**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xylella fastidiosa* EM
TRÊS REGIÕES PRODUTORAS DE CITROS (*Citrus
sinensis*) DO ESTADO DE SÃO PAULO**

ADRIANE WENDLAND
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de concentração:
Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Wendland, Adriane

Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em três regiões produtoras de citros
(*Citrus senensis*) do Estado de São Paulo / Adriane Wendland. - - Piracicaba, 2000.
75 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Bactéria 2. Clorose-variegada-dos-citros 3. Diversidade genética 4. Fruta cítrica
5. Xilema I. Título

CDD 634.3

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais: **Walter e Magda**

Por todo amor e incentivo

Dedico

À minha irmã **Andréia** e minha sobrinha **Amanda**

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo à Deus, pela presença constante em minha vida.

À ESALQ/USP pela oportunidade de progredir e aos professores do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo.

Em especial ao Prof. Dr. Luis E. Aranha Camargo por seus ensinamentos, pela valiosa orientação, confiança e incentivos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Pesquisa pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Rui Pereira Leite Jr, Prof. Dr. Armando Bergamin Filho e ao Prof. Dr. João R. Spoti Lopes pela cooperação, observações e idéias que aprimoraram esta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP: Marina, Jeferson, Edvaldo, Fernanda e Rodolfo pela colaboração durante o curso.

À alguns amigos e aos companheiros de trabalho do Laboratório de Genética Molecular: Alice, Andréia, Célia, Daniela, Jaqueline, Juliana, Kátia, Maeli, Maria Teresa, Mariana, Maurício, Paulo, Raquel, Regina, Rodrigo, Viviane e aos colegas do Curso de Pós Graduação em Fitopatologia da ESALQ/USP pela agradável convivência e auxílio.

Aos amigos: Cibele, Érica, Giorla, Glória, Kardeal, Kátia, Lilian, Mônica e Viviane pelos momentos compartilhados, pelo apoio e inestimável amizade.

À todos que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A Clorose Variegada dos Citros	4
2.2 O Patógeno	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Obtenção de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	14
3.1.1 Obtenção de isolados de uma mesma planta de citros	15
3.1.2 Obtenção de isolados de <i>X. fastidiosa</i> de outros hospedeiros	16
3.2 Obtenção do DNA genômico de <i>X. fastidiosa</i>	16
3.3 Confirmação da identidade dos isolados de <i>X. fastidiosa</i> com os iniciadores RST 31/ 33 e CVC-1/272-2 int	17
3.4 Avaliação da frequência de polimorfismos de sequência na região amplificada pelos iniciadores RST 31/ 33	19
3.5 Amplificação de seqüências ERIC, BOX e REP (Rep-PCR)	20
3.6 Avaliação da frequência do plasmídio pXF51 em isolados de <i>X.</i> <i>fastidiosa</i>	22

4 RESULTADOS	24
4.1 Coleção de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	24
4.1.1 Obtenção de isolados de uma mesma planta de citros.....	28
4.2 Confirmação da identidade dos isolados de <i>X. fastidiosa</i> de citros com os iniciadores RST 31/33.....	30
4.3 Análise da sequência nucleotídica obtida da região amplificada pelos iniciadores RST 31/33.	32
4.4 Análise de sequências repetitivas de dna amplificadas com os iniciadores eric, box e rep (rep-pcr).....	35
4.4.1 De isolados de <i>X. fastidiosa</i> obtidos de diferentes plantas de citros...35	
4.4.2 De isolados de <i>X. fastidiosa</i> obtidos de uma mesma planta de citros.....	43
4.4.3 De isolados de <i>X. fastidiosa</i> obtidos de outros hospedeiros.....	46
4.5 Avaliação da frequência do plasmídeo pXF51 em isolados de <i>X. fastidiosa</i>	48
5 DISCUSSÃO	51
5.1 Obtenção dos isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	51
5.2 Análise da sequência nucleotídica obtida da região amplificada pelos iniciadores RST31/33.	51
5.3 Análise de sequências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (rep-PCR).....	53
5.4 Avaliação da frequência do plasmídeo pXF51 entre isolados de <i>X. fastidiosa</i>	57
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (iniciadores rst 31/33) do DNA de *Xylella fastidiosa* onde, 1 corresponde ao isolado 20.06; 2: isolado 20.09; 3: isolado 20.12; 4: isolado 01.10 (provenientes de Sta R. P. Quatro, SP.); 5: isolado 01.31; 6: isolado 01.01; 7: isolado 05.01; 8: isolado 05.08; 9: isolado 08.14; 10: isolado 08.49 (provenientes de Gavião Peixoto, SP.); 11: isolado 02.07; 12: isolado 07.09; 13: isolado 11.20 (provenientes de Neves Paulista, SP.); 14: controle negativo; M: corresponde ao padrão de peso molecular de 1 kb (Pharmacia).....31

- 2 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (iniciadores CVC -1/ 272-2 int) do DNA de isolados de *Xylella fastidiosa*. M: corresponde ao padrão de peso molecular de 1 kb (Pharmacia).....31

- 3 Sequência parcial (587 pb) da região genômica de 733pb de DNA de *Xylella fastidiosa* obtidos de citros e amplificada com os iniciadores RST 31/33.32

- 4 Sequência parcial do produto de 733 pb obtido de isolados de *X. fastidiosa* de citros (0206), videira (8935, 9715), ameixeira (9777, 12304) e cafeeiro (11782) indicando os polimorfismos de sequência nucleotídica em vermelho e o sítio de restrição *Rsa*I em verde.....34

5	Posicionamento de <i>Xylella fastidiosa</i> em dendrograma construído com base em seqüência do gene <i>rpoD</i> de algumas espécies do reino bactéria e do fragmento de <i>X. fastidiosa</i> amplificado pelos iniciadores RST 31/33.....	34
6	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os iniciadores ERIC (A), REP (B) e BOX (C). Os diferentes haplótipos estão representados por H1 a H5. M corresponde ao padrão de peso molecular 1kb (Pharmacia) para ERIC e 100 pb (Promega) para REP e BOX.....	37
7	Interpretação esquemática dos haplótipos gerados pelo iniciador ERIC (A), BOX (B) e REP (C) em isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> com os respectivos tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de bases.	37
8	Freqüência de haplótipos (porcentagem) encontrados entre os isolados obtidos nas regiões Noroeste, Centro e Sul do Estado de São Paulo gerados por elementos repetitivos amplificados por rep-PCR utilizando os iniciadores ERIC, BOX e REP.....	41
9	Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard dos 19 haplótipos combinados obtidos pelos iniciadores ERIC, BOX e REP entre 106 isolados de <i>X. fastidiosa</i>	42
10	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por BOX-PCR do DNA de <i>Xylella fastidiosa</i> . Os números 1 a 4 correspondem aos isolados da planta 05.53; 5 a 8, aos isolados da planta 08.05; 9 a 11, aos isolados da planta 09.37; 12 a 15, aos isolados da planta 03.06; 16 a 19, aos isolados da planta 12.04. M corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb (Promega).....	45

- 11 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por rep-PCR do DNA de *Xylella fastidiosa*. os números 1 a 4 correspondem aos isolados da planta 05.53; 5 a 8, aos isolados da planta 08.05; 9 a 12, aos isolados da planta 12.30; 13 a 16, aos isolados da planta 09.02; 17 a 20, aos isolados da planta 10.04. M corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb (Promega)..... 45
- 12 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por rep-PCR do DNA de *Xylella fastidiosa*. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos isolados 12.30S, 12.30L e 12.30O de citros; 4 ao isolado 11840 de ameixeira; 5 e 6, aos isolados 8935 e 9715 de videira; 7 a 10, aos isolados 12372, 12375, 12378 e 11753 de cafeeiro; 11 a 13, aos isolados 09.37S, 09.37N, 09.37L de citros. M corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb (Promega)..... 47
- 13 Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (iniciadores MEGAR e MEGAF) do DNA de *Xylella fastidiosa*. M corresponde ao padrão de peso molecular de 1 kb (Promega). 48

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Procedência e data de coleta de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> originados de plantas de Laranja Pêra.....	25
2 Procedência de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> obtidos de diversos hospedeiros.....	27
3 Procedência e tamanho de colônia de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> originados de uma mesma planta.....	29
4 Haplótipos ERIC, REP e BOX de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> procedentes de três regiões citrícolas do Estado de São Paulo.....	38
5 Representantes dos 19 haplótipos combinados obtidos com os iniciadores ERIC, REP e BOX entre os isolados de <i>Xylella</i> <i>fastidiosa</i>	40
6 Relação dos haplótipos obtidos por rep-PCR em 48 isolados de <i>Xylella</i> <i>fastidiosa</i> originados de folhas de citros coletadas (em quatro pontos distintos de uma mesma planta) em plantas de laranja Pêra localizadas em Neves Paulista, Gavião Peixoto e Santa Rita do Passa Quatro.....	43
7 Relação dos haplótipos obtidos por amplificação do DNA de isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> originados de diferentes hospedeiros.....	47

- 8 Relação da frequência do plasmídio pFX51 obtido por amplificação do DNA de isolados de *Xylella fastidiosa*, procedentes de três regiões citrícolas do Estado de São Paulo, com os iniciadores MEGAR e MEGAF49
- 9 Relação da frequência do plasmídio pFX51 obtido por amplificação do DNA de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de uma mesma planta, procedentes de três regiões citrícolas do Estado de São Paulo, com os iniciadores MEGAR e MEGAF50

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xylella fastidiosa* EM TRÊS REGIÕES PRODUTORAS DE CITROS (*Citrus sinensis*) DO ESTADO DE SÃO PAULO

Autora: ADRIANE WENDLAND

Orientador: LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

RESUMO

Xylella fastidiosa Wells et al. (1987) é agente causal de doenças em diversas culturas de importância econômica, entre elas a clorose variegada dos citros (CVC). Em recente levantamento da incidência da CVC no Estado de São Paulo, foi observado que a doença está presente em toda a região citrícola e é mais severa na região Norte que na Sul. Este estudo teve por objetivo averiguar o grau de diversidade genética existente entre 138 isolados de *X. fastidiosa* coletados nas regiões citrícolas Sul, Centro e Noroeste do Estado de São Paulo. Isolados de videira, ameixeira e cafeeiro também foram incluídos para servirem como referências nos estudos moleculares.

A identidade dos isolados foi confirmada com a amplificação de DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR) com os iniciadores RST 31/33. A sequência nucleotídica do fragmento genômico amplificado por estes iniciadores foi determinada para isolados de *X. fastidiosa*. Não foram observados polimorfismos de sequência nucleotídica entre isolados de citros. Já os isolados obtidos de videira, cafeeiro e ameixeira apresentaram polimorfismos de sequência quando comparados a *X. fastidiosa* de citros. Esta sequência apresenta alto grau de homologia com genes *rpoD* que codificam a subunidade

sigma de RNA polimerase em diversos gêneros bacterianos. Comparações dessa sequência com a de 12 espécies de Proteobactérias agrupou *X. fastidiosa* com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, concordando com o seu posicionamento taxônomico dentro do grupo das *Xanthomonadaceas*.

A diversidade genética entre os isolados também foi averiguada por amplificação de seqüências conservadas e repetitivas no DNA genômico de *X. fastidiosa* com os iniciadores ERIC, REP e BOX (rep-PCR). Os perfis obtidos com os três iniciadores foram analisados em conjunto e um total de dezenove haplótipos combinados foi obtido. Maior diversidade de haplótipos combinados foi encontrada em Neves Paulista, representante da região Noroeste do Estado de São Paulo. Alguns haplótipos só foram detectados nessa área. Os isolados de Santa Rita do Passa Quatro apresentaram maior freqüência do haplótipo onze e os isolados de Gavião Peixoto, do haplótipo quatorze. Foi possível identificar a existência de isolados de *X. fastidiosa* geneticamente distintos dentro de uma mesma planta de citros. Estimativas de similaridade genética entre haplótipos combinados variaram acima de 60%. Isolados de videira apresentaram perfis bem distintos entre si e diferiram dos demais isolados de outros hospedeiros. Os isolados de cafeeiro e ameixeira apresentaram perfis similares aos dos isolados de citros. A ocorrência do plasmídio pXF51, seqüenciado recentemente pelo Projeto Genoma de *X. fastidiosa*, foi determinada por PCR. Iniciadores específicos foram sintetizados e a amplificação do fragmento de 750 pb foi positiva em 73 dos 90 isolados incluídos neste estudo.

GENETIC DIVERSITY OF *Xylella fastidiosa* IN THREE CITRUS PRODUCTION REGIONS IN SÃO PAULO STATE

Author : ADRIANE WENDLAND
Adviser: Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

SUMMARY

Xylella fastidiosa Wells et al. (1987) is the causal agent of many economically important plant diseases, including citrus variegated chlorosis (CVC). Incidence analysis of CVC in three citrus growing regions in the State of São Paulo show that the disease is present in all of these regions and is more severe in the North than in the South. One hundred thirty eight isolates cultured on PWG medium were obtained from three orchards located at distinct citrus growing regions in the State of São Paulo (Neves Paulista, Gavião Peixoto and Santa Rita do Passa Quatro). Strains isolated from grapevine, plum and coffee were also included in this study.

The nucleotide sequence of the genomic fragment, specific of *Xylella fastidiosa*, amplified by the pair of primers RST 31/33, was determined for thirty eight isolates of citrus and for isolates of grapevine, coffee and plum the level of sequence polymorphism of this fragment among isolates was evaluated, as well as its genomic identity. Sequence polymorphisms were not observed among isolates of citrus, but were detected among isolates of citrus and of grapevine, coffee and plum. The presence of the restriction site *Rsa*I, that distinguishes

isolates of citrus and grapevine from isolates of plum and other arboreal species was identified, as expected, in a North American isolate of plum but not in a Brazilian one. The nucleotide sequence of this fragment is highly homologous to that of *rpoD* genes that encode the sigma subunit of RNA polymerase in several bacterial species. Comparisons of that sequence with the ones of 12 species of Proteobacteria grouped *X. fastidiosa* with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agreeing with its current taxonomic positioning in the *Xanthomonadacea* group.

