

## CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Xylella fastidiosa* DE CAFEIRO DO ESTADO DO PARANÁ ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO

CARVALHO, F.M.S.<sup>1,3</sup>; MENEGUIM, L.<sup>2,3</sup> e LEITE Jr., R.P.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> IAPAR, C. P. 481, 86001-970, Londrina-PR; <sup>2</sup> UNIFIL, Rua Alagoas, 2050, 86020-430, Londrina-PR; <sup>3</sup> Bolsista CBP&D/Café; <sup>4</sup> Bolsista CNPq; <flaviaregis@bol.com.br>

**RESUMO:** *Xylella fastidiosa* é responsável por doenças em muitas plantas de importância econômica. Esta bactéria causa a clorose variegada dos citros (CVC), que se tornou séria ameaça para a citricultura em vários Estados brasileiros. Em cafeeiro (*Coffea arabica*), plantas infectadas por *X. fastidiosa* apresentam sintomas de depauperamento generalizado, incluindo desfolha e ramos com internódios curtos. No presente estudo, 27 isolados de *X. fastidiosa* procedentes de isolamentos de cafeeiros das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Paraná e isolados de videira, ameixeira e citros da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná foram caracterizados através da análise genômica em eletroforese de campo pulsado. Perfis genômicos obtidos a partir de restrição com a endonuclease *Swa* I permitiram diferenciar três grupos geneticamente distintos entre os 27 isolados de cafeeiro. Os seis isolados de outras plantas hospedeiras apresentaram perfis genômicos distintos e diferentes dos três perfis encontrados para os isolados de cafeeiros. Os isolados de cafeeiros das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Paraná apresentaram similaridade genética que variou entre 0,87 e 0,93. No entanto, os coeficientes de similaridade revelaram grande variabilidade genética (0,27 a 0,86) entre isolados de *X. fastidiosa* de diferentes plantas hospedeiras.

**Palavras-chave:** *Xylella fastidiosa*, café, *Coffea arabica*, caracterização genética, campo pulsado.

### PULSE-FIELD ELECTROPHORESIS GENETIC CHARACTERIZATION OF XYLELLA FASTIDIOSA ISOLATES FROM COFFEE IN THE PARANÁ STATE

**ABSTRACT:** *Xylella fastidiosa* is associated with high losses in several crops of economic importance. In Brazil, *X. fastidiosa* causes citrus variegated chlorosis (CVC), a serious disease for the citrus production in several States. On coffee (*Coffea arabica*), trees infected by *X. fastidiosa* show symptoms of dieback and branches with short internodes. In the present study, 27 isolates of *X. fastidiosa* established from

coffee plants of the North, Northeast and Northwest regions of the State of Parana, Brazil and, isolates of grapevine, japanese plum and citrus of the collection of bacteria of the Laboratory of Bacteriology and Virologia of the Agronomic Institute of Parana were characterized by genomic analysis by pulsed field electrophoresis. Genomic profile obtained by restriction with the endonuclease *Swa* I allowed to differentiate 3 groups genetically distinct for the 27 isolates from coffee. The 6 isolates of different host plants produced distinct genomic profiles. They were different from the profiles found for the isolates of coffee. The 27 isolates of coffee of the North, Northeast and Northwest regions of Parana presented genetic similarity that ranged from 0.87 to 0.93. However, the similarity coefficients revealed a great genetic variability (0.27 to 0.86) among the isolates of *X. fastidiosa* of different hosts.

**Key words:** *Xylella fastidiosa*, coffee, *Coffea arabica*, genetic characterization, pulsed-field.

## INTRODUÇÃO

*X. fastidiosa* (Wells et al., 1987) causa doenças de importância econômica em diversas plantas cultivadas (Hopkins, 1989). No Brasil, doenças causadas por essa bactéria têm se constituído em fatores limitantes da exploração de culturas como ameixeira e citros. Em cafeeiro (*Coffea arabica* L.), a bactéria foi constatada pela primeira vez em 1995 no Estado de São Paulo (Paradela et al., 1995). Cafeeiros infectados pela bactéria apresentavam ramos com internódios curtos, folhas pequenas, deformadas e cloróticas e sintomas de depauperamento generalizado (Paradela et al., 1995). Estudos recentes têm mostrado a presença da bactéria associada a cafeeiros em várias regiões produtoras dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (Paradela et al., 1995; Lima et al., 1996; Ueno & Leite, 1996; Carvalho et al., 2000). Entretanto, essa bactéria, que ocorre em cafeeiro, ainda não foi caracterizada detalhadamente, bem como a sua relação com outras estirpes de *X. fastidiosa*. O presente estudo objetivou caracterizar isolados de cafeeiro e outras plantas cultivadas e estabelecer a similaridade genética entre os diferentes isolados de *X. fastidiosa*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Preparação do DNA bacteriano.** Vinte e sete isolados de *X. fastidiosa* obtidos de cafeeiros das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Paraná foram incluídos neste estudo (Tabela 1). Também foram incluídos isolados de videira, ameixeira e citros pertencentes à coleção de bactérias fitopatogênicas do

