Variegada dos Citros**

Sem dúvida a principal doença causada pela *Xylella fastidiosa* no Brasil é a Clorose Variegada dos Citros. A CVC é uma doença que ataca as culturas de laranja e também pode ser chamada vulgarmente de “amarelinho” por se caracterizar apresentando pontos amarelados na superfície das plantas afetadas (Rossetti & De Negri, 1990).

Ultimamente tem se tornado uma das mais importantes doenças agrícolas do país por representar grande perda econômica na área (Scheinberg, 2000). Ela afeta as principais espécies doces de laranjas comerciais (Pêra, Valência, Baianinha, Natal, Hamlin, Folha Murcha e Barão) (Carvalho, 1994) fazendo com que o tamanho dos frutos fique reduzido tornando-os imprestáveis para comercialização “in natura” e produção de sucos concentrados. A doença foi constatada no Brasil e Argentina, onde se chama “fruta bolita” (XYLELLA. html). Relatos da presença de *Xylella fastidiosa* em culturas na Ásia (Leu & Su, 1993) e Europa (Berisha *et al.*, 1998) demonstraram uma ampla distribuição desta bactéria.

Também são afetados diferentes porta enxertos como *Citrus reshni*, *C. sunki*, *C. limonia*, *C. paradisi* x *C. trifoliata* (Laranjeira *et al.* 1998). Porém não foram diagnosticados os sintomas em tangerinas comerciais como Cravo, Poncan, Tangor, Murcote.

O Brasil responde por 50% da produção mundial de laranja, sendo o seu estado de maior produção o estado de São Paulo, seguido pelos Estados Unidos que mantém a margem de 17% desta produção pelo estado da Flórida.

A maior parte da produção nacional de laranjas é destinada a fabricação de sucos concentrados (70%) que pode alcançar valores anuais de lucros por volta de 1.2 a 1.4 bilhões de dólares, restando, portanto uma porção de cerca de 26% para o consumo interno. Em 2001, o Brasil exportou cerca de 1.200 toneladas de suco concentrado (FAO.org).

Apesar do Brasil ser o maior produtor mundial de laranjas problemas como a CVC, leprose, cancro cítrico, entre outras fazem com que o controle de qualidade dos frutos seja relativamente dificultado em função do alastramento e difícil controle dessas pragas dos pomares (Machado, 1997).

Das 200 milhões de árvores cítricas espalhadas pelo estado de São Paulo, 30% mostraram-se com sintomas da CVC entre 1999 e 2000 onde a severidade e a incidência da doença também se mostraram aumentadas. Em 1996 a incidência de CVC na região sul de Minas e Norte e nordeste de São Paulo era de 26% e em 2001 subiu para 37% (FUNDECITROS). A CVC também representa o maior impedimento na indústria citrícola brasileira ocasionando perdas estimadas em até 1 bilhão de dólares decorrentes da destruição de árvores sintomáticas (Quin *et al.*, 2001).

A partir do momento em que se diagnosticou a doença em citros, medidas foram tomadas a fim de controlar a doença. Começou então incessantes pesquisas para o desenvolvimento de técnicas para o controle da CVC.

O Primeiro relato de que se têm notícias sobre a CVC no Brasil data de 1987 em pomares da região de Triângulo Mineiro e desde então têm se espalhado por regiões do estado de São Paulo (Lee *et al.*, 1993). A doença também foi diagnosticada no Mato Grosso do Sul e arredores de Campinas (Tubelis, 1993) além de ultrapassar fronteiras do estado do Rio de Janeiro (Lee *et al.*, 1991), Goiás, Sergipe, Santa Catarina (Tubelis, 1993), Paraná (Leite *et al.*, 1993), e região da Zona da Mata em Minas Gerais (Mizubuti *et al.*, 1994).

Os sintomas nas plantas demoram a aparecer devido a natureza fastidiosa da bactéria, mas geralmente os primeiros aparecem nas folhas, seguindo para os frutos até afetarem toda a planta. Em pesquisas de campo foram observados que a doença é mais severa quando atinge plantas jovens diminuindo a severidade conforme as plantas vão envelhecendo (CVC, html), porém quando se trata de incidência esta é maior em plantas mais velhas com 6 a 10 anos chegando a índices de 48% (FUNDECITRUS). Isto provavelmente se deve ao fato do tempo de aparecimento dos sintomas.

Os principais sintomas observados são clorose nas folhas maduras das copas, as folhas apresentam-se com pontuações circulares e amareladas em sua face superior, e na face inferior apresentam lesões de cor palha, às vezes necrosadas. Com o agravamento da doença, os frutos ficam queimados pelo sol e de tamanho reduzido e endurecidos com maturação precoce. Nesse estágio são imprestáveis para o comércio (Donadio *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1991; Rossetti & De Negri, 1990). Em plantas já bastante afetadas é comum evidenciar a presença de ramos secos, desfolhados e com pencas de frutos miúdos.(CVC. html) Em árvores com mais de 15 anos, estes sintomas são mais localizados, e raramente a árvore toda é afetada.

Em um estudo feito por Hartung (1994) mostrou que talvez a causa mais provável de transmissão da CVC seja feita originariamente de ervas daninhas ou outras culturas e levadas até os pomares pelos insetos vetores que são cigarrinhas sugadoras que se alimentam do fluido xilemático de plantas infectadas, e ao se alimentarem de outra planta sadia transmitem a doença à mesma.(cigar. html 2000).

As principais espécies de vetores são as chamadas cigarrinhas do xilema, *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* (Roberto *et al.* 1996). Nas videiras, o principal inseto vetor é o *Graphocephala atropunctata* (Hill & Purcell, 1995), mas também há considerações de que o *Oncometopia nigrans* e *Homalodisca coagulata* sejam insetos vetores, visto que foram descobertas células de *Xylella* colonizando o canal alimentar destes insetos (Brlansky *et al.*, 1983). Recentemente novas espécies de cigarrinhas foram encontradas como sendo vetores potenciais da C.V.C., tais como, o *Bucephalagonia xanthophis* que é muito encontrada em viveiros, *Plesiommata corniculada* que é muito abundante e facilmente observada em gramíneas. Outras espécies estão sendo estudadas como sendo vetores da CVC são elas a *Hortensia similis*, *Macugonalia cavifrons*, *Molomes cincta*.(cigar. html 2000).

Segundo a Revista do Fundecitrus (ano XIV nº99) recentes pesquisas realizadas sobre a ação, reprodução de vetores eficientes de transmissão da *Xylella*, verificou-se que certas espécies de cigarrinhas, como o *Dilobopterus costalimamai* não sobrevivem em ambientes onde só existem plantas de citros, ou seja, necessitam de outras espécies de plantas para completar o seu ciclo biológico. Esta pesquisa reforça a hipótese de que em pomares contaminados por *Xylella fastidiosa* deve haver uma outra espécie de planta hospedeira da praga para que o ciclo do vetor se finalize.

No Estado de São Paulo existem cerca de 26 milhões de plantas com sintomas de nível um, ou seja, só nas folhas e outras 68 milhões de árvores têm os sintomas da CVC. A região de maior índice de casos da doença continua sendo a região Norte do estado seguida das regiões Noroeste e Central (FUNDECITRUS, 2001). O fato de a região Norte ser a mais

afetada deve-se a hipótese de que lá o déficit hídrico é mais acentuado e é onde se encontra uma população de cigarrinhas cinco vezes maior que na região Sul (Revista Fundecitus n.99). Outro fato que alguns autores também consideram seria a presença de diferentes linhagens do patógeno em diferentes regiões resultando na diferença de severidade e incidência da doença (Quin *et al.*, 2001).

Apesar destes números terem baixado se comparado a outros estudos, os sintomas da doença se tornaram mais severos. O que se têm feito em relação frente a essas estatísticas é fazer o manejo adequado de mudas e controle biológico dos insetos vetores.

A incidência da CVC pode ser reduzida significativamente se forem removidas as plantas jovens sintomáticas e os galhos afetados de plantas mais velhas (Derrick *et al.* 2000). Dentre as técnicas de manejo mais citadas temos a utilização de plantas sadias de viveiros conhecidos e comprovadamente sem fonte de inóculo e a poda das plantas de acordo com os sintomas e a idade.(CVC. html). Uma outra técnica citada por Derrick (2000) para o controle da CVC é baseada na poda ou remoção de árvores sintomáticas em companhia dos insetos e controle das ervas daninhas. Essa técnica tem sido usada em larga escala pelos produtores brasileiros. Para o controle dos insetos o que se tem feito é a monitorização desses insetos como aplicação de amadilhas adesivas amarelas, observações visuais, redes entomológicas e controle químico com pulverizações (cigar. html).

### **3.2.2. Mal de Pierce em Videiras**

A Doença de Pierce ou Mal de Pierce é uma doença letal para as videiras e pode ser amplamente difundida através de insetos vetores assim como a CVC (Hopkins *et al.*, 1989). Este mal foi somente diagnosticado da América do Norte à América Central e em algumas regiões na América do Sul. Está presente em alguns vinhedos da Califórnia onde há uma das maiores perdas de produção (Albibi *et al.*, 1998). O mal acomete algumas espécies de videira mas algumas muscadíneas e híbridos são tolerantes ou resistentes. Assim como a CVC, o Mal de Pierce prevalece nas estações de temperaturas mais quentes.

A primeira evidência da doença geralmente aparece como escaldadura das folhas e ressecamento. As folhas tornam-se cloróticas nas marginais até progressivamente necrosarem. Isto pode ocasionar frutos impróprios para a produção de vinhos e mesmo para o consumo interno. Contudo os sintomas da Doença de Pierce pode variar de acordo com a espécie de videira afetada (Albibi *et al.*, 1998).



### 3.2.3. Outros hospedeiros de *Xylella fastidiosa*

Um dos fatos mais preocupantes para a comunidade científica é o fato da *Xylella fastidiosa* possuir uma gama de hospedeiros naturais muito extensa, podendo ser transmitida para cerca de 100 espécies diferentes (Freitag 1951). Alguns dos seus hospedeiros são espécies vegetais que infestam os pomares de cultura de frutos, não apresentando sintomas, o que dificulta a identificação do inóculo.

As linhagens de *Xylella fastidiosa* possuem também os hospedeiros ditos alternativos que emergem nos conceitos sobre fonte de inóculo que afetam os pomares. Até os dias atuais nenhum pesquisador publicou estudos relatando a relação entre os hospedeiros alternativos e *Xylella fastidiosa* causadora da CVC, e nenhuma erva daninha foi relatada (Derrick *et al.*, 2000).

Em 1989 Hopkins verificou que os hospedeiros de linhagens de *Xylella fastidiosa* que causa a doença de Pierce somam-se por volta de 28 espécies de plantas incluindo mono e dicotiledôneas sendo a maioria do tipo arbórea e perene (Purcell 1997).

Entre os hospedeiros da linhagem da videira incluem: Alfafa (*Medicago sativa*); *Rubus* sp; *Prunus amygdalus*; *Sambucus canadensis*; *Callicarpa americana*; *Paspalum Dilatatum*; *Ampelopsis arborea*, *Cornium maculatum*, *Parthenocissus quinquefolia* com presença de sintomas e existem também hospedeiros desta linhagem que não apresentam sintomas como o caso de *Montia lineares*; *Vinca minor*; *Cyperus eragrostis*; *Fragaria vescas* (Hopkins 1989).

Outras linhagens da bactéria também hospedam plantas causando outras doenças: *Baccharis halimifolia*; *Ulmus americana*; *Solidago fistulosa*; *Morus rubra*; *Quercus* ssp.; *Prunus persica*; *Vinca minor*; *Acer rubrum*; *Prunus* spp. *Plantanus occidentalis*, *Rhus* sp (Hopkins, 1989).

Já as espécies *Montia linearis*, *Vinca minor*, *Cyperus eragrostis*, *Fragaria vescas*, não apresentam os sintomas da linhagem de bactérias que causam a Doença de Pierce; *Sorghum halapense*, *Ambrosia artemisiifolia* não apresentam os sintomas causados por outras linhagens de *Xylella* (Hopkins 1989).

Esses estudos feitos na Flórida em 1989 foram apenas uma pequena fração da gama de hospedeiro que a *Xylella* possui. Atualmente conhece-se no Brasil várias espécies de hospedeiros tidas como plantas invasoras de pomares. Por exemplo, em pomares de ameixa são conhecidas as espécies *Braquiaria plantaginea* (capim-marmelada), *Paspalum urvillei*

(capim-estrada), *Digitaria* sp (capim-colchão), *Pennisetum clandestinum* (capim-quicuí), *Richardia* sp (poaia branca), *Vernonia* sp (assa-peixe) (Leite *et al.* 1997).

Outras espécies de plantas infestantes foram identificadas segundo Lopes *et al.* (1999) no estado de São Paulo: Apaga-fogo (*Alternanthera tenella*), braquiária (*Brachiaria decumbens*), capim-carrapicho (*Cenchrus echinatus*), capim-amargoso (*Digitaria insularis*), erva de Santa Luzia (*Euphorbia hirta*), erva-quente (*Spermacoce latifolia*), maria preta (*Solanum americanum*), picão (*Bidens pilosa*), e tapoeraba (*Commelina benghalensis*). Porém as plantas hospedeiras de maior importância econômica para o nosso país são *Coffea arabica* e *Citrus* spp. devido ao seu índice de contaminação e perdas monetárias que representam.

Alguns outros hospedeiros relatados de *Xylella fastidiosa*: Oleander, carvalho, amêndoa, pêssego, pêra, café, Maple, amora, Olmo, Sycamore.

### 3.3. Variabilidade Genética

Existem muitas evidências da existência de grupos de similaridade genética em *Xylella fastidiosa*, que apesar de não apresentar uma classificação intra-específica, se espera que em pouco tempo venham a surgir subespécies ou patovares.

Em estudos feitos por Purcell *et al.* (1996) a diferenciação é tão clara que afirmam ser óbvia, porém com algumas dificuldades como a probabilidade de diferentes linhagens causarem a mesma sintomatologia em hospedeiros comuns, necessitando ser descoberto um novo hospedeiro para a linhagem de referência até que se possa criar um novo patovar. Esse estudo também relata a variação na gama de hospedeiros, nível de "fastidiosidade" e homologia de DNA. Foram realizadas análises baseadas na técnica de RAPD, onde foi possível distinguir diferentes grupos de acordo com hospedeiros e fator de virulência: grupo do carvalho; grupo da uva, alfafa, ambrósia americana, amêndoa; grupo da amora; grupo da ameixa; e o grupo do citros. Porém esses resultados preliminares devem ser seguidos de comparações com mais linhagens da bactéria. Em um estudo anterior onde foi utilizada a mesma técnica entre 11 linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de ameixeira, amendoeira, citros, elmo e videira os resultados foram semelhantes com exceção da linhagem de amêndoa que compreendeu um grupo isolado separado da linhagem da videira (Pooler & Hartung, 1995). As linhagens de café também formam um grupo isolado das linhagens de citros apesar de serem muito semelhantes (Lacava *et al.*, 2000).

Chen *et al.* (1992) propuseram um outro estudo das variabilidades genéticas usando técnicas como RFLP em 24 linhagens de *Xylella fastidiosa* de 8 hospedeiros diferentes, revelaram diferenças entre as linhagens segundo a sua patogenicidade, requerimento

nutricional, e também, homologia de DNA. Para este estudo, foram usadas enzimas de restrição como *Bam*HI ou *Hind*III para as clivagens. O polimorfismo não foi detectado com duas digestões da enzima *Bam*HI; tornou-se necessário combinações das duas enzimas.

É neste contexto que estudos moleculares apresentam papel essencial na diferenciação, principalmente com a utilização de técnicas de RAPD e RFLP. Foi possível observar que o coeficiente de similaridade entre as linhagens de *Xylella fastidiosa* e da *X.c. campestris* mostrou-se menor que 0.08 indicando portando uma pequena relação genética entre estas duas espécies com relação à discriminação conferida pela análise de RFLP com seleção aleatória de sondas genômicas (Chen *et al.*, 1992), comparando com Wells *et al.*, que ao criarem o gênero e a espécie em 1987 afirmaram serem bactérias relacionadas. Em contraste o coeficiente de similaridade entre as linhagens de *X. fastidiosa* foi maior que 0.58 sugerindo que todas as linhagens de *X. fastidiosa* examinadas pertenceriam a um mesmo grupo homogêneo em relação a espécies.

