

**ANÁLISE DE REGIÕES DE PROFAGOS EM DIFERENTES
ISOLADOS DE *Xylella fastidiosa***

KALINCA PATRÍCIA MARENGO

Bióloga

Orientador(a): Profa. DRA. ALINE AP. PIZZIRANI-KLEINER

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo- Brasil

Janeiro-2001

ERRATA

Página (p), parágrafo (^), Linha (L)	Onde está	Substituir ou complementar por:
p 15, 2^, L 2	profanos	profagos
p 19, ^2, L 6	<i>Bacelo subtileza</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
p 76, ^1, L 2	J Biol Chem.	Journal of biological Chemistry
p 76, ^5, L 4	Microbiology	Microbiology and molecular biology reviews
p 77, ^1, L 2	Ann. Rev. Genetics	Annual review of genetics.
p 78, ^5, L 2	Ann. Rev. Microbiology	Annual review microbiology.
p 81, ^5, L 2	Trends in Geneticas	Trends in genetics
p 82, ^5, L 3	Nucleic Acids Res	Nucleic acids research
P83, ^1	Referência bibliográfica repetida	Considerar a segunda citação
p 82, ^5, L 4	DNA Rese.	DNA research
p 84, ^3, L 1	Lacava,	Lacava, P.T
p 82, ^4, L 2	Element from <i>Clavibacter...</i>	<i>... xyli subsp. Cynodontis</i> , is related to insertion sequences from Gran-negative and Gran- positive bacteria. Plasmid. v
p 86, ^2, L 2	Current Opinium in microbiology	Current opinion in Microbiology
p 87, ^2, L 3	Mol. Microbiological	Molecular Microbiology.
p 88, ^4	Referência bibliográfica repetida	Considerar a primeira citação
p 89, ^3, L 2	Ann. Rev. Phytopathol.	Annual review of phytopathological
p 92, ^3, L 2	Tig	Trends in genetics : TIG

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Marengo, Kalinca Patrícia

Análise de regiões de profagos em diferentes isolados de *Xylella fastidiosa* / Kalinca Patrícia Marengo. - - Piracicaba, 2001.

92 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Bactéria Gram-negativa 2. Bacteriófago 3. Clorose variegada do citros 4. Fruta cítrica 5. Variabilidade genética 6. Xilema l. Título

CDD 589.9

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Este trabalho é fruto do apoio,
estímulo e colaboração de muitos.
Pois então o dedico a todos que
direta ou indiretamente me
ajudaram.

A todos minha eterna gratidão.

Á Profa. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner

Pelo exemplo humanístico e o profundo compromisso como educadora e pesquisadora. Além da amizade e apoio.

Meu muito obrigado.

À Dra. Cláudia Barros Monteiro-Vitorello

O meu imenso carinho e gratidão pela orientação, amizade e apoio incansável durante o decorrer deste trabalho, transmitindo seus conhecimentos e experiências.

Minha amizade e eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Luiz Coutinho

Pelo apoio, amizade e incentivo.

Meus agradecimentos.

AGRADECIMENTOs ESPECIAIS

Ao meu marido Marcio pelo apoio, carinho e amor durante todo esse tempo que estamos juntos.

Aos meus pais Valter e Sonia pelo exemplo e amor me ajudando em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Felipe pelo carinho e amizade.

Aos meus avós pelo amor e as orações.

Mais uma vez a Claudinha pela amizade e a ajuda essencial durante este mestrado, e também ao seu marido e filhos pela compreensão.

As minha amiga Helena pelas correções e ajuda nos momentos de necessidade.

Ao José Otávio pela ajuda e apoio com o sequenciamento.

Ao Paulo Lacava pela ajuda e pela doação dos isolados de *Xylella fastidiosa*.

AGRADECIMENTOS

Ácima de tudo à Deus, pela presença constante em minha vida.

Aos docentes do Departamento de Genética.

Á secretária Léia pela amizade e eficiência.

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial ao Valdir, Zézo e Bendam.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Animal, Jorge, Roberta, Nirlei, D. Tirsa, Sr. Antonio.

Aos funcionários da pós-graduação da ESALQ-USP.

Ao prof. Dr. Roque Dechem e a Fealq.

Aos amigos e companheiros de trabalho: Adilson, Clarissa, Cláudia, Déborah, Christina, Cristiane, Érica Baron, Érika Jorge, Elaine, Gisele, Helena, Jamilla, Mirela, Jane, José Otávio, Kátia, Lúcia, Miriam, Pilar, Rachel, Rodrigo.

A todos os amigos do laboratório de genética de microorganismos, em especial a Ágata, Fernando e Paulo Lacava.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> e a Clorose Variegada dos Citros	3
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Xylella fastidiosa</i>	5
2.3 Aspectos da patogenicidade e virulência	8
2.4 Variabilidade genética entre os isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	11
2.5 O genoma de <i>Xylella</i> e a presença de bacteriófagos	13
2.6 Bacteriófagos e a transferência horizontal de genes	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Isolados	22
3.2 Meios de Cultura	25
3.2.1 Condições para crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i>	25
3.3 Soluções e Tampões	27
3.3.1 Solução de Hemina Clorada	27
3.3.2 Solução de RNase	27
3.3.3 Tampão GET	27

3.4 Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	27
3.5 Extração do DNA genômico da bactéria	28
3.6 PCR de monitoramento de culturas	29
3.7 PCR de colônias	29
3.8 PCR a partir de DNA Genômico	31
3.9 Extração de DNA do gel de agarose utilizando kit Sephaglas	31
3.10 Reação de seqüenciamento	32
3.11 Purificação da Reação de seqüenciamento	33
3.12 Eletroforese em gel de agarose	33
3.13 Hibridização	34
3.14 Análise dos resultados	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Análise da presença de profagos em isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	35
4.2 Análise da seqüência de nucleotídeos das regiões amplificadas dos diferentes isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	46
4.2.1 Análise da seqüência de DNA do produto do PCR de 1,2 kb (banda2)	49
4.2.2 Análise da seqüência de Dna do fragmento de 1,4 kb (banda1)	59
5 DISCUSSÃO	68
5.1. Análise da presença de profagos em isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	68
5.2. Análise da seqüência de nucleotídeos das regiões amplificadas nos diferentes isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	70

6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Mapa do estado de São Paulo localizando as cidades de origem dos isolados de <i>Xylella fastidiosa</i> neste trabalho.....	26
2 Representação esquemática de um bacteriófago de DNA de dupla-fita (dsDNA), com cauda. (B) Organização dos profagos Xfp1 e Xfp2 presentes no genoma de <i>Xylella fastidiosa</i> ..	37
3 Representação esquemática dos profagos Xfp1 e Xfp2 e o tamanho dos fragmentos amplificados a partir de cada par de <i>primer</i> (A-B, C-D, E-F)	38
4 Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos <i>primers</i> A-B C-D, E-F. A reação de PCR foi realizada a partir de cultura de células de isolados de citros de Itápolis <i>fastidiosa</i>	38
5 Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos <i>primers</i> C-D. A reação de PCR foi realizada com DNA de vários isolados de citros, café e videira	41

- 6 Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *Primers* C-D. A reação de PCR foi realizada com DNA dos isolados: 9a5c, videira, café Rio Preto, café Marília 41
- 7 Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* C-D. A reação foi realizada com DNA dos isolados de Itápolis e Paraná(11067)42
- 8 Eletrofororese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* C-D. A reação foi realizada com DNA de Araraquara(Rep3) e Paraná(11399) 42
- 9 Eletrofororese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* A-B,C-D e E-F. A reação foi realizada a partir de células dos isolados de Matão e café Marília..... 43
- 10 Eletrofororese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos
primers A-B. A reação de PCR foi realizada com DNA dos isolados 9a5c(X0), videira, café Rio Preto e café Marília..... 44
- 11 Hibridização do DNA total dos diferentes isolados de *X. fastidiosa* com o produto de PCR dos *primers* A-B 44

12	Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos <i>primers</i> 272-1 e 272-2. A reação foi realizada com DNA dos isolados de 9a5c(X0) e videira	43
13	Representação esquemática da seqüência de ORFs encontradas nos produtos de amplificação com os <i>primers</i> C-D do isolado de <i>X. fastidiosa</i>	47
14	Porcentagem de identidade entre as seqüências dos produtos de amplificação dos <i>primers</i> C e D do isolado X0.....	48
15	Alinhamento a partir do seqüenciamento completo do DNA da banda 2 dos diferentes isolados	49
16	Dendograma obtido do alinhamento múltiplo entre as seqüências dos fragmentos de 1,2 kb obtidos com os <i>primers</i> C e D	53
17	Dendograma obtido do alinhamento entre as seqüências parciais dos fragmentos de 1,2 kb obtidos com os <i>primers</i> C e D	54
18	Alinhamento da seqüência consenso dos grupos A e B	57
19	Resultado do BLASTX no GenBank da seqüência da banda 2 do isolado de videira	58

20	Dendogram obtido do alinhamento múltiplo entre as seqüências parciais dos fragmentos de 1,2 kb com os <i>primers</i> C eD (C).....	60
21	Dendogram obtido do alinhamento múltiplo entre as seqüências parciais dos fragmentos de 1,2 kb com os <i>primers</i> C eD (D).....	60
22	Resultado do BLASTX no GenBank da seqüência consenso da banda 1 dos isolados do grupo B.....	58

LISTA DE TABELAS

- 1 Isolados de *Xylella fastidiosa*, origem e hospedeiro23

 - 2 Número de bandas obtidas nas reações de PCR com os *primers* nos diferentes isolados de *Xylella* 39

 - 3 Agrupamento dos isolados de acordo com o seqüenciamento dos fragmentos de DNA das banda 1 e2. 62
-

ANÁLISE DE REGIÕES DE PROFAGOS EM DIFERENTES

ISOLADOS DE *Xylella fastidiosa*

Autora: KALINCA PATRICIA MARENGO

Orientador(a): Profa. Dra. ALINE AP. PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

Xylella fastidiosa é o agente causal da doença clorose variegada dos citros (CVC), e afeta principalmente a variedade de laranja doce no Brasil. É encontrada no xilema de plantas infectadas obstruindo o fluxo normal de água e nutrientes para todas as partes da planta. Os principais sintomas da doença são o aparecimento de frutos pequenos com a casca enrijecida e clorose nas folhas. Além de infectar variedades de laranjas, a bactéria é encontrada associada a doenças em outras culturas economicamente importantes como videiras, pessegueiros, ameixeiras, amoreiras, cafezais e carvalhos. O seqüenciamento completo do genoma revelou a presença de uma grande quantidade de regiões associadas a bacteriófagos. Duas dessas regiões foram escolhidas para serem avaliadas em isolados de populações naturais infectando citros, uva e café através de PCR e seqüenciamento dos produtos amplificados. Os *primers* desenhados com base no genoma seqüenciado amplificam bandas de 1,0; 1,2; 1,4 e 1,7 kb. Os resultados mostraram que todos os isolados analisados apresentam seqüências semelhantes aquelas encontradas em bacteriófagos. Além disso, existe variação quanto ao número de produtos amplificados e seqüências de nucleotídeos dentro de isolados de citros de hospedeiros de diferentes regiões e entre os isolados de citros, café e videira. Dentro

dos isolados de citros de hospedeiros de diferentes regiões do estado de São Paulo e Paraná dois grupos foram formados (grupo A e B), que compreendem os isolados de 9a5c(X0), Cordeirópolis, Itápolis, Araraquara(Rep3), Matão(Rep11), Matão(Rep16), Paraná(11067), Paraná(11399), Paraná(11834), Novais e Curupá, Itapetininga, Olimpia, Araraquara(Rep1), Matão(Rep15), Colina(11038), Colina(11039). Na sequência amplificada de 1,2 kb aparecem 15 alterações de bases polimórficas, sendo que não ocorrem alterações na demarcação das ORFs nessa região e as proteínas traduzidas a partir dessa nova sequência apresentam cerca de 92% de identidade. A sequência amplificada de 1,4 kb entretanto, apresenta alterações significativas na composição de bases na região central do fragmento. Nessa região são encontradas sequências cujo BLASTX encontra similaridade com ORFs localizadas em outras regiões de profago do genoma do clone de *Xylella* sequenciado. Esses resultados indicam que existe variação significativa nas regiões associadas a bacteriófagos no genoma de isolados de diferentes hospedeiros de *Xylella* e que essas regiões devem estar associadas a rearranjos do genoma.

ANALYSIS OF PROPHAGE REGIONS IN DIFFERENT ISOLATES

OF *Xylella fastidiosa*

Author: KALINCA PATRICIA MARENGO
Adverser: Profa. Dra. ALINE AP. PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

Xylella fastidiosa is the causal agent of the disease named “variegated chlorosis of citrus”, which mainly affects sweet orange varieties of Brazil. It is found infecting the xylem of plants, obstructing water and nutrient fluxes throughout the plant. The major symptoms of the disease are small fruit size, hardened rind and leaf chlorosis. Besides infecting orange plants, the bacterium is found associated with diseases in other economically important crops, such as grapes, coffee, peaches, plum, oak. The full sequencing of the genome of *X. fastidiosa* disclosed the presence of many regions associated with bacteriophages. Two of these regions were chosen to be evaluated in isolates of natural populations infecting citrus, grape and coffee through PCR and sequencing of the amplified products. Use of primers designed from the genome sequence results in amplified bands of 1.0; 1.2; 1.4 and 1.7 kb. The results show that all the analyzed isolates present sequences similar to those found in bacteriophages. However, there is variation as to the number of amplified products and nucleotide sequences among the citrus isolates obtained from different regions and among the isolates from citrus, coffee and grapes. The citrus isolates from hosts from different regions of the state of São Paulo were distributed into two groups (group A e B): 9a5c(X0), Cordeirópolis, Itápolis, Araraquara(Rep3), Matão(Rep11),

Cordeirópolis, Itápolis, Araraquara(Rep3), Matão(Rep11), Matão(Rep16), Paraná(11067), Paraná(11399), Paraná(11834), Novais and Curupá, Itapetininga, Olimpia, Araraquara(Rep1), Matão(Rep15), Colina(11038), Colina(11039). In the 1.2 Kb amplified sequence there are 15 polymorphic bases, but these differences do not change the boundaries of the ORFs in this region and the translated proteins from these new regions present an identity of 92%. However, the 1.4 kb amplified sequence presents significant alterations in the composition of bases in the central region of the fragment. In this region, sequences were found with a similarity (BLASTX) to ORFs located in other regions of the sequenced genome of *Xylella*. These results indicate that there are significant variations in regions associated with bacteriophages in the genome of isolates from different hosts of *Xylella* and that these regions may be associated with rearrangements of the genome.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria Gram-negativa *Xylella fastidiosa* é o agente causal da doença clorose variegada dos citros (CVC), e afeta principalmente a variedade de laranja doce no Brasil (Donadio & Moreira, 1998). É encontrada no xilema de plantas infectadas obstruindo o fluxo normal de água e nutrientes para todas as partes da planta. Os principais sintomas da doença são o aparecimento de frutos pequenos com a casca enrijecida e clorose nas folhas (Pooler & Hartung, 1995). Além de infectar variedades de laranjas, a bactéria é encontrada associada a doenças em outras culturas economicamente importantes como videira, café, pessegos, ameixeiras, carvalhos (Purcell, 1997).