Laboratório de Bacteriologia e Virologia do IAPAR, Londrina-PR (Tabela 1). Após crescimento e obtenção de culturas puras, células bacterianas foram utilizadas para extração de DNA em blocos de agarose. Para preparação de blocos de agarose contendo DNA bacteriano, foram utilizadas suspensões de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL dos isolados de *X. fastidiosa*, e o protocolo utilizado foi basicamente o descrito por Egel et al. (1991). Secções dos blocos contendo DNA bacteriano foram lavados com tampão fornecido pelo fabricante. O tampão foi trocado após 15 minutos e em seguida foram adicionadas 30 unidades da endonuclease *Swa* I por um período mínimo de oito horas, a 25°C. Após esse período, foram feitas lavagens das secções com solução de lise sem proteinase K, a 50°C (Egel et al., 1991).

**Eletroforese em campo pulsado.** A eletroforese foi conduzida no equipamento Gene Navigator (Pharmacia, Uppsala, Suécia), contendo cerca de 2 litros de tampão TBE 0,5 X (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). As secções de agarose foram depositadas em poços de gel de agarose a 1,2%, preparado com tampão TBE 0,5 X. Os poços foram selados com agarose 1% de baixo ponto de fusão, fundida no mesmo tampão. A corrida foi realizada a 15 V/cm, sob temperatura de 10°C. O programa de pulsos empregado foi de 3 segundos durante 1 hora, seguido de 10 segundos durante 23 horas. Conectâmeros de fago lambda foram usados como marcadores moleculares. A coloração do gel foi feita com brometo de etídio (0,5 mg/L) e o gel foi fotografado com filme polaróide 667 preto e branco (Polaroid Corporation, MA, EUA). Perfis únicos foram analisados conjuntamente através da determinação visual da presença ou ausência de bandas. A presença ou ausência de uma banda em cada posição ao longo do perfil de cada isolado foi convertida em dados binários (1 para a presença e 0 para ausência). Coeficientes de similaridade foram determinados aos pares, utilizando o coeficiente de Dice, comparando-se fragmentos maiores que 40 Kb (Nei & Li, 1979). As relações genéticas foram determinadas utilizando o método UPGMA do programa computacional NTSYS (Rohlf, 1993).

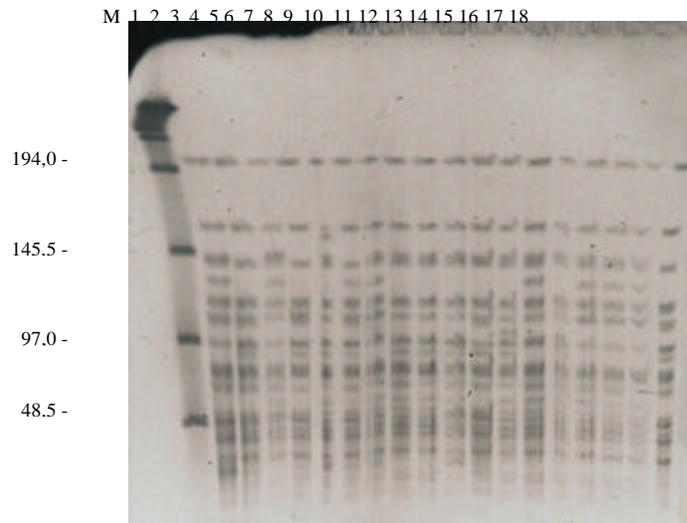
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram comparados 27 isolados de *X. fastidiosa* de cafeeiros provenientes das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Paraná, com base nos perfis genômicos de restrição do DNA bacteriano. Utilizando a endonuclease de restrição *Swa* I, foram observados três grupos geneticamente distintos (Figura 1). O grupo 1 foi representado por 11 isolados (40,2%), o grupo 2, por 15 isolados (56,0%), e o grupo 3, por apenas 1 isolado (3,8%). Do total de isolados, 24 foram obtidos de cafeeiros procedentes da região Norte do Paraná, e entre esses isolados existem representantes dos três diferentes grupos observados. Dois isolados obtidos da região Norte Pioneiro e um da região Noroeste apresentaram perfis