Análises de coeficiente de similaridade, são indicativas de que as linhagens que causam doenças em videiras, alfafa e amêndoas compreenderiam um mesmo RFLP grupo. Isto reforça o estudo sugerido por Davis *et al.* (1980) que a doença de Pierce em videiras seria causada pela mesma linhagem da bactéria, concordando com os ensaios de Chen *et al.* (1995). Todas as linhagens de bactérias do grupo de doença de Pierce (videira) mostraram coeficiente menor que 0.61-0.69 sendo assim um grupo bem uniforme. Ao grupo das videiras incluem-se as linhagens de ambrósia, amora. As linhagens isoladas de ameixa e olmo compreendem um mesmo RFLP grupo próximo a vinca e distantes da videira. Wells e Raju (1987) realizaram um ensaio que possibilitou a diferenciação entre as duas linhagens (ameixa e olmo) baseado na extensão de crescimento em meio PW. O objetivo maior desta pesquisa feita por Chen era mostrar que pela análise de RFLP era possível detectar variações genéticas entre as linhagens de *X. fastidiosa*. Em 1992, foi publicado um estudo que revelava a diferenciação entre estirpes de videira por observação da produção de diferentes tipos de proteases (Fry *et al.*, 1992).

Durante estudos realizados por Kamper *et al.* (1985), foram analisados vários pontos em questão sobre a relação genética entre as linhagens de *Xylella fastidiosa* como composição de DNA, peso molecular do genoma, e homologia de DNA. As linhagens analisadas foram de ameixeira, pessegueiro, videira, vinca. Os resultados mostraram que o conteúdo de C+G do DNA das bactérias analisadas foram de  $50.6 \pm 0.5$  mol%. Estes resultados mostraram-se menor quando comparados com o estudos prévios de Davis *et al.* (1981) e Wells e Raju (1984) que apresentaram valores variando entre 52.0 a 53.1 mol% de C+G. Já o peso do genoma molecular encontrados por Kamper foi de  $1.4 \times 10^{9+}$   $0.2 \times 10^9$  e a identidade de DNA entre as

linhagens quando comparadas à linhagem de ameixa mostrou-se 85% para a linhagem de pêssego, 97% para vinca, 75% para a linhagem causadora da doença de Pierce.

Utilizando a técnica de RAPD para analisar a diversidade genética entre populações de *Xylella fastidiosa* isoladas plantas cítricas, verificou-se uma baixa variabilidade entre estes isolados (Rosato *et al.*, 1998; Lacava *et al.* 2000). Mais tarde a fim de confirmar os resultados prévios, foi realizado novamente um estudo sobre esta variabilidade genética dentro de um mesmo hospedeiro e o que se pôde concluir é que existem duas populações dentro das linhagens de citros isoladas de diferentes regiões geográficas do Brasil: uma formada por linhagens isoladas da região sul e outra por linhagens dos estados de SP e SE (Mehta *et al.*, 2001).

Outros estudos sobre polimorfismo genético de linhagens da bactéria *Xylella fastidiosa*, constatou novamente a pequena diversidade genética entre isolados de citros e café. Uma grande variabilidade entre os isolados de ameixa do Brasil e da América do Norte foi relatado com índice de 0,48% de similaridade, o que classifica o isolado do Brasil no mesmo grupo do citros e café e coloca o isolado da América do Norte juntamente com o isolado da videira do mesmo continente (Costa *et al.*, 2000).

Além das tradicionais técnicas moleculares usadas para diferenciação genética entre linhagens de bactérias (RAPD, RFLP, etc.) ressalta-se, porém uma técnica relativamente recente para estudos de caracterização e diferenciação de linhagens em procaríotos. Esta técnica utiliza como princípio a análise de pequenas sequências repetidas de nucleotídeos (SSRs – *Short sequences repeats*) em um número variável de repetições ao longo do genoma (VNTR-*variable number of tandem repeats*) e também foi utilizada com sucesso para a diferenciação entre linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de citros de diferentes regiões geográficas do Brasil (Coletta-Filho *et al.*, 2001)

Quanto ao perfil eletroforético de proteínas totais, o que encontra é uma similaridade entre os padrões obtidos das linhagens isoladas de videira, ambrósia, ameixa e citros (Rodrigues Neto *et al.*, 1992). Outros estudos foram conduzidos com outras linhagens da bactéria. O resultado obtido foi que a linhagem de pêra mais uma vez mostrou-se bem diferenciada em relação aos perfis de bandas obtidos. As linhagens de ameixa não puderam ser diferenciadas pela análise de proteínas totais, o mesmo não acontece com as linhagens de citros onde a estirpe X0 apresentou padrões diferentes em relação as outras analisadas (Mehta *et al.*, 2001). Distinguiu-se portanto 6 grupos por SDS-PAGE: videira, café, X0, outras linhagens de citros, ameixa e pêra.

### 3.4. O uso de rDNA como método de análise

Em 1965 Emile Zuckerkandl e Linus Pauling introduziram a idéia de que moléculas poderiam ser “documentos da história evolucionária” ou “cronômetros moleculares”. Uma década depois, Carlos Woese e seus colaboradores identificaram o gene 16S rRNA e estabeleceram para ele um papel como método padrão, não só para filogenia, mas também para identificação de bactérias com relação à família, gênero e espécie (Woese, 1987). Logo depois desenvolveram a primeira árvore filogenética baseada no gene 16S. Desde então, o uso de seqüências de rDNA como indicadores evolucionários, vem sendo amplamente empregado. Hoje em dia, na era genômica, técnicas como PCR auxiliam e agilizam a análise uma vez que, não requerem um cultivo “*in vitro*” das bactérias a serem analisadas e, portanto ganha uma enorme vantagem das técnicas clássicas de taxonomia (Woese, 1987).

A análise das seqüências das subunidades menores do rDNA, como o gene 16S, é tida como um método poderoso e preciso para a determinação das relações intra e interespecíficas. Contudo, a diminuição da distância evolutiva, e a baixa diversidade encontrada neste gene, isto geralmente é insuficiente e, portanto a relação genética de espécies intimamente relacionadas não pode ser precisamente definida (Rogall, *et al.*, 1990).

Em contraste às seqüências do gene 16S para identificação de bactérias, a heterogeneidade presente na região espaçadora 16S-23S tem sido amplamente explorada também para a identificação de bactérias (Tyler *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 1993). Foi demonstrado que os polimorfismos encontrados na seqüência de bases e na extensão do espaço intergênico pode ser usado para discriminação entre diferentes espécies de procariontes (Barry *et al.*, 1991). Portanto foi proposto aos pesquisadores o sequenciamento do espaço intergênico 16S-23S, que poderia superar este problema porque possui maiores variações em seqüência e extensão (Barry *et al.*, 1991, Dolzani *et al.*, 1995, Leblond-Bourget *et al.*, 1996, Navarro *et al.*, 1992). Realmente a análise desta região diferencia com sucesso linhagens de vários grupos de bactérias (Jeng *et al.*, 2001; Garcia-Martinez *et al.*, 1999, Mehta *et al.*, 2001) e o sequenciamento do espaço entre os genes 16S e 23S tornou-se viável por comparação.

### 3.5. Análise da região espaçadora rDNA 16S-23S

O uso das seqüências de nucleotídeos da região espaçadora rDNA 16S-23S é um método amplamente usado para estudos de variabilidade genética e filogenia entre bactérias (Leblond-Bourget, *et al.*, 1996; García-Martinez, *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 2001, Jensen *et al.*, 1993) e vêm se tornando um importante suplemento às sequências do gene 16S (Nagpal *et al.*,

1998). Este espaço pode ser amplificado facilmente levando-se em conta a vantagem de regiões altamente conservadas de nucleotídeos nos genes adjacentes 16S e 23S.

Entre as espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas Gürtler (1996) reporta que pelo menos a metade delas carrega apenas uma única cópia do rDNA. Em um único genoma é possível encontrar com frequência múltiplas cópias do *locus* genético rRNA (Jensen *et al.*, 1993) No genoma de procariontes, o operon *rrn*, tipicamente começa com o rDNA 16S, seguido de um espaço, o rDNA 23S, um segundo espaço e o rDNA 5S com a presença de genes tRNA nos espaços intergênicos (Chen *et al.*, 2000). O número de cópias do gene operon *rrn* no genoma bacteriano depende da razão de crescimento e pode ser tanto dez (10) quanto uma cópia apenas (Cole & Saint Girons, 1994; Kostman *et al.*, 1992). Algumas bactérias fastidiosas incluindo *Archea*, *Micobacterium* e *Micoplasmas* possuem apenas uma cópia do rDNA. Alguns autores acreditam que bactérias que possuem poucas cópias do gene operon *rrn*, sejam mais fastidiosas do que aquelas com mais cópias (Kiss *et al.* 1977). Estudos citando a relação entre o número de operons e velocidade de replicação cita a *Escherichia coli*, com sete cópias do gene operon *rrn*, que cresce muito mais rápido que a *Rickettsia prowazekii* e *Mycoplasma capricolum* com uma e duas cópias respectivamente (Kiss *et al.* 1977).

O que hoje se sabe sobre o número de operons em *Xylella fastidiosa* são a existência de dois operons (Simpson *et al.*, 2001) e onde mais dois estudos relataram a presença dos mesmos números de operons *rrn* (Schneider & Seemuller, 1994; Chen *et al.*, 2000). Segundo Chen (2000) sua hipótese pode ser reforçada pelos estudos realizados com análises enzimáticas onde foram revelados resultados que a comprovem. Já outros estudos sugerem que exista apenas uma cópia do operon em *Xylella fastidiosa* reforçado pela hipótese de que as ampliações realizadas por PCR revelaram apenas uma banda quando analisada em gel de agarose (Rosato *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 2001). Estes estudos devem portanto ser reforçados a fim de mostrar-nos com fidelidade o número de operons existentes em *Xylella fastidiosa* apesar de concordar que bactérias fastidiosas possuam menos cópias do gene operon.

Enquanto isto em *Xanthomonas campestris*, foi relatado a existência de dois a cinco *rrn* operons (Chan, 1999). As variações encontradas entre diferentes espécies de bactérias nesta região possivelmente se devem ao número e tipos de genes de tRNA presentes (Gürtler & Stanisich, 1996).

Em *Xylella fastidiosa*, dois estudos foram realizados com a região espaçadora a fim de determinar uma relação filogenética entre as estirpes (Metha *et al.*, 2001; Hendson *et al.*, 2001). Estudos estes que se diferenciam pelo método usado na filogenia e também pela escolha das estirpes analisadas.

De acordo com estudos de Hendson *et al.* (2001) sobre análise da região 16S-23S de diferentes estirpes de *Xylella fastidiosa* isoladas da Califórnia, pode-se concluir que as mesmas podem se subdividir em 4 grupos: I - Grupos das amêndoas, pêssegos e amora; II – Grupo do carvalho; III – Grupo do oleander; IV – grupo das videiras e algumas amêndoas. Neste experimento não foram inclusos os grupos de citros e café.

Quando se inclui os isolados de citros e café, os agrupamentos de diferenciam formando apenas dois grupos distintos: I – Grupo do citros, café, ameixa, pêssego e carvalho; Grupo II – Grupo oleander, videira e *Acer macrophila* (Mehta *et al.*, 2001).

Sobre a existência de unidades funcionais no *operon* foi reportado a presença de 3 tipos: As seqüências *BOX A*, tRNA's, sítios de ação de ribonucleases rIII.

Em 2000, Chen fez um estudo para apresentar informações sobre a presença de genes de tRNA no espaço intergênico 16S-23S de *Xylella fastidiosa* e verificou a existência de dois tipos de genes para tRNA, para o aminoácido alanina e para a isoleucina. Foi também reportado a homologia dos genes e verificou-se que, entre 51 seqüências disponíveis no Banco de Dados, 50% apresentavam 100% de identidade no gene tRNA<sup>ala</sup> e 48% no gene para tRNA<sup>ile</sup>.

Estudos conduzidos a fim de avaliar a composição deste espaço intergênico 16S-23S da *Xylella fastidiosa* verificou-se que nas ampliações realizadas com DNA de várias linhagens da bactéria, houve apenas um fragmento amplificado de padrões de banda semelhantes mostrando que não há polimorfismos quanto à extensão de diferentes operons (Rosato *et al.*, 1998). O padrão de bandas obtido pela análise de RFLP revelou um mesmo padrão para as linhagens de CVC e café, mas diferentes para outros hospedeiros. Este resultado foi confirmado por Metha (2000) quando foi seqüenciada a região em questão.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Piracicaba – SP.

##### **4.1. Linhagens de *Xylella fastidiosa* usadas e condições de cultivo**

Linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros foram adquiridas da coleção da Fundação André Tosello – Campinas/SP (Tabela 01). As linhagens estão identificadas de acordo com a numeração da Fundação. As amostras estavam estocadas em glicerol a -80°C. Para o uso, elas foram retiradas do freezer -80°C. e mantidas em recipiente com gelo até seu total descongelamento. Uma alíquota de 30µl de suspensão bacteriana de cada linhagem foi repicada e espalhada sobre a superfície de uma placa de Petri com meio de cultura PW ágar 1,5% (Davis *et al.*, 1981) sólido e mantidas por aproximadamente 25 dias a 28°C até seu crescimento. Após este período, as bactérias foram transferidas para tubos Falcom estéreis de 15ml contendo 5ml de meio PW líquido e mantidas a 28°C sem agitação para posterior extração do DNA.



**Tabela 1.** Isolados de *Xylella fastidiosa* adquiridos da Fundação André Tosello utilizados neste estudo.

ISOLADO	HOSPEDEIRO	ORIGEM GEOG.	FONTE	ATCC **
9a5c	Citros	Macaubal, SP	IAC	
CSR1	Café	Sta Rita Passa Quatro, SP,	CCT*6738	
P3	Café	Pindorama, SP	CCT 6740	
MUL-1	Amora	Massachussetts, USA	CCT 6744	ATCC 35868
MUL-3	Amora	Massachussetts, USA	CCT 6745	ATCC 35869
ALS-BC	Amêndoa	Califórnia, USA	CCT 6746	ATCC 35870
ELM-1	Olmo	Washington, USA	CCT 6748	ATCC 35873
RGW-R	Ambrosia	Flórida, USA	CCT 6749	ATCC 35876
PCE-GG	Videira	Califórnia, USA	CCT 6750	ATCC 35877
PWT-22	Vinca	Flórida, USA	CCT 6751	ATCC 35878
PCE-FG	Videira	Flórida, USA	CCT 6753	ATCC 35881
	Café	Marília, SP	CCT 6755	
	Videira	USA	CCT 6068	ATCC

- \* Coleção de Culturas Tropicais do acervo da Fundação André Tosello – Campinas/SP.
- \*\* ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA); L.W. Moore, Oregon State University (Corvallis, OR, USA).

#### 4.2. Perfil de crescimento dos isolados.

Para a determinação do perfil de crescimento dos isolados de *Xylella fastidiosa*, foram realizadas curvas de crescimento seguindo os procedimentos padrões. Para o inóculo inicial foram cultivadas colônias dos isolados em 5,0mL de meio PW líquido (Davis *et al.*,1981) a 28°C com agitação orbital de 210 rpm e sem iluminação. Após sete dias, 2,5mL dessa, foram transferidos para 50mL de meio líquido fresco. A cada 24 horas, alíquotas de 2mL foram retiradas para a leitura em espectrofotômetro (UV/VIS Spectrophotometer Lambda Bio - Perkin Elmer) para determinar a densidade óptica das amostras. As leituras foram realizadas sob absorvância de  $A_{=640}$  nm.