Devido a sua importância econômica como patógeno na citricultura brasileira (Simpson & Perez, 1999), esta bactéria teve o seu genoma completamente seqüenciado recentemente (Simpson *et al.*, 2000). Como resultado do seqüenciamento ficou evidente a presença de uma grande quantidade de regiões similares àquelas encontradas em fagos de DNA de dupla fita, principalmente os pertencentes ao grupo do fagos Lambda (Simpson *et al.*, 2000). Um corpo crescente de informações vem se acumulando sobre a transferência lateral de genes e a composição de genomas bacterianos e o envolvimento de bacteriófagos e outros

elementos genéticos móveis (Cruz & Davies, 2000; Ochman et al., 2000). É importante lembrar que a aquisição de novas características por genomas bacterianos só acontece através de mutações ou da transferência lateral de genes (Nelson et al., 1999). Em casos onde genomas de diferentes isolados de uma mesma espécie são estudados, variações que vão desde poucos kbp até 200 kpb de inserções ou deleções múltiplas são encontradas devido a elementos do tipo transposons, transposons conjugativos, profagos, profagos defectivos, ilhas de patogenicidade e plasmídeos (Levin, 1993; Levin & Bergstrom, 2000).

Xylella fastidiosa aparece como um modelo adequado para o estudo comparativo de genomas com enfoque para alterações associadas a presença de bacteriófagos. Primeiro porque essa bactéria apresenta uma grande quantidade de seqüências de fagos inseridas no genoma (Simpson *et al.*, 2000) e segundo, o fato dela infectar várias espécies, sendo que existe uma baixa variabilidade genética dentro e entre isolados de diferentes espécies hospedeiras (Chen et al., 1992; Pooler & Hartung, 1995). O objetivo desta pesquisa foi avaliar a presença de regiões de bacteriófagos no genoma de populações naturais isoladas de citros, de diferentes regiões do estado de São Paulo, de videria e de café por meio de PCR. Tendo também como objetivo verificar o quanto são semelhantes essas regiões através do seqüenciamento dos produtos amplificados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A bactéria *Xylella fastidiosa* e a Clorose Variegada dos Citros.

Xylella fastidiosa é uma bactéria restrita aos vasos do xilema e é causadora da doença conhecida como Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou amarelinho. A doença foi identificada oficialmente no Brasil em 1987, em pomares do Triângulo Mineiro e também do Norte e Noroeste do Estado de São Paulo. Embora estas regiões sejam as mais afetadas, a CVC já está presente em quase todas as áreas citrículas do país. Só em 1993 foi confirmado que realmente a bactéria *Xylella fastidiosa* era a causadora da CVC (Fundecitrus, 2000). Quando ocorre em grande quantidade é responsável por obstruir os vasos do xilema causando doenças também em outras culturas como por exemplo, pessegueiros, videiras, ameixeiras, amoreiras, ambrósia, cafezais e carvalhos (Purcell, 1997).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de citros e seus derivados, sendo responsável por cerca de 30% da produção mundial de suco concentrado de laranja, onde o estado de São Paulo contribui com 70% desta produção. Em São Paulo a doença mostra-se endêmica ocorrendo com severidade e de forma não uniforme em todas as regiões do estado. As regiões centrais e sul do estado são as mais afetadas (Salva *et al.*, 1996). Apesar da CVC estar principalmente localizada nos estados de São

Paulo e Minas Gerais, essa doença tem potencial para atacar citros crescendo em regiões de todo o mundo (Donadio & Moreira, 1997, Pooler & Hartung, 1995). Os principais sintomas da doença são clorose mosqueada, redução no tamanho das folhas e frutos, amadurecimento precoce, casca dura, acidez dos frutos acarretando grande prejuízo para as fábricas de sucos (Pooler & Hartung, 1995).

Sabe-se hoje que a transmissão da doença entre as plantas e pomares está associada a presença de cigarrinhas, inseto-vetor responsável por carregar as bactérias de plantas infectadas para as saudáveis após a sua alimentação. As cigarrinhas são insetos sugadores que se alimentam em um grande número de espécies de plantas. Só na cultura de citros existem cerca de 70 espécies que podem ser observadas nas plantas e pomares. Três espécies de cigarrinhas (*Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis*) são comprovadamente capazes de transmitir a bactéria, e portanto, são responsáveis pela disseminação da CVC em todas as regiões citrículas do país. Ao adquirir a bactéria, as cigarrinhas adultas passam a transmiti-la pelo resto de suas vidas. Ela é introduzida toda vez que as cigarrinhas infectadas se alimentam. Embora só três espécies sejam comprovadamente transmissoras, existem uma série de outras cigarrinhas que potencialmente também podem transmitir a bactéria, já que se alimentam nos vasos do xilema de plantas. As cigarrinhas se alimentam nas brotações mais jovens, o que ocorre com maior frequência em épocas de chuva. Em anos chuvosos, elas aparecem na primavera e, em anos secos, começam a surgir mais tarde, no verão. Entre as medidas mais importantes de convivência com a doença e mais utilizada pelos agricultores está o controle da população de cigarrinhas nos pomares (Fundecitrus, 2000).

Os métodos de detecção precoce da bactéria com o objetivo de dificultar a disseminação da CVC para regiões ou países não infectados tem avançado significativamente. Neste sentido, técnicas que utilizam ensaios sorológicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR-“Polimerase Chain Reaction”) encontram-se bastante desenvolvidas. Inicialmente, a detecção da presença de *Xylella* era feita através da microscopia eletrônica nos tecidos das plantas afetadas (Chagas *et al.*, 1992; Rossetti *et al.*, 1990). Em seguida, foram utilizados os ensaios sorológicos como as reações imunoenzimáticas do tipo ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”), DIBA (“Dot Immuno-binding Assay”) e “Western blot” (Donadio & Moreira, 1998). Atualmente, a PCR aparece como sendo uma técnica de alta sensibilidade na detecção de vários patógenos hospedeiros de plantas, sendo bastante utilizado na detecção de *Xylella* (Minsavage *et al.*, 1994).

A PCR está sendo utilizada na detecção de *Xylella fastidiosa* e também especificamente na detecção de *Xylella fastidiosa* causadora da clorose através de pares de primers específicos. Esses *primers* foram desenvolvidos a partir de produtos de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNAs”) que foram clonados e seqüenciados. A amplificação do DNA pode ser feita diretamente das células da bactéria ou do DNA (Minsavage *et al.*, 1994).

2.2 Cultivo *in vitro* de *Xylella fastidiosa*.

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa com células imóveis, aflageladas, dimensões celulares variando entre 0,25 e 0,35 µm, estritamente aeróbica.

Em cultura apresenta crescimento à temperaturas entre 26 e 28 °C e pH 6,5 a 6,9, é catalase positiva e oxidase negativa, não fermentam glicose, sendo negativa para indol, H₂S, lipase, amilase, fosfatase e β-galactose, hidrolisam gelatina. A análise do DNA revela conteúdos de citosina e guanina (C+G) entre 51,0 e 52,4 % (Wells *et al.*, 1987). Com o seqüenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa* ficou comprovado que o conteúdo de C+G é 52,7 % apresentando o genoma 2,679,305 pares de base (pb) (Simpson *et al.*, 2000).

Quando em cultura, as células dessa bactéria, mostram-se altamente exigentes quanto a requisitos nutricionais durante o seu isolamento a partir do tecido vegetal e sua manutenção. Portanto, não crescem em meios comumente utilizados em bacteriologia. Os meios de cultura devem ser ricos contendo glutamina, asparagina e ácidos orgânicos (Hopkins, 1989). As colônias levam cerca de 10 dias para crescer 0,6 mm e 30 dias para atingir 1,5 mm em meio de cultura sólido, e quando crescidas em meio líquido mostram-se geralmente dispersas, com exceção de alguns isolados que formam agregados, podendo atingir concentrações de $2,0 \times 10^7$ a $6,0 \times 10^8$ células/ml em até 14 dias de incubação.

O primeiro relato do cultivo de *Xylella fastidiosa* em um meio de cultura chamado JD foi em 1978 (Davis *et al.*, 1978), desde então outros meios tem sido desenvolvidos tais como PD2 (Davis *et al.*, 1980), PW (Davis *et al.*, 1981 a), PWH (Lee *et al.*, 1993), SPW (Hartung *et al.*, 1994) e PWG (Hill & Purcell, 1995 a). Pequenas modificações na composição e quantidade de reagentes foram realizadas em relação ao meio original. Alguns dos reagentes presentes nos meios de crescimento utilizados para

o crescimento de células de *Xylella*, tais como albumina de soro bovino, carvão ativado e amido de batata, favorecem o crescimento da bactéria mas não são essenciais (Davis *et al.*, 1978). Esses reagentes agem na desintoxicação do meio, seqüestrando compostos inibidores provenientes do meio ou de tecidos de hospedeiros durante os isolamentos primários (Wells *et al.*, 1981). Fontes de ferro, tais como pirofosfato férrico e cloreto de hemim, também presentes nos meios, estimulam seu crescimento (Chang & Donaldson, 1993).

O meio CS20 também foi desenvolvido e utilizado para o isolamento da bactéria das folhas de carvalho. Esse meio difere dos demais na composição e na preparação tendo como variação entre seus componentes a *soytone*, *dextrose*, L-histidina HCl. Enquanto que no PW, a glutamina e o albumina de soro bovino, e no BCYE, a L-cisteína e o pirofosfato férrico, são esterilizados por filtração (filtro de 0,2 µm) e depois acrescentados ao meio autoclavado, este meio tem como vantagem sobre os demais o fato de ser totalmente autoclavável (Chang & Walker, 1988). O meio de cultura específico para o isolamento primário de estirpes causadoras de CVC à partir de tecidos de citros utilizado por Leite Jr. & Leite (1991) foi o BCYE, que continha em sua composição extrato de levedura, carvão ativado, L-cisteína HCl, pirofosfato férrico, tampão ACES, o pirofosfato férrico e L-cisteína, todos esses componentes são dissolvidos, filtrados e acrescentados ao meio já autoclavado. No fechamento do postulado de Koch utilizou-se PW e PWH, um meio que difere do anterior pois contém *phytona peptone*, *trypticase*, cloreto de hemin, vermelho de fenol, L- glutamina, soro de albumina bovino (Chang *et*

al., 1993), observando-se um período de incubação para o surgimento de colônias entre 9 a 20 dias (Hartung *et al.*, 1994).

O meio químico definido, XF-26, foi utilizado para o cultivo *in vitro* de duas linhagens de *X. fastidiosa* originalmente isoladas de videira com sintomas da doença e uma linhagem isolada de amendoeira com sintomas de queimadura das folhas. O crescimento em XF-26 foi comparado com o meio CS20, o resultado mostrou que o meio XF-26 foi mais eficiente no crescimento primário de células de *Xylella* isoladas de tecidos de videira (Chang & Donaldson, 1993).

Em geral, os métodos atuais para isolamento e cultura de *X. fastidiosa* são de baixa eficiência, apresentando elevados índices de contaminação devido ao prolongado tempo de crescimento da cultura.

2.3 Aspectos da patogenicidade e virulência

As bactérias limitadas ao xilema *Xylella fastidiosa* e *Pseudomonas syringii*, são transmitidas por insetos introduzindo-as diretamente no xilema durante a sucção da seiva (Purcell & Hopkins, 1996). Portanto, estas bactérias podem ser encontradas em dois ambientes, no xilema de hospedeiros vegetais e no lúmen do canal alimentar anterior (estomodeu e estiletos) dos insetos vetores. Nestes locais prevalece a baixa concentração de nutrientes disponíveis e alta turbulência e pressão (Raven, 1984). Deste modo, acredita-se que a adesão do organismo ao substrato, planta ou inseto, seja vital para sua permanência e colonização (Davis *et al.*, 1981 e Hopkins, 1989).

Observações microscópicas de plantas com sintomas de CVC mostraram a presença de bactérias colonizando os vasos do xilema (Chagas *et al.*, 1992). As células

foram observadas forrando a parede dos vasos ou no lúmen, sempre envolvida por uma matriz também chamada de glicocálix constituída de exopolissacarídeos. A associação de *X. fastidiosa* com glicocálix é constante em todos os hospedeiros analisados (Purcell & Hopkins, 1996). Hopkins em 1996, sugeriu que essa matriz poderia funcionar como proteção contra as condições do xilema, além de facilitar a nutrição das colônias, a adesão bacteriana, assim proporcionando condições para sua colonização.

O mecanismo de patogenicidade da *Xylella fastidiosa* pode então, estar associado com o estresse de água para na planta devido a oclusão do xilema com agregados de bactérias. Essa oclusão impediria a distribuição normal da seiva do xilema a todas as partes da planta. Os agregados de células produzem fitas de polissacarídeos que fazem com que estas permaneçam ligadas entre si e a parede dos vasos internos e com isto dando início ao fechamento do xilema e conseqüente estresse de água (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). No caso de bactérias fitopatogênicas Gram-negativas, a formação de glicocálix pode ser importante no estabelecimento da infecção no tecido hospedeiro. O glicocálix ocorre naturalmente na formação de microcolônias, tanto em interações patogênicas como nas interações não patogênicas. Esta estrutura concentra os nutrientes, especialmente em ambientes aquáticos (Costerton *et al.*, 1981).

