

OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM INSETOS VETORES ASSOCIADOS A CAFEIEIRO

PAIÃO, F.G.^{1,2}; MENEGUIM, A.M.¹ e LEITE Jr., R.P.^{1,3}

¹IAPAR, C.P. 481, 86001-970, Londrina-PR; ²Bolsista CBP&D/Café; ³Bolsista CNPq; <fergonzalesp@hotmail.com>

RESUMO: *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa limitada ao xilema, que causa doenças em várias plantas de interesse econômico. No Brasil, foi relatada causando escaldadura da folha de ameixeira, clorose variegada dos citros (CVC) e depauperamento em cafeeiro. O principal meio de transmissão desta bactéria ocorre através de insetos sugadores do xilema. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) para detecção de *X. fastidiosa* em insetos vetores. Cigarrinhas coletadas em cafezais no Paraná tiveram o DNA total extraído segundo os métodos propostos por Vega et al. (1993), Cheung et al. (1993) e pela extração utilizando a resina CHELEX 100. Devido à baixa sensibilidade apresentada pelo PCR, foi desenvolvido o nested-PCR. Esta técnica envolve inicialmente a amplificação de fragmento de DNA, utilizando primeiramente um par de "primers", e a seguir o produto deste PCR serve como molde para uma segunda amplificação usando um novo conjunto de "primers", internos à sequência amplificada no primeiro PCR. Os "primers" utilizados para amplificar o DNA de *X. fastidiosa* presente em cigarrinhas foram: 272-1 e 272-2 e RST31-RST33, para o primeiro PCR; e CVC-1 e 272-2 interno e RST31-RST33 internos, para o segundo PCR (nested PCR). O nested-PCR mostrou-se mais sensível e específico, utilizando os "primers" RST31-RST33 no primeiro PCR e RST31-RST33 internos no segundo PCR, para detecção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas.

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*, PCR, nested-PCR, vetores.

OPTIMIZING THE PCR TECHNIQUE TO DETECT XYLELLA FASTIDIOSA IN COFFEE ASSOCIATED INSECT VECTORS

ABSTRACT: Optimization of the PCR technique for the detection of *Xylella fastidiosa* in insect vectors associated with coffee trees. *Xylella fastidiosa* is a Gram negative xylem-limited bacterium responsible for economic losses in several agriculturally important plants. In Brazil, the bacterium causes plum leaf scald, citrus variegated chlorosis (CVC) and coffee leaf scorch (CLS). *X. fastidiosa* is transmitted by xylem feeding leafhoppers. The subject of this work was to develop a PCR (Polymerase chain reaction) protocol for detection of *X. fastidiosa* in potential insect vectors. Leafhoppers collected

in coffee plantations in Paraná State were used for DNA extraction according to methods proposed by Vega *et al.* (1993), and Cheung *et al.* (1993), and by the method using the resin CHELEX 100. Due to low sensibility on regular PCR, the nested-PCR procedure was developed. This technique involves an initial amplification of DNA fragment by using an external set of primers. Next, the product of this PCR is used as template for a second amplification using a new set of primers, internal to the sequence amplified in first round of PCR. The primers used to amplify the DNA of *X. fastidiosa* were: 272-1 and 272-2, and RST31-RST33 for first round of PCR and CVC-1 and 272-2 int, and RST31int-RST33 int for the second PCR, respectively. The nested PCR using the RST sets of primers was highly sensitive and specific for detection of *X. fastidiosa* in potential insect vectors.