#### 4.3. Extração do DNA genômico de *Xylella fastidiosa*

##### 4.3.1. Metodologia 1

##### 4.3.1.1. Soluções utilizadas

#### **4.3.1.1.1. Tampão TE**

Tris-HCl 1M

EDTA 0,5 M

#### **4.3.1.1.2. SDS 10%**

#### **4.3.1.1.3. NaCl 5M**

#### **4.3.1.1.4. CTAB 10%**

#### **4.3.1.1.5. Clorofil (Clorofórmio-/ álcool isoamílico 24:1)**

#### **4.3.1.1.6. Clorofane (Fenol/Clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1)**

#### **4.3.1.1.7. Solução de álcool etílico 70%**

#### **4.3.1.1.8. Proteinase K (20mg/ml)**

#### **4.3.1.1.9. Solução de RNase**

#### **4.3.1.1.10. TBE 10X**

Para a obtenção de DNA genômico dos diferentes isolados, foi utilizado um método de extração de DNA total segundo Dunningan, 1997. Colônias de *Xylella fastidiosa* foram mantidas em meio PW líquido a 28°C sem agitação por 6 dias. As colônias foram submetidas à centrifugação (Centrífuga Sorvall RT 6000D) a 3.000rpm por 20 minutos a 4°C para que o meio de cultura fosse descartado restando somente as células bacterianas. O pellet formado foi ressuscitado em 600µl de TE através de repetidas pipetagens. Foi então adicionado 30µl de SDS 10% (concentração final de 0,5%) e invertido o tubo várias vezes. Adicionaram-se 20µl de uma solução de 20mg/ml de proteinase K, misturou-se vagarosamente e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 100µl de NaCl 5M e a suspensão invertida vagarosamente várias vezes. Adicionaram-se 80µl de CTAB 10% e a suspensão foi homogeneizada. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos ou a 60°C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado à suspensão, 1ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (Clorofil), e centrifugada (Centrífuga Sorvall RT 6000D) por 20 minutos a 3.000rpm a 4°C. Este processo foi repetido por mais 4 vezes até que fossem removidas as impurezas residuais. A fase aquosa foi removida para um tubo eppendorf, adicionado 1ml de fenol:

clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) (Clorofane), misturadas vagarosamente e centrifugadas (Centrífuga Sorvall MC 12V ) por 20 minutos a 12.000rpm a 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa contendo o DNA foi retirada e feita a precipitação de DNA. Para tal, acrescentou-se à solução 1ml de etanol absoluto. Após homogeneização, as amostras foram armazenadas a -20°C por no mínimo 3 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3.000 rpm a 4°C. O sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1ml de etanol absoluto, duas lavagens com etanol 70% e mais uma lavagem com etanol absoluto e, mantido à temperatura ambiente para a secagem por aproximadamente 1 hora ou seco em “speed-vac” (Hetovac VR1 – High Technology of Scandinavia) após a secagem, o pellet foi ressuscitado em 20µl de TE + 2µl de RNase e deixado por 30 minutos a 37°C para a ação da enzima.

Para a visualização do material genético extraído, foi utilizado gel de agarose 1% adicionado de 0,4µl/mL de brometo de etídeo em buffer TBE 0,5% a 3V/cm. Foram em seguida visualizados sob luz UV e fotodocumentados. Para a quantificação em ng foram usados 6,5µl do plasmídeo pGEM® -3Zf (+) double-stranded DNA Control Template 0,2µg/µl (Applied Biosystems) e para a verificação do peso molecular/tamanho do fragmento 0,8µl de Marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder™ 250µg - 1µg/µl – Life Technologies), 0,5µl de tampão de carregamento, 2µl das amostras.

### 4.3.2. Metodologia 2

#### 4.3.2.1. Soluções usadas

##### 4.3.2.1.1. Tampão de extração

NaCl.....	1.4M
Tris-Hcl, pH 8,0.....	100mM
EDTA pH 8,0.....	20mM
PVP – 40.....	1%
CTAB 10%.....	2%
Proteinase K.....	100ug/ml
B-mercaptoetanol.....	0,2%
Água Ultrapura autoclavada q.s.p.....	

O DNA genômico foi extraído segundo o protocolo de Doyle & Doyle (1990).

Uma população bacteriana de *Xylella fastidiosa* foi inoculada em 4ml de meio PW líquido e incubada a 28°C sem agitação por aproximadamente seis dias. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação (Centrífuga Sorvall RT 6000D – Du Pont) a 3.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o meio de cultura descartado. Ao pellet formado foram adicionados 700

μl de tampão de extração, vortexado e deixado por 30 minutos em banho a 65 °C sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Após a etapa do banho foram adicionados 650μl de CIA, homogeneizado até que se formasse uma emulsão e então centrifugado a 12000rpm por 7 minutos (Centrífuga 5417R - Eppendorf). A fase aquosa foi removida para um tubo eppendorf limpo e adicionado 200 μl de tampão de extração sem proteinase K . Foi então homogeneizado, adicionado mais 650μl de CIA , homogeneizado novamente e centrifugado a 12000rpm por 7 minutos. Este processo foi repetido por mais 3 vezes até que fossem removidos todos os resíduos de polissacarídeos. Para a precipitação do DNA foi usado 1 volume de isopropanol a temperatura ambiente, homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A superfície do precipitado foi lavada 2 vezes com 250μl de etanol 70% preparado pouco antes do uso. Após o processo de lavagem as amostras foram secas em um concentrador de DNA por 10 minutos (Hetovac VR1 – High Technology of Scandinavia). A ressuspensão do DNA foi realizada com 40μl de TE acrescido de 10μg/ml de RNase e deixado no banho a 37°C por 30 minutos. A concentração e integridade do DNA foram estimadas em mini-gel de agarose 1,0% com os padrões conhecidos para a sua posterior utilização na reação de PCR. Para tal foi usada uma quantia de 0,5μl de tampão de carregamento, 0,8μl de Marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder™ 250μg - 1μg/μl – Life Technologies) para a verificação do peso molecular/tamanho do fragmento, 6,5μl do plasmídeo pGEM® -3Zf (+) double-stranded DNA Control Template 0,2μg/μl (Applied Biosystems) para a quantificação em ng, 2μl das amostras.

#### **4.4. Construção dos primers**

Para o desenho e construção dos primers foi usada como seqüência modelo os genes 16S e 23S rDNA de *Xylella fastidiosa* isolado 9a5c seqüenciada por Simpson e colaboradores (2000) disponível no GenBank e foram escolhidos arbitrariamente 20 oligonucleotídeos utilizando o programa Primer3 output (NCBI) (primer3.cgi.htm) escolhendo critérios para amplificação da totalidade do espaço intergênico 16S-23S. Após a seqüência dos oligonucleotídeos obtida, a mesma foi analisada utilizando a ferramenta computacional BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) do NCBI para uma pesquisa em banco de dados com seqüências homólogas àquela escolhida. Os resultados da pesquisa indicaram que ambos os oligonucleotídeos com 20 bases escolhidos (Reverse e Forward) foram altamente específicos para *Xylella fastidiosa*.

#### **4.5. Condições de amplificação por PCR da região 16S-23S rDNA de *Xylella fastidiosa***

Os “primers” utilizados para a amplificação dos fragmentos da região intergênica 16S-23S rDNA dos isolados de *Xylella fastidiosa* estão descritos na Tabela 02 e Tabela 03. Foram realizadas duas reações de PCR com dois pares de primers diferentes. Um foi inicialmente proposto por Honeycutt (1995) baseado na região 16S-23S de *Xanthomonas*

spp. e utilizado por Mehta (2001) em seus estudos, o outro par foi desenhado em nosso laboratório baseado na mesma seqüência em *Xylella fastidiosa* isolado 9a5c. Para ambas as reações de PCR foram utilizados um volume final de 25µl, contendo 100ng de DNA molde; 0,5µM de cada primer; 100µM de dNTP (dioxinucleotídeo); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Life Technologies); 0,5U de *Taq* DNA Polimerase (Life Technologies); 1X Tampão Buffer 10x (Life Technologies).

Em todos os experimentos, foi realizada uma reação de controle negativo, onde o DNA foi excluído; e um controle positivo com o isolado 9a5c. Foi utilizado o termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), o qual foi programado para gerar uma denaturação inicial de 94°C 4 minutos ("hot start"), seguido de 40 ciclos de 94°C 40 segundos; 52°C 40 segundos; 72°C 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 2 minutos para o par de primers construídos em nosso laboratório. Para o conjunto de primers relatado por Honeycutt a programação foi 1X (4 min a 94°C), 40x (30 s a 94°C, 30 s a 65°C, 1 min a 72°C). Foram utilizados 3µl da reação para a observação dos fragmentos amplificados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (0,4µg/mL), visualizados sob luz ultravioleta e documentados através do Flúor-S Multimager System (Bio Rad). O padrão molecular utilizado foi 1Kb Plus DNA Ladder™ (Life Technologies).

**Tabela 2.** Seqüência dos “primers” desenhados em nosso laboratório para amplificar a região intergênica 16S-23S de *Xylella fastidiosa*.

Primer	Seqüência 5' ® 3'	Temperatura de anelamento
16S-23SF	GATGACTGGGGTGAAGTCGT	52°C
16S-23SR	GACACTTTTCGCAGGCTACC	52°C

(“Primers” sintetizados pela Life Technologies – Gibco BRL)

**Tabela 3.** Seqüência dos “primers” proposto por Honeycutt para amplificação da a região intergênica 16S-23S de *Xylella fastidiosa*.

Primer	Seqüência 5' ® 3'	Temperatura de anelamento
16S uni1330	GTTCCCGGGCCTTGTACACAC	65°C
23S uni 322	GTTGTTTTTCGCCTTCCCTC	65°C

(“Primers” sintetizados pela Life Technologies – Gibco BRL)

#### **4.6. Purificação dos fragmentos amplificados**

Após a visualização dos fragmentos amplificados, os mesmos foram purificados utilizando o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit (Pharmacia Biotech) para remover quaisquer resíduos não incorporados durante a reação de PCR. A purificação foi realizada para um volume de 22µl onde foram adicionados 103µl de Buffer de captura à reação. As amostras foram homogeneizadas vagarosamente por aproximadamente 10 vezes e então a mistura foi colocada na coluna GFX com um tubo coletor e centrifugada (Centrífuga 5417 C Eppendorf) por 2 min. a 12.000rpm. Feita a centrifugação, foi descartado a alíquota do tubo coletor e adicionado 103µl de Buffer de lavagem e novamente centrifugado nas mesmas condições. As colunas foram transferidas para novos tubos eppendorf e foram adicionados aos tubos 30µl de Água ultrapura autoclavada autoclavada e deixado por 2 min. a TA. Somente então é que foram centrifugadas por 2 min. a 12.000rpm para resgatar os produtos já purificados. Após a purificação concluída, os fragmentos foram novamente visualizados sob luz UV e quantificados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (0,4µg/mL), utilizando os mesmos padrões moleculares citados para a visualização do material genético extraído. Os resultados foram novamente fotodocumentados através do Flúor-S Multimager System (Bio Rad).

#### **4.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados**

Os fragmentos de DNA correspondentes às regiões 16S-23SrDNA amplificadas pelos dois conjuntos de primers foram utilizadas para o sequenciamento das bases do DNA. As amostras foram preparadas pelo método de cadeia terminal dideoxi (ddNTP) segundo o protocolo ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems) em um volume final de 10µl onde foram utilizados 30-50ng de DNA; 5pmoles de “primers”; 2µl de Big Dye (Solução Kit); 2µl de tampão 2,5X (Tris-HCL 200mM pH 9,0; MgCl<sub>2</sub> 5mM e H<sub>2</sub>O Ultrapura autoclavada para o volume final de 20µl). As duas fitas de DNA correspondentes à região espaçadora foram sequenciadas. As reações para o sequenciamento foram conduzidas em termociclador com as mesmas condições citadas para amplificação dos produtos.

Terminadas as reações, as amostras foram purificadas por um método de precipitação, onde os ddNTP's que não foram incorporados durante a síntese das moléculas de DNA são eliminados. O método foi realizado adicionando-se às amostras 10µl de água ultrapura autoclavada e 30µl de isopropanol aos 10µl da reação. Após homogeneização por agitação, incubou-se a solução durante 15 minutos a TA. A seguir, a mesma foi centrifugada 20 min. a 10000 x g. O sobrenadante foi descartado e foi então adicionado 250µl de etanol 70%. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 5 min a 12.000rpm e novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado a 60°C por um período de 10 min e ressuspendido em Formamida (Hi Di Formamide – Applied Biosystems). A leitura das bases

marcadas foi realizada em Seqüenciador Automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser do Laboratório de Sequenciamento do CENA/USP.

#### **4.8. Análise das seqüências**

A região espaçadora 16S-23S rDNA das linhagens seqüenciadas neste estudo foram submetidas a comparações utilizando o serviço do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI) usando o BLASTN, um subprograma do BLAST v.2.0 (Altschul *et al.*, 1997) contra seqüências não redundantes depositadas no GenBank (GenBank – NCBI, 2002). O alinhamento das múltiplas seqüências foi realizado usando o programa EasyAlign que usa o método Malign

Para a detecção dos genes tRNAs foi utilizado o programa tRNAscan-SE (v. 1.11) (Lowe and Eddy, 1997) do serviço do Instituto Pasteur, França (pasteur.htm).

#### **4.9. Análises filogenéticas**

As análises filogenéticas de máxima parcimônia foram realizadas com o programa PAUP\* 4b8 (Swofford, 1999). *Gaps* foram considerados como quinta base, uma vez que também possuem informação filogenética (Giribet & Wheeler, 1999). Foram obtidas árvores por meio de busca heurística (Swofford *et al.*, 1996) via adição aleatória com 2000 replicações. Das árvores mais parcimoniosas, foram obtidas e apresentadas as árvores de consenso semi-estrito. O suporte dos ramos foi inferido pela análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1985; Swofford *et al.*, 1996), conduzida através de busca heurística com 2000 replicações e adição aleatória com 100 replicações. Para servir de grupo-externo, foi empregada a linhagem de pêra (PE.PLS) por ser a linhagem que apresentava o menor coeficiente de similaridade entre as outras linhagens de *Xylella fastidiosa* (79%) e, como foi citada em um estudo prévio de Mehta *et al.* (2000), a diferença neste coeficiente indica que esta linhagem não pertence à espécie.

As regiões intergênicas 16S-23S rDNA de *Xylella fastidiosa* utilizadas para comparação com as seqüenciadas no laboratório estão listadas na Tabela 4. Os cladogramas foram desenhados com o auxílio do programa TreeView (Page, 1998).