Um segundo aspecto que parece ser importante na patogenicidade desta bactéria é a movimentação através dos vasos do xilema na colonização dos diferentes tecidos da planta (Hopkins, 1985; Hopkins, 1989; Fry & Milholland, 1990; Hill & Purcell, 1995; Purcell & Hopkins, 1996). Esta movimentação deve ser dependente de enzimas que degradam a parede celular como pectinases e celulases. Em experimentos realizados com células de *Xylella*, não foram detectadas a atividade dessas enzimas durante o seu

crescimento em meio de cultura (Wells *et al.*, 1989). Existe a possibilidade dessas enzimas serem produzidas somente *in vivo* ou em extratos de plantas, como acontece em outras bactérias (Kelume & Collmer, 1993).

A partir da seqüência completa do genoma da *Xylella*, novas hipóteses puderam ser apresentadas sobre a patogenicidade e virulência desta bactéria (Simpson *et al.*, 2000). Entre elas, a presença de toxinas do tipo hemaglutininas e adesinas que podem estar envolvidas na adesão das células juntamente com a secreção da matriz de polissacarídeo similar a goma xantana (Simpson *et al.*, 2000). Ficou evidente ainda a proximidade entre *Xylella* e *Xanthomonas* spp., em particular com *X. campestris* pv. *campestris* (Dow & Daniels, 2000). Entre os genes mais próximos e associados a virulência e patogenicidade estão o sistema de secreção do tipo II, responsável pela secreção de enzimas extracelulares envolvidas na degradação da parede celular (endoglucanases, poligalacturonase, proteases). Esse sistema compreende 11 genes, *xpsEFGHIJKLMND*, presentes na mesma organização e com alta porcentagem de similaridade. A matriz de polissacarídeos extracelular é outro exemplo de proximidade entre as duas espécies. A *Xylella fastidiosa* apresenta o operon *gumBCDEFHJKM* com algumas modificações em relação ao operon responsável pela síntese da goma xantana.

A produção de enzimas e polissacarídeos extracelulares é regulada em *Xanthomonas* por um grupo de genes chamados *rpf* (“regulation of pathogenicity factors”) e compreende nove genes, *rpfA-I*. Em *Xylella* foram encontradas ORFs com alto grau de similaridade (e-99) às ORFs *rpfA* e *rpfB*. A principal diferença entre *Xylella* e *Xanthomonas*, e também de outros patógenos de plantas e animais, é a ausência do sistema de secreção do tipo III, codificados pelos genes *hrp* (Gallan & Collmer, 1999). Esse sistema é

responsável pela secreção de elicitores da resposta de defesa em plantas não-hospedeiras.

Estudos comparativos através do seqüenciamento da subunidade 16S rRNA de isolados PWT-100 e PLM-G83 de *Xylella* já haviam apontado que essa bactéria está mais próxima a espécies de *Xanthomonas* do que de *Escherichia*, *Pseudomonas* ou *Nitrobacter* (Wells *et al.*, 1987).

2.4 Variabilidade genética entre isolados de *Xylella fastidiosa*

A técnica RAPD-PCR tem sido utilizada para estabelecer relações filogenéticas entre diferentes isolados dispensando o conhecimento prévio da genética do organismo em estudo. A análise é feita comparando-se a presença ou ausência de bandas após uma reação de amplificação com *primers* aleatórios (Pooler & Hartung, 1995). Após a amplificação, pode-se ainda fazer a digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição para avaliar a diferenciação de tipos de bactérias fitopatogênicas (Minsavage *et al.*, 1994). Baixa diversidade genética dentro de isolados de uma mesma espécie hospedeira é encontrada em estudos utilizando RFLP e RAPD (Chen *et al.*, 1992; Rosato *et al.*, 1998). Quando isolados de diferentes espécies hospedeiras foram utilizados grupos puderam ser formados. De maneira geral, os isolados de citros formam um grupo, assim como os isolados de café, amendoeira e amoreira (Pooler & Hartung, 1995; Lacava, 2000). Já isolados de videira e ambrósia formam um grupo assim como os de ameixeira e elmo (Chen *et al.*, 1992; Minsavage *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Pooler & Hartung, 1995).

O isolados de *Xylella* apresentam diferenças quanto a presença de elementos extracromossômicos como os plasmídios. Os plasmídios são moléculas de DNA circular superespiralizados presentes na maioria das espécies de bactérias, mas não em todas as linhagens de uma mesma espécie. Algumas linhagens de *Xylella fastidiosa* apresentam plasmídios pequenos, entre elas as linhagens PD82-21, mul1 e PWT-22 (Chen *et al.*, 1991). Em estudos realizados com mais de 10 linhagens de *Xylella fastidiosa* isoladas de diferentes plantas hospedeiras, somente as citadas apresentaram plasmídios detectáveis. Chen *et al.* (1992) isolaram e caracterizaram o plasmídio pXFPW1 de 1,3 kb isolado da linhagem PWT-22. O plasmídio pXF868 de 1296 nucleotídeos foi clonado e seqüenciado da linhagem ATCC35868 mostrando a presença de 3 ORFs cujas seqüências apresentam homologias com outros plasmídios crípticos de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetobacter pasteurianus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Pooler *et al.*, 1997).

O seqüenciamento do genoma do clone 9a5c de *X. fastidiosa* revelou a presença de dois plasmídios em suas células, sendo de 51.158 pb e 1.285 pb em tamanho, que receberam os nomes de pXF51 e pXF1.3, respectivamente (Simpson *et al.*, 2000). O plasmídio pXF1.3 apresenta somente duas ORFs sendo que uma codifica a proteína associada a sua replicação. O plasmídio pXF51 contém 64 ORFs das quais cinco codificam proteínas envolvidas na replicação ou estabilidade do plasmídio, vinte ORFs que codificam proteínas potencialmente envolvidas na transferência por conjugação e uma ORF que codifica a proteína similar a proteína D (VapD) associada a virulência em *Dichelobacter nodosus* (Bloomfield *et al.*, 1997). Além disso quatro regiões do plasmídio pXF51 apresentam similaridade significativa com parte do DNA de

transposons vindo de outras bactérias, sugerindo interespecificidade de transferência horizontal de material genético (Simpson *et al.*, 2000).

A partir da seqüência completa do genoma da *Xylella*, a pesquisadora Patrícia Monteiro da Fundecitrus, desenvolveu um sistema de transformação inédito para essa bactéria (FAPESP-Pesquisa, n.56). A pesquisadora optou por construir um vetor cuja origem de replicação foi clonada do genoma da bactéria e acrescido de um gene para resistência a canamicina, vetor esse denominado p16KOC. Três partes constituem o vetor: a origem de replicação, um DNA promotor do gene 16S do rRNA, ambos clonados a partir do genoma da *Xylella*, e o gene que confere resistência a canamicina. Foram adicionados a estrutura do plasmídio de *E. coli* pBS, normalmente utilizado em experimentos de clonagem. A técnica utilizada para introduzir o DNA nas células de *Xylella* foi eletroporação.

2.5 O genoma de *Xylella* e a presença de bacteriófagos

A utilização de métodos para o seqüenciamento de DNA automatizado vem revolucionando as diversas áreas das ciências biológicas com o crescente estudo de genes e genomas. Esta nova tecnologia vem contribuindo para a associação entre genes e doenças, com diagnósticos baseados no DNA, e no seqüenciamento dos genomas humano e de outros organismos modelos (Fraser e Fleishmann, 1997; Gibbs, 1997; Oliver, 1996; Fraser *et al.*, 2000). Desde a seqüência completa de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), a seqüência completa de 27 genomas de bactérias, e 3 cromossomos de eucariotos inferiores foram publicadas e pelo menos 60 outros genomas de microrganismos estão sendo seqüenciados (Sterky & Lundeberg, 2000;

Fraser *et al.*, 2000). A linhagem de *X. fastidiosa* 9a5c, primeiro genoma de fitopatógeno seqüenciado, é derivada de uma cultura patogênica 8.1b obtido em 1992 de Bordeaux, França (Simpson *et al.*, 2000).

O seqüenciamento desta bactéria apresentou a seguinte estratégia: em uma primeira fase, foi construído o mapa físico do genoma baseado em sítios de restrição definidos com o uso de enzimas com alta e rara especificidade. Os fragmentos obtidos do DNA da bactéria foram selecionados, com base na superposição parcial de seqüências de modo a perfazer todo o genoma, para a construção de bibliotecas com insertos de aproximadamente 40 kb (Frohme *et al.*, 2000). A segunda fase, envolveu a construção de bibliotecas de plasmídios, na estratégia conhecida como “*shotgun*” (Fleischmann *et al.*, 1995).

O seqüenciamento de genomas propicia o aparecimento de muitos genes onde as funções bioquímica e fisiológica não são conhecidas. A estratégia mais eficiente na descoberta do papel de determinado gene é a análise da seqüência da seu ORF (“*open reading frame*”) pela porcentagem de similaridade com outras seqüências já presentes em bancos de dados. Esse recurso pode trazer as seguintes informações sobre uma dada sequencia: (1) a função bioquímica e fisiológica; (2) a função bioquímica, mas não o papel fisiológico; (3) sem função definida em outro organismo ou (4) não encontrar homologia significativa com seqüências já depositadas em bancos de dados (Oliver, 1996; Wray & Abouheif, 1998; Pellegrini *et al.*, 1999). No genoma de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, por exemplo, 46% dos ORFs identificados apresentaram seqüências de proteínas com função definida, 28% de seqüências homólogas a proteínas com função desconhecida e 27% de seqüências inéditas (Smith *et*

al., 1997). Em *Xylella*, 38% das ORFs são de seqüências inéditas (Simpson *et al.*, 2000). Essa estimativa varia entre os organismos, mas acredita-se que menos da metade dos genes em potencial devem codificar proteínas com função desconhecida e cerca de um quarto das seqüências encontradas em um dado genoma não apresentam similaridade com qualquer outra presente nos bancos de dados (Frazer *et al.*, 2000).

Além dos genes associados a virulência que foram revelados pelo projeto genoma, foi marcante a presença de regiões de profagos e o alto número de ORFs semelhantes a seqüências de fagos, dispersos no genoma desta bactéria (Simpson *et al.*, 2000). Um total de 7% do genoma corresponde a seqüências semelhantes às de fagos de DNA de dupla fita, principalmente de fagos do grupo Lambda. Foram identificadas 4 regiões de profagos, denominadas Xfp1-4. Xfp1 e Xfp2 apresentam entre 88-99% de identidade, pertencem ao grupo de fagos de dsDNA com cauda e parecem apresentar a maioria das ORFs associadas com a formação de partículas virais. Entre os genes da cauda V e W, Xfp1, apresenta duas ORFs semelhantes com seqüências associadas a virulência de *Dichelobacter nodosus* (região VAP, “virulence associated protein”) (Bloomfield *et al.*, 1997). Entre as ORFs V e W no profago Xfp2, encontram-se ORFs semelhantes a de transposons de *Ralstonia eutropha* (Simpson *et al.*, 2000). Os outros dois profagos, Xfp3 e Xfp4 também são semelhantes entre si, apresentando a maior repetição exata do genoma, cerca de quatorze mil pares de bases. Neste caso, foram encontradas poucas ORFs associadas a formação de partícula viral. Devido a alta concentração de ORFs de fagos, é sugerido que a transferência lateral de genes pode ter sido importante na evolução do genoma desta bactéria.

2.6. Bacteriófagos e a transferência horizontal de genes

Os vírus das bactérias, também chamados de bacteriófagos, são amplamente distribuídos na natureza, existindo fagos para a maioria, senão a totalidade, das bactérias e para alguns outros protistas. Os bacteriófagos não diferem significativamente de outros vírus, exceto no que se diz respeito à escolha de seus hospedeiros. Apesar da maioria dos fagos apresentarem genes que codificam várias proteínas, eles somente se duplicam dentro da célula bacteriana. Todos os fagos conhecidos utilizam todo o sistema de síntese de proteínas e metabolismo energético da célula hospedeira. Estruturalmente, os bacteriófagos assemelham-se aos demais vírus, sendo constituídos por ácido nucléico circundado por uma capa protéica. Morfologicamente porém, muitos bacteriófagos apresentam uma cauda, através do qual injetam o ácido nucléico na célula hospedeira. Duas outras formas de fagos são conhecidas: o fago icosaédrico sem cauda, cujo exemplo mais conhecido é o ϕ X174 (Aoyoma & Hayashi, 1985) e o fago filamentosos, ao qual pertence o fago M13 (Speckthrie *et al.*, 1992).

Existem cerca de 180 bacteriófagos isolados e caracterizados dentro dos fagos caudados cujo material genético é o DNA de dupla fita (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esses são os mais encontrados entre as bactérias, mas existem exemplos de fagos com DNA de fita simples infectando espécies do gênero *Spiroplasma* (Marais *et al.*, 1996). Os fagos caudados estão divididos em três grupos: (1) Myoviridae, fagos com cauda contrátil; (2) Podoviridae, fagos com caudas curtas; (3) Siphoviridae, fagos com caudas longas e não-contráteis. Deste último fazem parte os fagos do grupo Lambda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dentre os 180 fagos caudados de dsDNA caracterizados,

74 apresentam o seu genoma totalmente seqüenciado. De maneira geral, o tamanho do genoma é menor que 40 kb. Entretanto, existem alguns casos de genomas maiores. Um exemplo destes casos é o genoma do fago T4 que apresentam aproximadamente 170 kb (Leiman *et al.*, 2000).

Os bacteriófagos apresentam-se como um modelo conveniente para o estudo de fenômenos biológicos, como a estrutura de partículas virais, a replicação, o metabolismo, a genética, a infecciosidade e a transferência lateral de genes. O ciclo de vida dos bacteriófagos pode ser dividido em duas categorias: os ciclos líticos e lisogênicos. Um fago em ciclo lítico infecta as células bacterianas, produz novas partículas virais e acaba por lisar as células para liberar essas novas partículas. No ciclo lisogênico, o qual é observado somente em fagos com dsDNA, não ocorre a formação de novas partículas virais. Ao invés disto, o DNA do fago torna-se parte do genoma bacteriano. Neste caso o fago é chamado de fago temperado e a sua condição o torna um profago. O fago temperado pode se tornar lítico em certas condições, podendo carregar fragmentos do DNA bacteriano (Kunst *et al.*, 1997).