Key words: *Xylella fastidiosa*, PCR, nested-PCR, leafhoppers, vectors.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Xylella fastidiosa* causa doenças em diversas plantas, como alfafa e videira (Goeheen et al., 1973), pessegueiro (Hopkins et al., 1976), ameixeira (Hopkins, 1989), citros (Chagas et al., 1992) e cafeeiro (Paradela Filho et al., 1995). O principal meio de transmissão desta bactéria é através de cigarrinhas sugadoras do xilema (CDX), como *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* (Lima et al., 1998; Roberto et al., 1996). Essas cigarrinhas são observadas constantemente alimentando-se em plantas de cafeeiro (Paradela Filho et al., 1997). Entretanto, todas as cigarrinhas que se alimentam preferencialmente de seiva do xilema são potencialmente transmissoras de *X. fastidiosa*. A técnica de PCR tem sido amplamente utilizada para detectar *X. fastidiosa* em diferentes tecidos de plantas hospedeiras (Minsavage et al., 1994; Pooler & Hartung, 1995; Paradela Filho et al., 1997). No entanto, esta técnica molecular não tem sido utilizada regularmente na detecção da bactéria em insetos vetores. O presente trabalho teve como objetivo a otimização da técnica de PCR para detecção de *X. fastidiosa* em insetos vetores potenciais da bactéria. Foram testados diferentes métodos para extração de DNA bacteriano presente nesses insetos e diferentes "primers", bem como a técnica de nested-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA genômico de *X. fastidiosa* a partir de cigarrinhas. Cigarrinhas coletadas em cafezais de diferentes regiões do Paraná foram submetidas a três métodos de extração de DNA. Em todas as extrações foram utilizadas cabeças de cigarrinha contendo preferencialmente o cibário. O

primeiro método foi basicamente desenvolvido para extração de micoplasmas de insetos (Vega et al., 1993). Grupos de cinco insetos ou um único inseto foram macerados em 400 μ L de tampão de extração (Tris 100 mM; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM, pH 8,0), adicionado de 2 μ L de β -mercaptoetanol e SDS na concentração final de 1%, seguido de centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aquecido por cinco minutos a 65°C. Ácidos nucleicos foram extraídos com clorofórmio/álcool-isoamílico/fenol saturado com TE. A seguir, o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado por 30 minutos a -80°C, seguido de lavagem com etanol 70%. Depois de seco, o DNA foi ressuspensionado em 100 μ L de SSC 6X (cloreto de sódio 0,9 M; citrato de sódio 0,09 M, pH 7,0).

O segundo método testado foi o descrito por Cheung et al. (1993), para extração do DNA de mosca branca, com algumas modificações. Cabeça de uma cigarrinha foi macerada em 200 μ L de tampão de extração SPC (succinato-citrato-fosfato, 1,0 g/L; citrato trissódico, 1,0 g/L; K_2HPO_4 , 1,5 g/L; KH_2PO_4 , 1,0 g/L, pH 7,0). Durante a extração foi acrescentado sarcosil a uma concentração final de 1% e 3 μ L de proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi agitada e incubada por uma hora a 60°C. A seguir, foi acrescentado fenol/clorofórmio, seguido de centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para novos tubos, aos quais foram acrescentados 90 μ L de acetato de amônia 10 M e 200 μ L de isopropanol, para precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram mantidos a 0°C por 18 horas. Decorrido esse tempo, o DNA foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm, e o pellet foi lavado com etanol 70% gelado. A seguir, os microtubos foram secos e o DNA foi ressuspensionado em 25 μ L de TE.

No terceiro método de extração de DNA foi utilizada a resina CHELEX 100. Cada cigarrinha (cabeça ou cibário) foi macerada em 200 μ L de tampão SPC, acrescido de PVPP insolúvel lavado em ácido na concentração final de 0,25% e ascorbato de sódio 0,1 M. As amostras foram maceradas em tubos de microcentrífuga, com auxílio de micropistilos de plástico, sendo posteriormente centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, acrescentando-se ao pellet 100 μ L de Chelex 100. Após incubadas por 30 minutos a 56°C, as amostras foram agitadas, centrifugadas, fervidas por oito minutos e agitadas novamente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e estocado a -20°C.