The genetic diversity of *X. fastidiosa* was assessed by comparing haplotypes obtained from repetitive element-based polymerase chain reaction (rep-PCR). Comparisons of banding patterns of genomic DNA fragments amplified with ERIC primers revealed multiple products varying from 500 to 900 bp in two haplotypes. With REP primers revealed multiple products varying from 200 to 2200 bp in four haplotypes, and BOX primers revealed products varying from 270 to 1600 bp in five distinct haplotypes. A total of 19 combined haplotypes were found, one of which (haplotype 11) was prevalent in Santa Rita do Passa Quatro and other (haplotype 14) was prevalent in Gavião Peixoto. The remaining haplotypes were detected at intermediate frequencies in Neves Paulista. The presence of the plasmid pXF51, sequenced recently by the Genome Project of *X. fastidiosa* was determined by PCR. Plasmid specific primers amplified 750-bp fragment in 73 out of 90 isolates studied in the present thesis.

1 INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC), uma das principais doenças da citricultura brasileira na atualidade, é causada por *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987), uma bactéria limitada ao xilema, fastidiosa, gram-negativa, não-móvel, aflagelada, baciliforme e estritamente aeróbia. Detectada pela primeira vez no Norte do Estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro em 1987 (Rosseti et al., 1990b), a doença alastrou-se rapidamente pela região produtora. Amaro et al. (1997) relataram que a doença está espalhada por toda a região citrícola do Estado e que é mais grave nas regiões Norte quando comparada à região Sul. Em recente levantamento da incidência da CVC no Estado de São Paulo realizado pela Fundecitrus entre os meses de junho e julho de 2000, foi constatado que a incidência da doença passou de 23,1% a 52,62% na região Norte, ao passo que no Sul houve uma redução de 23,7% para 15,70%. Esta marcante diferença é interessante do ponto de vista prático, pois um estudo aprofundado de suas causas pode fornecer subsídios ao controle da enfermidade.

Estudos da variabilidade genética de isolados de *X. fastidiosa* suportam a hipótese de que essas bactérias constituem uma espécie única (Chen et al.,

1992ab; Wells et al., 1987). Entretanto, parece haver variabilidade genética suficiente para justificar separações ao nível subespecífico (Chen et al., 1992ab; Hopkins, 1989; Wells et al., 1987). Leite Jr. et al. (1998) compararam isolados de citros em que a similaridade genética variou de 0,77 a 1,00 estimada com base no valores combinados dos perfis obtidos pelas endonucleases *Not* I e *Sfi* I. Em comparação com isolados de citros e cafeeiro, a similaridade variou de 0,69 a 0,84, e de isolados de citros com videira, variou de 0,31 a 0,45. Uma região específica com inserção de 28 nucleotídeos, por exemplo, foi encontrada no genoma de isolados de citros diferenciando-os de isolados de videira (Pooler & Hartung, 1995). Além disso, variabilidade nutricional tem sido reportada para *X. fastidiosa* entre isolados obtidos de uma mesma planta hospedeira (Uchibaba et al., 1992).

Famílias de seqüências repetitivas de DNA presentes no genoma de bactérias têm sido utilizadas na caracterização e subdivisão de espécies bacterianas a nível infraespecífico (Louws, 1995). Três famílias têm sido estudadas mais detalhadamente: seqüências de 35 - 40 pb, denominadas "palindrômicas repetitivas extragênicas" (REP), as de 124 - 127 pb "consensuais intergênicas repetitivas enterobacterianas" (ERIC) e as de 154 pb denominadas "BOX" que possuem número de cópias semelhante às seqüências ERIC (Martin et al., 1992). A amplificação dessas seqüências por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) permite uma rápida avaliação da variabilidade genética em populações (Louws, 1994). Essa informação, por sua vez, pode ser associada à distribuição microgeográfica do patógeno no

campo e auxiliar na formulação de hipóteses a respeito da epidemiologia da doença (Vera Cruz, 1996).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética de isolados de *Xylella fastidiosa* coletados nas regiões citrícolas Noroeste, Centro e Sul do Estado de São Paulo por meio de rep-PCR. Outras técnicas moleculares, como seqüenciamento de fragmento genômico amplificado pelos iniciadores RST 31/33 e PCR com iniciadores que amplificam o plasmídeo pXF51, foram utilizadas para averiguar se populações geneticamente distintas ocorrem nas referidas áreas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Clorose Variegada dos Citros

A clorose variegada dos citros, ou CVC, foi observada pela primeira vez em 1987 em pomares localizados no município de Colina, São Paulo (Rossetti et al., 1990b). A doença se alastrou rapidamente pela região produtora e, atualmente, é citada como um dos fatores responsáveis pela retração na produtividade de citricos do país (Neves, 1998). A CVC também ocorre no Paraguai, constatada em 1997, e na Argentina, onde foi encontrada pela primeira vez na região de Misiones em 1984 (Rossetti et al. 1990a).

Sintomas da doença estão relacionados com o transporte irregular de água e nutrientes nos vasos do xilema, que são bloqueados por células bacterianas, tiloses e gomas (Hopkins, 1989), por desbalanço hormonal (French & Stassi, 1978) e pela presença de fitotoxinas (Lee et al., 1982). Os sintomas, que podem ser facilmente confundidos com estresse hídrico ou deficiências nutricionais (Malavolta et al., 1990), vão desde manchas cloróticas, queimaduras nos bordos das folhas, morte de ponteiros, redução no tamanho dos frutos, excesso de frutificação no mesmo ramo, suscetibilidade dos frutos à queimaduras causadas pelo sol, seca de ramos e declínio no vigor das plantas.

Porém, muitas plantas, embora infectadas são assintomáticas, dificultando a diagnose da doença (Wells et al., 1987)

A doença recebeu o nome de Clorose Variegada dos Citros em 1990, devido aos sintomas foliares que são caracterizados por manchas cloróticas na superfície superior da folha e por pequenas pontuações de coloração marrom, semelhante a exsudação de goma, na superfície inferior correspondente da folha (Rossetti et al., 1990a). A qualidade dos frutos é comprometida devido ao endurecimento e redução acentuada do seu tamanho, tornando-os impróprios tanto para o comércio “in natura” quanto para a extração de suco. Os sintomas são classificados em dois níveis: nível 1 quando as plantas de citros apresentam sintomas apenas nas folhas e nível 2 quando são observados frutos de tamanho reduzido nas plantas (Fundecitrus, 2000).

Todas as cultivares comerciais de laranja doce são afetadas pela CVC independentemente do porta-enxerto utilizado. Não foram encontrados sintomas em mandarinas, murcott, limões verdadeiros e em lima ácida Galego (Carvalho et al. 1995).

A transmissão de *Xylella fastidiosa* ocorre através de cigarrinhas da família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae e Cercopidae, que se alimentam da seiva bruta das plantas (Purcell e Hopkins, 1996). As espécies transmissoras mais comuns em citros no estado de São Paulo são *Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* (Roberto et al. 1996). Atualmente foram reportadas mais onze espécies envolvidas na transmissão do patógeno, entre elas, *Bucephalogonia xanthopis*, *Plesiommata corniculata*,

Ferrariana trivittata, *Homalodisca ignorata*, *Macugonalia leucomelas*, *Parathona gratiosa* e *Sonesimia grossa* (Krügener et al., 1998; Fundecitrus, 2000). Estudos continuam sendo realizados, visto que a entomofauna de Homópteros é numerosa, principalmente na vegetação rasteira presente em pomares, e novas espécies poderão ser acrescentadas a esta lista (Pereira et al. 1996).

Mudas infectadas também podem disseminar o patógeno, entretanto a transmissão de *X. fastidiosa* através de instrumentos cortantes ou por sementes ainda não foi constatada (Sugimori et al., 1995). Entre as diversas plantas invasoras de pomares, algumas delas também são hospedeiras da bactéria, como por exemplo *Lolium multiflorum* (azevém), *Digitaria* sp. (capim colchão), *Richardia* sp. (poaia branca) e *Taraxacum officinale* (dente-de-leão) (Leite et al., 1997; Travençolo & Leite, 1996).

Em adição aos métodos tradicionais de cultivo, serologia e microscopia, técnicas moleculares baseadas em seqüências de DNA específicas também têm sido utilizadas para detecção de *X. fastidiosa* por meio da reação de polimerase em cadeia (PCR). Diversos iniciadores foram desenvolvidos com base em seqüências específicas de determinadas regiões genômicas da bactéria (Minsavage et al., 1994, Pooler & Hartung, 1995, Beretta et al. 1997). O par de iniciadores RST 31/33, por exemplo, produz um fragmento de 733 pb para *X. fastidiosa* obtida em diferentes hospedeiros e têm sido utilizado rotineiramente na identificação dessa bactéria. A digestão do fragmento de 733 pb com a enzima de restrição *RsaI* permitiu diferenciar os isolados em dois grupos distintos de *X. fastidiosa*: o primeiro grupo correspondeu a isolados do

mal de Pierce e CVC, que apresentaram um único fragmento de 733 pb, e o segundo grupo a isolados de ameixeira e espécies arbóreas que apresentaram dois fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pb e 100 pb após a digestão com a enzima (Minsavage et al., 1994).

Os citricultores convivem com a doença em seus pomares utilizando basicamente três medidas de controle: produção de mudas livres do patógeno, monitoramento da população de cigarrinhas com a aplicação de inseticidas e poda de ramos doentes (Donadio et al., 1998).

Estudos sobre a dinâmica tempo-espacial da CVC se restringem a apenas dois trabalhos publicados. Gottwald et al. (1993) sugerem uma limitada dispersão do patógeno, provavelmente decorrente de uma baixa autonomia de voo de insetos transmissores, ao passo que Laranjeira (1997) postula uma maior importância da autoinfecção comparado a aloinfecção, isto é, o inóculo gerado dentro do próprio pomar é o principal responsável pelo progresso da doença em detrimento de inóculo de origem externa. Tomados em conjunto, os resultados destes trabalhos tornam razoável supor que existe restrito fluxo gênico entre populações de regiões geograficamente distintas. Neste caso, espera-se uma maior diversidade genética entre isolados provenientes de regiões diferentes do que entre isolados da mesma região.

Amaro et al. (1997) observaram que a doença está espalhada por toda a região citrícola do Estado e que é mais grave nas região Norte quando comparada à região Sul. Em recente levantamento da incidência da CVC no Estado de São Paulo pela Fundecitrus, foi constatado que a incidência da

doença na região Norte passou de 23,1% a 52,62% em três anos, ao passo que no Sul houve uma redução de 23,7% para 15,70% (Fundecitrus, 2000). Esta marcante diferença é interessante do ponto de vista prático, pois um estudo aprofundado de suas causas pode fornecer subsídios ao controle da enfermidade. Variáveis climáticas e diferenças genéticas entre populações do patógeno, por exemplo, podem estar relacionadas com o perfil epidemiológico diferenciado da doença verificada nessas regiões.

2.2 O patógeno

Xylella fastidiosa (Wells et al., 1987) é uma bactéria fastidiosa, gram-negativa, não-móvel, aflagelada, baciliforme e estritamente aeróbia. Inicialmente, essa bactéria foi associada a membros da família Rickettsiaceae devido a similaridades na morfologia e ultraestrutura da célula bacteriana (Leite, 1989). Entretanto, a relação encontrada entre *X. fastidiosa* e espécies da família Rickettsiaceae através de estudos de homologia de DNA foi de somente 2% (Wells et al., 1987). Além disso, a composição do DNA de *X. fastidiosa* apresenta teores de G+C de 49,6% (Simpson et al., 2000) enquanto *Rickettsia quintana* apresenta esses teores em torno de 38,5 mol% (Davis et al., 1980). Atualmente, verificou-se que *X. fastidiosa* está geneticamente relacionada com o grupo das *Xanthomonadaceas* (Simpson et al., 2000).

É responsável por doenças de grande importância econômica em diversas culturas, como mal de Pierce em videira (Davis et al., 1980), “phony peach” em pessegueiro (Wells et al., 1981), escaldadura das folhas em

ameixeira (Raju et al., 1982; French, 1982), clorose variegada dos citros (Chang et al., 1993; Rossetti et al., 1990b) e requeima do cafeeiro (Paradela et al., 1995; Beretta et al., 1996). Foi relatada também em alfafa (Goheen et al., 1973), pereira (Leu & Su, 1993), noqueira pecã (Sanderlin, 1998) e outros hospedeiros que englobam espécies de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (Freitag, 1951; Hopkins, 1989; Wells et al., 1987).