Os fagos temperados muitas vezes carregam genes que alteram a bactéria hospedeira após a lisogenia. Este processo, denominado conversão lisogênica, tem um papel muito importante na evolução de patógenos (Ochman *et al.*, 2000). Com o seqüenciamento de genomas, está cada vez mais evidente a presença da transferência horizontal de genes mediada não somente por bacteriófagos, mas também por plasmídios e transposons (Cruz & Daniels, 2000). Ao contrário dos eucariotos, a modificação da informação genética existente na bactéria ocorre através da aquisição de seqüências vindas de organismos distantes, através da transferência de genes,

produzindo genomas dinâmicos e com grande quantidade de DNA introduzido ou deletado do cromossomo principal (Ochman *et al.*, 2000).

São conhecidos vários exemplos da presença de bacteriófagos e a aquisição de novas características. Entre os mais importantes estão os genes estruturais que codificam exotoxinas tais como a: a toxina da difteria, as toxinas tipo C1 e D do botulismo, a toxina eritrogênica de *Streptococcus*, a enterotoxina A de *Staphilococcus*, as toxinas Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2), a citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, e a toxina da cólera (Metzler *et al.*, 1997; Casjens, 1998; Lawrence & Ochman, 1998; Nakayama *et al.*, 1999; Miao & Miller, 1999). Em todos estes casos, a estrutura completa do bacteriófago é conhecida, inclusive com o isolamento da partícula viral. Existem outros casos, entretanto, onde a estrutura do fago não está bem definida e muitas vezes somente fragmentos da seqüência completa do fago podem ser detectados inseridos no genoma (Bloomfield *et al.*, 1997; Dow & Daniels, 2000; Gallan & Collmer, 1999; Simpson *et al.*, 2000). Para que isso ocorra, uma ou mais regiões de DNA são adquiridos por transdução, incorporados no cromossomo da bactéria, e posteriormente inativados por deleção ou inserção, daí então, os genes incorporados são fixados (Cruz & Davies, 2000).

Estudos indicam que a maioria dos genes de patogenicidade estão localizados no cromossomo principal, onde eles aparecem agrupados em regiões chamadas de ilhas de patogenicidade. Evidências sugerem que essas ilhas são ou foram elementos móveis. Na maioria dos casos existe o envolvimento de bacteriófagos defectivos, mas também existem casos da presença de restos de plasmídios conjugativos ou componentes de transposons integrados ao genoma hospedeiro. Entre as principais características que podem definir uma ilha de patogenicidade estão: a presença de genes de virulência

agrupados; presença somente em linhagens patogênicas; conteúdo G+C e “*codon usage*” diferentes quando comparados aos do genoma hospedeiro; presença de repetições invertidas nas regiões flanqueadoras; e a proximidade com tRNA e integrases. Alguns exemplos conhecidos bem são as ilhas de patogenicidade hrp de *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas compestris* e *Ralstonia solanacearum* (Alfano *et al.*, 2000; Alfano & Collmer, 1997).

A *Dichelobacter nodosus* é a bactéria causadora da doença conhecida como podridão do pé em ovinos. A maioria dos isolados virulentos apresentam uma região chamada Vap (“virulence associated proteins), que compreende 5 genes *vap* (A, B,C,D,E) e uma integrase (Cheetham & Katz, 1995; Bloomfield *et al.*, 1997). O gene da integrase está adjacente a um gene de tRNA e é similar a integrases de fagos do Grupo Lambda. O genoma de *Bacelo subtiliza* apresenta duas cópias de fago de cerca de 33 kb (Kunst *et al.*, 1997). Esse fago apresenta uma característica interessante pois a partícula viral formada é capaz de empacotar somente 13 kb de DNA, apesar dos 33 kb do seu genoma original. Esse fragmento de 13 kb que é encontrado na partícula viral pertence na maioria ao genoma de *B. subtilis*.

Enquanto esses exemplos referem-se a bactérias patogênicas, também existem casos onde diferenças no genoma podem estar envolvidas na especificidade ao hospedeiro em relações simbiotes. Este é o caso dos genes *nodABC* de *Rhizobium* (Preston *et al.*, 1998) e da presença de um segmento de DNA de 500 kb em *Mesorhizobium loti* onde estão localizados os genes para nodulação e fixação de nitrogênio (Sullivan & Ronson, 1998). Esse segmento de DNA está flanqueado por integrases semelhantes as codificadas por fagos da família P4.

Com o seqüenciamento de genomas inteiros de bactérias, seqüências homólogas a genes de fagos e fagos crípticos (fagos que perderam a capacidade de excisão) estão sendo encontradas onde não haviam evidências da infecção por vírus (Casjens, 1998). O seqüenciamento do genoma de *H. influenzae* permitiu a descoberta do profago críptico ϕ flu de 37 kb (Hendrix *et al.*, 1999). Da mesma forma, o seqüenciamento do genoma de *E. coli* revelou a existência de pelo menos oito profagos críptico (Blattner *et al.*, 1997). O genoma de *B. subtilis*, além do fago PBSX já conhecido, revelou sete outras regiões que podem fazer parte de eventos de integração (Kunst *et al.*, 1997). O genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv apresentou dois novos profagos, ϕ RV1 e ϕ RV2, de aproximadamente 8 kb. Esses fagos apresentam grandes regiões idênticas intercaladas por seqüências com baixa ou nenhuma homologia (Casjens, 1998).

Mais recentemente, no genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, foram encontradas cerca de 7% de seqüências associadas a fagos (Simpson *et al.*, 2000). Identificou-se 4 regiões de profagos além de outras seqüências de fagos dispersas pelo genoma da *Xylella*. Dois dos profagos são semelhantes entre si e apresentam a maioria dos genes responsáveis pela formação da cápsula viral. A organização geral e distribuição dos genes é bastante semelhante a do fago CTX de *Pseudomonas aeruginosa* (Nakayama *et al.*, 1999). Além do mais, foi detectada a presença de genes associados a virulência de outras bactérias patogênicas como *Dichelobacter nodosus*. Nessa bactéria existe claramente o envolvimento de bacteriófagos nas regiões associadas a virulência (Cheetham & Katz, 1995). Os outros dois profagos presentes no genoma da *Xylella* são similares ao profago ϕ flu de *Haemophilus influenzae* (Mutagandura *et al.*, 1998),

incluindo a presença de um dos componentes do agrupamento de genes responsável pela formação do pilus em linhagens patogênicas.

Outros genomas, como de *Helicobacter*, *Synechocystis*, *Mycoplasma* e *Borrelia*, não apresentaram profagos que puderam ser detectados (Alm *et al.*, 1999; Kaneko *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1995; Himmelreich *et al.*, 1996). Todos, no entanto, apresentaram a presença de transposons. O motivo exato pela presença de tantas seqüências de fagos em alguns genomas e a ausência em outros precisa ser melhor estudada. A razão mais simples se refere a alta diversidade encontrada no mundo dos fagos, impedindo o pronto reconhecimento de tais seqüências quando analisadas através de regiões homólogas a outras já estudadas (Casjens, 1998). A adsorção dos fagos acontece através de receptores e transportadores específicos. Além do mais, existe o sistema de restrição e modificação do hospedeiro que impede a sua manutenção no interior do hospedeiro mesmo que o DNA do fago tenha sucedido na infecção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados

Os isolados utilizados neste trabalho (Tabela 1) foram doados pelo grupo do Dr. João Lúcio de Azevedo do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ USP.

Tabela 1. Isolados de *Xylella fastidiosa*, origem e hospedeiro.

Número	Isolados	Hospedeiro	Origem
1	X0*	<i>Citrus sinensis</i>	Macaubal/ Genoma
2	X*	<i>Citrus sinensis</i>	Cordeirópolis/ SP
3	11038	<i>Citrus sinensis</i>	Colina/ SP
4	11039	<i>Citrus sinensis</i>	Colina/ SP
5	11834	<i>Citrus sinensis</i>	Paraná
6	11067	<i>Citrus sinensis</i>	Paraná
7	11066	<i>Citrus sinensis</i>	Paraná
8	11399	<i>Citrus sinensis</i>	Paraná
9	Rep1	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara/ SP
10	Rep2	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara/ SP
11	Rep6	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara/ SP
12	Rep3	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara/ SP
13	Rep15	<i>Citrus sinensis</i>	Matão/ SP
14	Rep16	<i>Citrus sinensis</i>	Matão/ SP
15	Rep11	<i>Citrus sinensis</i>	Matão/ SP
16	Rep17	<i>Citrus sinensis</i>	Matão/ SP
17	Taquaritinga	<i>Citrus sinensis</i>	Taquaritinga/ SP
18	Itapetininga	<i>Citrus sinensis</i>	Itapetininga/ SP
19	Curupá	<i>Citrus sinensis</i>	Curupá/ SP
20	Olimpia	<i>Citrus sinensis</i>	Olimpia/ SP
21	Itápolis	<i>Citrus sinensis</i>	Itápolis/ SP
22	Novais	<i>Citrus sinensis</i>	Novais/ SP
23	Transformada	<i>Citrus sinensis</i>	-
24	videira	<i>Vitis vinifera</i>	EUA
25	café	<i>Coffea arabica</i>	Marília/ SP
26	café	<i>Coffea arabica</i>	S. J. do Rio Preto/ SP

*Culturas do clone 9a5c obtidos de diferentes laboratórios.

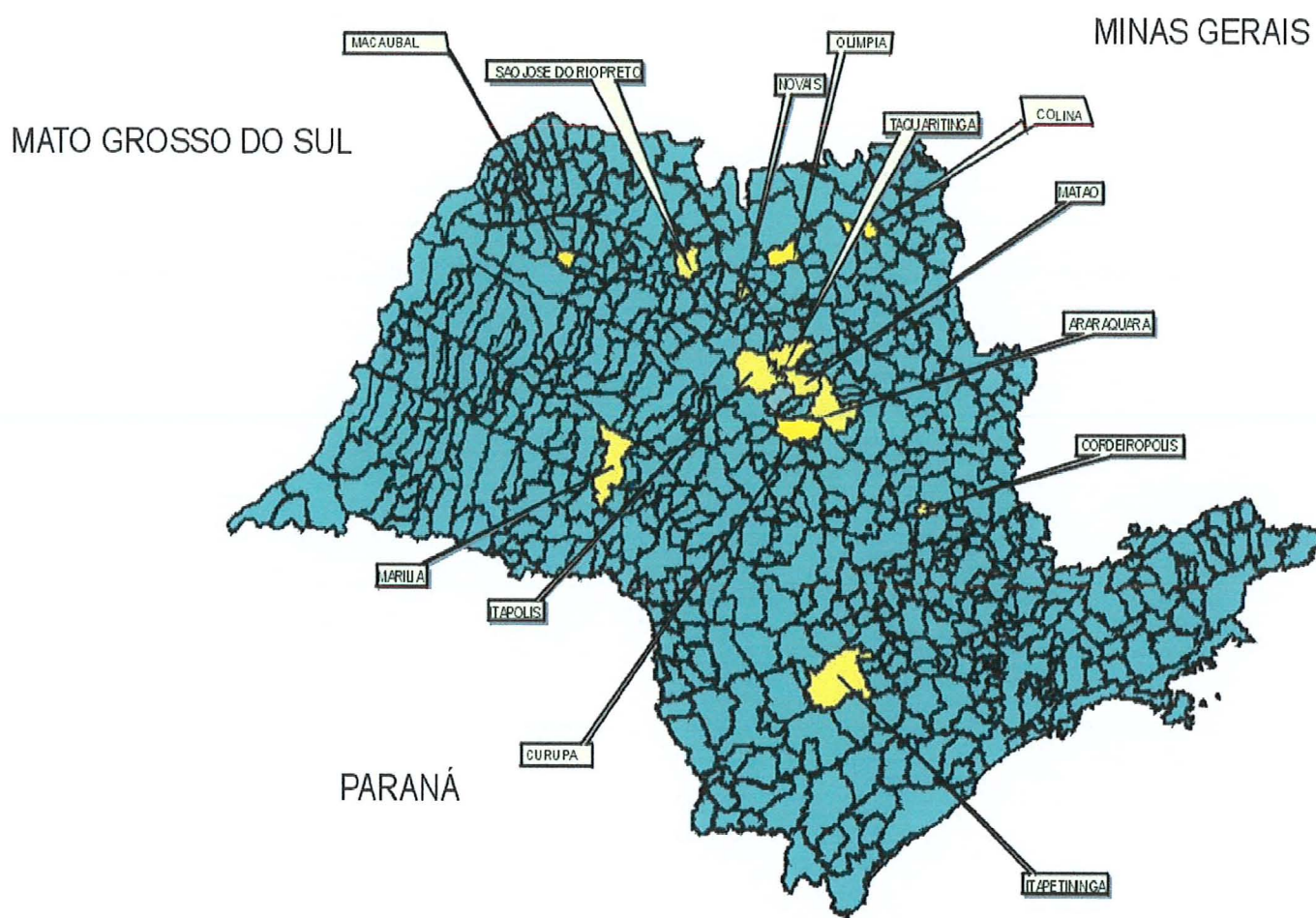


Figura 1. Mapa do estado de São Paulo localizando as cidades de origem dos isolados de *Xylella fastidiosa* utilizados neste trabalho.

O isolado X0 utilizado como controle nos experimentos é o clone de *X. fastidiosa* (8.1 b clone 9a5c) utilizado no projeto genoma da Fapesp. O projeto Genoma Fapesp recebeu o isolado dos pesquisadores Dr. J.M. Bové e Dr. M. Garnier (Laboratório de Biologia Molecular, INRA & Universit' de Bordeaux, Villenave d'Ornon Cedex, França). Esse clone foi derivado de uma cultura original de *X. fastidiosa* (8.1b), a qual preenche os postulados de Knock (Cheng et al., 1993).

O isolado de videira (EUA) foi cedido pelo Dr. Rui Pereira Leite (IAPAR/Londrina).

Os isolados foram monitorados por PCR durante todo o período de realização do trabalho. Os *primers* 272-1 e 272-2 utilizados para os PCRs de monitoramento são responsáveis pela amplificação de banda em PCR de *Xylella fastidiosa* de qualquer hospedeiro (Pooler & Hartung, 1995).

3.2 Meio de Cultura

O meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 30 minutos. Outros materiais utilizados e que necessitaram ser esterilizados, foram autoclavados sob as mesmas condições.