Deteção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas. Os DNAs extraídos de amostras de cigarrinhas foram utilizados para amplificação de seqüências genômicas, utilizando os seguintes pares de "primers": 1) RST31 (GCGTTAATTTTCGAAGTGATTTCGATTGC) e RST33 (CACCATTCGTATCCCGGTG); 2) RST31 interno (CGACTCCACGGAATTGGC) e RST33 interno (GGCAATGCCGCATCAACATC); 3) 272-1 (AGCGGGCCAATATTCAATTGC) e 272-2

(AGCGGGCCAAAACGATGCGTG); 4) 272-2 - interno (GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT) e CVC-1 (AGATGAAAACAATCATGCAAA).

Os "primers" RST31 e RST33 e seus internos amplificam uma região de 733 pb e 500 pb, respectivamente. As regiões amplificadas apresentam homologia com os genes *rpoD*, que codificam a subunidade sigma da RNA polimerase em diversos gêneros bacterianos (Wendland et al., 1999). Já os "primers" 272-1 e 272-2 e 272-2 interno e CVC-1, descritos por Pooler & Hartung (1995), são seqüências de bandas polimórficas obtidas por RAPD para *X. fastidiosa* e amplificam seqüências de aproximadamente 700 pb e 500 pb, respectivamente.

Os "primers" foram utilizados para detectar *X. fastidiosa* em cigarrinhas através das técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) e nested-PCR. Para o nested-PCR, primeiro foi realizada reação de PCR utilizando o par externo de "primers". O produto deste PCR foi então utilizado como molde para uma nova amplificação, utilizando o par interno de "primers" que reconhecem seqüências internas ao fragmento amplificado no primeiro PCR. Foram utilizados dois tipos de reações para os "primers" descritos por Minssavage et al. (1994) e por Pooler & Hartung (1995) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Reação de PCR utilizada para os "primers": RST31-RST33 e RST31-RST33 internos

Componentes do PCR	Volume
H ₂ O	28,95 µL
Tampão da enzima 10x	5 µL (1x)
MgCl ₂ (50 mM)	3 µL (3,0 mM)
dNTPs (1,25 mM)	8 µL (200 µM)
RST31 ou RST31 int (25 pmoles/µL)	0,4 µL (10 pmoles)
RST33 ou RST33 int (25 pmoles/µL)	0,4 µL (10 pmoles)
Taq (5 U/µL)	0,25 µL (1,25 U)
DNA	4 µL
Volume final	50 µL

Tabela 2 - Reação de PCR utilizada para os "primers" 272-1, 271-2, CVC-1 e 272-2 interno

Componentes do PCR	Volume
H ₂ O	10,6 µL
Tampão da enzima 10x	2 µL (1x)
MgCl ₂ (50 mM)	0,8 µL (2 mM)
dNTPs (10mM)	0,4 µL de cada (200 µM)
272-2 ou 272-2 int (25 pmoles/ µL)	0,4 µL (10 pmoles)
CVC-1 ou 272-1 (25 pmoles/µL)	0,4 µL (10 pmoles)
Taq (5 U/µL)	0,2 µL (2 U)
DNA	4 µL
Volume final	20 µL

Para amplificação do DNA foi utilizado o termociclador PTJ-100-60 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA). Na amplificação do DNA de *X. fastidiosa* com os diferentes "primers" também foram utilizados diferentes programas de amplificação. Para os "primers" RST 31/RST33, as amostras foram inicialmente submetidas à denaturação inicial de 95°C por um minuto, seguido de 35 ciclos com denaturações à mesma temperatura por 30 segundos, anelamento a 55°C e 61°C (internos) por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguido de extensão final de três minutos a 72°C. Já para os "primers" descritos por Pooler & Hartung (1995), as amostras foram inicialmente submetidas a uma denaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguido de 35 ciclos, com denaturações à mesma temperatura por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos, seguido de extensão final de cinco minutos a 72°C.