**Tabela 4.** Linhagens de *Xylella fastidiosa* disponíveis no GenBank utilizadas para comparação na análise filogenética da seqüência rDNA do espaço intergênico 16S-23S e seus respectivos números de acesso

<b>Bactéria</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>GenBank 16S-23S</b>
<i>Xylella fastidiosa</i>	Maple	Acer macrophila	AF073219
<i>Xylella fastidiosa</i>	PL.788	Ameixa	AF203395
<i>Xylella fastidiosa</i>	Plum2#4	Ameixa	AF073209
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS1	Amêndoa	AF073240
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS2	Amêndoa	AF073243
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS3	Amêndoa	AF073244
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS4	Amêndoa	AF073245
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS5	Amêndoa	AF073246
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS6	Amêndoa	AF073247
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS7	Amêndoa	AF073248
<i>Xylella fastidiosa</i>	ALS9	Amêndoa	AF073249
<i>Xylella fastidiosa</i>	Manteca	Amêndoa	AF073241
<i>Xylella fastidiosa</i>	ContraCosta	Amêndoa	AF073250
<i>Xylella fastidiosa</i>	Tulare	Amêndoa	AF073242
<i>Xylella fastidiosa</i>	CO.01	Café	AF203394
<i>Xylella fastidiosa</i>	Oak 88-9	Carvalho	AF 073210
<i>Xylella fastidiosa</i>	Oak 92-3	Carvalho	AF073211
<i>Xylella fastidiosa</i>	Oak 92-10	Carvalho	AF073212
<i>Xylella fastidiosa</i>	OLS#2	Carvalho	AF073213
<i>Xylella fastidiosa</i>	Stucky	Carvalho	AF073214
<i>Xylella fastidiosa</i>	CI.52	Citros	AF203393
<i>Xylella fastidiosa</i>	CI.11067	Citros	AF237650
<i>Xylella fastidiosa</i>	CI.XO	Citros	AF237651
<i>Xylella fastidiosa</i>	Ann1	Oleander	AF 073215
<i>Xylella fastidiosa</i>	PF1	Oleander	AF073216
<i>Xylella fastidiosa</i>	T1c	Oleander	AF073217
<i>Xylella fastidiosa</i>	TR1	Oleander	AF073218
<i>Xylella fastidiosa</i>	5S2	Pêssego	AF 073206
<i>Xylella fastidiosa</i>	5R1	Pêssego	AF073207
<i>Xylella fastidiosa</i>	4S3	Pêssego	AF073208
<i>Xylella fastidiosa</i>	PE.PLS	Pêra	AF203396

<i>Xylella fastidiosa</i>	GR8935	Videira	AF203397
<i>Xylella fastidiosa</i>	ConnCreek	Videira	AF073225
<i>Xylella fastidiosa</i>	Stags Leap	Videira	AF073226
<i>Xylella fastidiosa</i>	Fetzer	Videira	AF073227
<i>Xylella fastidiosa</i>	STL	Videira	AF073228
<i>Xylella fastidiosa</i>	Santa Cruz	Videira	AF073229
<i>Xylella fastidiosa</i>	Meyley	Videira	AF073230
<i>Xylella fastidiosa</i>	UCLA	Videira	AF073231
<i>Xylella fastidiosa</i>	Preston Ranch	Videira	AF073232
<i>Xylella fastidiosa</i>	VinoF	Videira	AF073233
<i>Xylella fastidiosa</i>	Medeiros	Videira	AF073234
<i>Xylella fastidiosa</i>	Traver	Videira	AF073235
<i>Xylella fastidiosa</i>	Moore Park	Videira	AF073236
<i>Xylella fastidiosa</i>	Douglas	Videira	AF073237
<i>Xylella fastidiosa</i>	Oxford	Videira	AF073238
<i>Xylella fastidiosa</i>	Hopland	Videira	AF073239
<i>Xylella fastidiosa</i>	PD95-2	Videira	AF073220
<i>Xylella fastidiosa</i>	PD95-4	Videira	AF073221
<i>Xylella fastidiosa</i>	PD95-9	Videira	AF073222
<i>Xylella fastidiosa</i>	R116V3	Videira	AF073223
<i>Xylella fastidiosa</i>	Dixon	Videira	AF073251
<i>Xylella fastidiosa</i>	R118V3-4	Videira	AF073224

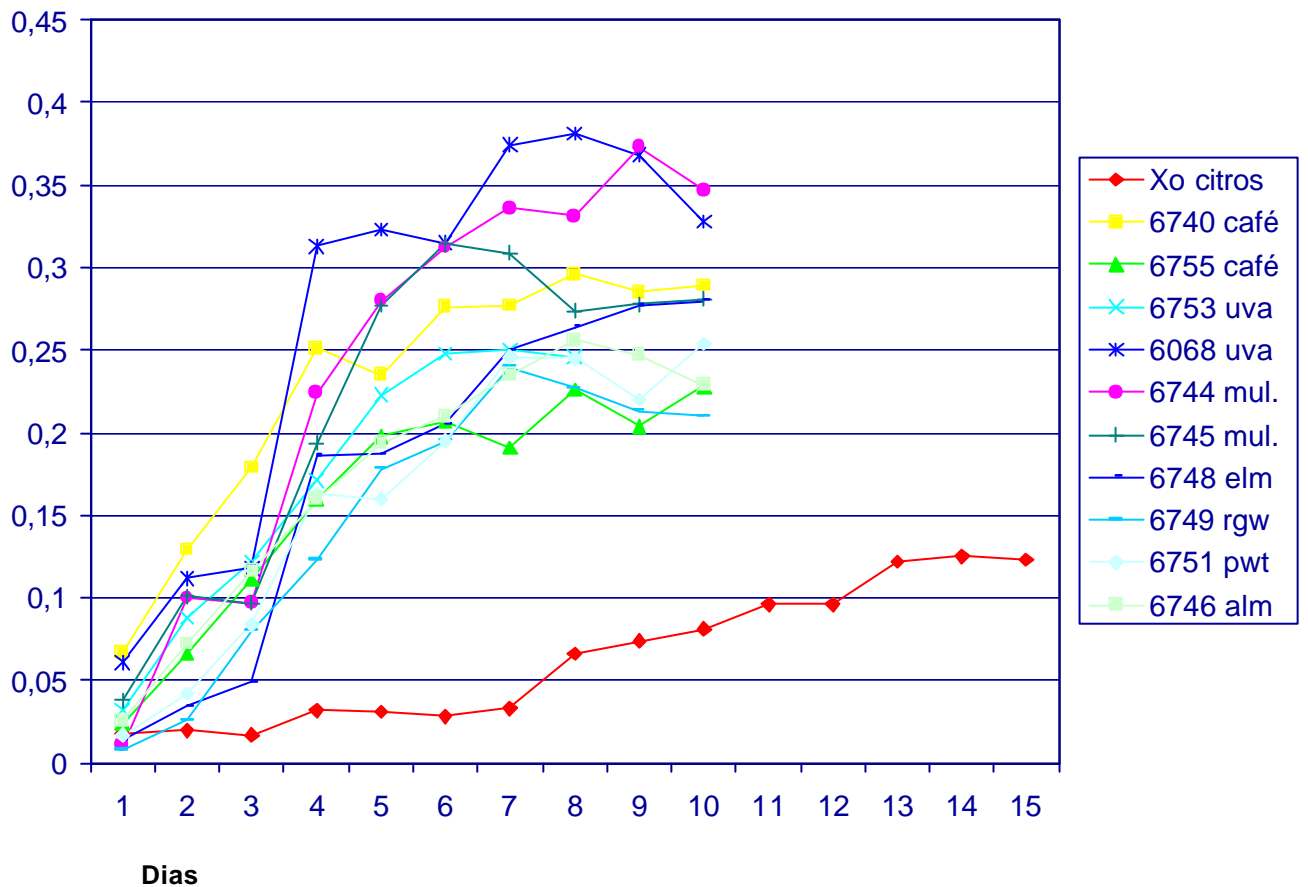
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Perfil de crescimento

Sob as condições avaliadas, os isolados de *Xylella fastidiosa* provenientes de diferentes espécies vegetais comportaram-se de maneira sutilmente distinta. O isolado X0 foi o que apresentou a maior fase *lag* em relação aos demais isolados (Gráfico 1). Outros isolados analisados mostraram um perfil semelhante entre si com um período de 1 a 3-4 para a fase *log* chegando a fase estacionária por volta do 10<sup>o</sup> dia (Gráfico 2).

**Gráfico 01.** Gráfico representativo das curvas de crescimento de *Xylella fastidiosa* de diferentes hospedeiros. Os valores são referentes a leituras diárias da absorbância a 640nm em espectrofotômetro. As células foram cultivadas em meio PW líquido, a 28°C.

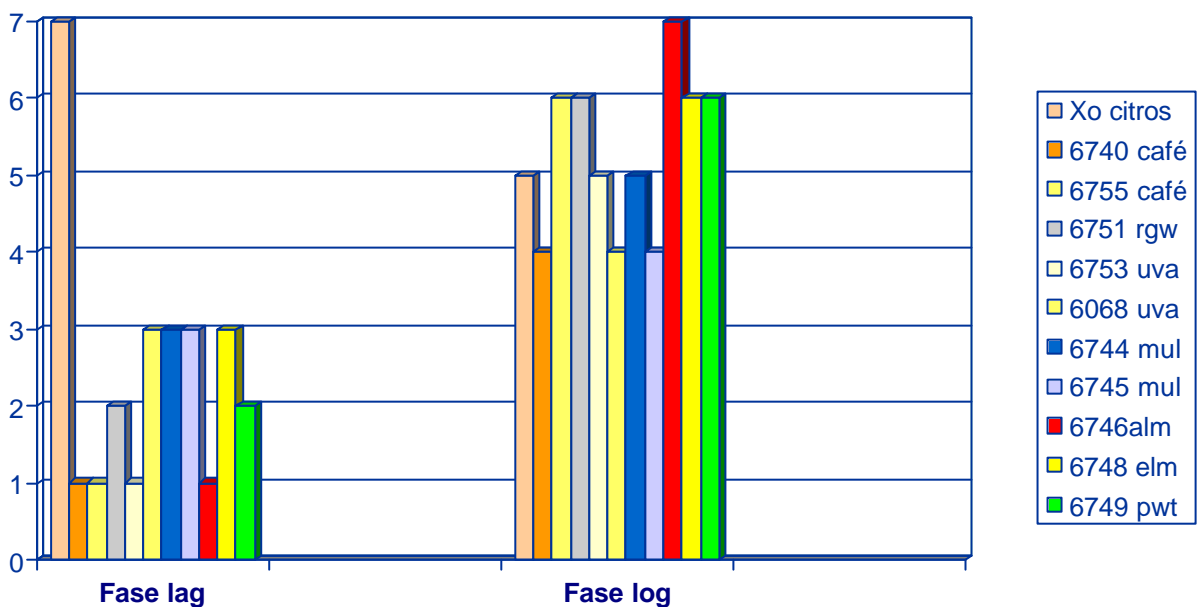
**Absorbância**



Mul. – amora  
 ELM – Olmo  
 RGW – ambrosia americana  
 PWT – vinca  
 Alm - amêndoa

**Gráfico 02.** Gráfico representativo do tempo de duração das fases lag e log em dias dos isolados de *Xylella fastidiosa*. Os valores são referentes a leituras diárias a 640nm em espectrofotômetro. As barras verticais indicam o tempo, em dias, de duração das fases em meio de cultura PW líquido.

**Dias**



**Mul. – amora**

**ELM – Olmo**

**RGW – rambrosia americana**

**PWT – vinca**

**Alm - amêndoa**

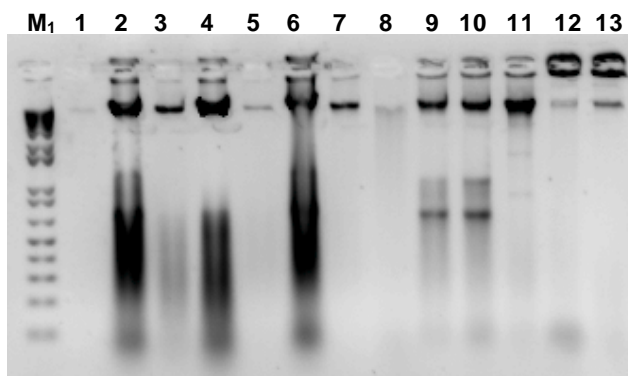
Os perfis de crescimento dos isolados testados comprovaram a diferença na velocidade de crescimento em meio de cultura. Com os gráficos obtidos foi possível observar claramente a divergência na velocidade de crescimento entre o isolado de citros (9a5c) e os demais. Os isolados de outros hospedeiros apresentaram crescimento semelhante quanto ao tempo de adaptação e fase logarítmica. O isolado de ameixa 6747 adquirido da Fundação André Tosello não se desenvolveu no meio de cultura PW neste experimento. Os problemas citados para tal fato pode estar relacionado a uma série de fatores que estão listados como inibidores de crescimento, ou mesmo uma possível morte das colônias. A proposta da realização dos perfis de crescimento de diferentes isolados da bactéria estudada, foi tomada frente às dificuldades de crescimento encontradas durante o

experimento. Com estes resultados pudemos verificar as diferenças na velocidade e também características das culturas entre diferentes estirpes.

## 5.2. Extração do DNA

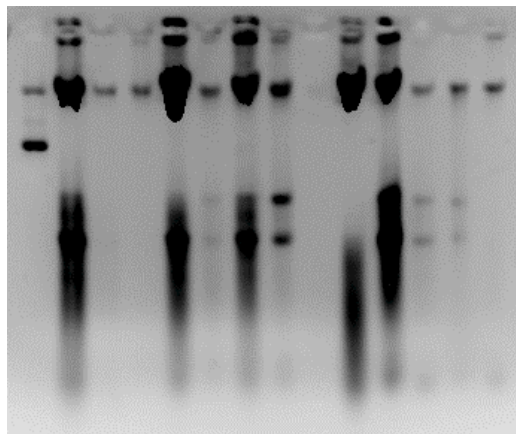
Os géis abaixo mostram as diferenças na qualidade do DNA extraído utilizando os dois métodos propostos para a extração.

**Figuras 01 e 02. Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs extraídos pelo método de Dunningan.**



**Figura 1.** Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café (6738, 6740, 6755); 5-7- Videira (6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745) ; 10-Amêndoa (6746); 11-Olmo (6748); 12- Ambrosia americana (6751); 13- Vinca (6749).

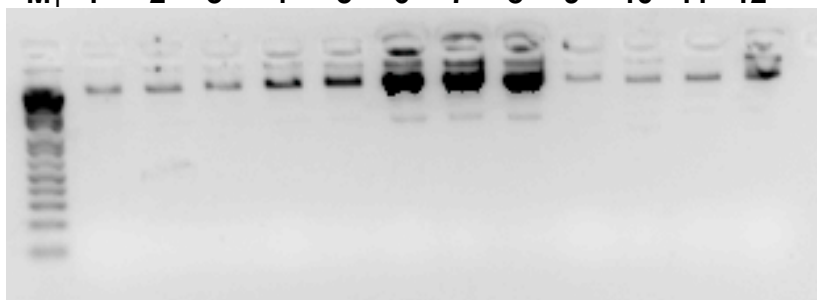
M<sub>1</sub> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



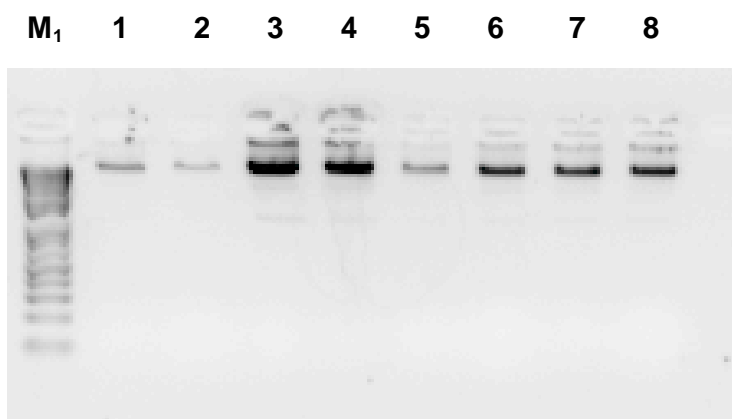
**Figura 2.** Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular pGEM; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café (6738, 6740, 6755); 5-7- Videira (6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745) ; 10-Amêndoa (6746); 11-Olmo (6748); 12- Ambrosia americana (6751); 13- Vinca (6749).

**Figura 03 e 04.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos DNAs extraídos pelo método de Doyle & Doyle.

M<sub>1</sub> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Figura 3.** Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 1-12 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-3- Café (6738, 6740); 4-6 Videira (6068, 6752, 6753); 7-8 Amora (6744, 6745) ; 9-Amêndoa (6746); 10-Olmo (6748); 11- Ambrosia americana (6751); 12- Vinca (6749).



**Figura 4** Eletroforetograma da quantificação dos DNAs extraídos. M<sub>1</sub> – Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 1-8 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-Café (6755); 3 Videira (6753); 4 Amora (6744,) ; 5-Amêndoa (6746); 6-Olmo (6748); 7- Ambrosia americana (6751); 8- Vinca (6749).

Para a extração de DNA verificou-se que o método proposto por Doyle & Doyle é simples, rápido e eficiente para a extração de DNA genômico bacteriano, além de produzir um DNA com muito mais qualidade que o método proposto por Dunningan (1997). Pode-se atribuir o fato da qualidade do DNA estar prejudicada no método proposto por Dunningan o tempo de manipulação despendido para o método.