3.2.1 Condições para crescimento de *Xylella fastidiosa*

As culturas de *Xylella* foram mantidas em meio líquido ou sólido PW a temperatura de 28 °C.

Meio PW- “Periwinkle Wilt Agar”, (Davis et al., 1981).

Componentes	Volume final = 1000 mL
Peptona de soja	4,0g
Triptona	1,0g
Hemina Clorada (0,1%)	10 mL
Vermelho de Fenol (0,2%)*	10 mL
K ₂ HPO ₄	1,2g
KH ₂ PO ₄	1,0g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,4g
Agar	12,0g
Água destilada	820 mL
Componentes adicionados após o meio (pH 6,8) ser esterilizado em autoclave e resfriado.	
Glutamina 4%*	100 mL
Albumina de soro bovino V (BSA) 10%*	60 mL

*Componentes preparados em água Milli-Q e esterilizados por filtração (filtro de 0,2 µm).

3.3 Soluções e Tampões

3.3.1 Solução de Hemina Clorada 0,1%

Hemina clorada	0,10 g
Hidróxido de sódio	0,20 g
Água Milli-Q	100 mL

3.3.2 Solução de RNase

RNase pancreática (A).....	10 mg/mL
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	15 mM

A solução foi aquecida a 98⁰ C por 15 minutos e armazenada a -20⁰ C.

3.3.3 Tampão GET

Glicose (50mM).....	0,45 g
Tris-HCL 1M, pH 8,0.....	1,25 mL
EDTA 0,5 M, pH 8,0	1,0 mL
Água Milli-Q	47,75 mL

3.4 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos (*primers*) foram adquiridos da Operon Technologies (USA), sob a forma de pelete liofilizados. A estes adicionou-se água Milli-Q esterilizada

de modo a obter-se uma solução estoque na concentração de 3,2 pmoles/ μ L. As soluções foram estocadas a -20° C.

3.5 Extração do DNA genômico da bactéria

Para a extração do DNA genômico, as culturas foram mantidas em meio líquido (PW) por 15 dias a 28° C sem agitação. A extração se deu através da centrifugação de 1,5 mL da cultura com crescimento saturado a 10 000 rpm por 2 minutos, até compactar o pelete. Após descartar o sobrenadante o pelete foi ressuscitado em 567 μ L de tampão de extração TE (10mM Tris e 1mM EDTA, pH 8,0) através de repetidas pipetagens. Foram adicionados 30 μ L de SDS 10% (sódio dodecyl sulfato/concentração final de 0,5%) e 3 mL de proteinase K 20 mg/mL (concentração final de 100 μ g/mL). Após 1 hora a 37° C adicionou-se 100 μ L de NaCl 5M. Em seguida foram adicionados 800 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, respectivamente), centrifugou-se a 10 000 rpm durante 5 minutos. A fase superior foi removida para outro tubo de 1,5 mL sem afetar a interfase. Foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, respectivamente). Misturou-se vigorosamente e centrifugou-se a 13 000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo adicionando 2 vezes o volume de etanol absoluto. Após misturados por inversão os tubos permaneceram a -80° C durante 20 min. Foram então centrifugados a 12000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pelete contendo DNA precipitado com 600 μ L de etanol 70%. Centrifugou-se a 12000 rpm durante 5 minutos à

temperatura ambiente. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante. O pelete foi ressuspendido em 50 μ L de TE (10mM Tris e 1mM EDTA, pH 8,0) + RNase.

3.6 PCR de monitoramento de culturas

Foram utilizados os *primers* 272-1 (AGCGGGCCAATATTCAATTGC) e 272-2 (AGCGGGCCAAAACGATGCGTG) (Pooler & Hartung, 1995a). A reação de amplificação se deu em termociclador (MJ Reserch Inc. modelo PC100), seguindo o programa: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C; 1 minuto a 62 °C; 2 minutos a 72 °C, e após os ciclos uma extensão final de 4 minutos a 72 °C.

3.7 PCR de colônias

Para o PCR de colônias as culturas foram crescidas em meio (PW) sólido por 10 dias à 28 °C. Em todos os PCRs, o isolado 9a5c (X0) foi utilizado como controle. Os tubos de PCR foram identificados para cada isolado e um para o controle. Foram adicionados 5 mL de água Milli-Q estéril em cada tubo de 0,2 mL, e com um palito estéril as colônias foram então transferidas da placa para os tubos correspondentes “lavando” a ponta do palito na água. A mistura de reação por tubo foi preparada da seguinte forma :

Água.....	3,5 mL
10x Buffer	1X
MgCl ₂ (50mM).....	1,25 mM
dNTP	2,5 mM
Primer 1.....	6 pmoles
2	6 pmoles
taq DNA polimerase.....	1,5 u

A reação de amplificação se deu em termociclador (MJ Reserch Inc. modelo PC100), seguindo o programa: desnaturação inicial por 3 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C; 1 minuto a 52 °C; 1 minutos a 72 °C, e após os ciclos uma extensão final de 4 minutos a 72 °C. Após o término do programa foi adicionado 3 µL de tampão da amostra (0,25% de bromofenol e 30% de glicerol) em cada tubo. O produto do PCR foi aplicado em gel de agarose 1% (1,0 g de agarose e 100 mL de TBE).

3.8 PCR a partir de DNA Genômico

O PCR a partir de DNA genômico foi feito utilizando-se 20 ng de DNA.

A mistura da reação por tubo foi preparada sa seguinte forma:

10x Buffer	1X
MgCl ₂ (50mM).....	1,25 mM
dNTP	2,5mM
Primer 1.....	6 pmoles
2	6 pmoles
taq	1 u
Água.....	13,5 mL

A reação de amplificação se deu em termociclador (MJ Reserch Inc. modelo PC100), seguindo o programa: desnaturação inicial por 3 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C; 1 minuto a 52 °C; 1 minutos a 72 °C, e após os ciclos uma extensão final de 4 minutos a 72 °C. Após o término do programa foi adicionado 3 µL de tampão da amostra (0,25% de bromofenol e 30% de glicerol) em cada tubo.

3.9 Extração de DNA do gel de agarose utilizando o Kit Sephaglas® (Pharmacia).

O produto de PCR (50 µL) foi submetido em gel de agarose 1% em eletroforese a 75 V. Depois de separadas as bandas os fragmentos de DNA foram retirados do gel.

Conforme indicado pelo fabricante para cada 250 mg de gel foi utilizado 250 μ L de gel solubilizador e 5 μ L de ácido acético (50%). Os tubos foram então mantidos por 10 minutos à 60 °C para dissolver o gel. Foram adicionados 5 μ L de suspensão de sílica, deixando 5 minutos a temperatura ambiente agitando moderadamente para manter a sílica em suspensão. Os tubos foram centrifugados durante 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante removido cuidadosamente. Foram acrescentados 80 μ L de tampão de lavagem com etanol ressuspensando a sílica com a pipeta várias vezes. Centrifugou-se por 30 segundos e removeu-se o sobrenadante. Essa lavagem foi repetida 2 vezes. Foram acrescentados 20 μ L de água Milli-Q e deixados por 5 minutos à temperatura ambiente com agitação periódica, seguido de um minuto de centrifugação a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e previamente marcado. Após a extração, o DNA foi armazenado em freezer -20°C e usado para o seqüenciamento.

3.10 Reação de Seqüenciamento.

O seqüenciamento foi feito no seqüenciador automático ABI Prism-377 DNA sequencer™ (Perkin Elmer). As amostras de DNA após serem extraídas do gel (Kit Sephaglas®) foram seqüenciadas seguindo o protocolo descrito no “*Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*” contendo a enzima AmpliTaq DNA polimerase (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, EUA).

A reação foi a seguinte:

Terminator Ready Reaction Mix.....	2 μ L
<i>Primer</i> (3,2 pmol)	1 μ L
Tampão (200 mM tris-HCL pH=9,0 e 5 mM MgCl ₂).....	2 μ L
DNA (200 ng)	5 μ L
Volume final de reação 10 μ L.	

Os *primers* foram obtidos da Operon Technologies, Inc. Nas reações de seqüenciamento de produto de PCR, os *primers* utilizados foram os mesmos da reação de amplificação.

A reação de amplificação se deu em termociclador (MJ Reserch Inc. modelo PC100), seguindo o programa: desnaturação inicial por 2 minutos a 96 °C, seguida de 35 ciclos de 20 segundos a 96 °C; 2 minutos a 96 °C; 20 segundos a 96 °C, 10 segundos a 50 °C, 4 minutos a 60.

3.11 Purificação da reação de Seqüenciamento

O produto da reação de seqüenciamento foi purificado através da adição de uma solução contendo: 19 μ L água Milli-Q; 2 μ L de glicogênio, 1g/l; 4 μ L de 1,5 acetato de sódio/ 0,25 EDTA 25 mM).

3.12 Eletroforese em gel de agarose.

A eletroforese em gel de agarose foi feita de acordo com os procedimentos descritos por Sambrook et al.,(1989).O peso molecular foi comparado com o padrão 1 kb

DNA ladder (Gibco Life Technologies) no gel sendo fotografado após a corrida com o fotodocumentador Kodak *digital science* sob luz ultravioleta.

3.13 Hibridização.

Nos experimentos de hibridização 50 ng de DNA total dos diferentes isolados foram adicionados a membrana de “nylon” num volume total de 5 μ L. Após alguns minutos a ligação do DNA a membrana foi feita em “UV-*cross linker*” (Stratagene). A preparação das sondas, hibridização e detecção foram realizadas utilizando o Kit ECL (“direct nucleic acid labelling and detection system” da Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante.

3.14 Análise dos resultados

As sequências de DNA foram analisadas no programa de montagem Sequencer 3,0 (Gene Codes). Para os alinhamentos múltiplos utilizado o MultAlien (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>), sendo que os dendogramas obtidos refletem as diferenças encontradas em número de nucleotídeos. Blast X e Blast N foram feitos no site: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4. RESULTADOS

4.1. Análise da presença de profagos em isolados de *Xylella fastidiosa*

O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar, através de PCR, a presença de profagos em vários isolados de *Xylella* infectando citros, café e videira. Para tanto foi analisado as quatro regiões de profagos (Xfp1, Xfp2, Xfp3, Xfp4) encontradas no genoma do clone 9a5c da *Xylella fastidiosa* causadora da CVC (Simpson *et al.*, 2000). Os profagos são semelhantes dois a dois, sendo que o par Xfp1 e Xfp2 apresenta ORFs homólogas a maioria das proteínas necessárias a formação da partícula viral (Figura 2), enquanto que o par Xfp3 e Xfp4 é defectivo. (Simpson *et al.*, 2000).

Na região do profago Xfp2 foram desenhados 3 pares de *primers*: A (CTG TTA ACT TCA CAG TGG) e B (GTC ACG TAG CTT CTA TGG), C (TCT ACC AAG AGA CCT TCC) e D (CTC AAG ATG TTC TGC ACC), E (ACG ACA ACG ATA TTA CCG) e F (GGT TGA ATC CAA ATA GGG) (Figura 2). Os *primers* A-B e E-F foram desenhados da junção profago-bactéria, enquanto que os *primers* C-D foram desenhados de uma região interna do Xfp2. Essa região interna foi escolhida pois os *primers* ancoram também no fago Xfp1, resultando em dois produtos de amplificação com tamanhos diferentes (1.023 e 1.411 kb) (Figuras 2 e 3). Os *primers* A-B e E-F amplificam produtos de 1.028 e 1.737 pb respectivamente (Figuras 2 e 3).

Culturas de células crescidas a 28 °C, por 10 dias em placas de Petri contendo meio de cultura PW (Figuras 4 e 7) ou DNA extraído (Figuras 5, 6, 8, 9, 10 e 12) dos diferentes isolados foram utilizados nas reações de PCR. Os resultados observados nas diferentes reações de PCR encontram-se na Tabela 2.

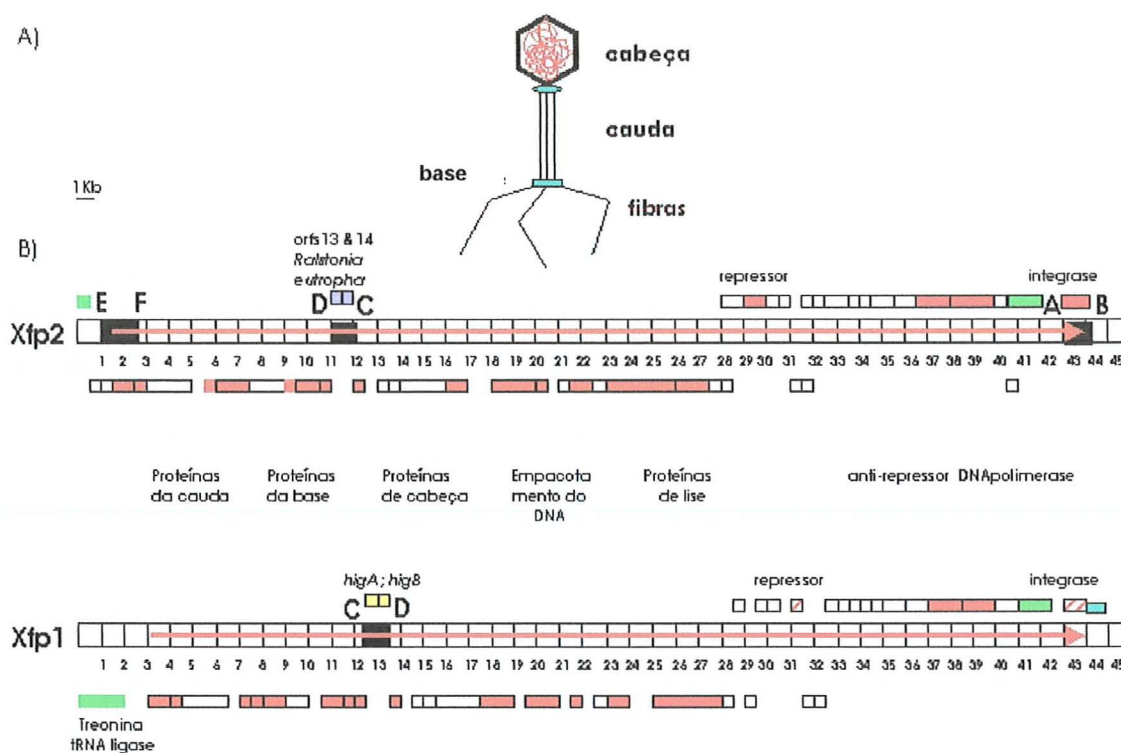


Figura 2. (A) Representação esquemática de um bacteriófago de DNA de dupla-fita (dsDNA), com cauda. (B) Organização dos profagos Xfp1 e Xfp2 presentes no genoma de *Xylella fastidiosa*. As setas vermelhas correspondem a segmentos de DNA de aproximadamente 43 kb nas coordenadas 649.115 – 690.537 e 2.361.085 – 2.404.268 do genoma da *Xylella*. As regiões em preto representam os produtos amplificados com os pares de *primers* A e B, C e D, E e F. Os genes e as suas funções na formação da partícula viral, de acordo com a anotação publicada (Simpson *et al.*, 2000), estão representados acima e abaixo dos segmentos de DNA, dependendo da direção da transcrição. As cores representam: em vermelho, ORFs homólogas a sequências de proteínas de fagos; em verde, sequências homólogas a proteínas conhecidas em bactérias; em branco, sequências sem homólogos em bancos de dados; em amarelo e roxo, ORFs localizadas nas regiões de amplificação.