Inicialmente a bactéria *X. fastidiosa* foi associada a uma doença que ocorria nas videiras da Califórnia, EUA, denominada de “mal de Pierce” (Pierce, 1892). Devido ao fato de ser transmitida por enxertia e insetos vetores, acreditava-se que o agente causal da doença era de origem virótica. Entretanto, a ocorrência de remissão dos sintomas nas plantas após a aplicação de tetraciclina evidenciou que o patógeno se tratava de uma bactéria (Hopkins & Mortesen, 1971). Os sintomas apresentam-se como necroses marginais nas folhas, alteração do vigor das plantas e, conseqüentemente, baixa produção (Raju & Wells, 1986). A ocorrência do mal de Pierce já foi relatada na Ásia (Leu & Su, 1993) e na Europa (Berisha et al., 1998). Outra doença causada por *X. fastidiosa*, constatada nos Estados Unidos e no Brasil na década de 70, é a escaldadura da folha da ameixeira (Raju & Wells, 1986; Kitajima et al., 1981). Sua ocorrência tornou-se o principal fator responsável pelo declínio da cultura nos estados da região Sul do Brasil (French & Feliciano, 1982; Kitajima et al., 1981, Mohan et al., 1980). A clorose variegada dos citros (CVC), também causada por *X. fastidiosa* (Chang et al., 1993; Lee et al., 1993; Leite e Leite, 1991; Rossetti et al., 1990b) é, na atualidade, uma grave ameaça para a

citricultura em diversas regiões do Brasil. Além dessas culturas, *X. fastidiosa* também foi descrita em cafeeiro na região Centro-Sul do Brasil, causando encurtamento de internódios, desfolha dos ramos e presença de tufos de folhas apenas nas pontas dos ramos (Paradela et al., 1995).

O isolamento e cultivo da bactéria *in vitro* é demorado e trabalhoso devido a exigência de meios complexos e ao seu crescimento muito lento, que favorece a contaminação (Goodwin & Zhang, 1997).

Os primeiros estudos de variabilidade genética entre isolados de *X. fastidiosa* obtidos de diferentes hospedeiros suportavam a hipótese de que essas bactérias constituíam uma espécie única (Chen et al., 1992ab; Wells et al., 1987). Entretanto, parece haver variabilidade genética suficiente para justificar a separação ao nível infrasubespecífico (Chen et al., 1992ab; Hopkins, 1989; Wells et al., 1987). Uma região específica com inserção de 28 nucleotídeos, por exemplo, foi encontrada no genoma de isolados de citros diferenciando-os de isolados de videira (Pooler & Hartung, 1995).

Famílias de seqüências repetitivas de DNA presentes no genoma de bactérias têm sido utilizadas na caracterização e subdivisão de espécies bacterianas a nível infraespecífico (Louws, 1995). Três famílias têm sido estudadas mais detalhadamente: seqüências de 35 - 40 pb, denominadas "palindrômicas repetitivas extragênicas" (REP), que possuem um número de cópias variando entre 500 a 1000 em *E. coli* (Gilson et al. 1984), as de 124 - 127 pb denominadas "consensuais intergênicas repetitivas enterobacterianas" (ERIC) com número de cópias de 30-50 em *E. coli* e as de 154 pb denominadas

“BOX” que possuem número de cópias semelhante às seqüências ERIC (Martin et al., 1992). Os elementos BOX parecem estar envolvidos na ligação da DNA girase e terminação da transcrição durante a replicação (Versalovic et al. 1991). As seqüências REP foram descritas inicialmente como seqüências com potencial regulatório dentro de regiões de operons não codificadoras em virtude da sua natureza palindrômica e devido a sua habilidade de formar estruturas estáveis de “stem-loop” no RNA transcrito (Versalovic et al., 1991). Os elementos ERIC maiores que 126 pb contêm seqüência central repetitiva, invertida e altamente conservada, localizada na região intergênica (Hulton et al., 1991). Dois mecanismos podem contribuir para o alto grau de conservação evolucionária destes elementos repetitivos: a seleção natural pode restringir a variação dessas seqüências por representarem locais de interação entre proteínas essenciais e o DNA e/ou essas seqüências podem se autopropagar por conversão gênica como um DNA “egoísta” (Gilson et al., 1990).

Essas seqüências repetitivas podem ser um indicativo da estrutura e evolução do genoma bacteriano e a sua amplificação por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) permite uma rápida avaliação da variabilidade numa população genética representativa do patógeno (Louws, 1994). Essa informação, por sua vez, pode ser associada à distribuição microgeográfica do patógeno no campo e auxiliar na formulação de hipóteses a respeito da epidemiologia da doença (Vera Cruz, 1996).

A utilização de rep-PCR para caracterização de bactérias e estudos de diversidade genética tem se mostrado como uma ferramenta útil para muitas

bactérias como por exemplo *Rhizobium* e outros habitantes do solo (de Bruijn, 1992), espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, (Louws et al. 1994) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Vera Cruz, 1996), *Clavibacter michiganensis* (Louws, 1998), espécies de *Bartonella*, *Legionella* e Cyanobactérias (Rasmussen et al., 1998). Todos estes estudos foram baseados na distribuição de seqüências ERIC, BOX e REP encontradas em eubactérias, primariamente no grupo das gram-negativas. Essas seqüências geram perfis de PCR distintos e reproduzíveis que podem ser utilizados para análise de grandes populações em diferentes níveis taxômicos e para obtenção de iniciadores específicos. Entretanto, devido a presença comum destas seqüências em várias espécies de bactérias, a utilização destes iniciadores requer culturas axênicas (Louws, 1995).

A ocorrência de elementos de DNA extracromossômicos em *Xylella fastidiosa*, assumidos como plasmídios, foi demonstrada pela primeira vez em trabalhos desenvolvidos por Chen et al. (1991). Um mapa de restrição do plasmídeo pXFPW1 de 1,3 kb foi construído utilizando diversos fragmentos de enzimas de restrição (Chen et al., 1992a). Estudos realizados por Leite et al. (1993) também revelaram sua presença em isolados de *Xylella fastidiosa*. Recentemente, a seqüência genômica completa da estirpe 9a5c de *Xylella fastidiosa* revelou que o genoma inclui um cromossomo circular de 2.679.306 pares de bases (pb) e dois plasmídios, o pXF51 com tamanho estimado de 51 kb, e o pXF1.3 de 1,3 kb. No plasmídio pXF51 foram encontradas 20 ORFs (open read frames) que codificam proteínas potencialmente envolvidas na

transferência gênica (conjugação), incluindo uma proteína similar a proteína D (VapD) que está associada à patogenicidade, encontrada em diversas espécies bacterianas. Também foi relatada a presença de quatro regiões do pXF51 que apresentam similaridade com seqüências de transposons encontrados em plasmídios de outras bactérias, sugerindo trocas interespecíficas de material genético (Simpson et al., 2000).

O exame desses plasmídios é de grande importância para o esclarecimento de diversos aspectos da genética de bactérias fitopatogênicas. Além de conferir características como resistência a antibióticos e metais pesados, plasmídios bacterianos são importantes elementos que medeiam a troca de informações genéticas entre bactérias. Um conhecimento mais detalhado desses elementos pode contribuir para o desenvolvimento de sistemas de transformação de DNA, aumentando o entendimento da evolução desse organismo e de possíveis interações entre suas diferentes estirpes e entre seus hospedeiros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados de *Xylella fastidiosa*

Folhas de laranja Pêra com sintomas da doença foram coletadas em pomares com aproximadamente sete anos de idade, localizados nas Regiões Citrícolas Noroeste (Estância Lilian - Neves Paulista), Centro (Sítio Carioca - Gavião Peixoto) e Sul (Sítio Taquaral - Santa Rita do Passa Quatro) do Estado de São Paulo. Em cada região, foram amostradas 30 plantas para realização do isolamento.

O material foi levado ao Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP e o isolamento de *X. fastidiosa* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hill & Purcell (1995). Os pecíolos foram previamente identificados, retirados das folhas sintomáticas, desinfestados superficialmente por 2 minutos em 100 mL de álcool, 100 mL de hipoclorito de sódio e rinsados em água por três vezes. Em seguida, os pecíolos foram picados em secções de aproximadamente 0,1 mm sobre papel de filtro autoclavado, transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) e homogeneizados em triturador de tecidos com haste giratória (modelo MA102,

Marconi S.A., Piracicaba, SP) a 25.000 rpm por 25 segundos. A suspensão homogeneizada foi diluída 10 vezes por transferência de 200 μ L da suspensão para tubos contendo 1,8 ml de tampão fosfato salino (PBS). Uma alíquota de 20 μ L da suspensão diluída foi depositada em placas estéreis contendo meio PWG (Hill & Purcell, 1995) constituído de 4,0 g Phytone Peptone; 1,0 g Tryptcase peptone; 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g KH_2PO_4 ; 10 mL Phenol Red 0,2%; 10 mL solução Hemincloride (0,1% em 0,05 N NaOH); 8 g Gel Rite; 50 mL L-glutamina (4 g em 50 mL dH_2O); 15 mL BSA fração V (20%); 900 mL H_2O destilada. Os reagentes do meio PWG foram misturados e autoclavados, com exceção de L-glutamina e BSA fração V que foram filtrados com Filtro Nalgene® (0,2 μ m de diâmetro) em câmara asséptica e adicionados ao meio previamente resfriado a 40 °C. Placas contendo suspensões diluídas da bactéria foram vedadas com Parafilm® e mantidas a 28 ± 1 °C até o surgimento das colônias bacterianas. Após o período de incubação, foi realizada a purificação dos isolados, que consistiu na retirada de uma colônia individual da bactéria com auxílio de alça de platina e distribuição em nova placa contendo meio PWG. Após seu crescimento, as colônias purificadas foram utilizadas para extração de DNA.

3.1.1 Obtenção de isolados de uma mesma planta de citros

Para averiguar a existência de variabilidade genética e morfológica entre isolados de uma mesma planta, quatro amostras constituídas de folhas de

laranja Pêra com sintomas de CVC foram coletadas em quatro pontos distintos de uma mesma planta. Foram amostradas quatro plantas em cada uma das três regiões citrícolas. O isolamento de *X. fastidiosa* foi feito conforme descrito anteriormente. Os 48 isolados obtidos foram purificados e utilizados para extração de DNA.

3.1.2 Obtenção de isolados de *X. fastidiosa* de outros hospedeiros

Isolados de ameixeira, cafeeiro e videira pertencentes a Coleção Bacteriológica do IAPAR e um isolado de citros, pertencente a Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Tabela 1), foram recuperados do meio PW-glicerol em que estavam armazenados a – 70°C e purificados em placas contendo meio PWG. Estes isolados foram incluídos para servirem como referências nos estudos moleculares. O isolado 9a5c, do qual foi obtida a seqüência genômica de *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000), também foi utilizado para fins comparativos.

3.2. Obtenção de DNA genômico de *X. fastidiosa*.

DNA genômico de *Xylella fastidiosa* foi extraído de 138 isolados de citros e 16 isolados dos outros hospedeiros conforme o método descrito por Ausubel (1992). Após a centrifugação e lavagem das células bacterianas (5×10^9 células/mL) em água destilada por 2 vezes, adicionou-se o tampão de extração constituído de 567 µL de tampão TE (10mM Tris e 1mM EDTA, pH

8,0), 30 μ L de 10% SDS (sodio dodecyl sulfato) e 3 μ L de proteinase K (20 mg/ml). As amostras foram mantidas a 37 °C por aproximadamente 1 hora e então foram adicionados 100 μ L de NaCl 5 M e 80 μ L da solução de CTAB/NaCl (4,1 g NaCl e 10g de CTAB em 100 ml de água). Após incubação em água a 65 °C por 10 min, as proteínas foram removidas por extração com 600 μ L de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) através de centrifugação. O DNA foi precipitado com 200 μ L de álcool etílico absoluto gelado, lavado com o mesmo volume de etanol 70% e dissolvido em 50 μ L de TE (10mM Tris e 1mM EDTA, pH 8,0). Sua concentração foi determinada com fluorômetro DyNA 200 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, EUA).

3.3 Confirmação da identidade dos isolados de *X. fastidiosa* com iniciadores RST31/33 e CVC-1/272-2 INT

A amplificação do DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR) com os iniciadores RST 31 e RST 33 (Minsavage et al., 1994) para detecção e confirmação da identidade dos isolados de *Xylella fastidiosa* foi realizada de duas formas: a) por adição direta de colônias da bactéria crescidas em meio PWG à reação de PCR, onde estas foram retiradas do meio aos 15 dias do isolamento com auxílio de palito dental previamente esterilizado e depositadas individualmente em microtubos contendo 4 μ L de tampão TE pH 8,0; e b) por adição de 4 μ L da amostra de DNA previamente extraído (aproximadamente 100 ng) na reação de PCR.

A mistura contendo tampão de amplificação (1X), 100 μ M de cada dNTP, 50 μ M dos iniciadores RST31 (5'-GCG TTA ATT TTC GAA GTG ATT CGA TTG C-3') e RST33 (5'-CAC CAT TCG TAT CCC GGT G- 3') e 1,25 U *Taq* DNA polimerase foi diluída em água destilada esterilizada e mantida no gelo durante seu preparo. Para cada reação, 22 μ L da mistura e 4 μ L de DNA foram utilizados. A amplificação por PCR foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, EUA), inicializada com desnaturação a 95°C por 1 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 min.

A amplificação do DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR) com os iniciadores CVC-1/272-2 INT (Pooler & Hartung, 1995) também foi realizada com a utilização de 2 μ L de DNA (aproximadamente 50 ng) depositados em microtubos contendo tampão de amplificação (1X), 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M dos iniciadores CVC-1 (5'-CTGCACTTACCCAATG CATCG-3') e 272-2 INT (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT- 3') e 1 U *Taq* DNA polimerase. Para cada reação, 23 μ L da mistura e 2 μ L de DNA foram utilizados. A amplificação por PCR foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, EUA), inicializada com desnaturação a 94°C por 4 min seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 67°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,5 μ g/mL de gel) por meio de eletroforese à 5 V/cm em

tampão 0.5X TBE (5,4g de tris base, 2,75 g de ácido bórico, 2,0 mL de EDTA pH 8,0 e água destilada deionizada até completar 100 mL).

Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados com ambos pares de iniciadores foram comparados com padrão de peso molecular de 1 kb. O gel foi fotografado após a corrida com auxílio de fotodocumentador ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV.