### 5.3. PCR da região intergênica 16S-23S rDNA de *Xylella fastidiosa* .

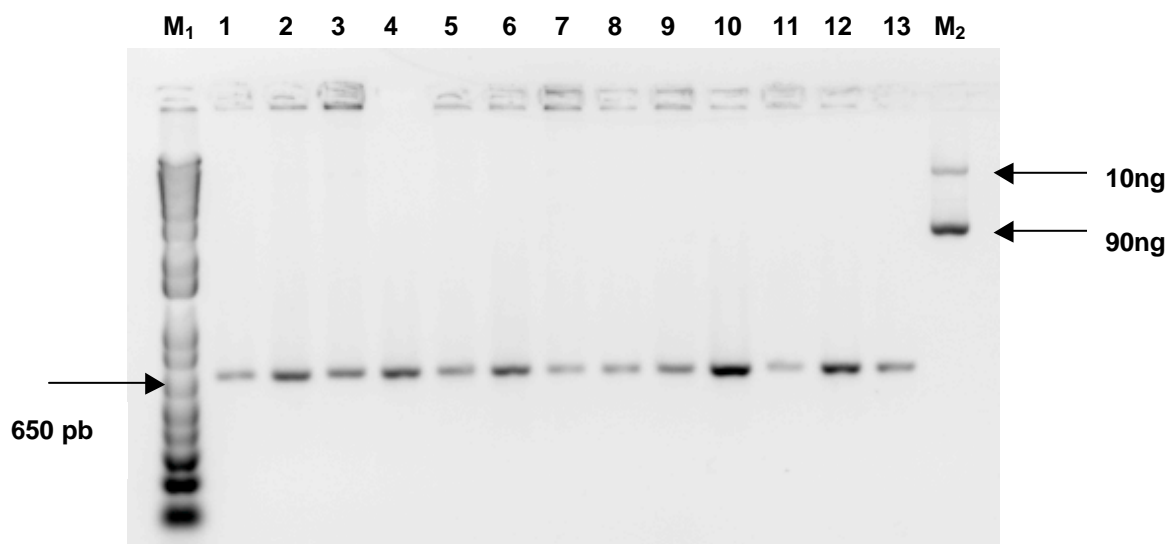
**5.3.1. Primers proposto por Honeycutt** - Os fragmentos diagnósticos obtidos com a amplificação por PCR pelo conjunto de primers propostos por Honeycutt revelaram –se com aproximadamente 1.1kb. Alguns isolados apresentaram mais de uma banda sendo esta outra inespecífica, porém todos os isolados testados apresentavam esta região no genoma.

**5.3.2. Primers sintetizados em nosso laboratório** - Os resultados obtidos através da amplificação dos fragmentos de DNA por PCR referente à região espaçadora entre os genes 16S e 23S do rDNA, utilizando os “primers” construídos em nosso laboratório, revelaram um único produto de PCR e que todos os isolados de *Xylella fastidiosa* possuem esta região. Os fragmentos amplificados mostraram-se com aproximadamente 650 bases para todos os isolados de *Xylella fastidiosa* testados.

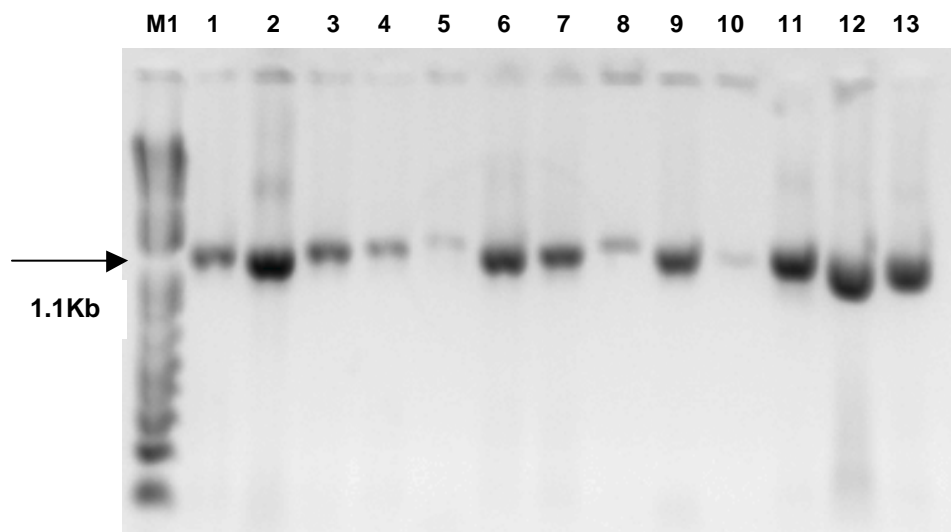
Este resultado não pode ser conclusivo para afirmar a quantidade de número de *rrn* operons existentes. Alguns autores afirmam que existem mais de um operon em *Xylella*



*fastidiosa* (Chen *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000) enquanto que outros consideram a presença apenas de um gene ou que se há mais de um, são iguais em extensão (Mehta *et al.*,2001; Rosato *et al.*,1998). Os produtos referentes à região amplificada podem ser observados nas Figuras 05 e 06



**Figura 5.** Fragmentos amplificados da região espaçadora 16S-23S de *Xylella fastidiosa* com aproximadamente 650 bases. M<sub>1</sub>-Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café (6738, 6740, 6755) ; 5-7- Videira(6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745) ; 10-Amêndoa (6746); 11-Olmo (6748); 12- Ambrosia americana(6749); 13- Vinca (6751); M<sub>2</sub>- Marcador molecular pGEM.



**Figura 6.** Fragmentos amplificados da região espaçadora 16S-23S rDNA de *Xylella fastidiosa* com os primers proposto por Honeycutt. M<sub>1</sub>-Marcador Molecular 1Kb Plus DNA Ladder; 1-13 Isolados de *Xylella fastidiosa*: 1-Citros (X0) ; 2-4- Café ( 6738, 6740, 6755); 5-7- Videira (6068, 6752, 6753); 8-9- Amora (6744, 6745); 10-Amêndoa (6746); 11-Elm (6748); 12- Ambrosia americana (6749); 13- Vinca (6751).

#### 5.4. Seqüenciamento da região espaçadora 16S-23S rDNA

Ambos os amplicons gerados pelos diferentes pares de primers foram submetidos ao seqüenciamento. A pesquisa feita com o programa BLASTN (NCBI), usando as seqüências obtidas neste estudo como seqüências modelo, identificou todas as 9 seqüências com as sequencias de *Xylella fastidiosa* já depositadas no GenBank com índices superiores a 98% de similaridade.

#### 5.5. Análise da região intergênica 16S-23S.

O fragmento amplificado foi seqüenciado nas duas direções (5'→3' e 3'→5') e as regiões finais correspondentes ao final do gene 16S e o começo do gene 23S foram eliminadas de acordo com outras seqüências depositadas no GenBank. Com relação aos primers proposto por Honeycutt *et al.* (1995) o sequenciamento tornou-se dificultado em razão da extensão do fragmento do produto de PCR produzido (1.1kb). Bandas inespecíficas podem ter prejudicado a qualidade do DNA para sequenciamento. As seqüências obtidas com os primers propostos por Honeycutt não foram utilizadas para análise, uma vez que após a remoção das regiões correspondentes aos genes 16S e 23S restou um número insuficiente de bases capaz de formar a seqüência completa da região intergênica. Após a remoção destas mesmas regiões,

nas seqüências obtidas com o par de primers sintetizados em nosso laboratório, o resultado foi uma seqüência em torno de 510 bases de extensão (Figura 7).

Os índices de similaridade encontrados nas seqüências 16S-23S rDNA dos diferentes isolados de *Xylella fastidiosa* podem ser vistos nas Tabelas 05 a 09. Os resultados mostraram que a estirpe PE.PLS (Pêra) é a que mais apresenta diferenças na seqüência em relação às outras estirpes relacionadas, cerca de 80% de similaridade. A linhagem mais próxima a esta foi a linhagem isolada de vinca (6751) com índice de 81%. Análises de outros genes conservados mostraram um índice de similaridade em torno de 99 a 100% para o gene 16S (Rodrigues *et al.*, 2003) e 97,5 a 100% para sequencias parciais do gene *gyrB*. Estes resultados suportam a hipótese de que a escolha do espaço intergênico para estudos de diversidade genética e filogenia entre organismos da mesma espécie torna-se um novo potencial para estas análises. As sequencias obtidas do espaço intergênico podem ser obtidas por completas pelo fato desta região ser de apenas 500 bases aproximadamente, o que torna o sequenciamento facilitado. Apesar de ser uma sequencia relativamente curta, possui ainda variações maiores do que as encontradas em outros genes conservados ao longo de sua extensão gerando resultados informativos.

Entre os isolados de Café o nível de similaridade entre a seqüência obtida com a seqüência do GenBank foi 98%. As estirpes 5R1, 4S3 (Pêssego) e 2#4 (ameixa) mostraram seqüências idênticas; apesar da última pertencer a outro hospedeiro. Inesperadamente, as estirpes 2#4 e PL.788, isoladas de um mesmo hospedeiro (ameixa) de uma mesma região apresentaram 7 diferenças na seqüência de bases, o que as coloca em grupos muito distintos filogeneticamente. Com esta separação não podemos afirmar que linhagens da mesma bacteria isoladas de um mesmo hospedeiro de uma mesma região devem se agrupar em grupos iguais. Entre estas estirpes houveram 2 translocações, apenas 1 transversão e 2 Indels. Entre as estirpes de videira, exceto 6068 e GR 8573, os resultados do sequenciamento apontaram seqüência. Ambas estirpes diferenciaram-se das demais em 11 bases e 4 indels apenas. Com exceção das estirpes de amêndoa ALS1, Manteca, Tulare, 6746, ameixa, citros e café, as outras estirpes de *Xylella fastidiosa* isoladas de um mesmo hospedeiro mostraram seqüências idênticas com relação ao espaço intergênico. Em relação a linhagem 6746 (amêndoa), seqüenciada em nosso laboratório, foram reveladas 8 bases diferentes, sendo 4 translocações, 2 transversões e 2 Indel, quando comparadas as linhagens ALS1, Manteca e Tulare, e apenas 3, do tipo translocação, entre as outras linhagens isoladas de amêndoa. As estirpes ALS1, Manteca, Tulare (amêndoa) e as estirpe isolada de *Acer macrophila*, possuem a mesma seqüência de bases do DNA das estirpes isoladas de videira.

As seqüências de nucleotídeos da região 16S-23S revelou-se com dois genes para tRNA (tRNA<sup>ala</sup> e tRNA<sup>ile</sup>) encontrados na maioria das bactérias gram-negativas (Gutler & Stanisch, 1996) com aproximadamente 72 e 74 bases para os genes tRNAs para alanina e isoleucina respectivamente. Analisando o conteúdo de bases destes genes foi revelado que somente as linhagens 6068 (videira), GR 8935 (videira), 6749 (Ambrósia) e 6751 (Vinca)

apresentaram diferenças na composição de nucleotídeos. Na linhagem 6068 encontrou-se 2 transversões (posições 263 e 285) para o tRNA<sup>ile</sup> e, 4 transversões (posições 330, 347 e 386) e 1 indel (posição 397) para o tRNA<sup>ala</sup>. Apenas uma transversão foi encontrada na linhagem GR 8935 (posição 263) para o gene tRNA<sup>ile</sup>. Estes resultados confirmam as diferenças que Mehta *et al.* (2000) encontrou ao relatar que somente as linhagens de videira e café possuíam diferenças em sua composição de bases. As diferenças nas bases encontrada na linhagem 6749 foram somente reveladas no tRNA<sup>ala</sup> e foi a que apresentou o maior número de variações com 4 transversões (posições 333, 353, 365 e 367) e 2 translocações (posições 348 e 396). A linhagem isolada de Vinca (6751) apresentou apenas uma translocação para o gene tRNA<sup>ala</sup> (posição 373).

## 5.6. Filogenia

O fenograma baseado em dados de similaridades é utilizado para observação de diversidade genética, diferenças na disposição das bases. No entanto isto não necessariamente implica uma história evolucionária de um táxon. Com o método cladístico empregado as relações evolucionárias hipotetizadas entre as linhagens de *Xylella fastidiosa* podem ser inferidas (Pooler & Hartung, 1995b). Em um estudo sobre filogenia realizado por Pooler & Hartung, usando análises de fragmentos gerados por RAPD, foi revelado a existência de cinco grupos: O grupo da CVC; ameixa-elmo; uva-ambrosia, amêndoa e amora (Pooler & Hartung, 1995). Esta conclusão foi suportada pelos dois métodos realizados: cladístico e fenético.

O cladograma gerado através do software PAUP revelou os seguintes índices estatísticos:

Índices estatísticos	Valores em número absoluto
Índice de consistência (CI)	0.9063
Índice de homoplasia (HI)	0.0938
CI excluindo caracteres não informativos	0.6538
HI excluindo caracteres não informativos	0.3462
Índice de retenção (RI)	0.9432
Índice de consistência otimizado	0.8548

Pelos estudos realizados em nosso laboratório foi possível diferenciar 3 grandes grupos de acordo com a origem dos filios: Grupo 01 Inclui as estirpes GR8935 e 6068 (Videira), 6748 (Olmo), 6744 (Amora), PL.788 (Ameixa), CI X0, CI.52, CI.11067 (Citros), CO.01, 6740 (Café); Grupo 02 inclui as estirpes 6749 (Ambrosia americana) e 6751 (Vinca) e o Grupo 03 onde se encontram as demais estirpes. Dentro do grupo maior onde se encaixam as demais estirpes ainda foi possível subdividi-los em 5 outros grupos (Figura 08). A análise do

cladograma gerado revelou alguns resultados inesperados. As linhagens de ameixa isoladas de uma mesma região ficaram distantes.

As linhagens isoladas do carvalho e oleander formaram grupos específicos e isolados. Dentro do primeiro grupo houve também um sub-agrupamento gerando divisões onde as estirpes de videira de agruparam com as estirpes de olmo e amora. O segundo sub-grupo agrupou os isolados de citros, café, ameixa. Citros e café permanecem no mesmo grupo, concordando assim com vários outros estudos onde é citada a estreita relação entre estas duas estirpes. Houve ainda uma diferenciação entre as linhagens de café e citros. Podemos ainda ressaltar que o isolado de café, bem como os outros isolados de citros (X0 e CI.11067) sofreu apenas 1 divergência depois do isolado CI.52 de citros. A linhagem de ameixa PL.788 ficou distante da outra de mesmo hospedeiro que se enquadrou no grupo das linhagens de pêssego e a maioria das linhagens isoladas de amêndoa. Podemos assim, dizer que estas as linhagens de ameixa pertencem a grupos parafiléticos e que a linhagem PL.788 divergiu em 3 tempos antes da linhagem 2#4 usando o PE.PLS como grupo externo que direcionou a análise com relação ao tempo de evolução das espécies. Com exceção dos isolados 6068 e GR 8935, que se agruparam com os isolados de amora e de elmo, todos os demais isolados de videira formaram um grupo juntamente com o isolado de maple e algumas amêndoas.

A variabilidade encontrada filogeneticamente entre linhagens de um mesmo hospedeiro pode representar uma variação interlinhagens/interoperon, erro de sequenciamento, ou outras variáveis laboratoriais (Clayton *et al*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

Este estudo foi primeiramente direcionado a dois aspectos principais: primeiro avaliar a diversidade genética do maior número disponível de linhagens da bactéria, isoladas de diferentes hospedeiros em diferentes regiões geográficas baseada na investigação de sequencias de nucleotídeos de uma região genômica conservada; e o segundo foi contruir uma relação filogenética baseada em principios cladísticos que expressam com mais fidelidade a razão evolutiva dos organismos estudados. Porém ao longo do trabalho outro fator tornou-se o principal aliado na busca das respostas antes lançadas. Como os primers utilizados em outros estudos geravam fragmentos muito extensos, foi necessária a construção de primers que se adequassem as nossas condições laboratórias sem dispende muito tempo e tampouco técnicas. Portanto a chave principal para a conclusão deste trabalho foi o uso dos novos primers construídos pelo nosso laboratório, que após isto o sequenciamento foi tornando-se mais qualificado e mais rápido.