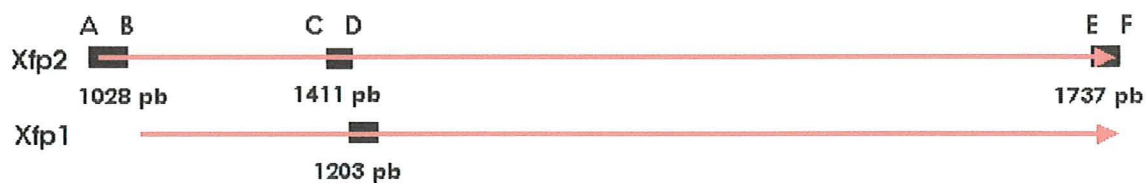


Figura 3. Representação esquemática dos profagos Xfp1 e Xfp2 em vermelho. O tamanho dos fragmentos amplificados a partir de cada par de *primers* (A-B, C-D, E-F) em preto, deduzidos a partir da seqüência completa do clone 9a5c (X0) de *Xylella fastidiosa*.

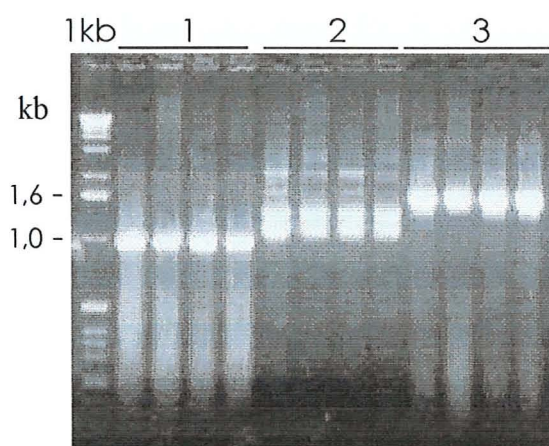


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers*: 1, A-B; 2, C-D; 3, E-F. A reação de PCR foi realizada a partir de cultura de células do isolado de citros de Itápolis de *Xylella fastidiosa*. *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

Tabela 2. Número de bandas obtidas nas reações de PCR com os *primers* A-B, C-D e E-F dos diferentes isolados de *Xylella* (* não foi realizada a reação de PCR).

Número	Origem	Nomenclatura	A-B	C-D	E-F
1	Macaubal/Genoma	X0	1	2	1
2	Cordeirópolis	Cordeirópolis	1	2	1
3	Colina	Colina(11038)	1	2	*
4	Colina	Colina(11039)	1	2	1
5	Paraná	Paraná(11834)	1	1	1
6	Paraná	Paraná(11067)	1	1	1
7	Paraná	Paraná(11066)	*	1	*
8	Paraná	Paraná(11399)	1	1	1
9	Araraquara	Araraquara(Rep1)	1	2	1
10	Araraquara	Araraquara(Rep2)	1	2	1
11	Araraquara	Araraquara(Rep6)	1	2	1
12	Araraquara	Araraquara(Rep3)	1	2	1
13	Matão	Matão(Rep15)	1	2	1
14	Matão	Matão(Rep16)	1	2	1
15	Matão	Matão(Rep11)	1	2	1
16	Matão	Matão(Rep17)	1	2	1
17	Taquaritinga	Taquaritinga	1	2	1
18	Itapetininga	Itapetininga	1	2	1
19	Curupá	Curupá	1	2	1
20	Olimpia	Olimpia	1	2	1
21	Itápolis	Itápolis	1	2	1
22	Novais	Novais	1	2	1
23	Transformada	J1a12	1	2	1
24	videira/EUA	Videira	0	2	1
25	café/Marília	CaféMarília	1	1	1
26	café/São José do Rio Preto	CaféRio Preto	1	1	1

Foram utilizados 26 isolados de *Xylella*, sendo que 23 são de citros; dois de café e um de videira. Os isolados são do interior de São Paulo e Paraná, e o isolado de videira proveniente dos Estados Unidos. Os resultados indicam que todos os isolados de citros apresentam seqüências homólogas à região de profago descrita para o genoma do clone 9a5c (X0). Entretanto, existem variações quanto a presença dos produtos de PCR. Por exemplo, os isolados de citros (11834, 11067, 11066, 11399) provenientes do Paraná apresentaram somente uma banda quando os *primers* C e D foram utilizados nas reações de PCR (Figuras 5, 7, e 8). Resultados semelhantes foram encontrados nos isolados de café, onde somente uma banda foi amplificada nos experimentos com os *primers* C e D (Figura 6). No isolado de videira, a diferença encontrada foi com relação ao produto dos *primers* A e B, pois não houve amplificação nas várias reações de PCR realizadas (Figura 10). Com o objetivo de confirmar a ausência de seqüência homóloga a amplificada pelos *primers* A e B no isolado de videira, foi realizado um experimento de hibridização em condições de alta stringência (Figura 11). A identidade do isolado de videira foi confirmada com os *primers* 272-1-272-2, cuja reação de PCR amplifica produtos somente em espécies de *Xylella* (Pooler & Hartung, 1995a) (Figura 12). Esses resultados podem acrescentar evidências à existência de uma distância genética maior entre os isolados de *Xylella fastidiosa* de citros e café em relação aos isolados de videira como já sugerido por outros autores (Chen et al., 2000; Chen et al., 1995; Lacava, 2000; Minsavage et al., 1994; Pooler & Hartung, 1995).

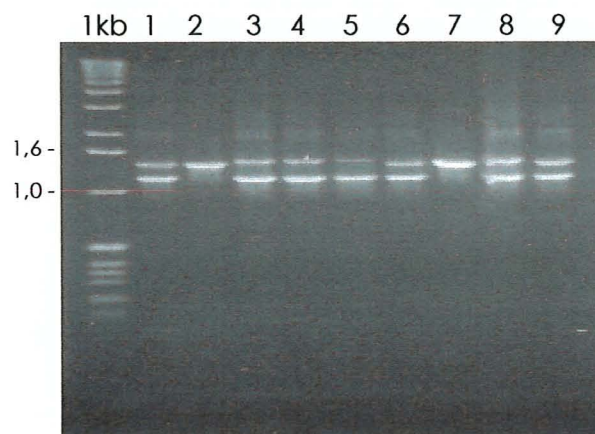


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* C-D. A reação de PCR foi realizada com DNA extraído dos isolados: 1, 9a5c (X0); 2, Paraná(11066); 3, Matão(Rep15); 4, Olímpia; 5, Araraquara(Rep2); 6, Matão(Rep16); 7, Paraná(11834); 8, Araraquara(Rep6); 9, Matão(Rep16). *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

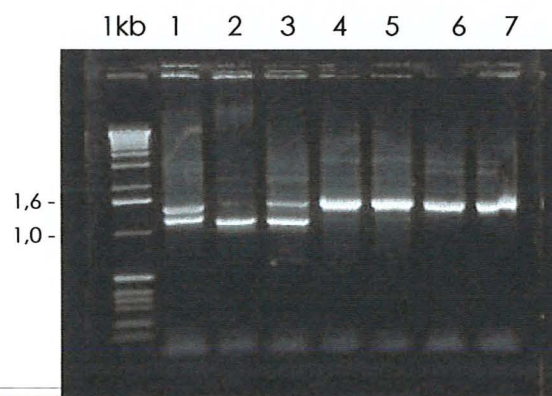


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* C-D. A reação de PCR foi realizada com DNA extraído dos isolados: 1, 9a5c (X0); 2 e 3, videira; 4 e 5, café Rio Preto; 6 e 7, café Marília. *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

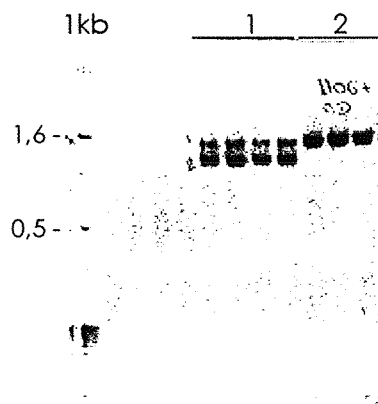


Figura 7 . Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* C-D. A reação de PCR foi realizada com DNA extraído dos isolados: 1, Itápolis; 2, Paraná (11067). *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.



Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* C-D. A reação de PCR foi realizada com DNA extraído dos isolados: 1, Araraquara(Rep3); 2, Paraná(11399). *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

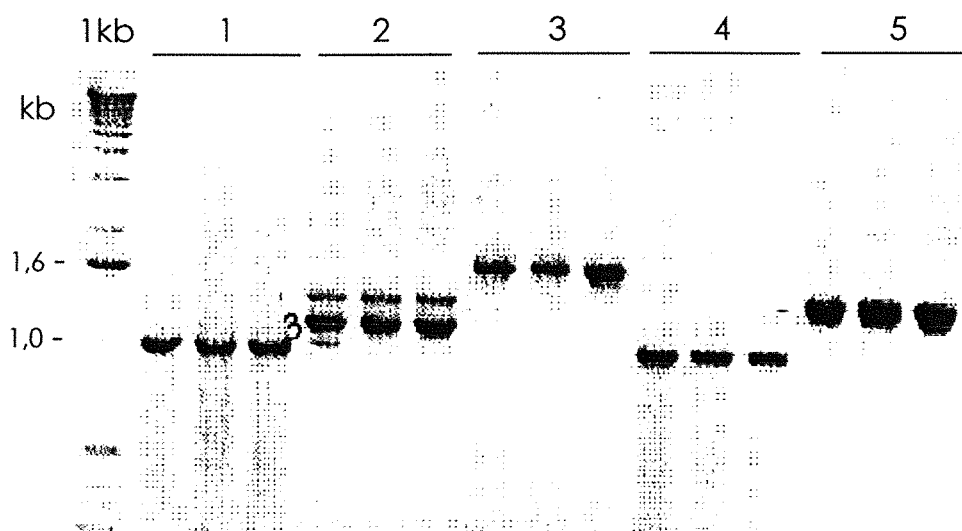


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos primers: 1, A-B; 2, C-D; 3, E-F; 4, A-B; 5, C-D. A reação de PCR foi realizada a partir de células dos isolados de citros Matão(Rep 16) (1, 2, 3) e Café Marília (4 e 5) de *Xylella fastidiosa*. 1kb ladder (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

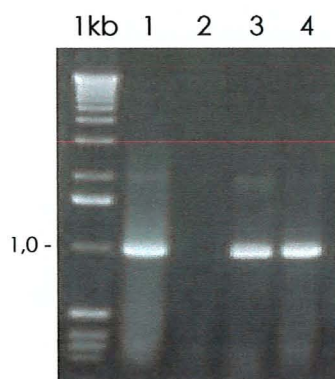


Figura 10 Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* A-B. A reação de PCR foi realizada com DNA extraído dos isolados: 1, 9a5c (X0); 2, videira; 3, café Rio Preto; 4, café Marília. *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

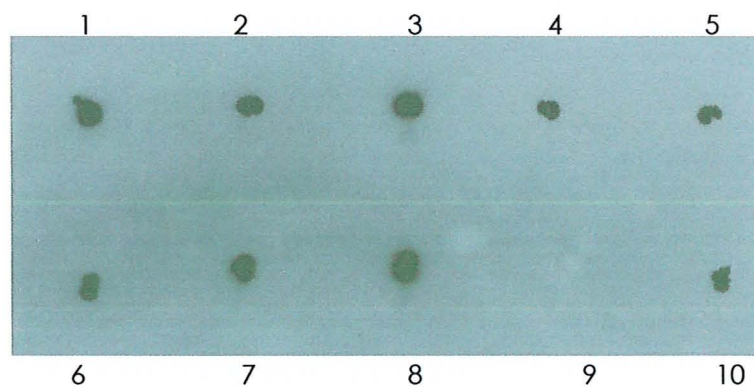


Figura 11. Hibridização do DNA total dos diferentes isolados de *Xylella fastidiosa* com o produto de PCR dos *primers* A-B com o DNA do clone 9c5a (X0). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 são isolados de citros; 7, isolado de café de Rio Preto e 8, isolado de café de Marília; 9, isolado de videira.

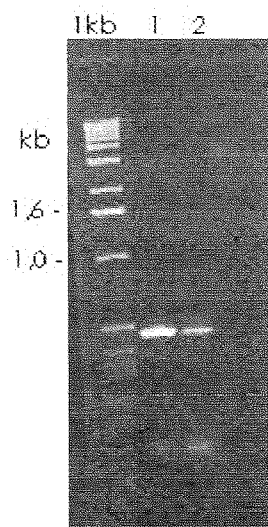


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de amplificação pelos *primers* 272-1-272-2. A reação de PCR foi realizada com DNA extraído dos isolados: 1, 9a5c (X0); 2, videira. *1kb ladder* (Gibco Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular.

Os resultados indicam que a presença de seqüências de fagos ocorre não somente no clone de *Xylella* seqüenciado, mas também em isolados de campo de diferentes regiões, indicando que a transferência lateral pode ter sido uma via importante para a espécie de *Xylella fastidiosa* e não somente para uma população em específico.