3.4 Avaliação da frequência de polimorfismos de sequência na região amplificada pelos iniciadores RST31 e RST33.

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados pelos iniciadores RST31/RST33 foi feito por meio de PCR utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA). Os fragmentos foram previamente retirados do gel de agarose de baixo ponto de fusão (Promega, Madison, WI, EUA) e purificados por meio do kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA). Para cada reação foi preparada uma mistura contendo 8 µL de TRR mix (terminator ready reaction mix), 3,2 pmol do iniciador RST31 para o sentido anverso ou 3,2 pmol do iniciador RST33 para o sentido reverso, 2,5 µL do produto previamente amplificado contendo aproximadamente 50 ng de DNA e 8,5 µL de água. A amplificação de seqüenciamento foi realizada de acordo com o protocolo "cycle sequencing" (PE Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA). Nova purificação do produto amplificado foi feita por precipitação com isopropanol em microtubos. Após a desnaturação das

amostras a 95°C por 3 min, foi realizada eletroforese em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™. As seqüências foram alinhadas e comparadas com auxílio do software Sequencher™ 3.0 (Gene Code Corporation, Michigan, EUA) com a finalidade de identificar polimorfismos nas seqüências nucleotídicas.

A seqüência dos isolados de *X. fastidiosa* de citros foi comparada a seqüências depositadas em banco de dados para identificar homologia com outras espécies bacterianas. O alinhamento destas seqüências foi utilizado para construção de um dendrograma pelo método da máxima parcimônia usando a rotina DNAPARS do software PHYLIP (versão 3.57c, Universidade de Washington, EUA).

3.5 Amplificação de seqüências ERIC, BOX e REP (REP-PCR)

Os iniciadores ERIC1R [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'], ERIC2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), BOXA1R [5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3']), REP1 R-I [5'-IIICGICGICATCIGGC-3'] e REP2 R-I [5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'] (Louws, 1995), foram utilizados para amplificação do DNA de isolados *X. fastidiosa* de citros por PCR conforme as condições descritas por de Bruijn (1992). Porém, algumas alterações foram realizadas na reação de PCR conforme descrito abaixo. Foram adicionados 4 µL (aproximadamente 100 ng), 2 µL (50 ng) e 1 µL (25 ng) da amostra de DNA extraído de cada isolado à reação de amplificação com os iniciador ERIC, REP e BOX, respectivamente.

Para o iniciador ERIC, o volume final da reação (30 μ L) conteve tampão de amplificação 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH 8.3], 0,1% Triton X 100), 3 mM de $MgCl_2$, 50 pmol de cada iniciador, 1,25 mM de dNTP e 2 U de *Tli* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, EUA). A concentração final de dNTP foi ajustada a 625 μ M (Vera Cruz, 1996). A amplificação foi realizada em termociclador (Geneamp PCR system - Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA) utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial a 95°C por 7 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 44°C por 1 min e extensão a 65°C por 8 min seguido de um ciclo final de extensão a 65°C por 15 min.

Para os iniciadores BOX e REP, o volume total da reação foi de 25 μ L contendo 2,5 μ L de tampão de amplificação 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl[pH 8.3], 0,1% Triton X 100), 2,5 mM de $MgCl_2$, 50 pmol de cada iniciador, 1 mM de dNTP e 1 U de Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, Alameda, CA, EUA) utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial a 95°C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min (40° C por 1 min para REP) e extensão a 65°C por 8 min, seguidos de um ciclo final de extensão a 65°C por 15 min.

O produto amplificado por PCR foi guardado a 4°C e uma porção de 5 a 8 μ L do produto foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% após corrida em tampão 0,5X TBE por 10 h à 5 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio e fotogradado em Fotodocumentador ImageMaster VDS sob luz UV. O

mesmo procedimento foi realizado com isolados obtidos em uma mesma planta de citros e com isolados de ameixeira, cafeeiro e videira.

Cada loco amplificado por um iniciador foi identificado de acordo com seu peso molecular estimado e recebeu uma denominação, considerando-se fragmentos de idêntico peso molecular como homólogos. Assim, cada isolado recebeu um haplótipo combinado binário no qual estão relacionados todos os locos amplificados por todos os iniciadores e que indica, dentre estes, quais os locos presentes (que receberam a denominação 1) e quais os ausentes (que receberam a denominação 0) no isolado em questão. Fragmentos com baixa resolução e/ou com peso molecular abaixo de 200 pb não foram considerados. (Sokal & Michener, 1958)

Um dendrograma foi obtido por meio da análise de matriz de similaridade gerada com a utilização do algoritmo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) no programa NTSYS – pc (versão 1.8, Exeter Biological Software, Setauket, NY) usando o coeficiente de similaridade de Jaccard (1 – coeficiente de Jaccard). A análise de agrupamentos foi obtida pelos dados gerados entre haplótipos de cada iniciador e pela combinação desses haplótipos de rep-PCR.

3.6 Avaliação da frequência do plasmídio pXF51 em isolados de *X.*

fastidiosa

Iniciadores específicos para detecção do plasmídio foram desenhados com base na sequência do mesmo descrita por Simpson et al. (2000). Os

iniciadores MEGAR (5'-TCACGTCATTGGTATTGG-3') e MEGAF (5'-TTGACAACATGGCTAAGC-3'), sintetizados por Operon Technologies (Alameda, CA, EUA), foram escolhidos de modo que não amplificassem outras regiões do genoma de *X. fastidiosa*.

A amplificação do DNA plasmidial por PCR foi realizada com a utilização de 2 µL de DNA total (aproximadamente 50 ng.) depositados em microtubos contendo tampão de amplificação (1X), 200 µM de cada dNTP, 5 ng dos iniciadores MEGAR e MEGAF e 1 U *Taq* DNA polimerase. Para cada reação, 23 µL da mistura e 2µL de DNA foram utilizados. A amplificação por PCR foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, EUA), inicializada com desnaturação a 94°C por 4 min seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL de gel) por meio de eletroforese à 5 V/cm em tampão 0.5X TBE (5,4g de Tris base, 2,75 g de ácido bórico e 2,0 mL de EDTA pH 8,0 e água destilada e deionizada até completar 100 mL). O peso molecular foi comparado com a inclusão de padrão 1 kb no gel e este foi fotografado após a corrida com fotodocumentador ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV.

4 RESULTADOS

4.1 Coleção de isolados de *Xylella fastidiosa*

Colônias de *Xylella fastidiosa* surgiram aproximadamente 12 dias após o isolamento, apresentando forma circular, coloração branca e tamanho médio de 1,12 mm. As colônias apresentaram tamanho variado entre isolados e uma classificação foi atribuída para os três tamanhos encontrados com maior frequência: P ($\cong 0,4$ mm), M ($\cong 0,8$ mm) e G ($\cong 1,5$ mm de diâmetro). O tamanho da colônia de cada isolado não variou após sucessivas repicagens e após a recuperação do meio PW/glicerol em que estavam armazenados.

Foram obtidos 90 isolados de *Xylella fastidiosa* provenientes das três regiões citrícolas. Estes foram numerados de acordo com linha do talhão e o número da planta da qual foram isolados, permitindo, caso necessário, o retorno à planta para estudos posteriores (Tabela 1).

Isolados de ameixeira, cafeeiro e videira pertencentes a Coleção Bacteriológica do IAPAR e um isolado de citros, pertencente a Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Tabela 2), foram recuperados, purificados e incluídos para servirem como referências nos estudos moleculares.

Tabela 1. Procedência e data de coleta de isolados de *Xylella fastidiosa* originados de plantas de Laranja Pêra.

Isolado	Data Isolamento	Procedência
02.01	02/99	Neves Paulista
02.02	02/99	Neves Paulista
02.06	02/99	Neves Paulista
02.07	02/99	Neves Paulista
02.08	02/99	Neves Paulista
07.01	02/99	Neves Paulista
07.09	02/99	Neves Paulista
07.10	02/99	Neves Paulista
07.20	02/99	Neves Paulista
07.25	02/99	Neves Paulista
07.26	02/99	Neves Paulista
07.27	02/99	Neves Paulista
10.06	02/99	Neves Paulista
11.20	02/99	Neves Paulista
12.22	02/99	Neves Paulista
22.11	02/99	Neves Paulista
22.14	02/99	Neves Paulista
22.15	02/99	Neves Paulista
22.20	02/99	Neves Paulista
22.32	02/99	Neves Paulista
22.36	02/99	Neves Paulista
22.40	02/99	Neves Paulista
22.66	02/99	Neves Paulista
22.72	02/99	Neves Paulista
23.06	02/99	Neves Paulista
06.10	01/99	Bebedouro
09.16	01/99	Bebedouro
09.26	01/99	Bebedouro
09.34	01/99	Bebedouro
09.37	01/99	Bebedouro
01.01	03/99	Gavião Peixoto
01.31	03/99	Gavião Peixoto
01.32	03/99	Gavião Peixoto
05.01	03/99	Gavião Peixoto
05.08	03/99	Gavião Peixoto
05.24	03/99	Gavião Peixoto
05.52	03/99	Gavião Peixoto
05.56	03/99	Gavião Peixoto
05.60	03/99	Gavião Peixoto
05.62	03/99	Gavião Peixoto
05.65	03/99	Gavião Peixoto
05.84	03/99	Gavião Peixoto
05.95	03/99	Gavião Peixoto
08.05	03/99	Gavião Peixoto
08.07	03/99	Gavião Peixoto

(Tabela 1 – continuação)

Isolado	Data Isolamento	Procedência
08.14	03/99	Gavião Peixoto
08.15	03/99	Gavião Peixoto
08.17	03/99	Gavião Peixoto
08.23	03/99	Gavião Peixoto
08.41	03/99	Gavião Peixoto
08.44	03/99	Gavião Peixoto
08.45	03/99	Gavião Peixoto
08.46	03/99	Gavião Peixoto
08.49	03/99	Gavião Peixoto
08.54	03/99	Gavião Peixoto
08.58	03/99	Gavião Peixoto
09.12	03/99	Gavião Peixoto
15.13	03/99	Gavião Peixoto
22.24	03/99	Gavião Peixoto
22.42	03/99	Gavião Peixoto
01.10	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
01.51	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
02.50	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
03.05	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
09.11	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
10.04	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
12.10	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
13.15	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
14.03	03/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.06	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.09	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.12	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.15	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.21	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.28	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.49	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.74	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.92	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.93	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
20.100	01/99	Santa Rita do Passa Quatro
12.01E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.23E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.34E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.52E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.64E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.72E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.84E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.94E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro
12.108E	11/98	Santa Rita do Passa Quatro

Tabela 2. Procedência de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de diversos hospedeiros.

Isolado	Hospedeiro	Data de Isolamento	Referência	Origem
9715	Videira	1990	¹ IAPAR	Austrália
8935	Videira	1989	(² ATCC 35879)	USA
9777	Ameixeira	1992	IAPAR	USA
11840	Ameixeira	1997	IAPAR	Irati, PR
11752	Cafeeiro	1996	IAPAR	³ São Paulo (IBSBF)
11753	Cafeeiro	1996	IAPAR	São Paulo (IBSBF)
11782	Cafeeiro	1996	IAPAR	Londrina, PR
12372	Cafeeiro	1999	IAPAR	Brasília, DF
12373	Cafeeiro	1999	IAPAR	Brasília, DF
12374	Cafeeiro	1999	IAPAR	Brasília, DF
12375	Cafeeiro	1999	IAPAR	Brasília, DF
12376	Cafeeiro	1999	IAPAR	Brasília, DF
12378	Cafeeiro	1999	IAPAR	Brasília, DF
9a5c	Citros	1993	Chang et al., 1993	São Paulo
CVC-LV	Citros	1999	⁴ CCT6570	Piracicaba, SP
CF-LV	Cafeeiro	1999	⁴ CCT6756	Matão, SP

¹ IAPAR- Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina, PR, Brasil.² ATCC- American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.³ IBSBF- Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Campinas, SP, Brasil.⁴ CCT6570 e CCT6756- Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil.

4.1.1 Obtenção de isolados de uma mesma planta de citros

Foram obtidos isolados de *X. fastidiosa* provenientes de folhas coletadas em quatro pontos distintos da planta (identificados como sul, norte, leste e oeste), totalizando dezesseis isolados para cada uma das três regiões citrícolas (Tabela 3). Estes isolados foram obtidos a fim de averiguar a existência de variabilidade genética e morfológica da bactéria numa mesma planta.

Estes isolados também apresentaram significativa variação no tamanho de colônias como descrito anteriormente. A classificação para três tamanhos encontrados com maior frequência também foi atribuída neste caso: P (0,4 mm), M (0,8 mm) e G (1,5 mm de diâmetro). Na planta 03.06, localizada em Neves Paulista, os isolados apresentaram colônias de tamanhos distintos. Os isolados 03.06 Sul e 30.06 Norte apresentaram tamanho de colônia G e os isolado 03.06 Leste e 03.06 Oeste apresentaram tamanho de colônia M. Foi possível identificar isolados com tamanhos de colônia diferentes provenientes da mesma planta em todas as três regiões citrícolas (Tabela 3).

Tabela 3. Procedência e tamanho de colônia de isolados de *Xylella fastidiosa* originados de uma mesma planta.