GR8935 CGCTTATTCGCTTGACCATATAACCCCAAGTCGCCTCA-AA--ATC--T-ACAAGACAAT  
6068 .....  
HOPLAND G.G.....  
OXFORD G.G.....  
DOUGLAS G.G.....  
MOORE PARK G.G.....  
TRAVER G.G.....  
MEDEIROS G.G.....  
VINOF G.G.....  
PRESTON RANCH G.G.....  
UCLA G.G.....  
MEYLEY G.G.....  
SANTA CRUZ G.G.....  
STL G.G.....  
FETZER G.G.....  
STAGS LEAP G.G.....  
CONN CREEK G.G.....  
R118V3-4 G.G.....  
R116V3 G.G.....  
PD95-9 G.G.....  
PD95-4 G.G.....  
PD95-2 G.G.....  
6746\_R .....A.....  
DIXON G.G.....A.....  
CONTRA COSTA G.G.....A.....  
ALS9 G.G.....A.....  
ALS7 G.G.....A.....  
ALS6 G.G.....A.....  
ALS5 G.G.....A.....  
ALS4 G.G.....A.....  
ALS3 G.G.....A.....  
ALS2 G.G.....A.....  
TULARE G.G.....  
MANTECA G.G.....  
ALS1 G.G.....  
TR1 G.G.....A.....  
T1C G.G.....A.....  
PF1 G.G.....A.....  
ANN1 G.G.....A.....  
STUCKY G.G.....A.....  
OLS#2 G.G.....A.....  
OAK 92-10 G.G.....A.....  
OAK 92-3 G.G.....A.....  
OAK 88-9 G.G.....A.....  
PLUM2#4 G.G.....A.....  
4S3 G.G.....A.....  
5R1 G.G.....A.....  
5S2 G.G.....A.....  
MAPLE G.G.....  
6748 .....C.....  
6744 .....  
6749 .....A.....  
6751 .....A.....T.....  
PE.PLS .....A..C.....G..TC..TG.G...A.A.C.  
CI.11067 .....A...T.....T.....  
CI.X0 .....A...T.....T.....  
CI.52 .....A...T.....T.....  
CO.01 .....A...T.....T.....  
6740 .....A...T.....T.....  
PL.788 .....A.....

GR8935 GGA-----TAAAC--ATTG--GCA----CTTA--AGGCTTCAAATGAGAAATTTTAA  
6068 .....T.....  
HOPLAND .....T.....  
OXFORD .....T.....  
DOUGLAS .....T.....  
MOORE PARK .....T.....  
TRAVER .....T.....  
MEDEIROS .....T.....  
VINOF .....T.....  
PRESTON RANCH .....T.....  
UCLA .....T.....  
MEYLEY .....T.....  
SANTA CRUZ .....T.....  
STL .....T.....  
FETZER .....T.....  
STAGS LEAP .....T.....  
CONN CREEK .....T.....  
R118V3-4 .....T.....  
R116V3 .....T.....  
PD95-9 .....T.....  
PD95-4 .....T.....  
PD95-2 .....T.....  
6746\_R .....T.....C.....A.....  
DIXON .....T.....C.....A.....  
CONTRA COSTA .....T.....C.....A.....  
ALS9 .....T.....C.....A.....  
ALS7 .....T.....C.....A.....  
ALS6 .....T.....C.....A.....  
ALS5 .....T.....C.....A.....  
ALS4 .....T.....C.....A.....  
ALS3 .....T.....C.....A.....  
ALS2 .....T.....C.....A.....  
TULARE .....T.....  
MANTECA .....T.....  
ALS1 .....T.....  
TR1 .....T.....  
T1C .....T.....  
PF1 .....T.....  
ANN1 .....T.....  
STUCKY .....T.....C.....A.....  
OLS#2 .....T.....C.....A.....  
OAK 92-10 .....T.....C.....A.....  
OAK 92-3 .....T.....C.....A.....  
OAK 88-9 .....T.....C.....A.....  
PLUM2#4 .....T.....C.....A.....  
4S3 .....T.....C.....A.....  
5R1 .....T.....C.....A.....  
5S2 .....T.....C.....A.....  
MAPLE .....T.....  
6748 .....T.....  
6744 .....T.....  
6749 .....T.....C.....A.....  
6751 .....T.....C.....A.....  
PE.PLS TC.CCACCTCA...T.TA..G.ACT..CGCC.AC.CCT...-C...CTT...G...  
CI.11067 .....C.....GC.....A.....  
CI.X0 .....C.....GC.....A.....  
CI.52 .....C.....GC.....A.....  
CO.01 .....C.....GC.....A.....  
6740 .....-...C.....GC.....A.....  
PL.788 .....C.....C.....A.....

GR8935 ATAAAAANNNTCAAACGCTTGCTACATCATCAAATTATAAAAGAACGCTTCACAGCTCCA  
6068 .....-T.....  
HOPLAND .....-T.....  
OXFORD .....-T.....  
DOUGLAS .....-T.....  
MOORE PARK .....-T.....  
TRAVER .....-T.....  
MEDEIROS .....-T.....  
VINO .....-T.....  
PRESTON RANCH .....-T.....  
UCLA .....-T.....  
MEYLEY .....-T.....  
SANTA CRUZ .....-T.....  
STL .....-T.....  
FETZER .....-T.....  
STAGS LEAP .....-T.....  
CONN CREEK .....-T.....  
R118V3-4 .....-T.....  
R116V3 .....-T.....  
PD95-9 .....-T.....  
PD95-4 .....-T.....  
PD95-2 .....-T.....  
6746\_R .....-G.....  
DIXON .....-G.....  
CONTRA COSTA .....-G.....  
ALS9 .....-G.....  
ALS7 .....-G.....  
ALS6 .....-G.....  
ALS5 .....-G.....  
ALS4 .....-G.....  
ALS3 .....-G.....  
ALS2 .....-G.....  
TULARE .....-T.....  
MANTECA .....-T.....  
ALS1 .....-T.....  
TR1 .....-T.....  
T1C .....-T.....  
PF1 .....-T.....  
ANN1 .....-T.....  
STUCKY .....-G.....  
OLS#2 .....-G.....  
OAK 92-10 .....-G.....  
OAK 92-3 .....-G.....  
OAK 88-9 .....-G.....  
PLUM2#4 .....-G.....  
4S3 .....-G.....  
5R1 .....-G.....  
5S2 .....-G.....  
MAPLE .....-T.....  
6748 .....-T.....  
6744 .....-T.....  
6749 .....-G.....  
6751 .....-G.....  
PE.PLS C...C...G...A...G...A...  
CI.11067 .....-G.....  
CI.X0 .....-G.....  
CI.52 .....-G.....  
CO.01 .....-G.....  
6740 .....-G.....  
PL.788 .....-G.....

GR8935 AGGCTGATAAGCAT-AAA-AATGCGC-AACNACATTCAGAATAATTGGTATAACANTGGT  
6068 .....A...T.....  
HOPLAND .....A...T.....  
OXFORD .....A...T.....  
DOUGLAS .....A...T.....  
MOORE PARK .....A...T.....  
TRAVER .....A...T.....  
MEDEIROS .....A...T.....  
VINO .....A...T.....  
PRESTON RANCH .....A...T.....  
UCLA .....A...T.....  
MEYLEY .....A...T.....  
SANTA CRUZ .....A...T.....  
STL .....A...T.....  
FETZER .....A...T.....  
STAGS LEAP .....A...T.....  
CONN CREEK .....A...T.....  
R118V3-4 .....A...T.....  
R116V3 .....A...T.....  
PD95-9 .....A...T.....  
PD95-4 .....A...T.....  
PD95-2 .....A...T.....  
6746\_R .....A...A...C.....  
DIXON .....A...A...C.....  
CONTRA COSTA .....A...A...C.....  
ALS9 .....A...A...C.....  
ALS7 .....A...A...C.....  
ALS6 .....A...A...C.....  
ALS5 .....A...A...C.....  
ALS4 .....A...A...C.....  
ALS3 .....A...A...C.....  
ALS2 .....A...A...C.....  
TULARE .....A...T.....  
MANTECA .....A...T.....  
ALS1 .....A...T.....  
TR1 .....A...AT.....  
T1C .....A...AT.....  
PF1 .....A...AT.....  
ANN1 .....A...AT.....  
STUCKY .....A...A...A...C.....  
OLS#2 .....A...A...A...C.....  
OAK 92-10 .....A...A...A...C.....  
OAK 92-3 .....A...A...A...C.....  
OAK 88-9 .....A...A...A...C.....  
PLUM2#4 .....A...A...A...C.....  
4S3 .....A...A...A...C.....  
5R1 .....A...A...A...C.....  
5S2 .....A...A...A...C.....  
MAPLE .....A...T.....  
6748 .....A...T.....  
6744 .....C...A...T.....  
6749 .....A...A...C.....  
6751 .....A...A...C.....  
PE.PLS .C...C...C...A...C...A...T...CGAC.ACC.C...T...  
CI.11067 .....A...A...C.....  
CI.X0 .....A...A...C.....  
CI.52 .....A...A...C.....  
CO.01 .....C...A...T.....  
6740 .....C...A...T.....  
PL.788 .....A...C.....

GR8935 GGGTCTGGGAGGACTCGAACCAACGACCTCACCCCTTATCAGGGGTGCGCTCTAACCACCT  
6068 .....G.....  
HOPLAND .....C.....  
OXFORD .....C.....  
DOUGLAS .....C.....  
MOORE PARK .....C.....  
TRAVER .....C.....  
MEDEIROS .....C.....  
VINOF .....C.....  
PRESTON RANCH .....C.....  
UCLA .....C.....  
MEYLEY .....C.....  
SANTA CRUZ .....C.....  
STL .....C.....  
FETZER .....C.....  
STAGS LEAP .....C.....  
CONN CREEK .....C.....  
R118V3-4 .....C.....  
R116V3 .....C.....  
PD95-9 .....C.....  
PD95-4 .....C.....  
PD95-2 .....C.....  
6746\_R .....C.....  
DIXON .....C.....  
CONTRA COSTA .....C.....  
ALS9 .....C.....  
ALS7 .....C.....  
ALS6 .....C.....  
ALS5 .....C.....  
ALS4 .....C.....  
ALS3 .....C.....  
ALS2 .....C.....  
TULARE .....C.....  
MANTECA .....C.....  
ALS1 .....C.....  
TR1 .....C.....  
T1C .....C.....  
PF1 .....C.....  
ANN1 .....C.....  
STUCKY .....C.....  
OLS#2 .....C.....  
OAK 92-10 .....C.....  
OAK 92-3 .....C.....  
OAK 88-9 .....C.....  
PLUM2#4 .....C.....  
4S3 .....C.....  
5R1 .....C.....  
5S2 .....C.....  
MAPLE .....C.....  
6748 .....C.....  
6744 .....C.....  
6749 .....C.....  
6751 .....C.....  
PE.PLS .....C.....T.....  
CI.11067 .....C.....  
CI.X0 .....C.....  
CI.52 .....C.....  
CO.01 .....N.....C.....  
6740 .....C.....  
PL.788 .....C.....

GR8935 GAGCTACAGACCCATAAAATACTTTCATGGTGGAGCCTGTCTGGGATCGAACCGACGACCCC  
6068 .....G.....A.....  
HOPLAND .....C.....  
OXFORD .....C.....  
DOUGLAS .....C.....  
MOORE PARK .....C.....  
TRAVER .....C.....  
MEDEIROS .....C.....  
VINOF .....C.....  
PRESTON RANCH .....C.....  
UCLA .....C.....  
MEYLEY .....C.....  
SANTA CRUZ .....C.....  
STL .....C.....  
FETZER .....C.....  
STAGS LEAP .....C.....  
CONN CREEK .....C.....  
R118V3-4 .....C.....  
R116V3 .....C.....  
PD95-9 .....C.....  
PD95-4 .....C.....  
PD95-2 .....C.....  
6746\_R .....C.....  
DIXON .....C.....  
CONTRA COSTA .....C.....  
ALS9 .....C.....  
ALS7 .....C.....  
ALS6 .....C.....  
ALS5 .....C.....  
ALS4 .....C.....  
ALS3 .....C.....  
ALS2 .....C.....  
TULARE .....C.....  
MANTECA .....C.....  
ALS1 .....C.....  
TR1 .....G.....  
T1C .....G.....  
PF1 .....G.....  
ANN1 .....G.....  
STUCKY .....C.....  
OLS#2 .....C.....  
OAK 92-10 .....C.....  
OAK 92-3 .....C.....  
OAK 88-9 .....C.....  
PLUM2#4 .....C.....  
4S3 .....C.....  
5R1 .....C.....  
5S2 .....C.....  
MAPLE .....C.....  
6748 .....C.....  
6744 .....C.....  
6749 .....G.....T.....G.....  
6751 .....C.....  
PE.PLS .....G.....-AC.C.....C.....A.....  
CI.11067 .....C.....  
CI.X0 .....C.....  
CI.52 .....C.....  
CO.01 .....C.....  
6740 .....C.....  
PL.788 .....C.....



GR8935 CTGCTTGCAAAGCAGGTGCTCTACCAGCTGAGCTAAGGCCCCAGAACAATAATCGCCAA  
6068 .....G.....  
HOPLAND .....  
OXFORD .....  
DOUGLAS .....  
MOORE PARK .....  
TRAVER .....  
MEDEIROS .....  
VINOF .....  
PRESTON RANCH .....  
UCLA .....  
MEYLEY .....  
SANTA CRUZ .....  
STL .....  
FETZER .....  
STAGS LEAP .....  
CONN CREEK .....  
R118V3-4 .....  
R116V3 .....  
PD95-9 .....  
PD95-4 .....  
PD95-2 .....  
6746\_R .....  
DIXON .....  
CONTRA COSTA .....  
ALS9 .....  
ALS7 .....  
ALS6 .....  
ALS5 .....  
ALS4 .....  
ALS3 .....  
ALS2 .....  
TULARE .....  
MANTECA .....  
ALS1 .....  
TR1 .....  
T1C .....  
PF1 .....  
ANN1 .....  
STUCKY .....  
OLS#2 .....  
OAK 92-10 .....  
OAK 92-3 .....  
OAK 88-9 .....  
PLUM2#4 .....  
4S3 .....  
5R1 .....  
5S2 .....  
MAPLE .....  
6748 .....  
6744 .....  
6749 .....C.T.....T.....C.....  
6751 .....G.....C.....  
PE.PLS .....C.....  
CI.11067 .....  
CI.X0 .....  
CI.52 .....  
CO.01 .....  
6740 .....  
PL.788 .....

GR8935 CATAAACCCAAACCTATGCCAACATCAAACCCTGAATGCAAGTAACTTGTGAGGACGCCT  
6068 .....  
HOPLAND .....  
OXFORD .....  
DOUGLAS .....  
MOORE PARK .....  
TRAVER .....  
MEDEIROS .....  
VINOF .....  
PRESTON RANCH .....  
UCLA .....  
MEYLEY .....  
SANTA CRUZ .....  
STL .....  
FETZER .....  
STAGS LEAP .....  
CONN CREEK .....  
R118V3-4 .....  
R116V3 .....  
PD95-9 .....  
PD95-4 .....  
PD95-2 .....  
6746\_R .....  
DIXON .....  
CONTRA COSTA .....  
ALS9 .....  
ALS7 .....  
ALS6 .....  
ALS5 .....  
ALS4 .....  
ALS3 .....  
ALS2 .....  
TULARE .....  
MANTECA .....  
ALS1 .....  
TR1 .....  
T1C .....  
PF1 .....  
ANN1 .....  
STUCKY .....  
OLS#2 .....  
OAK 92-10 .....  
OAK 92-3 .....  
OAK 88-9 .....  
PLUM2#4 .....  
4S3 .....  
5R1 .....  
5S2 .....  
MAPLE .....  
6748 .....G.....  
6744 .....  
6749 .....C.....C.....G.....  
6751 .....  
PE.PLS .....TCG...C.....A...T.....G.....  
CI.11067 .....  
CI.X0 .....  
CI.52 .....  
CO.01 .....  
6740 .....  
PL.788 .....

