

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

**Valquíria Campos Alencar<sup>1</sup>; Deibs Barbosa<sup>2</sup>; Regina Costa de Oliveira<sup>3</sup>**

Estudante do Curso de Bacharel em Ciências Biológicas; email: valquiria@umc.br<sup>1</sup>

Doutorando da Universidade de São Paulo<sup>2</sup>

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; email: reginaco@umc.br<sup>3</sup>

**Área do Conhecimento:** Genética de Microrganismos

**Palavras-chave:** *Xylella fastidiosa*, Requeima foliar do cafeeiro, Hibridação Subtrativa Supressiva

## INTRODUÇÃO

*Xylella fastidiosa* (*Xf*) é uma bactéria gram-negativa que se desenvolve no interior dos vasos xilemáticos de uma ampla variedade de espécies vegetais (HOPKINS & MOLLENHAUER, 1973; WELLS *et al.*, 1987). Alguns dos isolados de *Xf* estão associados a doenças em diferentes culturas como alfafa, ameixa, amêndoa, café, citrus, pêssego e videira (DODDAPANENI *et al.*, 2007; HOPKINS & PURCELL, 2002). Já foi demonstrado que esta bactéria possui um grande conjunto gênico flexível, elucidando parcialmente a sua especificidade nos diferentes hospedeiros e os mecanismos de virulência. No Brasil, as doenças mais prejudiciais são a Requeima Foliar do Cafeeiro (CLS) e a Clorose Variegada de Citrus (CVC), que está associada principalmente com os cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*). Embora os isolados de *Xf* relacionados à CLS e CVC representem grupos geneticamente distintos, podem ocorrer eventos de recombinação genética, estabelecendo um complexo patossistema (ALMEIDA *et al.*, 2008). Além disso, as semelhanças genéticas dos isolados associadas à proximidade geográfica, ou mesmo, a coexistência de culturas de café e laranja no interior do Estado de São Paulo, podem aumentar o risco do surgimento de linhagens hipervirulentas e elevando a evolução do grupo *Xf*.

## OBJETIVOS

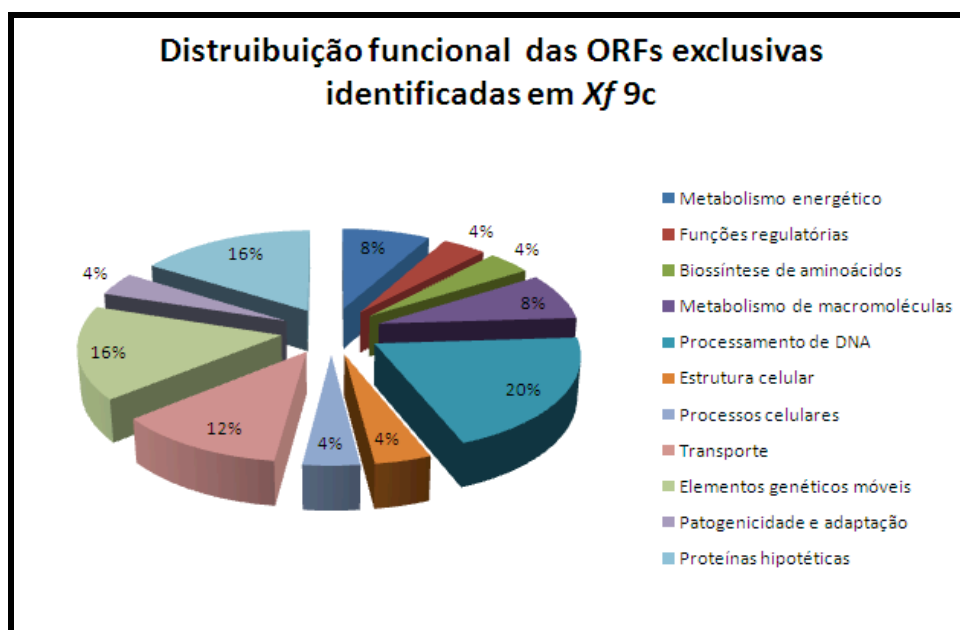
O objetivo deste trabalho é continuar a análise genômica comparativa entre isolados de *Xylella fastidiosa* provenientes de cafeeiros infectados, com a linhagem de referência (*Xf* 9a5c) que causa infecções em citrus. Então, o isolado 9c, foi escolhido por ter mostrado diferenças genômicas significantes em relação à linhagem referência e através de um método específico seus genes exclusivos foram analisados, caracterizando os aspectos genômicos particulares a este isolado teste e suas possíveis relações a adaptação, virulência, aos aspectos ligados a patogenicidade e aos mecanismos de transferência gênica horizontal.

## METODOLOGIA

Foi realizado um experimento de Hibridação Subtrativa Supressiva, utilizando a linhagem *Xf* 9a5c de citrus como referência e o isolado *Xf* 9c proveniente de café, como teste. Então, o DNA genômico de cada *Xf* 9a5c e *Xf* 9c foi digerido com a enzima *RSA I* e os fragmentos produzidos foram subtraídos através de uma série de hibridações e ampliações. Os fragmentos resultantes após a SSH foram clonados no vetor pGEM-T e posteriormente transformados em bactérias *E. coli*. Os clones obtidos foram crescidos e a extração plasmidial foi realizada através da lise alcalina. Todas as amostras de DNA extraído e purificado foram submetidas à reação de sequenciamento e as sequências obtidas foram analisadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 1.536 fragmentos clonados foram sequenciados e organizados em 30 contigs, utilizando o pacote Phred/Phrap/Consed. Estes contigs foram submetidos à comparação através do NCBI Genbank e foram distribuídos em onze categorias (Figura 1). Entre elas, é notável: três ORFs relacionadas com transporte, quatro ORFs de elementos genéticos móveis (fagos), uma ORF com a patogenicidade e adaptação. Em geral, isolados de café são muito semelhantes aos isolados norte-americanos, devido a grandes regiões ausentes em seus genomas. Curiosamente cinco ORFs estão relacionadas à *Xylella fastidiosa* Temecula1, de origem norte-americana.



**Figura 1:** Distribuição funcional das ORFs exclusivas identificadas no genoma do isolado Xf 9c através da Híbridação Subtrativa Supressiva. A classificação de acordo com a função foi feita de acordo com Simpson *et al.* (2000).

## CONCLUSÕES

Os resultados confirmaram a diversidade genética entre os diferentes isolados pertencentes à espécie *Xylella fastidiosa* em relação a diferentes hospedeiros. Além disto, estes resultados, juntamente com dados de trabalhos recentemente publicados apóiam a hipótese do surgimento do grupo ancestral de *X.fastidiosa* nas regiões temperadas da América do Norte com radiação adaptativa, possivelmente na Europa Central e depois para a América do Sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.P.; NASCIMENTO, F.E.; CHAU, J.; PRADO, S.S.; TSAI, C.W.; LOPES, S.A.; LOPES, J.R. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Appl Environ Microbiol.**,74(12):3690-701, 2008.

DODDAPANENI, H.; FRANCIS, M.; YAO, J.; LIN, H.; CIVEROLO, E. L. Genome-wide analysis of *Xylella fastidiosa*: implications for detection and strain relationships. **Afr J Biotechnol.**, 6:055-066, 2007.

HOPKINS, D.L. and MOLLENHAUER, H.H. *Rickettsia*-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science.**, 179: 298–300, 1973.

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.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L., and BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen.nov.sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **Int.J.Syst.Bacteriol.**, 37: 136–143, 1987.