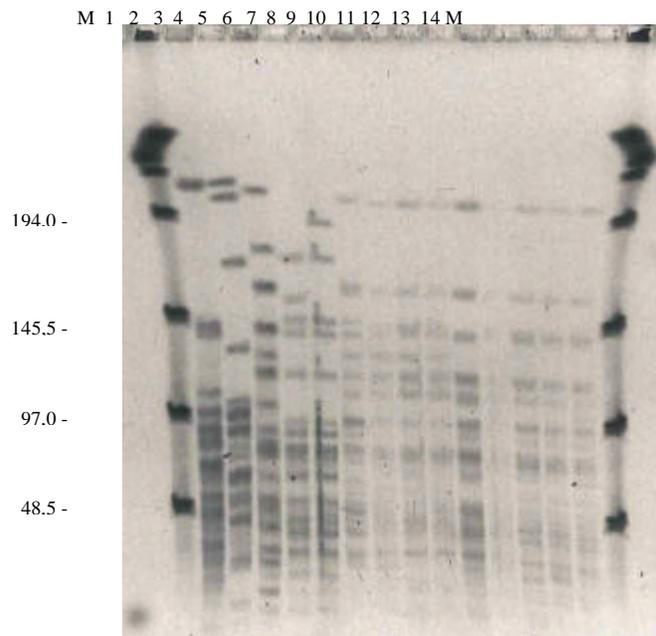
genômicos do grupo 2. Esses resultados evidenciam que não existe correlação entre perfil genético e origem geográfica de *X. fastidiosa*. Nos estudos comparativos, os isolados de videira, ameixeira e citros apresentaram diferenças evidentes nos perfis genômicos, distintos dos três perfis encontrados para os 27 isolados de *X. fastidiosa* de cafeeiros das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Paraná (Figura 2). A resolução de fragmentos únicos permitiu a análise numérica entre os diferentes isolados de *X. fastidiosa*. A similaridade entre os isolados foi feita com base na proporção de fragmentos comuns maiores que 40 Kb (Tabela 2). Os isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira e 9712, 12307, 11067 e 11380 de citros apresentaram-se geneticamente distantes entre si, bem como dos isolados de cafeeiro. A similaridade genética entre os seis isolados de diferentes plantas variou de 0,27 a 0,86, e entre estes e os isolados de cafeeiros, de 0,27 a 0,82 (Tabela 2). Os isolados 12746, 12755 e 12756, que representam um total de 11 isolados pertencentes ao grupo 1 de *X. fastidiosa* de cafeeiro, apresentaram similaridade de 0,93 com os isolados do grupo 2, representados pelos isolados 12737, 12745, 12762 e 12781. A similaridade entre o grupo 1 e o grupo 3, que é representado pelo isolado 12752, foi de 0,87 e entre o grupo 2 e o 3, de 0,93 (Tabela 2). Portanto, isolados de *X. fastidiosa* obtidos das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Estado do Paraná apresentaram similaridade genética que variou entre 0,87 e 0,93, mostrando certa uniformidade entre esses isolados de cafeeiros. No entanto, grande variabilidade genética foi verificada entre isolados de *X. fastidiosa* de diferentes plantas hospedeiras, representadas pelos isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira e 9712, 12307, 11067 e 11380 de citros (Tabela 2). Esses dados sugerem que existe certa especificidade entre a bactéria e a planta hospedeira. O dendograma obtido com base no método UPGMA apresentou cinco grandes ramificações, compreendendo os isolados 8935 de videira e 9746 de ameixeira, em uma ramificação; o isolado 12307 de citros, em outra; 11067 e 11380 de citros, em outra; os isolados 9712 de citros e 12746, 12755 e 12756 de cafeeiros, em outra; e os isolados 12737, 12745, 12762, 12781 e 12752, também de cafeeiros, formaram uma outra ramificação (Figura 3). Portanto, a análise filogenética dos isolados de *X. fastidiosa* estudados sugere que a distância genética entre eles está relacionada com a planta hospedeira. Além disso, também é possível verificar por este dendograma que o isolado 9712 de citros do Estado de São Paulo está geneticamente próximo aos dos isolados de cafeeiro das regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Estado do Paraná.