Teste de sensibilidade do PCR. Para determinação da sensibilidade da técnica de PCR, suspensões de células bacterianas do isolado 12723 de *X. fastidiosa* nas concentrações de 10^2 a 10^8 UFC/mL tiveram o DNA extraído e amplificado com os seguintes pares de "primers": 1) RST31 e RST33; 2) 272-1 e 272-2; e 3) 272-2 int e CVC-1. A extração de DNA foi feita segundo metodologia descrita por Ausubel et al. (1987), e a amplificação foi realizada conforme descrito anteriormente por MINSAVAGE et al. (1994) e Pooler & Hartung (1995) para cada par de "primers". Também foi realizado PCR com DNA diluído em concentrações de DNA equivalentes a 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 e 10^8 células/mL.

Montagem do nested-PCR. As reações de nested-PCR foram montadas em fluxo laminar, previamente tratados com luz UV por 30 minutos, para evitar contaminação com DNA de *X. fastidiosa*. As pipetas e ponteiras foram exclusivamente utilizadas para montagem do nested-PCR. Todas as ponteiras utilizadas possuíam proteção com filtro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas e a sensibilidade do PCR foram testadas para os pares de "primers" RST31 e RST33; 272-1 e 272-2; e 272-2 int e CVC-1 (Figura 1). A baixa sensibilidade apresentada pela técnica propiciou apenas a detecção de *X. fastidiosa* em insetos adicionados de suspensão bacteriana. O número mínimo de células detectadas pelo PCR foi de 10^3 UFC/mL. Uma alternativa para detecção desta bactéria é o uso do nested-PCR. Esta técnica tem se mostrado mais sensível, sendo utilizada para detecção de microrganismos fitopatogênicos, em insetos e plantas (Lee et al., 1994; Khadhair et al., 1998; Bedendo et al., 1999) e até para detecção de *X. fastidiosa* em insetos potencialmente vetores, juntamente com separação imunomagnética (Pooler et al., 1997). O teste de sensibilidade foi também realizado para os "primers" RSTs e para os demais,

através da técnica de nested-PCR (Figura 2). Os resultados obtidos para os "primers" descritos por Pooler & Hartung (1995) não foram considerados, pois houve amplificação do controle negativo no nested-PCR, quando utilizado reagente do PCR somado a uma alíquota de 4 µL do controle negativo do primeiro PCR. Maior sensibilidade foi obtida no nested-PCR para os pares de "primers" RSTs (RST31 e RST33; e RST31 e RST33 internos), onde foram detectadas 10 células bacterianas. No primeiro PCR ocorre produção de pequeno número de fragmentos (não visualizados em gel), que são utilizados em um segundo PCR, contendo "primers" que amplificam regiões internas ao produto do primeiro PCR. Dessa forma, ocorre amplificação em quantidade suficiente, permitindo a visualização da banda de DNA. No PCR, para os três protocolos de extração testados, apenas cigarrinhas de amostras acrescidas de *X. fastidiosa* e DNA extraído de colônias desta bactéria formaram o produto de amplificação de 733 pb (Figura 3). Quando foi realizado o nested-PCR dessas mesmas amostras das duas cigarrinhas submetidas à extração pelo protocolo 1, uma delas apresentou resultado positivo para *X. fastidiosa* no nested-PCR, com presença de banda de cerca de 500 pb. Pelos métodos 2 e 3, ambas as amostras de cigarrinhas que se mostraram negativas no primeiro PCR, no nested-PCR apresentaram resultado positivo para *X. fastidiosa*. O método de extração apresentou pouca influência no nested-PCR, sendo a alta sensibilidade apresentada pela técnica o fator importante na detecção da bactéria.

CONCLUSÕES

A técnica de nested-PCR permitiu a detecção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas, aumentando a sensibilidade em relação ao PCR, permitindo a detecção de 10 UFC/mL de *X. fastidiosa*.