Procedência	Linha.Planta	Isolado	Tamanho colônia
Neves Paulista	03.06	1 Sul	G
		2 Norte	G
		3 Leste	M
		4 Oeste	M
Neves Paulista	10.40	1 Sul	M
		2 Norte	M
		3 Leste	M
		4. este	M
Neves Paulista	17.19	1 Sul	G
		2 Norte	M
		3 Leste	P
		4Oeste	M
Neves Paulista	40.10	1 Sul	M
		2 Norte	P
		3 Leste	M
		4 Oeste	G
Gavião Peixoto	05.53	1 Sul	P
		2 Norte	M
		3 Leste	G
		4 Oeste	P
Gavião Peixoto	08.05	1 Sul	G
		2 Norte	M
		3 Leste	P
		4 Oeste	M
Gavião Peixoto	09.37	1 Sul	G
		2 Norte	M
		3 Leste	G
		4Oeste	M
Gavião Peixoto	15.11	1 Sul	M
		2 Norte	M
		3 Leste	P
		4 Oeste	G

(Tabela 3 – Continuação)

S Rita Passa Quatro	09.02	1 Sul	M
		2 Norte	P
		3 Leste	M
		4 Oeste	G
S Rita Passa Quatro	12.04	1 Sul	M
		2 Norte	M
		3 Leste	M
		4 Oeste	G
S Rita Passa Quatro	12.30E	1 Sul	P
		2 Norte	P
		3 Leste	M
		4Oeste	M
S Rita Passa Quatro	13.05	1 Sul	M
		2 Norte	G
		3 Leste	G
		4 Oeste	G

4.2 Confirmação da identidade dos isolados de *X. fastidiosa* de citros

A confirmação da identidade dos isolados de *Xylella fastidiosa* foi realizada através da amplificação do DNA por PCR com os iniciadores RST31/RST33 e CVC-1/272-2 INT. As amplificações do fragmento de 733 pb obtidas por PCR com os iniciadores RST31/RST33 (Figura 1) e do fragmento de 500 pb obtidas com os iniciadores CVC-1/272-2 INT (Figura 2) foram positivas para todos os isolados incluídos neste estudo, confirmando que todos os isolados obtidos são de *Xylella fastidiosa*.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (iniciadores RST 31/33) do DNA de *Xylella fastidiosa* onde, 1 corresponde ao isolado 20.06; 2: isolado 20.09; 3: isolado 20.12; 4: isolado 01.10 (provenientes de Sta R. P. Quatro, SP.); 5: isolado 01.31; 6: isolado 01.01; 7: isolado 05.01; 8: isolado 05.08; 9: isolado 08.14; 10: isolado 08.49 (provenientes de Gavião Peixoto, SP.); 11: isolado 02.07; 12: isolado 07.09; 13: isolado 11.20 (provenientes de Neves Paulista, SP.); 14: controle negativo; M: corresponde ao padrão de peso molecular de 1 kb (Pharmacia).

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (iniciadores CVC -1/ 272-2 INT) do DNA de isolados de *Xylella fastidiosa*. M: corresponde ao padrão de peso molecular de 1 kb (Pharmacia).

4.3 Análise da sequência nucleotídica obtida da região amplificada pelos iniciadores RST31/33

Uma sequência consenso parcial de 587 pb (Figura 3) foi obtida através da sobreposição e alinhamento da sequência de cada um dos isolados em ambos os sentidos, anverso e reverso. Entre os 38 isolados de citros incluídos neste estudo, não foram observados polimorfismos de sequência nucleotídica.

```

5'-TTA AAG GGG AAT ATT GCT AAA GAT TGA AAA GCA ACA AAC AAC GAA CAA AGG CAA CGA ACA
AAG GCA ATG CCG CAT CAA CAT CGC ACC AGA TCA CAT TTG CTT GCC CTA CAC GTG ATT AAG CAC
GTA TGG GAA AGA TCA TGA CCA GAT TTG ATT CAG TCA ATA TCA AGG AAT GAG CGC AGT TGT TCA
GAA CGA CTT GGA TGA CGA AGT TTC CGT AAT GCT TTA GCT TCA ATC TGG CGA ATA CGT TCA CGA
GTG ACA TCA AAT TGT TTA CCC ACC TCC TCC AGA GTG TGG TCG GTA TTC ATA TCA ATA CCG AAA
CGC ATA CGC AGA ACC TTC GCC TCT CTT GGT GTC AAA CCA GCC AAC ACT TCA CGC ACT GTT TCC
GAC AAG TTG ACA TTG GTT GTG GTA TCC ACA GGA GAC TCA ACA TTA GGA TCC TCA ATG AAGTCA
CCC AGA TGA GAA TCT TCA TCA TCT CCG ATC GGA GTC TCC ATT GAG ATT GGC TCT TTA GCA ATC
TTC ATT ACC TTA CGG ATC TTG TCC TCA GGC ATG TCC ATT TCC TTA GCC AAT TCC TCT GGA GTC
GCC TCA CGA CCA AAC TGC TGC AA-3'

```

Figura 3. Sequência parcial (587pb) da região genômica de 733pb de DNA de *Xylella fastidiosa* de citros amplificada com os iniciadores RST31/33.

As sequências dos isolados de *X. fastidiosa* obtidos de videira e ameixeira apresentaram vários polimorfismos quando comparados a sequência de *X. fastidiosa* de citros (Figura 4). Os isolados 8935 e 9715 de videira apresentaram um total de 7 e 3 bases distintas, respectivamente, quando comparados à sequência de citros. Os isolados de ameixeira 9777 (EUA) e

12304 (Brasil) apresentaram vários polimorfismos (de 6 a 8) em relação aos isolados de citros, mas também apresentaram 4 bases polimórficas entre si. O isolado 9777 de ameixeira (EUA) apresentou o sítio de clivagem de *RsaI* (GT↑AC/CA↑TG) na posição da base 87 (Figura 4) devido a inserção do nucleotídeo T. No isolado 12304 de ameixeira procedente do Brasil, ao contrário, este sítio não foi encontrado. O isolado 11782 de cafeeiro apresentou a inserção de apenas uma única de base que o distinguiu dos isolados de citros. Os demais isolados de cafeeiro incluídos neste estudo apresentaram sequência idêntica a dos isolados de citros.

Buscas realizadas no GenBank revelaram que a sequência do fragmento RST de isolados de citros é homóloga a sequências de genes *rpoD* que codificam a subunidade sigma de RNA polimerase de diversas espécies bacterianas, entre elas *Pseudomonas fluorescens* (valor e: 2e-21), *P. putida* (valor e: 3e-20), *P. aeruginosa* (valor e: 3e-20), *P. tolaassii* (valor e: 4e-19), *E. coli* (valor e: 3e-17). A comparação destas sequências pelo método da máxima parcimônia agrupou *X. fastidiosa* com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, (Figura 5) concordando com o seu posicionamento dentro do grupo das *Xanthomonadaceas* (Wells, 1987).

ISOLADO	BASES														
	87	90	141	146	150	152	196	226	295	304	466	513	515	543	
0206-	TC	GCAC	C	C:ATG	C	A	T	A	A	G	A	T	C	:	:
8935	TC	GCAC	C	C	CATG	G	C	C	G	A	T	G	T	C	:
9715	TC	GCAC	C	C:ATG	C	A	T	A	A	G	A	C	A	C	:
9777	TC	GTAC	T	CCATG	C	C	T	G	G	T	G	T	C	:	:
12304	TC	GCAC	C	C:ATG	C	C	C	G	G	T	G	T	C	:	:
11782	TC	GCAC	C	C:ATG	C	A	T	G	A	T	A	T	C	:	C

Figura 4. Sequência parcial do produto de 733 pb obtido de isolados de *X. fastidiosa* de citros (0206), videira (8935, 9715), ameixeira (9777, 12304) e cafeeiro (11782) indicando os polimorfismos de sequência nucleotídica em vermelho e o sítio de restrição *RsaI* em verde.

Figura 5. Posicionamento de *Xylella fastidiosa* em dendrograma construído com base em sequência do gene *rpoD* de algumas espécies do Reino Bactéria e do fragmento de *X. fastidiosa* amplificado pelos iniciadores RST31/33.

4.4 Análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (Rep-PCR)

4.4.1 De isolados de *X. fastidiosa* obtidos em diferentes plantas de citros

A diversidade genética entre os 90 isolados de *Xylella fastidiosa* foi averiguada pela comparação de haplótipos gerados por elementos repetitivos amplificados por REP-PCR (Tabela 4). Somente os fragmentos de DNA que apresentaram alta intensidade e mantiveram-se constantes entre as repetições realizadas foram analisadas. Haplótipos de isolados que mostraram perfil similar com variações apenas na intensidade das bandas foram considerados idênticos.

O padrão eletroforético gerado pela amplificação dessas seqüências conservadas e repetitivas no DNA genômico de *X. fastidiosa* resultou em múltiplos produtos com variação no tamanho de aproximadamente 500 a 900 pb com o iniciador ERIC, 270 a 1600 pb com o iniciador BOX e 200 a 2.200 pb para o iniciador REP (Figura 6).

A comparação entre os padrões de bandejamento de fragmentos de DNA genômico amplificados revelou dois, cinco e quatro haplótipos distintos, respectivamente para os iniciadores ERIC, BOX e REP (Figuras 6 e 7). Os haplótipos obtidos com os iniciadores ERIC, REP e BOX foram analisados em conjunto e um total de 19 haplótipos combinados foi obtido entre os isolados de *Xylella fastidiosa* de citros (Tabela 5). Os isolados de Neves Paulista

apresentaram maior divergência genética, representada por um total de 15 haplótipos combinados. Na região de Gavião Peixoto foram encontrados apenas quatro haplótipos combinados distintos e houve predominância de isolados com haplótipo 14, freqüente em 73% dos isolados. Em Santa Rita do Passa Quatro, foi encontrado um total de sete haplótipos combinados e a população de *X. fastidiosa* foi representada em 50% por isolados que apresentaram o haplótipo combinado 11 e o restante da população por isolados que apresentaram o haplótipo 14 (20%), 18 (20%), 10, 13, 16, 17 e 19 (Figura 8).

O dendrograma construído com base na similaridade dos haplótipos combinados, determinados pelos iniciadores ERIC, BOX e REP entre os isolados de *X. fastidiosa*, demonstrou um coeficiente de similaridade superior a 90% e também distinguiu 19 grupos de linhagens, como esperado (Figura 9).

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com os iniciadores ERIC (A), REP (B) e BOX (C). Os diferentes haplótipos estão representados por H1 a H5. M corresponde ao padrão de peso molecular 1 kb (Pharmacia) para ERIC e 100 pb (Promega) para REP e BOX. A seta em branco representa os fragmentos polimórficos de cada haplótipo.

A			B					C					
Peso Molecular (pb)	HAPLÓTIPOS		Peso Molecular (pb)	HAPLÓTIPOS				Peso Molecular (pb)	HAPLÓTIPOS				
	H1	H2		H1	H2	H3	H4		H1	H2	H3	H4	H5
900	-		2200		-			1600			-	-	-
700	-	-	2050	-		-		1450	-	-	-		
660	-	-	1980	-	-	-		1200				-	
500	-	-	1560	-		-		1000			-		
			1400	-	-	-	-	800	-	-			
			900	-	-	-	-	750	-	-	-	-	-
			740	-	-	-	-	720			-	-	-
			550	-	-	-	-	670	-		-	-	-
			470	-	-		-	430			-		
			200	-	-		-	343	-	-			
								270	-	-	-	-	-

Figura 7. Interpretação esquemática dos haplótipos gerados pelos iniciadores ERIC (A), BOX (B) e REP (C) em isolados de *Xylella fastidiosa* com os respectivos tamanhos dos fragmentos amplificados em pares de bases.

Tabela 4. Haplótipos ERIC, REP e BOX de isolados de *X. fastidiosa* procedentes de três regiões citrícolas do Estado de São Paulo.

Isolado	Procedência	ERIC	BOX	REP	Haplótipo combinado
02.01	Neves Paulista	H1	H5	H3	HC01
02.02	Neves Paulista	H1	H3	H2	HC02
02.06	Neves Paulista	H1	H1	H1	HC03
02.07	Neves Paulista	H1	H1	H2	HC04
02.08	Neves Paulista	H1	H2	H4	HC05
07.01	Neves Paulista	H2	H2	H3	HC06
07.09	Neves Paulista	H2	H3	H3	HC07
07.10	Neves Paulista	H1	H3	H3	HC08
07.20	Neves Paulista	H1	H3	H3	HC08
07.25	Neves Paulista	H1	H3	H3	HC08
07.26	Neves Paulista	H1	H2	H3	HC09
07.27	Neves Paulista	H1	H3	H1	HC10
10.06	Neves Paulista	H1	H5	H2	HC11
11.20	Neves Paulista	H1	H4	H3	HC12
12.22	Neves Paulista	H2	H5	H2	HC13
22.11	Neves Paulista	H1	H3	H1	HC10
22.14	Neves Paulista	H1	H5	H1	HC14
22.15	Neves Paulista	H1	H5	H1	HC14
22.20	Neves Paulista	H1	H5	H1	HC14
22.32	Neves Paulista	H1	H2	H1	HC15
22.36	Neves Paulista	H1	H2	H1	HC15
22.40	Neves Paulista	H1	H5	H3	HC01
22.66	Neves Paulista	H1	H3	H1	HC10
22.72	Neves Paulista	H1	H3	H1	HC10
23.06	Neves Paulista	H1	H2	H1	HC15
06.10	Bebedouro	H1	H2	H1	HC15
09.16	Bebedouro	H1	H2	H1	HC15
09.26	Bebedouro	H1	H5	H2	HC11
09.34	Bebedouro	H1	H5	H2	HC11
09.37	Bebedouro	H1	H5	H2	HC11
01.01	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
01.31	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
01.32	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.01	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.08	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.24	Gavião Peixoto	H1	H1	H1	HC03
05.52	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.56	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.60	Gavião Peixoto	H1	H5	H2	HC11
05.62	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.65	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
05.84	Gavião Peixoto	H1	H5	H2	HC11
05.95	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.05	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14

(Tabela 4 – continuação)

Isolado	Procedência	ERIC	BOX	REP	Haplótipo combinado
08.07	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.14	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.15	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.17	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.23	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.41	Gavião Peixoto	H1	H1	H1	HC03
08.44	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.45	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.46	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.49	Gavião Peixoto	H1	H2	H1	HC15
08.54	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
08.58	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
09.12	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
15.13	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
22.24	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
22.42	Gavião Peixoto	H1	H5	H1	HC14
01.10	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
01.51	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
02.50	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
03.05	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
09.11	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
10.04	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
12.10	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
13.15	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
14.03	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
20.06	Santa Rita do Passa Quatro	H2	H5	H1	HC16
20.09	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
20.12	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
20.15	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H2	HC11
20.21	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H2	H2	HC17
20.28	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H2	HC11
20.49	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
20.74	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
20.92	Santa Rita do Passa Quatro	H2	H5	H2	HC13
20.93	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H1	HC14
20.97	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H2	HC11
20.100	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H5	H2	HC11
12.01E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H3	H1	HC10
12.23E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H1	HC18
12.34E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H1	HC18
12.52E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H2	HC19
12.64E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H2	HC19
12.72E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H1	HC18
12.84E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H1	HC18
12.94E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H4	H1	HC18
12.108E	Santa Rita do Passa Quatro	H1	H1	H1	HC03

Tabela 5. Representantes dos 19 haplótipos combinados obtidos com os iniciadores ERIC, REP e BOX entre os isolados de *Xylella fastidiosa*.