GR8935	GGTAAGACAATTATATTC-ACCATACTCAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCC----	GR8935	GATA--
6068	.....	6068	.....
HOPLAND	.....	HOPLAND	.....
OXFORD	.....	OXFORD	.....
DOUGLAS	.....	DOUGLAS	.....
MOORE PARK	.....	MOORE PARK	.....
TRAVER	.....	TRAVER	.....
MEDEIROS	.....	MEDEIROS	.....
VINOF	.....	VINOF	.....
PRESTON RANCH	.....	PRESTON RANCH	.....
UCLA	.....	UCLA	.....
MEYLEY	.....	MEYLEY	.....
SANTA CRUZ	.....	SANTA CRUZ	.....
STL	.....	STL	.....
FETZER	.....	FETZER	.....
STAGS LEAP	.....	STAGS LEAP	.....
CONN CREEK	.....	CONN CREEK	.....
R118V3-4	.....	R118V3-4	.....
R116V3	.....	R116V3	.....
PD95-9	.....	PD95-9	.....
PD95-4	.....	PD95-4	.....
PD95-2	.....	PD95-2	.....
6746_R	.A.....T.....	6746_R	.....
DIXON	.A.....	DIXON	.....
CONTRA COSTA	.A.....	CONTRA COSTA	.....
ALS9	.A.....	ALS9	.....
ALS7	.A.....	ALS7	.....
ALS6	.A.....	ALS6	.....
ALS5	.A.....	ALS5	.....
ALS4	.A.....	ALS4	.....
ALS3	.A.....	ALS3	.....
ALS2	.A.....	ALS2	.....
TULARE	.....	TULARE	.....
MANTECA	.....	MANTECA	.....
ALS1	.....	ALS1	.....
TR1	.A.....	TR1	.....
T1C	.A.....	T1C	.....
PF1	.A.....	PF1	.....
ANN1	.A.....	ANN1	.....
STUCKY	.A.....	STUCKY	.....
OLS#2	.A.....	OLS#2	.....
OAK 92-10	.A.....	OAK 92-10	.....
OAK 92-3	.A.....	OAK 92-3	.....
OAK 88-9	.A.....	OAK 88-9	.....
PLUM2#4	.A.....	PLUM2#4	.....
4S3	.A.....	4S3	.....
5R1	.A.....	5R1	.....
5S2	.A.....	5S2	.....
MAPLE	.....	MAPLE	.....
6748	.....A.....	6748	....CG
6744	.....GATA	6744	....C.
6749	.A.....C.....	6749	....NG
6751	.A.....	6751	....C.
PE.PLS	AAC.G...G..G...G.TG.....	PE.PLS	.....
CI.11067	.A.....	CI.11067	.....
CI.X0	.A.....	CI.X0	.....
CI.52	.A.....	CI.52	.....
CO.01	.A.....	CO.01	.....
6740	.A.....	6740	.....
PL.788	.A.....	PL.788	.....

FIGURA 7 1 ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO INTERGÊNICA 16S-23S UTILIZANDO O PROGRAMA EASYALIGN. AS SEQÜÊNCIAS EM AZUL INDICAM O GENE PARA T RNA<sup>ILE</sup> E AS SEQÜÊNCIAS EM VERMELHO INDICAM O GENE T RNA<sup>ALA</sup>. O SÍMBOLO “-“ INDICA OS “GAPS”

## 6. CONCLUSÕES

A baixa variabilidade da região intergênica 16S-23S, entre as seqüências de todas as linhagens de *Xylella fastidiosa* analisadas, indica que elas estão intimamente relacionadas do ponto de vista filogenético (Hendson *et al.* 2001). Com base na metodologia cladística foi possível separar a linhagem do carvalho de citros, café e pêssego. Uma análise fenética realizada não foi suficiente para esta distinção (Mehta *et al.*, 2001). Foi também possível a distinção entre isolados de café e citros.

Com bases nos dados revelados pelo cladograma, não é possível afirmar que isolados oriundos de uma mesma espécie vegetal, estão juntos em um mesmo grupo filogenético, sendo assim sofreram evoluções em tempos diferentes talvez influenciados por motivos ainda desconhecidos. Podemos ressaltar ainda que o isolado de café sofreu processos de divergência ao mesmo tempo que os isolados de citros indicando que a doença do cafeeiro não foi introduzida através da linhagem que causa CVC. Outros estudos sobre evolução devem ser feitos a fim de elucidar o processo evolutivo das linhagens de *Xylella fastidiosa* através de outros métodos capazes elucidar este processo.

A região intergênica 16S-23S de todas as linhagens analisadas contém dois genes para tRNAs (tRNA<sup>ala</sup> e tRNA<sup>ile</sup>) concordando com os estudos de Mehta *et al.* (2001) e Hendson *et al.* (2001). Algumas diferenças nas bases dos genes foi encontrada em linhagens diferentes, contrastando com Chen (2001) que reporta a total similaridade entre as seqüências destes genes.

Em outros estudos onde foi usado o gene 16S para análises filogenéticas, revelou-se poucas diferenças entre as estirpes de *Xylella fastidiosa* de diferentes hospedeiros, não

servindo, portanto, como um bom marcador para avaliar as diferenças de uma bactéria da mesma espécie. Estudos sobre metabolismo, velocidade de crescimento em meio de cultura, análise de virulência devem ser feitos para que possam revelar possíveis diferenças entre as estirpes.

	Citros	café	uva	uva	amêndoa			oleander	oak	ameixa	pêssego	maple	amora	olmo	vinca	ambrosia	pêra
Seq.->	Cl.X0	6740	6068	Trave	6746	ALS9	ALS1	Ann1	88-9	PL.78	5S2	Acer	6744	6748	6749	6751	PE.PL
Cl.X0	1,000	0,994	0,964	0,968	0,984	0,982	0,968	0,968	0,980	0,992	0,982	0,968	0,976	0,972	0,968	0,986	0,812
6740	---	1,000	0,962	0,966	0,978	0,976	0,966	0,966	0,974	0,990	0,976	0,966	0,974	0,970	0,966	0,980	0,806
6068	---	---	1,000	0,976	0,964	0,962	0,976	0,968	0,961	0,972	0,962	0,976	0,984	0,980	0,949	0,966	0,793
Trave	---	---	---	1,000	0,980	0,986	1,000	0,992	0,984	0,976	0,986	1,000	0,988	0,984	0,953	0,970	0,797
6746	---	---	---	---	1,000	0,994	0,980	0,980	0,992	0,988	0,994	0,980	0,976	0,972	0,968	0,986	0,806
ALS9	---	---	---	---	---	1,000	0,986	0,986	0,998	0,986	1,000	0,986	0,974	0,970	0,966	0,984	0,804
ALS1	---	---	---	---	---	---	1,000	0,992	0,984	0,976	0,986	1,000	0,988	0,984	0,953	0,970	0,797
Ann1	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,984	0,976	0,986	0,992	0,980	0,976	0,953	0,970	0,797
88-9	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,984	0,998	0,984	0,972	0,968	0,964	0,982	0,802
PL.78	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,986	0,976	0,984	0,980	0,972	0,990	0,810
5S2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,986	0,974	0,970	0,966	0,984	0,804
Acer	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,988	0,984	0,953	0,970	0,797
6744	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,992	0,961	0,978	0,804
6748	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,957	0,974	0,804
6749	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,974	0,797
6751	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,810
PE.PL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000

**Tabela 5.** Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de citros, café, videira, amêndoa, oleander, carvalho, ameixa, amora, pêsego, *Acer macrophila*, olmo, ambrosia americana, vinca e pêra.

	<b>Citros</b>	<b>citros</b>	<b>citros</b>	<b>café</b>	<b>café</b>
<b>Seq.-&gt;</b>	<b>CI.X0</b>	<b>CI.11</b>	<b>CI.52</b>	<b>CO.01</b>	<b>6740</b>
<b>CI.X0</b>	1,000	1,000	0,998	0,994	0,994
<b>CI.11</b>	---	1,000	0,998	0,994	0,994
<b>CI.52</b>	---	---	1,000	0,996	0,996
<b>CO.01</b>	---	---	---	1,000	0,996
<b>6740</b>	---	---	---	---	1,000

**Tabela 6.** Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de citros e café.

	<b>Citros</b>	<b>café</b>	<b>café</b>	<b>uva</b>	<b>uva</b>	<b>uva</b>	<b>uva</b>	<b>uva</b>	<b>uva</b>	<b>uva</b>
<b>Seq.-&gt;</b>	<b>CI.X0</b>	<b>CO.01</b>	<b>6740</b>	<b>6068</b>	<b>GR.89</b>	<b>Trave</b>	<b>VinoF</b>	<b>STL</b>	<b>R116V</b>	<b>PD95-</b>
<b>CI.X0</b>	1,000	0,994	0,994	0,964	0,966	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968
<b>CO.01</b>	---	1,000	0,996	0,962	0,968	0,966	0,966	0,966	0,966	0,966
<b>6740</b>	---	---	1,000	0,962	0,968	0,966	0,966	0,966	0,966	0,966
<b>6068</b>	---	---	---	1,000	0,976	0,976	0,976	0,976	0,976	0,976
<b>GR.89</b>	---	---	---	---	1,000	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972
<b>Trave</b>	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>VinoF</b>	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>STL</b>	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000
<b>R116V</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000
<b>PD95-</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000

**Tabela 7.** Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de citros, café e videira.

Seq.->	Oleander				Carvalho					Pêssego		
	TR1	T1c	PF1	Ann1	Stuck	OLS#2	92-10	92-3	88-9	4S3	5R1	5S2
TR1	1,000	1,000	1,000	1,000	0,984	0,984	0,984	0,984	0,984	0,986	0,986	0,986
T1c	---	1,000	1,000	1,000	0,984	0,984	0,984	0,984	0,984	0,986	0,986	0,986
PF1	---	---	1,000	1,000	0,984	0,984	0,984	0,984	0,984	0,986	0,986	0,986
Ann1	---	---	---	1,000	0,984	0,984	0,984	0,984	0,984	0,986	0,986	0,986
Stuck	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	0,998	0,998
OLS#2	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	0,998	0,998
92-10	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	0,998	0,998	0,998
92-3	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	0,998	0,998	0,998
88-9	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,998	0,998	0,998
4S3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000
5R1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000
5S2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000

**Tabela 8.** Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de olmo, carvalho e pêssego.

<b>Seq.-&gt;6746</b>	<b>Dixon</b>	<b>Contr</b>	<b>ALS9</b>	<b>ALS7</b>	<b>ALS6</b>	<b>ALS5</b>	<b>ALS4</b>	<b>ALS3</b>	<b>ALS2</b>	<b>Tular</b>	<b>Mante</b>	<b>ALS1</b>
<b>6746</b>	1,000	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,980	0,980	0,980
<b>Dixon</b>	---	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>Contr</b>	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS9</b>	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS7</b>	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS6</b>	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS5</b>	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS4</b>	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS3</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,986	0,986	0,986
<b>ALS2</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,986	0,986
<b>Tular</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000
<b>Mante</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000
<b>ALS1</b>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

**Tabela 9.** Níveis de similaridade das seqüências de bases da região intergência 16S-23S rDNA entre linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de amêndoa.



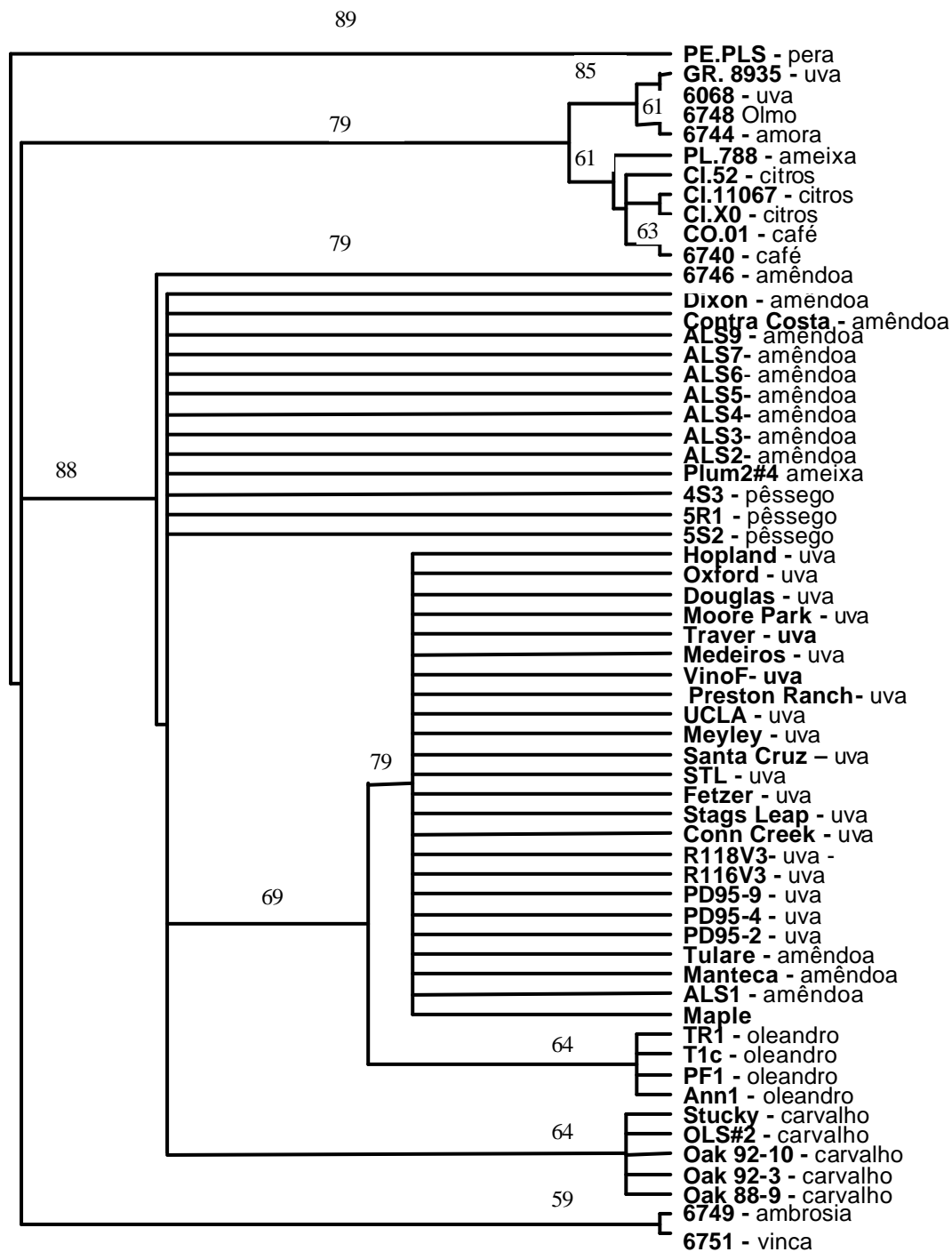


Figura 7. Cladograma gerado com o algoritmo de Busca heurística no programa PAUP\* de linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de diferentes espécies vegetais, tendo como grupo externo a linhagem de *Xylella fastidiosa* isolada de pêra (PE.PLS). Índice de consistência (CI) =0.9063 ; Índice de retenção (RI) = 0.9432 ; Índice de Homoplasia (HI) = 0.0938. Índice de consistência otimizado (RC) = 0.8548. Os números acima dos galhos são valores *bootstrap* (em %) obtidos com 2000 replicações. Apenas valores acima de 50% estão ilustrados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBIBI, R.; CHEN, J.; BANKS, D.; LAMIKAWA, O.; JARRET, R.; SMITH, B. RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's Disease strains from a vineyard in North Florida. **FEMS Microbiological Letters**, v. 165, p. 347-352, 1998.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARAÚJO, W.L. **Isolamento e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. 1996. 99f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Piracicaba, SP.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Eletronic Journal of Biotechnology [on line]**, 15 April 2000, 3 [cited 05 May 2000]. Available on the Web <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full3/4>. ISSN 0717-3458, 2000.
- BANKS, D.; ALBIBI, R.; CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; JARRET, R.L.; SMITH, B.J. Specific detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains. **Current Microbiology**, v.39, p.85-88, 1999.
- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Nutrição e Metabolismo bacteriano. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N.. **Microbiologia**, 3<sup>a</sup> Ed., Atheneu, 1999.
- BARRY, T.G.; COLLERAN, G.; GLENON, M.; DUNICAN, L.; GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria. **PCR Methods Applied**, v.01, p.51-56, 1991.
- BERETTA, M.J.G.; BACH, E.E.; ROSSETTI, V.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S. Serological detection of *Xylella fastidiosa* associated with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.01, p.10, 1991a.
- BERETTA, M.J.G.; BACH, E.E.; ROSSETTI, V.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S. Serological comparison of citrus blight from Florida with decline and citrus variegation chlorosis in Brazil. **Summa Phytopatologica**, Resumos. v.17, n.1, p. 51, 1991
- BERETTA, M.J.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M.; DERRICK, K.S.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F.; PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. **Plant Disease**, Resumos...v.80, n.7, p.821, 1996.
- BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, 1997.
- BERISHA, B.; CHEN, Y.D.; ZHANG, G.Y.; XU, B.Y.; CHEN, T.A. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in Citrus Variegated Chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, 1997.
- BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J.; Mc COY, R.E. Colonization of the sharpshooters vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by Xylem-Limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, p.530-535, 1983.
- CARVALHO, S.A. Comportamento de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) sobre enxertada em Natal/Cleópatra em presença de Clorose Variegada dos Citros (CVC). (resumo 329) Congresso Internacional de Fitopatologia, 1994.