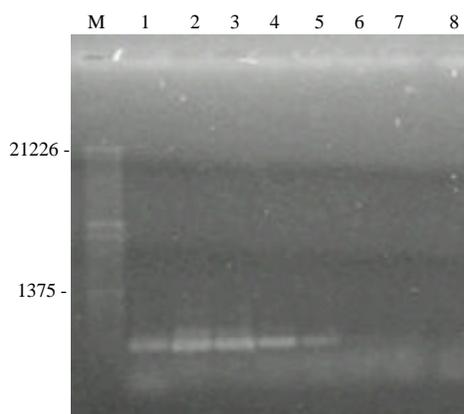


Figura 1 - Teste de sensibilidade da PCR utilizando os "primers" RST31-RST33. Colunas de 1 a 7 correspondem às concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10 UFC/mL de *Xylella fastidiosa*, respectivamente. Coluna 8 corresponde ao controle negativo. M corresponde ao marcador molecular λ EcoR I/Hind III.



Figura 2 - Amplificação de fragmento de 733 pb do DNA genômico de *X. fastidiosa* através de PCR e amplificação de fragmento de aproximadamente 500 pb do DNA genômico de *X. fastidiosa* através de nested-PCR, utilizando os "primers" RST31-RST33 e RST31-RST33 internos, respectivamente. Colunas de 1 a 7: PCR de diluições do DNA de *X. fastidiosa* correspondentes a 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL; 8: controle negativo do PCR. Colunas de 9 a 15: nested-PCR do produto do primeiro PCR contendo 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC/mL; 16: controle negativo (reagentes + controle negativo do 1 PCR); 17: controle negativo do segundo PCR (reagentes + água milliporizada).