ISOLADO	ERIC	BOX	REP	HAPLÓTIPO COMBINADO	CÓDIGO
02.01NP	H1	H5	H3	HC1	11111000011100101111111100
02.02NP	H1	H3	H2	HC2	11111101011110110101111111
02.06NP	H1	H1	H1	HC3	11110100110101101111111111
02.07NP	H1	H1	H2	HC4	11110100110101110101111111
02.08NP	H1	H2	H4	HC5	11110100110001100001111111
07.01NP	H2	H2	H3	HC6	01110100110001101111111100
07.09NP	H2	H3	H3	HC7	01111101011110101111111100
07.10NP	H1	H3	H3	HC8	11111101011110101111111100
07.26NP	H1	H2	H3	HC9	11110100110001101111111100
07.27NP	H1	H3	H1	HC10	11111101011110101111111111
10.06NP	H1	H5	H2	HC11	11111000011100110101111111
11.20NP	H1	H4	H3	HC12	11111010011100101111111100
12.22NP	H2	H5	H2	HC13	01111000011100110101111111
22.14NP	H1	H5	H1	HC14	11111000011100101111111111
22.32NP	H1	H2	H1	HC15	11110100110001101111111111
20.06SR	H2	H5	H1	HC16	01111000011100101111111111
20.21SR	H1	H2	H2	HC17	11110100110001110101111111
12.23ESR	H1	H4	H1	HC18	11111010011100101111111111
12.52ESR	H1	H4	H2	HC19	11111010011100110101111111

Figura 8. Frequência de haplótipos (porcentagem) encontrados entre os isolados obtidos nas regiões Noroeste, Centro e Sul do Estado de São Paulo gerados por elementos repetitivos amplificados por rep-PCR utilizando os iniciadores ERIC, BOX e REP.

Figura 9. Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard dos 19 haplótipos combinados obtidos pelos iniciadores ERIC, BOX e REP entre 106 isolados de *X. fastidiosa*.

4.4.2 De isolados de *X. fastidiosa* obtidos de uma mesma planta de citros.

Isolados de *X. fastidiosa* provenientes de folhas de citros coletadas em quatro pontos distintos de uma mesma planta em cada uma das três regiões citrícolas foram submetidos a amplificação de DNA por REP-PCR. Os padrões de bandejamento gerados pela amplificação das seqüências ERIC, BOX e REP do DNA de *X. fastidiosa* permitiram identificar haplótipos distintos dentro de uma mesma planta de citros. Todos os três iniciadores utilizados possibilitaram a identificação de dois haplótipos diferentes entre os isolados de uma mesma planta (Tabela 6). Na região de Gavião Peixoto e Santa Rita do Passa Quatro, três das quatro plantas amostradas apresentaram dois haplótipos diferentes dentro da mesma planta (Figuras 10 e 11).

Tabela 6. Relação dos haplótipos obtidos por rep-PCR em 48 isolados de *X. fastidiosa* originados de folhas de citros coletadas (em quatro pontos distintos de uma mesma planta) em plantas de Laranja Pêra localizadas em Neves Paulista, Gavião Peixoto e Santa Rita do Passa Quatro.

Planta	Procedência	Isolado	Tamanho colônia	ERIC	BOX	REP	Haplótipo Combinado
03.06	Neves Paulista	1 Sul	G	H1	H3	H3	HC08
		2 Norte	G	H2 *	H3	H3	HC07
		3 Leste	M	H1	H3	H3	HC08
		4 Oeste	M	H1	H3	H3	HC08
10.40	Neves Paulista	1 Sul	M	H1	H5	H1	HC14
		2 Norte	M	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	M	H1	H5	H1	HC14
		4 Oeste	M	H1	H5	H1	HC14
17.19	Neves Paulista	1 Sul	G	H1	H3	H3	HC08
		2 Norte	M	H1	H3	H3	HC08
		3 Leste	P	H1	H3	H3	HC08
		4 Oeste	M	H1	H3	H3	HC08

(Tabela 6 – continuação)

Planta	Procedência	Isolado	Tamanho colônia	ERIC	BOX	REP	Haplótipo Combinado
40.10	Neves Paulista	1 Sul	M	H1	H5	H1	HC14
		2 Norte	P	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	M	H2	H5	H1	HC16
		4 Oeste	G	H1	H5	H1	HC14
05.53	Gavião Peixoto	1 Sul	P	H1	H5	H1	HC14
		2 Norte	M	H1	H5	H2	HC11
		3 Leste	G	H1	H5	H1	HC14
		4 Oeste	P	H1	H5	H1	HC14
08.05	Gavião Peixoto	1 Sul	G	H1	H5	H1	HC14
		2 Norte	M	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	P	H1	H1	H1	HC03
		4 Oeste	M	H1	H5	H1	HC14
09.37	Gavião Peixoto	1 Sul	G	H1	H5	H1	HC14
		2 Norte	M	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	G	H1	H1	H1	HC03
		4 Oeste	M	H1	H5	H1	HC14
15.11	Gavião Peixoto	1 Sul	M	H1	H5	H1	HC14
		2 Norte	M	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	P	H1	H5	H1	HC14
		4 Oeste	G	H1	H5	H1	HC14
09.02	Sta Rita P. Quatro	1 Sul	M	H1	H5	H2	HC11
		2 Norte	P	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	M	H1	H5	H1	HC14
		4 Oeste	G	H1	H5	H2	HC11
12.04	Sta Rita P. Quatro	1 Sul	M	H1	H5	H2	HC11
		2 Norte	M	H2	H5	H2	HC13
		3 Leste	M	H1	H5	H2	HC11
		4 Oeste	G	H1	H5	H2	HC11
12.30E	Sta Rita P. Quatro	1 Sul	P	H1	H5	H2	HC11
		2 Norte	P	H1	H5	H1	HC14
		3 Leste	M	H1	H5	H2	HC11
		4 Oeste	M	H1	H5	H2	HC11
13.05	Sta Rita P. Quatro	1 Sul	M	H1	H5	H2	HC11
		2 Norte	G	H1	H5	H2	HC11
		3 Leste	G	H1	H5	H2	HC11
		4 Oeste	G	H1	H5	H2	HC11

^a Haplótipo distinto dos demais encontrados na mesma planta.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por BOX-PCR do DNA de *Xylella fastidiosa*. Os números 1 a 4 correspondem aos isolados da planta 05.53; 5 a 8, aos isolados da planta 08.05; 9 a 11, aos isolados da planta 09.37; 12 a 15, aos isolados da planta 03.06; 16 a 19, aos isolados da planta 12.04. M corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb (Promega).

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por REP - PCR do DNA de *Xylella fastidiosa*. Os números 1 a 4 correspondem aos isolados da planta 05.53; 5 a 8, aos isolados da planta 08.05; 9 a 12, aos isolados da planta 12.30; 13 a 16, aos isolados da planta 09.02; 17 a 20, aos isolados da planta 10.04. M corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb (Promega).

4.4.3 De isolados de *X. fastidiosa* obtidos de outros hospedeiros.

Isolados de ameixeira, cafeeiro e videira foram analisados e comparados com isolados de citros através de REP-PCR. O isolado de videira 8935 (procedente dos EUA), apresentou perfil bem distinto do isolado de videira 9715 (procedente da Austrália) e ambos diferiram dos isolados dos demais hospedeiros (Figura 12). O isolado 8935 apresentou o haplótipo combinado 24 e o isolado 9715 apresentou o haplótipo combinado 25 (Tabela 7). Entre os dez isolados de cafeeiro incluídos neste estudo, foi possível distinguir quatro haplótipos combinados com os iniciadores ERIC, REP e BOX: isolados 11752 e 11753 apresentaram haplótipo combinado 20 e 21 respectivamente, diferindo completamente dos demais; 12372, 12373, 12378 e CF-LV apresentaram o haplótipo combinado 22 e os isolados 12374, 12375, 11782 e 12332 apresentaram o mesmo perfil dos isolados de citros com o haplótipo combinado 08. O isolado de ameixeira 11840 também apresentou o mesmo haplótipo 08 dos isolados de citros e cafeeiro.

O isolado 9a5c apresentou perfil bem distinto dos demais isolados de citros incluídos neste estudo. Apenas com o iniciador REP foi possível identificar um haplótipo similar ao encontrado entre isolados de citros (H3).

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por REP - PCR do DNA de *Xylella fastidiosa*. Os números 1, 2 e 3 correspondem aos isolados 12.30S, 12.30L e 12.30O de citros; 4, ao isolado 1840 de ameixeira; 5 e 6 aos isolados 8935 e 9715 de videira; 7 a 10, aos isolados 12372, 12375, 12378 e 11753 de cafeeiro; 11 a 13, aos isolados 09.37S, 09.37N e 09.37L de citros. M corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb (Promega).

Tabela 7. Relação dos haplótipos obtidos por amplificação do DNA de isolados de *X. fastidiosa* originados de diferentes hospedeiros.

Isolado	Hospedeiro	ERIC	BOX	REP	Haplótipo combinado
9715	Videira	H3	H6	H5	HC25
8934	Videira	H4	H7	H6	HC24
11840	Ameixeira	H1	H3	H3	HC08
11752	Cafeeiro	H5	H1	H2	HC20
11753	Cafeeiro	H6	H3	H3	HC21
12372	Cafeeiro	H7	H1	H1	HC22
12373	Cafeeiro	H7	H1	H1	HC22
12374	Cafeeiro	H1	H3	H3	HC08
12375	Cafeeiro	H1	H3	H3	HC08
12376	Cafeeiro	H7	H3	H1	HC23
12378	Cafeeiro	H7	H1	H1	HC22
11782	Cafeeiro	H1	H3	H3	HC08
12332	Cafeeiro	H1	H3	H3	HC08
CF-LV	Cafeeiro	H7	H1	H1	HC22
CVC-LV	Citros	H1	H5	H1	HC14
9a5c	Citros	H8	H8	H3	HC26

4.5 Avaliação da frequência do plasmídio pXF51 em isolados de *X. fastidiosa*

A avaliação da frequência do plasmídio XF51 entre isolados de *X. fastidiosa* foi realizada através da amplificação do DNA por PCR com os iniciadores MEGAR e MEGAF. A amplificação do fragmento de 750 pb (Figura 13) foi positiva para 81% dos 90 isolados incluídos neste estudo. Não foi observada nenhuma correlação entre variação da frequência de isolados contendo o plasmídio com a região citrícola estudada (Tabela 8). A presença e ausência do plasmídio pXF51 entre os isolados não apresentou correlação com a análise de diferentes haplótipos obtidos por rep-PCR. Foi constatada tanto a presença de isolados que possuíam o plasmídio quanto de isolados que não o continham numa mesma planta de citros.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR (iniciadores MEGAR e MEGAF) do DNA de *X. fastidiosa*. M corresponde ao padrão de peso molecular de 1Kb (Promega).

Tabela 8. Relação da frequência do plasmídeo pXF51 obtido por amplificação do DNA de isolados de *X. fastidiosa*, procedentes de três regiões citricolas do Estado de São Paulo, com os iniciadores MEGAR e MEGAF.

