

ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA ENTRE ISOLADOS DE *XYLELLA* *FASTIDIOSA* ASSOCIADOS À CLS

Valquíria Campos Alencar¹; Deibs Barbosa², Regina Costa de Oliveira³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: vqrca@hotmail.com¹

Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; e-mail: ertablo@hotmail.com²

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br³

Área do Conhecimento: Genética de microrganismos

Palavras-chaves: *Xylella fastidiosa*, Microarranjos de DNA, Requeima foliar do cafeeiro

INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa (*Xf*) é um bacilo Gram-negativo, que se desenvolve nos vasos do xilema de uma ampla variedade de espécies vegetais e suas diferentes linhagens causam doenças economicamente relevantes (HOPKINS & PURCELL, 2002), entre elas a Clorose variegada dos citros (CVC) e a Requeima foliar do cafeeiro (CLS) (HOPKINS, 1989; PARADELA-FILHO, 1997). Com a análise do genoma de diversas linhagens de *Xf* foi encontrado um padrão compatível com as modernas teorias sobre a evolução procariontes, que propõem que os genomas de bactérias são divididos em um conjunto de genes central e um conjunto de genes flexível, adquirido por transferência horizontal. Considerando que CVC e CLS são responsáveis por enormes prejuízos econômicos no Brasil, um grande interesse tem se levantado sobre a existência de um patossistema conjunto.

OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo a análise genômica comparativa entre isolados de *Xf* obtidos de cafeeiros e provenientes do interior do Estado de São Paulo, com base na avaliação de sequências presentes em *Xf* 9a5c (cepa referência), que causa a Clorose variegada de Citros, mas ausentes ou duplicadas em 4 isolados que infectam cafeeiros (isolados-teste), através de hibridação em microarranjos de DNA.

METODOLOGIA

Foi realizada a extração de DNA das linhagens-teste e da referência (9a5c). Após isto, em um biochip de *Xf* 9a5c, que carrega seqüências representativas de 2200 ORFs da bactéria, foram realizados experimentos de hibridação competitiva, envolvendo marcação do DNA referência (*Xf* 9a5c) com Cy3-dCTP, que foi misturado com o DNA teste, marcado com Cy5-dCTP. As imagens obtidas das marcações foram analisadas com o software Jaguar 2.0 e posteriormente as análises estatísticas foram realizadas, gerando um mapa que compara o padrão genômico dos isolados em análise. Então, a análise das hibridações competitivas permitiu a categorização das diversas ORFs presentes no biochip como: (I) igualmente representadas nos dois genomas (II) exclusivas do genoma da *Xf* 9a5c ou (III) presente em maior número no genoma da linhagem teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base em todas as análises pode-se verificar que as ORFs de *Xf* 9a5c podem apresentar diferentes graus de similaridade, quando comparadas aos isolados em estudo. Quase todos os isolados apresentaram sequências gênicas duplicadas, com exceção do isolado 9c iso32, que não mostrou nenhuma duplicação no decorrer de seu cromossomo, já a linhagem 9c teve 51 ORFs duplicadas. Ênfase deve ser dada ao isolado 08, que possui quase todos os genes do megaplasmídeo de *Xf* 9a5c (Figura 1).

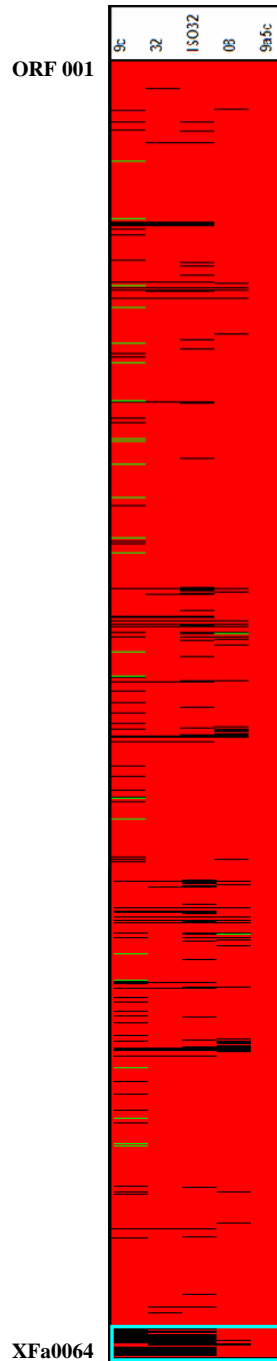


Figura 1: Perfil genômico dos isolados de *Xf* de cafeeiros. Genes compartilhados entre os isolados e a referência (9a5c) estão representados em vermelho, genes ausentes estão representados em preto e genes multiplicados estão representados em verde. Destacados em azul estão os genes correspondentes ao megaplasmídeo do isolado referência.

Sugerimos que o megaplasmídeo de *Xf 9a5c* tenha sido transferido, através do mecanismo de conjugação, para isolado 08 no decorrer do processo evolutivo. Apesar da idéia de que muitos componentes da virulência bacteriana sejam específicos para o hospedeiro, numerosos estudos já demonstraram a existência de mecanismos comuns usados por diversas espécies bacterianas em diferentes hospedeiros (FINLAY & FALKOW, 1997). Em todos os casos, o organismo patogênico tem que reconhecer, associar-se, aproveitar as reservas de nutrientes e combater os mecanismos de defesa do hospedeiro específico (HOPKINS, 1989), lançando mão de diversos fatores relacionados à virulência. Em relação à estes genes, dentre os genes duplicados presentes na linhagem 9c, muitos são considerados proteínas hipotéticas, ou seja, que ainda não possuem uma função definida, mas se pode destacar genes como o regulador de virulência *xrvA* (ORF XF1493), proteína transportadora do tipo ABC (ORF XF1409), proteína secretora de colicina V (ORF XF1220), proteína fimbrial *pilC* (ORF XF2538) e a proteína conjugal de transferência *traF* (ORF XF2058). Estes genes são conhecidos por contribuírem para adaptação ao hospedeiro assim como para a virulência, mecanismos de defesa e relacionando-se à adesão no hospedeiro. Os isolados de *Xf* causadores de CVC e CLS são distintos, porém filogeneticamente relacionados e com grande similaridade genética devido a eventos de recombinação.

CONCLUSÕES

Através do experimento de hibridação competitiva em microarranjos de DNA foi possível ter evidências a respeito da intensa atividade de transferência gênica lateral que ocorre em organismos procariotos, sendo este um importante mecanismo para promover a evolução deste grupo de microrganismos patógenos, conferindo características diferenciadas para a virulência de diferentes isolados. A presença de genes do pool gênico flexível indica que pode ocorrer a troca de material genético entre organismos que infectam hospedeiros diferenciados. Para ampliar os resultados e discussão deste trabalho, seria necessário usar outra metodologia, conhecida como Hibridação Subtrativa Supressiva, para conhecer genes exclusivos dos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FINLAY, B.B and FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61, 136-69, 1997.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annu. Rev. Phytopathology**, 27: 271–290, 1989.

HOPKINS, D.L. and PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Dis**, 86: 1056–1066, 2002.

PARADELA-FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; GARCIA, Jr.A.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAWA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; RODRIGUES, Neto J.; BERIAM, L.O.S. Occurrence of *Xylella fastidiosa* in coffee plants in Brazil. **Summa Phytopathologica**, 23:46-49, 1997.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas de estudo concedidas e a FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.