A amplificação de uma única banda nos isolados de café e em alguns isolados de citros com os *primers* C e D, pode significar que nestes isolados existam apenas um único profago do par XfP1 e XfP2. Entretanto, experimentos de hibridização com o DNA total tratado com diferentes enzimas de restrição devem ser realizados para confirmar essa afirmação. Mutações pontuais no sítio de anelamento de um ou dos dois *primers* é uma possível explicação para esse evento.

4.2. Análise da seqüência de nucleotídeos das regiões amplificadas nos diferentes isolados de *Xylella fastidiosa*

Com o objetivo de verificar se as regiões amplificadas nos diferentes isolados apresentavam a mesma seqüência de nucleotídeos quando comparadas as seqüências amplificadas no clone 9c5a(X0), os produtos de PCR foram isolados do gel e seqüenciados separadamente. Na região interna das bandas amplificadas no clone 9a5c(X0) com os *primers* C e D existem ORFs diferentes. Na banda 1 (B1) (1,4 kb) existem duas ORFs homólogas a proteínas localizadas no transposon (ORFs 13 e 14) de *Ralstonia eutropha*, e na banda 2 (B2) existem duas ORFs homólogas as proteínas VapA e ORF118 de *Dichelobacter nodosus* (Figuras 2 e 3) (Simpson *et al.*, 2000). Essas últimas são encontradas somente em isolados virulentos dessa bactéria de *Dichelobacter* (Bloomfield *et al.*, 1997). A esquerda e a direita dessas ORFs encontram-se seqüências que apresentam 100% de homologia entre os dois profagos XfP1 e XfP2, onde foram desenhados os *primers* (Figura 13).

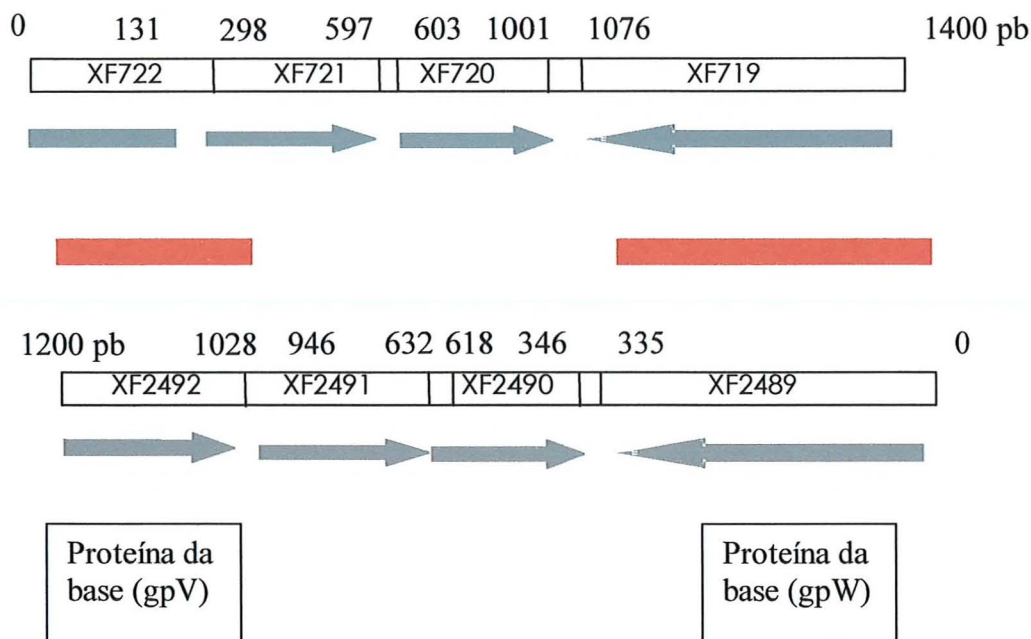


Figura 13. Representação esquemática da seqüência de bases e ORFs encontradas nos produtos de amplificação com os *primers* C-D do DNA isolado de *Xylella fastidiosa* clone 9c5a (X0). As setas representam as diferentes ORFs com a direção da transcrição. Os números representam a posição de início e fim de cada ORF na seqüência de DNA. A barra vermelha representa a região de identidade entre as duas seqüências.

O seqüenciamento do DNA de cada uma das bandas amplificadas, em pelo menos duas reações de PCR realizadas independentemente, foi feito com os *primers* utilizados na amplificação. Cada reação de seqüenciamento foi realizada pelo menos duas vezes. As seqüências obtidas foram analisadas no programa Sequencher 3.0 (GeneCodes) para a obtenção de uma seqüência consenso utilizada nos alinhamentos múltiplos. Esses alinhamentos foram feitos com o auxílio do programa Multialin (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>).

4.2.1. Análise da seqüência de DNA do produto de PCR de 1,2 kb (banda 2)

Com o objetivo de avaliar a existência de variação nessas regiões entre os isolados de citros, o seguinte alinhamento foi realizado a partir do seqüenciamento completo do DNA da banda 2 dos diferentes isolados. Para a maioria dos isolados foi possível obter a seqüência completa do fragmento de 1,2 kb. O polimorfismo de bases aparece no início e no final do alinhamento (Figura 15).

Figura 15. As regiões de 350 a 1051 estão representadas por (...), pois não apresentam alterações de bases.

	1				50
Xo	TCTACCAAGA	GACCTTCCCC	GCACCCAGCA	GCACCGCCCA	CCAGCCCTGC
Cordeirópolis
Novaes
Matão (Rep16)
Matão (Rep11)
Colina (11038)
Olimpia
Colina (11039)
Curupá
Itapetininga
Matão (Rep15)
Araraquara (Rep3)
Araraquara (Rep1)
Matão (Rep17)
Consensus

	51				100
Xo	CTGTTGTTTG	GCGACGGAAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
CordeirópolisTG	GCGACGGAAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
NovaesTG	GCGACGGAAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
Matão (Rep16)TG	GCGACGGAAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
Matão (Rep11)TG	GCGACGGAAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
Colina (11038)TG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
OlimpiaTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
Colina (11039)TG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
CurupáTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
ItapetiningaTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
Matão (Rep15)TG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
Araraquara (Rep3)TG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
Araraquara (Rep1)TG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
Matão (Rep17)TG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
ConsensusTG	GCGACGGcAC	ACGCATCACC	TAtGACCGCC	AAGCCCACGC
	101				150
Xo	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
Cordeirópolis	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
Novaes	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
Matão (Rep16)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
Matão (Rep11)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
Colina (11038)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Olimpia	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Colina (11039)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Curupá	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Itapetininga	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Matão (Rep15)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Araraquara (Rep3)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Araraquara (Rep1)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Matão (Rep17)	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Consensus	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATaTGCG
	151				200
Xo	CCACCGCCAC	CCTCACCGGT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
Cordeirópolis	CCACCGCCAC	CCTCACCGGT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
Novaes	CCACCGCCAC	CCTCACCGGT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
Matão (Rep16)	CCACCGCCAC	CCTCACCGGT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
Matão (Rep11)	CCACCGCCAC	CCTCACCGGT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
Colina (11038)	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Olimpia	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Colina (11039)	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Curupá	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Itapetininga	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Matão (Rep15)	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Araraquara (Rep3)	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Araraquara (Rep1)	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Matão (Rep17)	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCCAGC
Consensus	CCAgCGCCAC	CCTCAatGcC	AGCGACCaCg	TgActcTGGA	gACgCCCAGC
	201				250
Xo	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Cordeirópolis	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Novaes	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Matão (Rep16)	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Matão (Rep11)	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Colina (11038)	GTCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Olimpia	GTCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG

Colina (11039)	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Curupá	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Itapetininga	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Matão (Rep15)	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Araraquara (Rep3)	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Araraquara (Rep1)	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Matão (Rep17)	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Consensus	gTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG

251

300

Xo	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Cordeirópolis	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Novaes	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Matão (Rep16)	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Matão (Rep16)	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Colina (11038)	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Olimpia	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Colina (11039)	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Curupá	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Itapetininga	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Matão (Rep15)	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Araraquara (Rep3)	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Araraquara (Rep1)	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Matão (Rep17)	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Consensus	CGACATCACC	GCCGCAGaTA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC

301

350

Xo	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Cordeirópolis	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Novaes	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Matão (Rep16)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Matão (Rep11)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Colina (11038)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Olimpia	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Colina (11039)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Curupá	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Itapetininga	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Matão (Rep15)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Araraquara (Rep3)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Araraquara (Rep1)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Matão (Rep17)	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC
Consensus	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC

1051

1100

Xo	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCgGTGAG
Cordeirópolis	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCgGTGAG
Novaes	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCgGTGAG
Matão (Rep16)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCgGTGAG
Matão (Rep11)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCgGTGAG
Colina (11038)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Olimpia	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Colina (11039)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Curupá	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Itapetininga	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Matão (Rep15)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Araraquara (Rep3)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Araraquara (Rep1)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA
Matão (Rep17)	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGGGAA

Consensus	AACGCTAAGG	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCaGgGAa
		1101			1150
Xo	TCCCCCAAG	CTGCTGAGTA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Cordeirópolis	TCCCCCAAG	CTGCTGAGTA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Novaes	TCCCCCAAG	CTGCTGAGTA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Matão (Rep16)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGTA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Matão (Rep11)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGTA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Colina (11038)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Olimpia	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Colina (11039)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Curupá	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Itapetininga	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Matão (Rep15)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Araraquara (Rep3)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Araraquara (Rep1)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Matão (Rep17)	TCCCCCAAG	CTGCTGAGCA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....
Consensus	TCCCCCAAG	CTGCTGAGcA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	A.....

Existem apenas 15 alterações de bases que se mantêm entre as diferentes seqüências de forma a separar dois grupos entre os isolados de citros (Figura 15). O grupo A compreende o clone 9a5c (X0) e isolados das regiões de Matão(Rep11), Matão (Rep16), Cordeirópolis, Novais e o grupo B compreende os isolados Araraquara(Rep1), Colina(11039), Araraquara(Rep3), Matão(Rep15), Itapetininga, Curupá, Olimpia, Colina(11038). As alterações de bases encontradas ocorrem nas seqüências das ORFs XF722 e XF719. A seqüência de nucleotídeos consenso dos isolados do grupo B foi submetida ao programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) que revelou a presença de ORFs nessas regiões, o que significa que as alterações de bases encontradas não alteram o quadro de leitura. As ORFs XF719 XF722 apresentam 92% e 89% de identidade respectivamente com as mesmas ORFs encontradas no genoma do clone 9a5c (X0).

Outros três isolados (Itápolis, Curupá, e J1A12) cujo seqüenciamento do fragmento de DNA da banda 2 foi parcial, foram comparados com o grupo acima através

do seqüenciamento de uma das extremidades variáveis (250 bases entre as posições 104 e 354 da banda B2) com o *primer* C. A Figura 17 apresenta o dendograma gerado a partir desse alinhamento múltiplo, localizando esses isolados nos grupos A e B de citros. Os dendogramas apresentados representam os nucleotídeos diferentes encontrados nas seqüências de DNA. O isolado J1a12, que foi utilizado nos experimentos de transformação da *Xylella fastidiosa* (Pesquisa Fapesp, n56), não pertence ao grupo do clone 9a5c (X0).

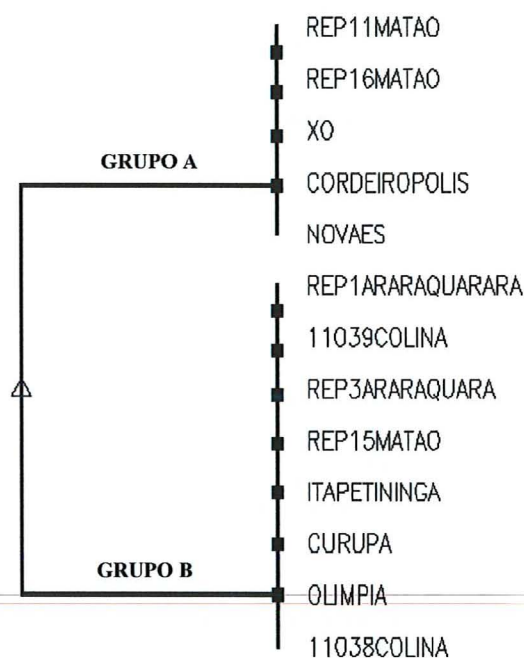


Figura 16. Dendograma obtido do alinhamento múltiplo (Multialien:(<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>)) entre as seqüências dos fragmentos de 1,2 kb obtidos com os *primers* C e D.

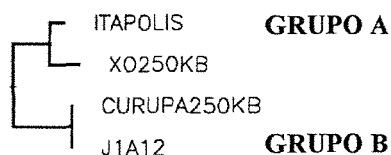


Figura 17. Dendrograma obtido do alinhamento múltiplo entre as seqüências parciais dos fragmentos de 1,2 kb obtidos com os *primers* C e D.

Com relação a seqüência de bases do fragmento B2 do isolado de videira, o alinhamento a seguir mostra que essa região apresenta diferenças significativas em relação aos isolados de citros. O alinhamento foi realizado com a seqüência consenso dos grupos A e B (Figura 18). Neste caso, entretanto, as diferenças estão concentradas na região central do fragmento onde estão localizadas as ORFs XF720 e XF721.