Isolado	Procedência	PXF51	Isolado	Procedência	PXF51
02.01	Neves Paulista	+			
02.02	Neves Paulista	+	08.07	Gavião Peixoto	+
02.03	Neves Paulista	+	08.14	Gavião Peixoto	+
02.06	Neves Paulista	-	08.15	Gavião Peixoto	+
02.07	Neves Paulista	+	08.17	Gavião Peixoto	+
02.08	Neves Paulista	+	08.23	Gavião Peixoto	+
07.01	Neves Paulista	+	08.41	Gavião Peixoto	+
07.09	Neves Paulista	-	08.45	Gavião Peixoto	+
07.10	Neves Paulista	+	08.46	Gavião Peixoto	+
07.20	Neves Paulista	-	08.49	Gavião Peixoto	+
07.25	Neves Paulista	+	08.54	Gavião Peixoto	+
07.26	Neves Paulista	+	08.58	Gavião Peixoto	+
07.27	Neves Paulista	-	09.12	Gavião Peixoto	-
10.06	Neves Paulista	+	15.13	Gavião Peixoto	+
11.20	Neves Paulista	+	22.24	Gavião Peixoto	+
12.22	Neves Paulista	+	22.42	Gavião Peixoto	-
22.11	Neves Paulista	+	01.10	Gavião Peixoto	+
22.14	Neves Paulista	-	01.51	Gavião Peixoto	-
22.15	Neves Paulista	+	02.50	Santa Rita do Passa Quatro	-
22.20	Neves Paulista	+	03.05	Santa Rita do Passa Quatro	+
22.32	Neves Paulista	+	09.11	Santa Rita do Passa Quatro	+
22.36	Neves Paulista	-	10.04	Santa Rita do Passa Quatro	+
22.40	Neves Paulista	+	12.10	Santa Rita do Passa Quatro	+
22.66	Neves Paulista	+	13.15	Santa Rita do Passa Quatro	+
22.72	Neves Paulista	+	14.03	Santa Rita do Passa Quatro	+
23.06	Neves Paulista	+	20.06	Santa Rita do Passa Quatro	+
06.10	Bebedouro	+	20.09	Santa Rita do Passa Quatro	+
09.16	Bebedouro	+	20.15	Santa Rita do Passa Quatro	+
09.26	Bebedouro	-	20.21	Santa Rita do Passa Quatro	+
09.34	Bebedouro	+	20.28	Santa Rita do Passa Quatro	+
09.37	Bebedouro	-	20.49	Santa Rita do Passa Quatro	+
01.01	Gavião Peixoto	+	20.74	Santa Rita do Passa Quatro	+
01.31	Gavião Peixoto	+	20.92	Santa Rita do Passa Quatro	-
01.32	Gavião Peixoto	+	20.93	Santa Rita do Passa Quatro	-
05.01	Gavião Peixoto	+	20.97	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.08	Gavião Peixoto	+	20.100	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.24	Gavião Peixoto	+	12.01E	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.52	Gavião Peixoto	+	12.23E	Santa Rita do Passa Quatro	-
05.56	Gavião Peixoto	+	12.34E	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.60	Gavião Peixoto	+	12.52E	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.62	Gavião Peixoto	+	12.64E	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.65	Gavião Peixoto	+	12.72E	Santa Rita do Passa Quatro	-
05.84	Gavião Peixoto	-	12.84E	Santa Rita do Passa Quatro	+
05.95	Gavião Peixoto	+	12.94E	Santa Rita do Passa Quatro	+
08.05	Gavião Peixoto	+	12.108E	Santa Rita do Passa Quatro	+

Tabela 9. Relação da frequência do plasmídeo pXF51 obtido por amplificação do DNA de isolados de *X. fastidiosa* obtidos de uma mesma planta, procedentes de três regiões citrícolas do Estado de São Paulo, com os iniciadores MEGAR e MEGAF.

Linha.Planta	Isolado	Tamanho colônia	Procedência	PXF51
03.06	1 Sul	G	Neves Paulista	+
	2 Norte	G	Neves Paulista	+
	3 Leste	M	Neves Paulista	+
	4 Oeste	M	Neves Paulista	+
10.40	1 Sul	M	Neves Paulista	+
	2 Norte	M	Neves Paulista	+
	3 Leste	M	Neves Paulista	+
	4.Oeste	M	Neves Paulista	+
17.19	1 Sul	G	Neves Paulista	-
	2 Norte	M	Neves Paulista	+
	3 Leste	P	Neves Paulista	+
	4 Oeste	M	Neves Paulista	+
40.10	1 Sul	M	Neves Paulista	-
	2 Norte	P	Neves Paulista	+
	3 Leste	M	Neves Paulista	+
	4 Oeste	G	Neves Paulista	-
05.53	1 Sul	P	Gavião Peixoto	+
	2 Norte	M	Gavião Peixoto	+
	3 Leste	G	Gavião Peixoto	+
	4 Oeste	P	Gavião Peixoto	+
08.05	1 Sul	G	Gavião Peixoto	+
	2 Norte	M	Gavião Peixoto	+
	3 Leste	P	Gavião Peixoto	+
	4 Oeste	M	Gavião Peixoto	+
09.37	1 Sul	G	Gavião Peixoto	+
	2 Norte	M	Gavião Peixoto	+
	3 Leste	G	Gavião Peixoto	+
	4Oeste	M	Gavião Peixoto	+
15.11	1 Sul	M	Gavião Peixoto	+
	2 Norte	M	Gavião Peixoto	+
	3 Leste	P	Gavião Peixoto	+
	4 Oeste	G	Gavião Peixoto	+
09.02	1 Sul	M	S Rita Passa Quatro	+
	2 Norte	P	S Rita Passa Quatro	+
	3 Leste	M	S Rita Passa Quatro	+
	4 Oeste	G	S Rita Passa Quatro	+
12.04	1 Sul	M	S Rita Passa Quatro	+
	2 Norte	M	S Rita Passa Quatro	+
	3 Leste	M	S Rita Passa Quatro	+
	4 Oeste	G	S Rita Passa Quatro	+
12.30E	1 Sul	P	S Rita Passa Quatro	+
	2 Norte	P	S Rita Passa Quatro	-
	3 Leste	M	S Rita Passa Quatro	+
	4Oeste	M	S Rita Passa Quatro	+
13.05	1 Sul	M	S Rita Passa Quatro	+
	2 Norte	G	S Rita Passa Quatro	+
	3 Leste	G	S Rita Passa Quatro	+
	4 Oeste	G	S Rita Passa Quatro	+

5 DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos isolados de *Xylella fastidiosa*

O meio de crescimento PWG mostrou eficiência no isolamento da bactéria por permitir rápido crescimento da bactéria, como também relatado por Almeida et al. (1999) e acusar a presença de contaminantes na placa através da mudança de coloração do meio.

Isolados de *Xylella fastidiosa* provenientes das três regiões citrícolas e de material coletado em quatro pontos distintos de uma mesma planta cítrica apresentaram significativa variação no tamanho de colônias, sugerindo a existência de diferentes estirpes bacterianas na mesma região geográfica ou até na mesma planta.

5.2 Análise da sequência nucleotídica obtida da região amplificada pelos iniciadores RST31 e RST33

A análise da sequência nucleotídica do fragmento genômico amplificado pelo par de iniciadores RST31/33 em isolados de *X. fastidiosa* de videira, cafeeiro e ameixeira evidenciou a existência de variabilidade a nível infrasubespecífico, pois isolados de um mesmo hospedeiro apresentaram

polimorfismos caracterizados tanto pela substituição quanto pela inserção de bases.

Minsavage et al., (1994) observaram que a digestão do fragmento RST31/33 com enzima de restrição *RsaI* gerou produtos que permitiram diferenciar os isolados em dois grupos distintos de *X. fastidiosa*: o primeiro grupo corresponde a isolados do mal de Pierce e CVC que apresentam um único fragmento de 733 pb e o segundo grupo a isolados de ameixeira e espécies arbóreas que apresentaram dois fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pb e 100 pb após a digestão com a enzima *RsaI*. Os resultados obtidos a partir do seqüenciamento do fragmento RST31/33 demonstram que a seqüência do isolado 9777 de ameixeira procedente de EUA apresenta o sítio de clivagem *RsaI* (GT↑AC/CA↑TG) na posição 87 bases enquanto que nos isolados de citros e videira esse sítio não foi identificado, concordando com os resultados obtidos pelo referido autor. O isolado 12304 de ameixeira procedente do Brasil, ao contrário, não apresentou o sítio de clivagem *RsaI* devido ao seu polimorfismo nessa região quando comparado ao isolado 9777. Da Costa et al. 2000, também observaram diferenças entre isolados de ameixeira provenientes dos EUA e Brasil em que estes formaram grupos distintos com isolados de outros hospedeiros originados no seu respectivo país de origem.

Embora os isolados de citros e videira sejam considerados do mesmo grupo por Minsavage et al. (1994), devido ao perfil eletroforético semelhante

após digestão de DNA com a enzima de restrição *Rsa*I, estudos recentes de variabilidade genética de *X. fastidiosa* evidenciam a sua separação em grupos distintos. Uma região específica com inserção de 28 nucleotídeos, por exemplo, foi encontrada no genoma de isolados de citros diferenciando-os de isolados de videira (Pooler & Hartung, 1995). A similaridade genética estimada com base no valores combinados dos perfis obtidos pelas endonucleases *Not*I e *Sfi*I através de eletroforese de campo pulsado (PFGE) variou de 0,77 a 1,00, entre isolados de citros e de 0,31 a 0,45, entre isolados videira (Leite Jr. et al., 1998). Resultados semelhantes foram obtidos por da Costa et al. (2000), que agruparam isolados de citros e cafeeiro (coeficiente de similaridade de 0,872), separando-os de isolados de videira (0,650) por análise com RAPD.

5.3 Análise de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com os iniciadores ERIC, BOX e REP (Rep-PCR)

A técnica de rep-PCR baseada na amplificação de seqüências conservadas e repetitivas no DNA genômico de *X. fastidiosa* com os iniciadores ERIC, REP e BOX mostrou ser uma ferramenta rápida, eficaz e altamente reproduzível por permitir estudos envolvendo um grande número de isolados e obtenção de dados confiáveis a um nível representativo da população natural da bactéria.

Foi averiguada a ocorrência de diversos haplótipos de *X. fastidiosa* presentes em plantas de citros em freqüências variáveis nas três regiões citrícolas amostradas. Em Neves Paulista, região noroeste do Estado de São

Paulo, foi possível observar que a população da bactéria é composta por mais de quinze haplótipos diferentes distribuídos em frequências intermediárias. Entretanto, em Gavião Peixoto (região Centro), a maioria da população é composta por apenas um haplótipo (haplótipo 14), encontrado em 73% dos isolados. Em Santa Rita do Passa Quatro (região Sul), 40% da população é caracterizada pela ocorrência de apenas uma haplótipo e os demais por dois haplótipos apresentando frequência de 20%.

A diversidade genética em isolados de *X. fastidiosa* pode ser considerada bem acima da esperada quando comparada a estudos realizados com diversas espécies bacterianas, como por exemplo, para *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Restrepo et al., 2000) e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Bouzar et al., 1999), onde foi possível distinguir 4 grupos por rep-PCR. Para *Clavibacter michiganensis*, a técnica distinguiu 5 grupos (Louws et al., 1998) e para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foram encontrados apenas 7 haplótipos combinados (Vera Cruz et al., 1996).

A expressiva variabilidade genética encontrada na população de *X. fastidiosa* pode estar relacionada com o perfil epidemiológico diferenciado entre as três regiões citrícolas, em que a Clorose variegada dos citros apresenta-se mais severa nas regiões norte e noroeste que no centro e sul do Estado. Porém, essa afirmação só poderá ser confirmada através de estudos da interação planta-patógeno em condições de ambiente controlado para que as demais variáveis envolvidas na epidemiologia diferenciada da doença, como as

condições edafoclimáticas e flutuação populacional de insetos vetores, possam ser completamente eliminadas.

A partir dos resultados obtidos, estudos para averiguar uma possível variação no nível de agressividade de haplótipos de *Xylella fastidiosa* caracterizadas geneticamente em diferentes haplótipos por REP-PCR devem ser realizados. Um conhecimento mais detalhado do genótipo deste patógeno pode evidenciar a necessidade de tratá-lo como uma variável epidemiológica a ser considerada quando do estudo da dinâmica da doença em campo e contribuir para o entendimento da evolução desse organismo e de possíveis interações entre suas diferentes estirpes e entre seus hospedeiros.

Além da identificação de diversas linhagens de *X. fastidiosa* de citros encontradas em frequências variáveis entre as três regiões citrícolas, também foi possível observar que isolados de diferentes haplótipos e diferente tamanho de colônia ocorreram em uma mesma planta de citros. Entretanto, nenhuma correlação foi constatada entre os diferentes haplótipos encontrados e a variação do tamanho das colônias. Essa diferença entre isolados encontrados na mesma planta pode estar relacionada à transmissão da bactéria por insetos vetores, pois estes se alimentam de diversas plantas e podem ser responsáveis pela disseminação de linhagens geneticamente distintas dentro de uma mesma planta.

Até o momento, não havia sido relatada a ocorrência dessa expressiva variabilidade genética entre isolados de citros no Estado de São Paulo, provavelmente devido ao restrito número de isolados utilizados nos estudos

realizados anteriormente que apontavam uma alta similaridade entre isolados de *X. fastidiosa* em citros, investigada por outras técnicas como RAPD (da Costa et al., 2000; Rosato, 1998) e PFGE "Pulsed Field Gel Eletrophoresis" (Leite et al., 1999). No trabalho de Xiaoting & Hartung (1999), nenhuma variação foi encontrada entre 64 isolados de citros analisados por rep-PCR. Uma hipótese levantada para a existência de resultados tão contrastantes foi que a utilização dos iniciadores específicos CVC-1/272-2 na detecção de isolados realizada pelo referido autor, poderia ter selecionado linhagens de *X. fastidiosa* distintas das obtidas pelos iniciadores RST 31/33, uma vez que uma alta especificidade na amplificação pode resultar em "falso-negativo" para determinados isolados. A fim de esclarecer esse fato, nova confirmação da identidade dos isolados incluídos no presente estudo foi realizada com os iniciadores CVC-1/272-2. A amplificação do fragmento de 500 pb também foi positiva para todas as amostras testadas, excluindo a possibilidade de seleção de linhagens idênticas pela utilização do iniciador CVC-1/272-2 INT, que poderia explicar a ausência de variabilidade genética entre isolados de citros encontrada pelo referido autor.