**Tabela 1** - Isolados de *Xylella fastidiosa* utilizados neste estudo

<b>Isolado</b>	<b>Região</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>
8935	-	Videira	EUA
9746	-	Ameixeira	Paraná
12307	-	Citros	São Paulo
11067	-	Citros	Paraná
11380	-	Citros	Santa Catarina
9712	-	Citros	São Paulo
12734	Norte	Cafeeiro	Paraná
12735	Norte	Cafeeiro	Paraná
12736	Norte	Cafeeiro	Paraná
12737	Norte	Cafeeiro	Paraná
12738	Norte	Cafeeiro	Paraná
12739	Norte	Cafeeiro	Paraná
12740	Norte	Cafeeiro	Paraná
12741	Norte	Cafeeiro	Paraná
12742	Norte	Cafeeiro	Paraná
12743	Norte	Cafeeiro	Paraná
12744	Norte	Cafeeiro	Paraná
12745	Norte	Cafeeiro	Paraná
12746	Norte	Cafeeiro	Paraná
12747	Norte	Cafeeiro	Paraná
12748	Norte	Cafeeiro	Paraná
12749	Norte	Cafeeiro	Paraná
12750	Norte	Cafeeiro	Paraná
12751	Norte	Cafeeiro	Paraná
12752	Norte	Cafeeiro	Paraná
12753	Norte	Cafeeiro	Paraná
12754	Norte	Cafeeiro	Paraná
12755	Norte	Cafeeiro	Paraná
12756	Norte	Cafeeiro	Paraná
12757	Norte	Cafeeiro	Paraná
12761	Norte Pioneiro	Cafeeiro	Paraná
12762	Norte Pioneiro	Cafeeiro	Paraná
12781	Noroeste	Cafeeiro	Paraná



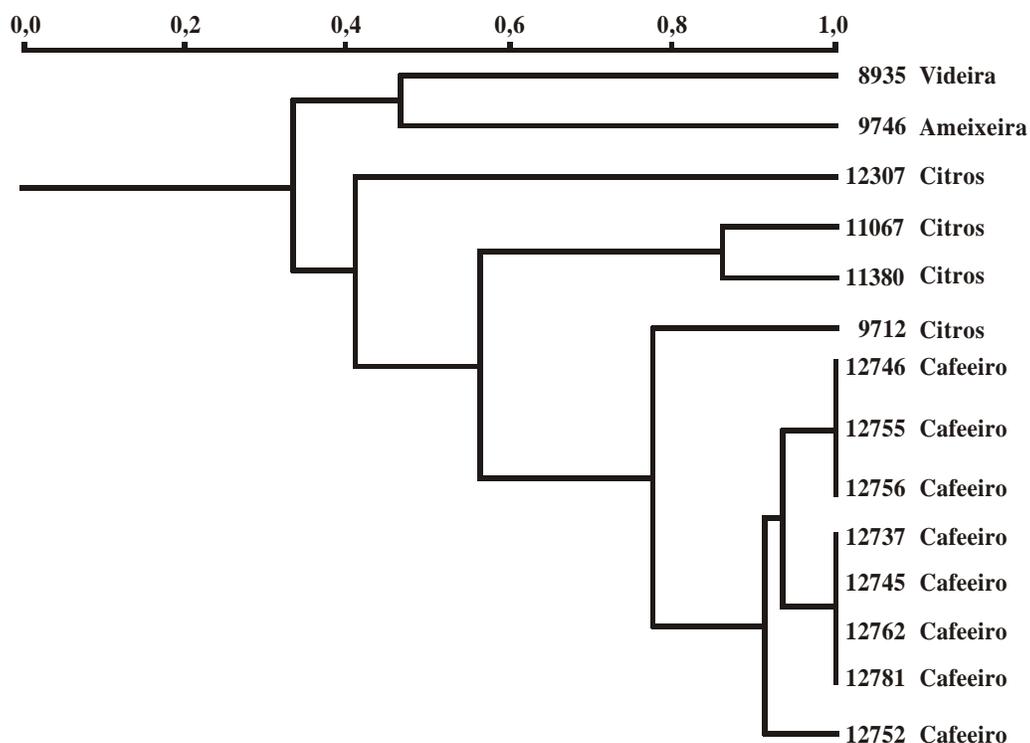
**Figura 1** - Perfis genômicos de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando a endonuclease de restrição *Swa* I. Coluna M corresponde ao marcador molecular Lambda. Colunas 1 a 18 correspondem, respectivamente, aos isolados 12735 (grupo 1), 12737 (grupo 2), 12739 (grupo 1), 12741 (grupo 2), 12742 (grupo 2), 12744 (grupo 1), 12746 (grupo 1), 12747 (grupo 2), 12748 (grupo 2), 12750 (grupo 2), 12751 (grupo 1), 12752 (grupo 3), 12753 (grupo 1), 12754 (grupo 2), 12755 (grupo 1), 12756 (grupo 1), 12737 (grupo 1) e 12781 (grupo 2). Marcador molecular está apresentado em kilobases.