CARVALHO, S.A.; SOUZA, M. Escaldadura das folhas da ameixa Provável responsável pelo declínio da cultura no sul do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 2015-2020, 1991.

CIGAR.htm [On line] <<http://fundecitrus.com.br/cigar.html>>

CITRICULTURA ATUAL, A Ciência em defesa da citricultura (2000) Revista Citricultura Atual Ano III, n.15, p.06, 2000.

CHAN, J.W.Y.F.; GODWIN, P.H. A physical map on the chromosome of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* BXP65. **FEMS Microbiological Letters**, v.180, p.85-90, 1999.

CHANG, C.J.; DONALDSON, R.C. *Xylella fastidiosa* cultivation in chemically defined medium. **Phytopathology**, v.83, n.2, p. 192-194, 1993.

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of a xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v. 27, p. 137-142, 1993.

CHEN, J.; CHANG, C.J.; JARRET, R.L.; GAWEL, N. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**, v.82, n.09, p. 973-977, 1992.

CHEN, J.; CHANG, C.J. Plasmids from *Xylella fastidiosa* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.993-995, 1992.

CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C.J.; HOPKINS, D.L. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's Disease and oak leaf scorch pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 1688-1690, 1995.

CHEN, J., BANKS, D.; JARRET, R.L.; JONES, J.B. Evidence for conserved tRNA genes in the 16S-23S rDNA spacer sequence and two *rrn* operons of *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1171-1175, 2000.

CHEN, J., BANKS, D.; JARRET, R.L.; CHANG, C.J.; SMITH, B. Using 16S rDNA sequence as a signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.40, p.29-33, 2000.

COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; SOUZA, A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. Differentiations of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, no. 09, p. 4091-4095, 2001.

COSTA, P.I.; FRANCO, C.F.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, G.D.; HARTUNG, J.S. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrary primed-PCR. **Current Microbiology**, v.40, p. 279-282, 2000.

COLE, S.T.; SAINT GIRON, I. Bacterial genomics. **FEMS Microbiology Review**, v.14, p.139-160, 1994.

CVC.html.[On line]. Casa Editorial Medrano < <http://www.fundecitrus.com.br/cvc.html>> [2000]

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 183-196, 2001.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMPSON, S.V. Pierce's Disease of grapevines isolation of the causal agent bacterium. **Science**, n.199, p.75-77, 1978.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for the Pirce's Disease Bacterium. **Phytopathology**, v. 70, n.05, p. 425-429, 1980.

DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf. **Current Microbiology**, n.6, p.309-314, 1981.

DAVIS, M.J.; WHITCOMB, R.F.; GILLASPIE Jr.; A.G. Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so-called rickettsia-like bacteria). P. 2177-2188. In STARR, M.P.; STOLP, H.G.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G..(ed) **The prokaryotes a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. Springer-Verlag KG, Berlin, 1981.

DERRICK, K.S.; TIMMER, L.W. Citrus Blight and Other Diseases of Recalcitrant Etiology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 181-205, 2000.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; MONTI-BRAGADIN, C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. clacoceticus* – *A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, pg1108-1113, 1995.

DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. Clorose Variegada dos Citros. In Edição Comemorativa do 15º Aniversário da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro FUNDECITRUS, Jaboticabal, p. 27, 1997.

DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella fastidiosa* and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v. 17, p. 263-271, 2000.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-18, 1990

DUNIGAN, D.D. Preparation of Genomic DNA from bacteria. **Current Protocols in Molecular Biology**, p.241-242, 1997.

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (2000) O novo produto brasileiro- Mariluce Moura **Revista Pesquisa FAPESP - Julho de 2000**, p.09-15

FEIL, H.; PURCELL, A.H. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and potted grapevines. **Plant Disease**, v. 85, n.12, p. 1230-1234, 2001.

FELDMANN, A.W.; HANKS, R.W.; GOOD, G.E.; BROWN, G.E. Occurrence of a bacterium in YTD-affected as well as healthy citrus trees. **Plant Disease Report**, v.61, p. 546-550, 1977.

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies an approach using the bootstrap. **Evolution**, v 39 p.783-791, 1985.

FERREIRA, H.; NETO, J.R.; GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y. A simplified subtractive hybridization protocol used to isolate DNA sequences specific to *Xylella fastidiosa*. **Microbiology**, v.145, p.1967-1975, 1999.

FREITAG, J.H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, v.41, p. 920-934, 1951.

FRY, S.M.; HUANG, J.S.; MILHOLLAND, R.D. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Phytopathology**, v.84, n.04, p.357-363, 1994.

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da agricultura Descoberta abre novas frentes de combate às cigarrinhas. Revista do Fundecitrus, ano XIV n. 99, p.10-11; 2000.

FUNDECITRUS. <http://www.fundecitrus.com.br> (2001-2002)

GARCÍA MARTINEZ, J.; ACINAS, S.G.; ANTÓN, A.I.; RODRÍGUEZ VALERA, F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 55-64, 1999.

GARDNER, J.M.; FELDMANN, A.W.; ZABLOTOWICS, M. Identify and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1335-1342, 1982.

GIRIBET, G. and W.C. WHEELER On gaps. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v.13, no. 1, p.132-143,1999.

GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of disease in grapevines. **Phytopathology**, v. 63, p. 341-345, 1973.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142, p.3-16, 1996.

HALLMAN, J.; QUADT-HALMAN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HARTUNG, J.J.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium Axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.64, p.591-597, 1994.

HEARON, S.S.; SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Association of a xylem-limited bacteria with elm, sycamore and oak leaf scorch. **Canadian Journal of Botany**, v.58, p.1986-1993, 1980.

HENDSON, M.; PURCELL, A.H.; CHEN, D.; SMART, C.; GUILHABERT, M.; KIRKPATRICK, B. Genetic diversity of Pierce's Disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa* **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.02, p.895-903, 2001.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR Critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, v.23, n.03, p.504-511, 1997.

HILDEBRAND D.C.; PALLERONI, N.J.; SCHROTH, M.N. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 263-296, 1990.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v.85, n.2, p.209-212, 1995a.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995b.

HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.S.; McCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v. 141, p 3229-3239, 1995.

HOPKINS, D.L.; Natural host of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, v.72, p. 429-431, 1988.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* A Xylem-Limited Bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.

JENG, R.S.; SVIRCEV, A.M.; MYERS, A.L.; BELIAEVA, L.; HUNTER, D.M.; HUBBES, M. The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common gram-negative orchard epiphytes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p.69-77, 2001.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of the polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.945-952, 1993.

KAMPER, S.M.; FRENCH, W.J.; DEKLOET, S.R. Genetic relationships of some fastidious Xylem-limited bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.35, n.02, p. 185-188, 1985.

KISS, A.; SAN, B.; VENETIANER, P. The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v.79, p.77-79, 1977.

KOSTKA, S.J.; TATTAR, T.A.; SHERALD, J.L.; HURTT, S.S. Mulberry leaf scorch, a new disease caused by a fastidious xylem-inhabiting bacterium. **Plant Disease**, v.70, p. 690-693, 1986.

KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J.; STULL, T.L. Molecular epidemiology of *Pseudomonads cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p. 2084-2087, 1992.

LACAVA, P.T. **Isolamento, caracterização genética por RAPD e resistência a antibióticos em *Xylella fastidiosa***. 2000. 108f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Piracicaba, São Paulo.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L. RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Letters In Applied Microbiology**, v. 33, p. 302-306, 2001.

LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.S.; CAMARGO, L.E.A.; GOLDMAN, G.H. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p. 459-462, 2000.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU Jr.,J.; HAKAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.02, p.147-154, 1998.

LEBLOND-BOURGET, N.; PHILIPPE, H.; MANGIN, I.; DECARIS, B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analysis reveal inter-and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, n.01, p.102-111, 1996.

LEE, R.F.; DERRICK, K.S.; BERETTA, M.J.G.; CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V. Citrus Variegated chlorosis a new destructive disease of citrus in Brazil. **Citrus Industry**, v.72, n. 15, p. 10-13, 1991.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.. Clorose Variegada dos Citros Uma nova e destrutiva doença dos citros no Brasil. **Laranja**, v.12, n.2 , p. 345-356, 1991.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; HOOKER, M.E. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis – a new disease of citrus In Brazil. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.105, p.32-34, 1992.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v.19, n.02, p.123-125, 1993.

LEITE Jr, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica** (resumo), v. 17, p. 7, 1991.

LEITE Jr, Escaldadura da folha em ameixeira a doença e seu agente causal *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, suplemento, v. 21, p. 327, 1996.

LEITE, R.M.V.B.C.; JACOMINO, A.P. Ocorrência de clorose variegada dos citros no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 19, p. 35, 1993.

LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE Jr., R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* em ameixeiras suscetíveis e resistentes à escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n. 01, p. 58-63, 1997.

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

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.

LOPES, S.A.; ROBERTO, P.G.; FRANÇA, S.C. Hospedeiros alternativos da *Xylella fastidiosa* dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento, v.24, p.250, 1999.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; BERETTA, M.J.G.; LARANJEIRA, F.F.; CARVALHO, S.A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja pêra com clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p. 30-33, 1997.

MARQUES, M.V.; SILVA, A.M.; GOMES, S.L. Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Plasmid**, v. 45, p. 184-199, 2001.

McCOY, R.E.; THOMAS, D.L.; TSAI, J.H.; FRENCH, W.J. Periwinkle wilt disease, a new disease associated with xylem delimited rickettsialike bacteria transmitted by a sharpshooter. **Plant Disease Report**, v. 62, p. 1022-1026, 1978.

METHA, A.; ROSATO, Y.B. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different host, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.311-318, 2001.

METHA, A.; ROSATO, Y.B. Polymorphism of *Xylella fastidiosa* strains by RAPD-PCR and SDS-PAGE of proteins. Campinas, 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas – UNICAMP.

METHA, A.; ROSATO, Y.B. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and REP-PCR fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v.79, p. 53-59, 2001.

MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.; STALL, R.E. Development of a Polymerase Chain Reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, n.5, p. 456-461, 1994.

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

MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; ARIZZI, P.; Associação de bactérias do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n.12, p. 241-242, 1994.

NAGPAL, M.L.; FOX, K.F.; FOX, A. Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology How similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organism? **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, p. 211-219, 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (2001-2002)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Blast**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (2001-2002)

NAVARRO, E.; SIMONET, P.; NORMAND, P.; BARDIN, R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp., using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. **Arch. Microbiology**, v.157, p.107-115, 1992.

NOMÉ, S.F.; RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; DO CAMPO, D. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Pierce's Disease bacteria in plant tissues. **Phytopathology**, v. 70, p. 746-749, 1980.

PAGE, R. D. M. TreeView Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows, version 1.5.2. Institute of Biomedical & Life Sciences, University of Glasgow, Scotl., UK, 1998.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; GARCIA JÚNIOR, A.; BERETTA, M..J.; HAKAKAVA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; RODRIGUES NETO, J.R.; BERIAM, L.O.S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil de *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 JÚNIOR, A.; BERETTA, M..J.; HAKAKAVA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; RODRIGUES NETO, J.R.; BERIAM, L.O.S. Constatação da *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopatologica**, v.23, n.1, p. 46-49, 1997.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995a.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. **Current Microbiology**, v.31, p.134-137, 1995b.

Primer3.cgi.htm – <http://genome.wi.mit.edu/cgi.bin/primer/primer3.cgi>

PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat?. **Journal of Plant Pathology**, v.79, p.99-105, 1997.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious Xylem-Limited Bacterial Plant Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p. 131-151, 1996.

QUIN, 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, n. 06, p. 599-605, 2001.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald Isolation, culture and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, v. 72, p. 1460-1466, 1982.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citrus. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.04, p. 517-518, 1996.



- RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S.; KOMORI, N. Caracterização de isolados de *Xylella fastidiosa* de citros por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS. **Summa Phytopathologica**, (resumo), v. 18, p. 46, 1993.
- ROGALL, T.; WOLTERS, J.; FLOHR, T.; BOTTGER, E. Toward a phylogeny and the definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.323-330, 1990.
- ROSATO, Y.B.; RODRIGUES NETO, J.; 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. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, p.593-598, 1998.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose Variegada dos Citros – revisão. **Laranja**, v.11, p. 01-14, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2.ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SCHEINBERG, G. Conclusão do genoma ajuda a controlar pragas. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 16 fev. 2000, p.13.
- SCHNEIDER, B.; SEEMULLER, E. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3409-3412, 1994.
- SCHERALD, J.L.; WELLS, J.M.; HURTT, S.S.; KOSTKA, S.J. Association of fastidious xylem-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple. **Plant Disease**, v. 71, p. 930-933, 1987.
- SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P. *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, n. 13, p. 151-157, 2000.
- SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELLI, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference In D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable [eds.], **Molecular Systematics**, 407-425, Sinauer Associates, Inc., 2.ed., Sunderland, MA, USA, 1996.
- TIMMER, L.W.; BRLANSKY, R.H.; LEE, R.F.; RAJU, B.C. A fastidious, xylem limited bacterium infecting ragweed. **Phytopathology** v.73, p. 975-979, 1983.
- THOMPSON, J.D.; DESMOND, G.H.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, no. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TUBELIS, A.; RODRIGUES NETO, J.; BERETTA, M.J.G. Primeira constatação da anomalia clorose variegada dos citros no Estado de Goiás. **Summa Phytopathologica**, (resumo) v. 19, p. 46, 1993.
- TYLER, S.D.; STRATHDEE, C.A.; ROZEE, K.R.; JOHNSON, W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic Pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacer. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.02, p. 448-453, 1995.
- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOOLER, M. Reação da polimerase em cadeia. **O DNA recombinante**. 2ª edição, p.75-93, 1997.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. 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.

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

WELLS, J.M.; RAJU, B.C. Cellular Fatty Acid Composition of Six Fastidious, Gram-negative, Xylem-limited Bacteria from Plants. **Current Microbiology**, v.10, p. 231-236, 1984.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y. WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL; L.;BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov. Gram-negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp.. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, v.51, p.221-271, 1987.

XYLELLA.htm. [On line].< <http://watson.fapesp.br/xylella.htm>>