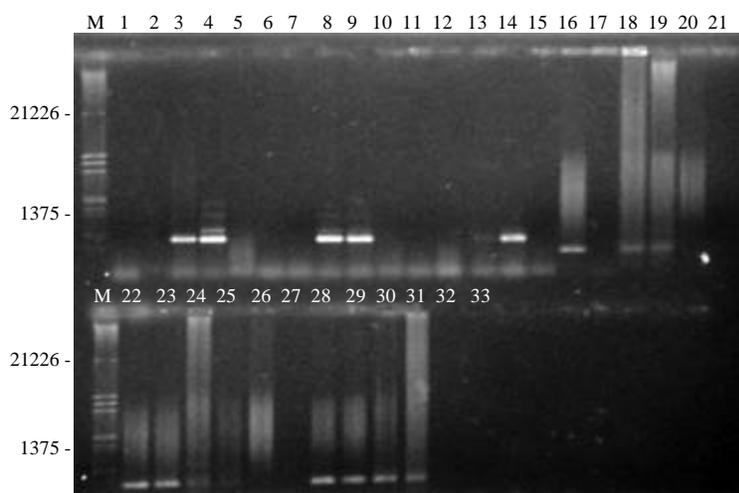


Figura 3 - Colunas 1 a 15: amplificação de fragmento de 733 pb do DNA de *X. fastidiosa* de cigarrinhas através de PCR, utilizando os "primers" RST31-RST33. Colunas de 1 a 5, PCR montado com DNA extraído segundo método de Vega et al. (1993). Colunas 1 e 2, cigarrinhas; 3, cigarrinha + suspensão bacteriana; 4, *X. fastidiosa*; 5, controle negativo; 6 a 10, PCR montado com DNA extraído segundo método de Cheung et al. (1993). Colunas 6 e 7, cigarrinhas; 8, cigarrinha + suspensão bacteriana; 9, *X. fastidiosa*; 10, controle negativo; 11 a 15, PCR montado com DNA extraído segundo método de CHELEX 100. Colunas 11 e 12, cigarrinhas; 13, cigarrinha + suspensão bacteriana; 14, *X. fastidiosa*; 15, controle negativo. Colunas de 16 a 33, amplificação de fragmento de aproximadamente 500 pb do DNA a partir do fragmento de 733pb de *X. fastidiosa* de cigarrinhas através de nested-PCR, utilizando os "primers" RST31-RST33 internos; 16 a 21, nested-PCR a partir do produto do PCR obtido por extração descrita por Vega et al. (1993). Colunas 16 e 17, cigarrinhas; 18, cigarrinha + suspensão bacteriana; 19, *X. fastidiosa*; 20 e 21, controle negativo do primeiro e segundo PCR; 22 a 27, nested-PCR a partir do produto do PCR obtido por extração descrita por Cheung et al. (1993). Colunas 22 e 23, cigarrinhas; 24, cigarrinha + suspensão bacteriana; 25, *X. fastidiosa*; 26 e 27, controle negativo do primeiro e segundo PCR; 28 a 33, nested-PCR a partir do produto do PCR obtido por extração descrita por CHELEX 100; 28 e 29, cigarrinhas; 30, cigarrinha + suspensão bacteriana; 31, *X. fastidiosa*; e 32 e 33, controle negativo do primeiro e segundo PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, R.D.D. & SEIDMAN, J.G. **Current protocols in molecular biology**. J. Wiley & Sons, New York. 1987.

- BEDENDO, I.P.; DAVIS, R.E. & DALLY, E.L. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e de RFLP. **Summa Phytopathologica**, 25 (3): 197-201. 1999.
- CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V. & BERETA, M.J.G. Eletron microcopy studies of xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, 34: 306-312. 1992.
- CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N. & LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Journal of Invertebrate Pathology**, 3: 12-17.1993.
- GOEHEEN, A.C.; NYLAND, G. & LOWE, S.K. Association of ricketesia-like organisms with Pierce's diseases of grapevines and alfafa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. **Phytopathology**, 63: 341-345. 1973.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem limited bacterial pathogens of plants. **Annual Review of Phytopathology**, 27: 271-290. 1989.
- HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.A. & FRENCH, W.J. Ocurrance of reckettsia-like bacterium in the xylem of peach trees with pony disease. **Phytopathology**, 63: 1422-1423. 1973.
- KHADHAIR, A.H.; KAWCHUK, L.M.; TAILLON, R.C. & BOTAR, G. Detection and Molecular characterization of an Aster yellows phytoplasma in parsley. **Canadian Journal of Plant Phathology**, 20: 55-61. 1998.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN, R.W.; HAMMOND, R.W.; DAVIS, R.E. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide "primers" for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. **Molecular Plant Pathology**, 84, 559-566. 1994.
- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R. & CARLOS, E.F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, 82: 94-97. 1998.
- MINSAVAGE, G.V. THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.B.C. & STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, 84: 456-461. 1994.
- PARADELA FILHO, O; SUGIMORI, M.H; RIBEIRO, I.J.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA, J.R. & BERETA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros em café. **Laranja**, 16 (2): 135-136. 1995.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H; RIBEIRO, I.J.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA, J.R. & BERETA, M.J.G. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Pathologyca**, 23: 415-431. 1997.
- POOLER, M.R. & HARTUNG, J.S. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, 31: 377-381. 1995.
- POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J.; SHERALD, J. & HARTUNG, J.S. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, 25: 123-126. 1997.

- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S. & CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, 21 (4): 517-518. 1996.
- VEGA, F.E.; DAVIS, R.E.; BARBOSA, P.; DALLY, E.L.; PURCELL, A.H. & LEE, I.M. Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, 83: 621-624. 1993.
- WENDLAND, A.; TRUFFI, D.; ALMEIDA, R.P.P.; LOPES, J.R.S.; LEITE, JR, R.P. & CAMARGO, L.E.A. Sequenciamento de região genômica de *Xylella fastidiosa* amplificada com os "primers" RST31 e RST33. **Anais do XXII Congresso Paulista de Fitopatologia**, Jaboticabal, p.144. 1999.