O número limitado de isolados de outros hospedeiros incluídos neste estudo foi suficiente para distinguir diferentes haplótipos de *X. fastidiosa* por rep-PCR. Isolados de citros, cafeeiro e ameixeira apresentaram maior similaridade e formaram um grupo distinto dos isolados de videira. Foi possível identificar diferentes haplótipos entre isolados do mesmo hospedeiro. Estes

resultados confirmam a separação de linhagens destes hospedeiros a nível subespecífico.

O isolado 9a5c, utilizado no projeto genoma de *X. fastidiosa*, apresentou perfil distinto dos demais isolados de citros incluídos neste estudo, indicando que esta estirpe é rara ou não ocorre nas regiões estudadas.

Iniciadores específicos baseados em seqüências repetitivas ERIC, REP ou BOX tem sido desenvolvidos para detecção de *X. fastidiosa* em citros e em diferentes hospedeiros (Lemos et al., 1999; Traversolo 2000). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a população natural da bactéria em citros tem considerável divergência genética e portanto, a escolha do fragmento a ser utilizado para a obtenção de iniciadores específicos em citros dever ser bastante criteriosa.

5.4 Avaliação da frequência do plasmídio pXF51 entre isolados de *X. fastidiosa*

A ocorrência do plasmídio pXF51 na população de *X. fastidiosa* foi analisada através da amplificação do fragmento de 750 pb e foi possível evidenciar que a sua frequência entre os isolados é elevada. O plasmídio pXF51 foi encontrado em 81% dos isolados. Este resultado é interessante do ponto de vista prático pois permite a realização de novos estudos com o objetivo de averiguar a interação entre plantas de citros e linhagens de *X. fastidiosa* na presença e ausência do plasmídio a fim de detectar variações na sua patogenicidade. Trabalhos envolvendo transformação de *X. fastidiosa* pela

inserção de fragmentos de DNA através de plasmídios têm sugerido que alguns casos de insucesso ocorrem devido a utilização de linhagens que, por conterem o plasmídio pXF51, podem estar expulsando o plasmídio transformante (Alves, 2000, comunicação pessoal). A utilização de isolados que não apresentam o plasmídio pXF51, previamente identificados por PCR com os iniciadores MEGAR e MEGAF, poderia solucionar este problema.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram as seguintes conclusões:

- 1- A análise da sequência nucleotídica obtida da região amplificada pelos iniciadores RST31 e RST33 mostrou que não existem polimorfismos na sequência de 733 pb entre isolados de citros e que várias substituições e inclusões de bases na sequência dos isolados de videira e ameixeira foram encontradas. Apenas um dos três isolados de café apresentou polimorfismo na sequência.
- 2- Foram encontrados 19 haplótipos combinados por rep-PCR entre os isolados de citros obtidos nas três regiões citrícolas. No pomar de Neves Paulista (região noroeste do Estado de São Paulo) a população de *X. fastidiosa* é bastante variável. Nos pomares de Gavião Peixoto (Centro) e Santa Rita do Passa Quatro (Sul), a população está representada por duas linhagens que aparecem em maior frequência.
- 3- A infecção de plantas de citros pode ocorrer por diferentes haplótipos de *X. fastidiosa*.

4- Embora um número limitado de isolados de diferentes hospedeiros tenha sido utilizado, foi possível distinguir diversos haplótipos de *X. fastidiosa*. Isolados de citros, cafeeiro e ameixeira formaram um grupo distinto dos isolados de videira.

5- O plasmídio pXF51 foi encontrado em 81% dos isolados, indicando que a sua frequência na população natural de *X. fastidiosa* é elevada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. P. P. Multiplicação e movimentação de *Xylella fastidiosa* em mudas de *Citrus sinensis* e sua eficiência de aquisição e inoculação por vetores. Piracicaba, 1999. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

AMARO, A. A.; MAIA, M. L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Laranja**, v.18, n.1, p.1-26, 1997.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, v.1, 1992.

BERETTA, M. J. G.; HAKAKA, R.; CHAGAS, C. M.; DERRICK, K. S.; BARTHE, G. A.; CECCARDI, T. L.; LEE, R. F.; PARADELA, O.; SUGIMORI, M.; RIBEIRO, I. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. **Plant Disease**, v.80, p.821, /Resumo/. 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 affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.1196-1198, 1997.

BERISHA, B.; CHEN, Y. D.; ZHANG, G. Y.; XU, B. Y.; CHEN, T. A. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.427-433, 1998.

BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, R. E.; LOUWS F. J.; SCHNEIDER, M.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J.; JACKSON, L. E. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing Bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common Lineages Within and Between Countries. **Phytopathology**, v.89, p.328-335, 1999.

CARVALHO, M. L. V.; ROSSETI, V.; POMPEU JR. Evolução da sintomatologia de clorose variegada dos citros, em laranja doce (*C. sinensis*). **Fitopatologia Brasileira**, v.20 (Suplemento) p.351, 1995.

CHANG, C. J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J. M. Culture and serological detection of the 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.81, p.1209, 1991.

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

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

De BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied Environmental Microbiol.** v.58, p.2180-2187, 1992.

DA COSTA, P. I.; FRANCO, C. F.; MIRANDA, V. S.; TEIXEIRA, D. C.; HARTUNG, J. S. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed-PCR. **Current Microbiology** v.40, n.4, p.279-282, 2000.

DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p.425-429, 1980.

DONADIO, L. C; MOREIRA, C. S. **Citrus variegated chlorosis**. Bebedouro, SP. 1998. 166p.

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.

FRENCH, W. I.; STASSI, D. L. Response of phony-infected peach trees with gibberellic acid. **HortScience**, v.13, p.158-159, 1978.

FRENCH, W. I.; FELICIANO, A. Distribution and severity of plum leaf scald disease in Brasil. **Plant Disease**, v.66, p.515-517, 1982.

FUNDECITRUS. <http://www.fundecitrus.com.br/escvcbr.html>. Incidência de CVC por região - 2000.(Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro). 2000.

GILSON, E.; CLEMENTE, J. M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO Journal**, v.3, p.1417-1421, 1984.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.3941-3952. 1990.

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

GOODWIN, P. H.; ZHANG, S. Distribution of *Xylella fastidiosa* in southern Ontario as determined by the polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.19, p.13-18, 1997.

GOTTWALD, T.R.; GIDTTI, F.B.; SANTOS, J.M.; CARVALHO, A.C. Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in São Paulo, Brazil. IN: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL, IOCV, 12, 1993, India. **Proceedings**, p.327-335. 1993.

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

HOPKINS, D. L.; MORTENSEN, J. A. Suppression of Pierce's disease symptoms by tetracycline antibiotics. **Plant Disease Reporter**, v.55, p.610-612, 1971.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.2711-3290, 1989.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.

KITAJIMA, E. W.; MOHAN, S. K.; TSUNETTA, M.; BLEICHER, J.; FRENCH, W.; LEITE, JR., R. P. Ocorrência da escaldadura das folhas de ameixeira nos Estados do Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia brasileira**, v.6, p.285-292. 1981.

KRÜGNER, R., LOPES, M. T. V. de C., SANTOS, J. S. , BERETTA, M. J. G.; LOPES, J. R. S..Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, Brasil, 1998. **Programme & Abstracts**, p.81, 1998.

LARANJEIRA, F.F. Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros. Piracicaba, 1997. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LEE, R. F.; RAJU, B. C.; NYLAND, G.; GOHEEN, A. C. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.71, p.886-888, 1982.

LEE, R. F.; BERETTA, M. J. G.; HARTUNG, J. H.; HOOKER, M. E. & DERRICK, K. S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa*: as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v.19, n.2, p.123-125, 1993.

LEITE, JR., R. P. Uso do termo bactéria tipo rickettsia em fitobacteriologia. **Fitopatologia brasileira**, v.14, p.195-197, 1989.

LEITE JR., R. P. & LEITE, R. M. V. B. C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.17, n.1, p.1, 1991.

LEITE, R. M. V. B. C, MINSVAGE, G. V., STALL, R. E., HOPKINS, D. L. Characterization of *Xylella fastidiosa* by DNA analysis and plasmid content.

In: PROC. 6TH INT. CONG. PLANT PATHOL, Montréal, 1993. **Abstracts.**
Montreal, Canada: 1993. p.36.

LEITE, R. M. V. B. C.; LEITE, JR., R. P. & CEREZINE, P. C. Hospedeiros alternativos para *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia brasileira**, v.22, p.54-57, 1997.

LEITE JR., R. P., MEHTA, A., CARVALHO, F. M. S., UENO, B. Genetic diversity of brazilian strains of *Xylella fastidiosa* associated with citrus and coffee. p. 156 In: XIV CONFERENCE OF IOCV. Campinas, 1998. **Abstracts**, Campinas, SP, 1998.

LEMOS, E. G. M.; CIAPINA, L. P.; KISHI, L. T.; ALVES, L. M. C. Avaliação da eficiência dos diferentes primers específicos no diagnóstico da Clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.1, p.41, 1999.
/Apresentado ao XXII Congresso Paulista de Fitopatologia, Jaboticabal, 1999- Resumo/

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.

LOUWS, F. J., FULBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T., de BRUIJN, F. J.
Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and
Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences
and PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** v.60, p.2286-2295, 1994.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; de BRUIJN, F. J.
Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly
classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**. v.85,
p.528-536, 1995.

LOUWS, F. J.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C. M.; SMART, C. D.; OPGENORTH,
D.; ISHIMARU, C. A.; HAUSBECK, M. K.; DE BRUIJN, F. J.; FULBRIGHT,
D. W. rep-PCR-Mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective
method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, v.88, p.862-
868, 1998.

MALAVOLTA, E., MALAVOLTA, M. L.; CABRAL, C. P.; PRATES, H. S.; VITTI,
G. C. Nova anomalia dos citros – Estudos preliminares. **Laranja**, v.11, n.1,
p.15-38, 1990.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.;
MITCHEL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.;
HAKENBECK, R.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERY, J. P.

A highly conserved repeated DNA element located in the chromossome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479-3483, 1992.

MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE, R. M. V. B. C. & STALL, R. E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, p.456-461, 1994.

MOHAN, S. K.; LEITE, R. P.; TSUNETTA, M. & HAUAGGE, R.. **Problema da escaldadura da folha da ameixeira no Estado do Paraná**. (IAPAR, Informe da Pesquisa, 31), Londrina, IAPAR, 1980. 5p.

NEVES, E.M. Produção de suco concentrado: soberania ameaçada. **Citro News**. n.1, p.10, 1998.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; MACHADO, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; GARCIA JR., A.; BERETA, M. J. G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.16, n.2, p.135-136, 1995.

PEREIRA, E. F.; MENEGUIM, A. M. & LEITE, JR., R.P.. Diversidade e abundância de cigarrinhas em pomares de citros com a doença clorose

variegada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14, Curitiba, 1996. **Fruticultura sem fronteiras**, resumos. Londrina: IAPAR, 1996. 561p.

PIERCE, N. B. **The California vine disease**. United States Department of Agriculture Div. Veg. Path. Bull. Berkeley. v.2, 1892. 222 p.

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, 1995.

PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p.131-151, 1996.

RAJU, B. C., WELLS, J. M., NYLAND, G., BRLANSKY, R. H., LOWE, S. K. Plum leaf seald: isolation, culture and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, v.72, n.11, p.1460-1466, 1982.

RAJU, B. C., WELLS, J. M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. **Plant disease**, v.70, p.182-186, 1986.

RASMUSSEN, U.; SVENNING, M. M. Fingerprinting of Cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p.265-272, 1998.

RESTREPO, S.; VÉLEZ, C. M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v.90, p.683-690, 2000.

ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; LIMA, J. E. O. de; MIRANDA, V. S. & CARLOS, E. F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. **Fitopatologia brasileira**, v.21, n.4, p.517-518, 1996.

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

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, D. Clorose Variegada dos citros: revisão. **Laranja**, v.11, n.1, p.1-14, 1990a.

ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J. M., BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R. R., QUAGGIO, J. A. & DE NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'oranges atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **C. R. Séances Acad. Sci. [III]**, v.310, p.345-349, 1990b.

SANDERLIN, R. S. Evidence that *Xylella fastidiosa* is associated with Pecan fungal leaf scorch. **Plant disease**, v.82, p.264, 1998.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Univ. Kansas Sci. Bull.** v.28, p.1409-1438, 1958.

SUGIMORI, M. H.; PARADELA FILHO, O.; RIBEIRO, I. J. A.; LARANJEIRA, F. F.; GARCIA Jr, A.; MARTINS, A. L.M. Estudo de transmissão do agente da CVC por semente. **Summa Phytopathologica**, v.22, n.1, p.58, 1995.

SIMPSON, A. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-157, 2000

TRAVENSOLO, R. F. Marcador scar para *Xylella fastidiosa* em videira. Jaboticabal, 2000. Dissertação (M.S.) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

TRAVENSOLO, R. F. & LEITE, JR., R. P. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com clorose variegada. **Fitopatologia brasileira**, v.21, p.336, 1996. Suplemento. /Apresentado ao XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Ilhéus, 1996-Resumo/

UCHIBABA, E. Y.; LEITE JR., R. P.; LEITE, R. M. V. B. C. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos para cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia brasileira**, v.17, p.252-257, 1992.

VERA CRUZ, C. M.; ARDALES, E. Y.; SKINNER, D. Z.; TALAG, J.; NELSON, R. J.; LOUWS, F. J.; LEUNG, H.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. **Phytopathology**, v.86, p.1352–1359, 1996.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.

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

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.42, p.357-363, 1981.

XIAOTING, Q. I. N. & HARTUNG, J. S. Strains of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased orange trees in Brazil have a relatively homogeneous population structure. **Phytopathology**, v.89, s.62, 1999.