

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

Rafaela Maria Rios dos Anjos<sup>1</sup>; Valquíria Campos Alencar<sup>2</sup>; Regina Costa de Oliveira<sup>3</sup>

Estudante do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas; e-mail: rafaella.anjos.bio@hotmail.com<sup>1</sup>

Doutoranda da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: valquiria@umc.br<sup>2</sup>

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

Área do Conhecimento: Genética Molecular 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 e alguns de seus isolados estão associados a doenças em diferentes culturas, tais como alfafa, ameixa, amêndoa, café, citros, pêssego e uva (HOPKINS e MOLLENHAUER, 1973; WELLS *et al.*, 1987). No Brasil esta bactéria afeta importantes culturas, causando as doenças Clorose Variegada de Citros (CVC), e a Requeima foliar do Cafeeiro (Coffee Leaf Scorch, ou CLS) (PURCELL *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2007). As pressões econômicas associadas às perdas decorrentes da CVC fizeram com que o isolado *Xf* 9a5c, obtido no interior do Estado de São Paulo, tivesse seu genoma completamente sequenciado, possibilitando a proposição de um abrangente metaboloma virtual (SIMPSON *et al.*, 2000). Embora os isolados de *Xf* relacionados à CLS e CVC representem grupos geneticamente distintos, podem ocorrer eventos de recombinação genética, estabelecendo um patossistema conjunto (ALMEIDA *et al.*, 2008). Recentemente, Barbosa (2011) em um estudo comparativo entre diversos isolados obtidos de cafeeiros com *Xf* 9a5c, evidenciou que a estrutura genômica destes é divergente. Este estudo permitiu avaliar genes ausentes entre cada isolado e a referência, restando apenas caracterizar genes exclusivos de cada isolado de café.

## OBJETIVOS

Obter sequências gênicas exclusivas de um isolado de *Xylella fastidiosa* denominado 33 em relação à linhagem 9a5c, através do método de Hibridação Subtrativa Supressiva.

## METODOLOGIA

O DNA genômico de *Xf* 9a5c e *Xf* 33 foi extraído e posteriormente digerido com a enzima Rsa I. Então, o DNA de *Xf* 33 foi ligado a duas sequências adaptadoras diferentes (desenhadas de acordo com a enzima utilizada para a digestão) e os fragmentos produzidos foram subtraídos através de uma série de hibridações e ampliações. Após a SSH os fragmentos resultantes foram clonados no vetor pGEM-T e transformados em bactérias *E. coli*. Os clones obtidos foram crescidos e foi feita a extração plasmidial através de lise

alcalina. Por fim todas as amostras de DNA extraído e purificado foram submetidas à reação de sequenciamento e as sequências obtidas foram analisadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

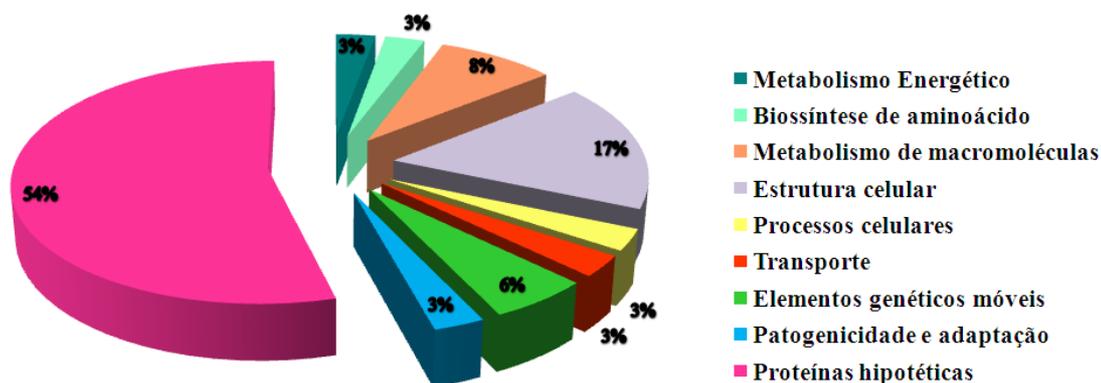
Foram obtidos 35 contigs, que foram classificados em nove categorias, com base na classificação feita por Simpson *et al.* (2000) para a linhagem *Xf* 9a5c (Figura 1). Dentre as sequências encontradas podem-se destacar proteínas relacionadas à profagos: bacteriófago terminase e uma integrase; genes relacionados à superfície e estrutura celular: peptidoglicano glicosiltransferase, lipoproteína, proteína de biossíntese de lipopolissacarídeo, polissacarídeo deacetilase e antígeno de membrana externa; e uma proteínas de secreção, associada a mecanismos de patogenicidade e adaptação.

Portanto, as sequências exclusivas obtidas no isolado 33 mostram que as principais diferenças estão relacionadas a genes de fagos, proteínas de superfície e genes associados à patogenicidade.

A presença de genes relacionados à Lipopolissacarídeos indica que estas moléculas além de ser um importante fator na mediação de interações, tais como o reconhecimento e adesão das bactérias no inseto vetor e na planta hospedeira, podem estar relacionados a especificidade aos seus diferentes hospedeiros.

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

### Distribuição funcional das ORFs exclusivas identificadas em *Xf* 33



## CONCLUSÕES

Os resultados mostram que embora constituam uma única espécie, os isolados de *X. fastidiosa* de diferentes hospedeiros apresentam grande variabilidade genética devido principalmente a elementos móveis, obtidos através da transferência gênica horizontal e que as principais diferenças entre isolados obtidos de cafeeiros e citros provavelmente estejam relacionadas a elementos da superfície celular

## REFERÊNCIAS

## BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.P.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.**, v. 74, n. 12, p. 3690-701, 2008.

BARBOSA, Deibs. **Análise genômica comparativa de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de cafeeiros.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2011.

DA SILVA, V.S.; SHIDA, C.S.; RODRIGUES, F.B.; RIBEIRO, D.C.; DE SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; NUNES, L.R.; DE OLIVEIRA, R.C. Comparative genomic characterization of citrus-associated *Xylella fastidiosa* strains. **BMC Genomics.**, 8:474, 2007.

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

PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R.; HENDSON, M.; GREBUS, M.E.; HENRY, M.J. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch. **Phytopatology.**, 89: 53–58, 1999.

SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S., *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature.**, 406: 151–157, 2000.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, 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. **Int.J.Syst.Bacteriol.**, 37: 136–143, 1987.

## AGRADECIMENTOS

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