**Figura 2** - Perfis genômicos de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando a endonuclease de restrição *Swa* I. Coluna M corresponde ao marcador molecular Lambda. Colunas 1 a 14 correspondem, respectivamente, aos isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira, 9712, 12307, 11067 e 11380 de citros, 12746 (grupo 1), 12755 (grupo 1), 12756 (grupo 1), 12737 (grupo 2), 12745 (grupo 2), 12762 (grupo 2), 12781 (grupo 2) e 12752 (grupo 3) de cafeeiro. Marcador molecular está apresentado em kilobases.

**Tabela 2** - Valores do coeficiente de similaridade genética entre isolados de *Xylella fastidiosa* estimados com base em perfis de restrição, utilizando a endonuclease *Swa I*

Isolado	Isolado													
	Videira	Ameixeira	Citros				Cafeeiro							
	8935	9746	12307	11067	11380	9712	12746	12755	12756	12737	12745	12762	12781	12752
8935	-													
9746	0,46	-												
12307	0,29	0,27	-											
11067	0,46	0,29	0,40	-										
11380	0,46	0,29	0,40	0,86	-									
9712	0,40	0,37	0,59	0,62	0,62	-								
12746	0,29	0,40	0,37	0,53	0,53	0,82	-							
12755	0,29	0,40	0,37	0,53	0,53	0,82	1,00	-						
12756	0,29	0,40	0,37	0,53	0,53	0,82	1,00	1,00	-					
12737	0,31	0,29	0,40	0,57	0,57	0,75	0,93	0,93	0,93	-				
12745	0,31	0,29	0,40	0,57	0,57	0,75	0,93	0,93	0,93	1,00	-			
12762	0,31	0,29	0,40	0,57	0,57	0,75	0,93	0,93	0,93	1,00	1,00	-		
12781	0,31	0,29	0,40	0,57	0,57	0,75	0,93	0,93	0,93	1,00	1,00	1,00	-	
12752	0,43	0,27	0,37	0,53	0,53	0,71	0,87	0,87	0,87	0,93	0,93	0,93	0,93	-



**Figura 3** - Dendrograma das relações filogenéticas dos isolados de *Xylella fastidiosa* inferido a partir de perfis genômicos de DNA digerido com endonuclease de restrição *Swa* I e construído através do pacote computacional NTSYS, utilizando o método UPGMA.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, F.M.S.; MENEGUIM, L. & LEITE JR., R.P. Levantamento da distribuição de *Xylella fastidiosa* associada a *Coffea* spp. em regiões cafeeiras do Paraná. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Resumos Expandidos**, p.287-290. 2000.
- EGEL, D.S.; GRAHAM, J.H. & STALL, R.E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* causing diseases of citrus. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:2724-2730. 1991.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*; xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** 27:271-290. 1989.
- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R. & CARLOS, E.F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*. **Fitopatol. Bras.**, 21:392-393. 1996.
- NEI, M. & LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 75: 5269-5273. 1979.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JR., A. & BERETTA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros, Laranja. 1:135-136. 1995.

ROHLF, F.S. NTSYS-pc v.1.8. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. Setauket, NY, p.191. 1993.

UENO, B. & LEITE JR., R.P. Estudo da variabilidade de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de cafeeiro e citros através da análise de proteínas totais. **Fitopatol. Bras.**, 21:341. 1996.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; & BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. **J. Syst. Bacteriol.**, 37:139-143. 1987.