	1				50
Grupo B
Grupo A	TCTACCAAGA	GACCTTCCCC	GCACCCAGCA	GCACCGCCCA	CCAGCCCTGC
videira
Consensus
	51				100
Grupo BTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCCACGC
Grupo A	CTGTTGTTTG	GCGACGGAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
videiraTTTG	GCGACGGAAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCCACGC
ConsensusttTG	GCGACGGaAC	ACGCATCACC	TAcGACCGCC	AAGCCCACGC
	101				150
Grupo B	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATATGCG
Grupo A	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
videira	CCTGACCGTA	GATGCTTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGTG
Consensus	CCTGACCGTg	GATGCcTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATcTGcG
	151				200
Grupo B	CCAGCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCACG	TGACTCTGGA	GACGCCACGC
Grupo A	CCACCGCCAC	CCTCACCGCT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
videira	CCACCGCCAC	CCTCAATGCC	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACGCCACGC
Consensus	CCAcCGCCAC	CCTCAatGcc	AGCGACCgCc	TcACctTGGA	cACgCCCAGC

	201				250
Grupo B	GTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Grupo A	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
videira	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Consensus	cTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
	251				300
Grupo B	CGACATCACC	GCCGCAGATA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Grupo A	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
videira	GGACATCACC	GCCGCAGACA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Consensus	cGACATCACC	GCCGCAGaCa	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
	301				350
Grupo B	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCAGCGC	AGGGGTAGGC	GGTTACACAT
Grupo A	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCAGCGC	AGGGGTAGGC	GGTTACACAT
videira	AAGGACCCAA	TGCACCTACC	ACCCCTGCAC	AGGGGTAGGC	GGTTACGCAT
Consensus	AAGGACCCAA	TGCACCcACC	ACCCCaGCgC	AGGGGTAGGC	GGTTACaCAT
	351				400
Grupo B	GAAGGCGTGT	GATCTTCGGG	CGTGGCTGCT	GACTGGCAAC	CCACAGGTCA
Grupo A	GAAGGCGTGT	GATCTTCGGG	CGTGGCTGCT	GACTGGCAAC	CCACAGGTCA
videira	GAAGGCGCGT	GATCTT.GGG	AGTG.....	..TTCACAAA	CCT.AGTTTCG
Consensus	GAAGGCGtGT	GATCTTcGGG	cGTGgctgct	gacTggCAAC	CCacAGgTcCa
	401				450
Grupo B	TACTTGAACT	GCATGGCTAC	CCACATCTCT	GCACTGGTGC	CAAGCGCATC
Grupo A	TACTTGAACT	GCATGGCTAC	CCACATCTCT	GCACTGGTGC	CAAGCGCATC
videira	..CTGTGTGA	GCCAA..TGC	GCACGA.GCT	GCAATGTCTC	GTTGTCTGGGC
Consensus	taCTTgaact	GCatggcTAc	cCACatctCT	GCAcTggtgC	caaGcgcatC
	451				500
Grupo B	TTCCAGGCGT	..AGGGCCAT	ATCGGCAGAG	ATGCCGTTGG	CACCATTGAG
Grupo A	TTCCAGGCGT	..AGGGCCAT	ATCGGCAGAG	ATGCCGTTGG	CACCATTGAG
videira	TTCCGGTATA	TCAGTACCAA	GTCGGGTTTG	ATG...TGG	CAA.....
Consensus	TTCCaGgcgt	..AGggCCAt	aTCGGcagaG	ATGccgtTGG	CAccattgag
	501				550
Grupo B	AATACGCGAC	AAAGCGACAC	GGCTGACGCC	AAGCTTTGCA	GCCGCATTGG
Grupo A	AATACGCGAC	AAAGCGACAC	GGCTGACGCC	AAGCTTTGCA	GCCGCATTGG
videira	...TCACGGT	GATCTTTC..	..CAGTCGCC	AGTTAGTGCG	TGATCGT.GG
Consensus	aataCgCGac	aAagcgaCac	ggCtGaCGCC	AagcttTGCa	gccgCaTtGG
	551				600
Grupo B	TCACAGTGAG	ATCACCAAGA	TACTCACGCA	ACACTTCACC	TGGATGTGCG
Grupo A	TCACAGTGAG	ATCACCAAGA	TACTCACGCA	ACACTTCACC	TGGATGTGCG
videira	TGGC.GTG.G	CTCCAACGGA	TGATCACAGG	TCAA.....	.GGCTTTCCA
Consensus	TcaCaGTGaG	aTCaccaaGA	TacTCACgca	aCActtcacc	tGGaTgTgCg
	601				650
Grupo B	GGATTGTGCA	TACGTT..TC	ATCGTGTGTT	TC.CTAGTGG	TAATCCTGAT
Grupo A	GGATTGTGCA	TACGTT..TC	ATCGTGTGTT	TC.CTAGTGG	TAATCCTGAT
videira	AGAC.GTGTA	TCAGTTCCTC	ATCAAGCGTG	GCGCGAATGC	TGGCCCTTAG
Consensus	gGAttGTGcA	TacGTT..TC	ATCgtGtGtT	tC.CtAgTGg	TaatCCTgAt
	651				700
Grupo B	AGTCGACCAA	GATTGCGTCT	TCGCCTTCAA	AAGCAAACGT	GAGGCGATAG
Grupo A	AGTCGACCAA	GATTGCGTCT	TCGCCTTCAA	AAGCAAACGT	GAGGCGATAG
videira	CTTCGCGCTT	GTAGTCGCGC	TTGAATTGGC	CAGTCTGGCT	AATCCTCCGC

Consensus	agTCGacCaa	GattgCGtct	TcGccTTcaa	aAGcaaacgT	gAggCgatag
	701				750
Grupo B	TTGCCATTTA	CCCAGATGGA	CCAATGACCT	TTTAAGTCAG	CGCCTTTTAg
Grupo A	TTGCCATTTA	CCCAGATGGA	CCAATGACCT	TTTAAGTCAG	CGCCTTTTAg
videira	ATGCAAGTCC	GCCATGAGCG	CCTYAATACT	AT.....CAA	AGCTTTGAG
Consensus	tTGCcAtTta	cCCAgatGga	CCaatgacCT	tTtaagtCAg	cGCctTTTAg
	751				800
Grupo B	TGAGTGCAGT	TTCCAGCCTG	GAGCATTCAT	ATCTTTGGGG	TGCTTAGCAC
Grupo A	TGAGTGCAGT	TTCCAGCCTG	GAGCATTCAT	ATCTTTGGGG	TGCTTAGCAC
videira	.GTGACCAGC	A.CGGGCTTC	ACGCATGGCT	GCGAT..GGT	AGTTTCGTTT
Consensus	tGaGtgCAGt	ttCcaGCcTg	gaGCATtcaT	atctTtgGGg	tGcTTaGcaC
	801				850
Grupo B	T.CTCCAACG	CGGTGAGCTG	GATACGCAGT	TTGGCGGCGT	GTTTGGTTTTG
Grupo A	T.CTCCAACG	CGGTGAGCTG	GATACGCAGT	TTGGCGGCGT	GTTTGGTTTTG
videira	GGCACCAGCG	GCTCGAAC.G	GCAGCGCCTT	CTCGCGGGCA	ATGCGGGTCA
Consensus	t.CtCCAaCG	cggtGAqCtG	GataCGCagT	tTgGCGGcgt	gTttGGtTtG
	851				900
Grupo B	GATACCAGCG	GTTGATCCCT	CGAGGAAGAA	TTGTTGAATG	CCTTTGTGGC
Grupo A	GATACCAGCG	GTTGATCCCT	CGAGGAAGAA	TTGTTGAATG	CCTTTGTGGC
videira	GCATCATACG	GAA.....	CGCATCAGAC	ACGCTTAGGC	CCATCGTCGC
Consensus	GataCcagCG	Gttgatccct	CGaggaAGaa	ttGtTgAatg	CctTtGTgGc
	901				950
Grupo B	GGAAACTTTT	GATCACAAAG	CCGATTGTAT	AC.CGTAAT	GATCGGTATA
Grupo A	GGAAACTTTT	GATCACAAAG	CCGATTGTAT	AC.CGTAAT	GATCGGTATA
videira	CAGCACGGTT	GAT.GCTTCT	TCTTTGATGT	GCGCGTCAAC	GCGGGCACGG
Consensus	ggaaACTttT	GATcaCaaag	cCgaTtgTaT	aC.CGTAaAT	GatcGgtata
	951				1000
Grupo B	CATCCAGCGG	CAGCTATAGC	CAGTCGAACC	CACATTAAC	CATTGAGCAA
Grupo A	CATCCAGCGG	CAGCTATAGC	CAGTCGAACC	CACATTAAC	CATTGAGCAA
videira	ACAACTGCGT	TTGCAGACAT	AGTGCGATCC	TTTCGATAC.C	CAGTGAG.GA
Consensus	catcCaGCGg	caGctatagc	caGtCGAaCC	caCatTAaaC	CAtTGAGcaA
	1001				1050
Grupo B	ATGCCCCATA	TCCTGTCGGA	AAAACCTCTG	ATCATGCGTT	GCATATATCG
Grupo A	ATGCCCCATA	TCCTGTCGGA	AAAACCTCTG	ATCATGCGTT	GCATATATCG
videira	ATGAGCTACA	TTGTAGCTCA	ATAATTCCAA	GGCACTCACT	..CTGCGTCA
Consensus	ATGccCcAtA	TccTgtCggA	AaAAcTCctg	atCatgCgtT	gcaTataTCg
	1051				1100
Grupo B	GTAACCGATA	AAAGAAACGC	TAAGGAAAAC	CCGCCACAGG	ACACCGCCCA
Grupo A	GTAACCGATA	AAAGAAACGC	TAAGGAAAAC	CCGCCACAGG	ACACCGCCCG
videira	TTGCCAAGTG	CATTGAGC.C	TTCGGAAAAC	CCGCCACAGG	ACACCGCCCA
Consensus	gTaaCcgaTa	aAgaAaCgC	TaaGGAAAAC	CCGCCACAGG	ACACCGCCCA
	1101				1150
Grupo B	GGGAATCCCC	CCAAGCTGCT	GAGCATGCGC	GGAATGAACA	TGCACA....
Grupo A	GTGAGTCCCC	CCAAGCTGCT	GAGTATGCGC	GGAATGAACA	TGCACACCGG
videira	GTGAGTCCCC	CCAAGCTGCT	GAGCATGCGC	GGAATGAACA	TGCACACCGG
Consensus	GtGAgTCCCC	CCAAGCTGCT	GAGcATGCGC	GGAATGAACA	TGCACAccgg
	1151			1185	
Grupo B	
Grupo A	AAAGCCGCTT	GATGGCATCG	ACCA.CTGCG	CATCA	
videira	AAAGCCGCTT	GAGGGCATYG	ACCAACKG..	

Consensus aaagccgctt ga.ggcat.g acca.c.g..

Figura 18. Alinhamento da sequência consenso dos grupos A e B.

O ORF finder não encontrou ORFs na região central do fragmento. A análise dessa sequência através do BlastX revelou a presença de seqüências distintas a das ORFs XF720 e XF721. O resultado revelou a existência de regiões com 66% e 70% de identidade com as ORFs XF2081 e XF2080 de *Xylella* (Figura 19). A ORF XF2081 tem homologia com o gene *dinJ* de *Escherichia coli*, cuja proteína está associada ao reparo de DNA (*DNA-damage inducible protein*). A ORF XF2080 apresenta homologia com proteínas hipotéticas. Essas ORFs estão localizadas a ~6.000 pb da região de inserção da duplicação de um fragmento do megaplasmídeo no clone 9a5c e não estão associadas a região de profagos (Simpson *et al.*, 2000). O isolado de videira deve apresentar um rearranjo nesta região, o que levou a introdução dessas ORFs na região interna ao profago.


```

>pir||G82603 conserved hypothetical protein XF2080 [imported] - Xylella
                fastidiosa (strain 9a5c)
gb|AAF84879.1|AE004023_15 (AE004023) conserved hypothetical protein [Xylella
fastidiosa]
                Length = 93

Score = 90.5 bits (223), Expect(2) = 4e-23
Identities = 42/58 (72%), Positives = 48/58 (82%)
Frame = -3

Query: 495 ALTCDHPLEPRHHDHALTGDWKDHRDCHIKPDLVLIYRKPDNETLQLVIRIGSHSELGL 322
                AL D PLEPRH DHAL G+WKD RDCHIK DLVLIY + D++TL LVR+GSH+ELGL
Sbjct: 36 ALAKDMPLEPRHRDHALLGNWKDLRDCHIKLDLVLIYTRVDSKTLTLVRLGSHAEGL 93

Score = 40.4 bits (93), Expect(2) = 4e-23
Identities = 18/22 (81%), Positives = 18/22 (81%)
Frame = -1

Query: 602 MRRISQTGQFKRDYKREAKGQH 537
                MR I Q GQFKRD KREAKGQH
Sbjct: 1 MREIKQLGQFKRDLKREAKGQH 22

>pir||H82603 DNA-damage-inducible protein XF2081 [imported] - Xylella
fastidiosa
                (strain 9a5c)
gb|AAF84880.1|AE004023_16 (AE004023) DNA-damage-inducible protein [Xylella
fastidiosa]
                Length = 86

Score = 95.9 bits (237), Expect = 7e-19
Identities = 45/68 (66%), Positives = 59/68 (86%)
Frame = -3

Query: 852 MSANAVVRARVDAHIKEEASTVLATMGLSVSDAFRMLTRIAREKALPFEPLVPNETTIA 673
                M+AN +V+AR+D IK EA+ VLA MGL++SDA R++LT++A++KALPFEPL+PN TTI
Sbjct: 1 MAANQLVQARIDGAIKAEATVVLAAMGLTISDAVRLLLTKVAQDKALPFEPLIPNATTIK 60

Query: 672 AMREARAG 649
                AMREARAG
Sbjct: 61 AMREARAG 68

```

Figura 19. Resultado do BLASTX no GenBank: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

da seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA da banda 2 do isolado de videira.

4.2.2. Análise da seqüência de DNA do fragmento de 1,4 kb (banda 1)

Para a maioria dos isolados não foi possível o seqüenciamento completo do fragmento de 1,4 kb a partir dos *primers* C e D. A média de uma leitura de seqüenciamento a partir de cada *primer* foi de 400 pb. Entretanto, considerando que as regiões variáveis do fragmento encontram-se a 300 pb do início do seqüenciamento com o *primer* C e a 100 pb com o *primer* D, foi possível agrupar os isolados baseado nas seqüências obtidas. Nesse experimento foram utilizados os seguintes isolados: Araraquara(Rep3), Matão(Rep16), Cordeirópolis, Colina(11039), Paraná(11067), 9a5c(X0), Novais, Matão(Rep11), café Marília, J1a12, Itapetininga, Curupá, Araraquara(Rep1), café Rio Preto, Itápolis, Matão(Rep15), Olimpia, Araraquara(Rep6), Colina(11038). Os resultados apresentados nas figuras 20 e 21 mostram o alinhamento do consenso obtido das leituras de seqüenciamento de DNA de cada isolado a partir dos *primers* C e D, respectivamente. A exemplo dos resultados encontrados para a banda 2 pudemos definir dois grupos, sendo que um deles compreende o clone 9a5c (X0) (Grupo A) (Tabela 3). Nas seqüências analisadas, dois isolados (Rep11 e Rep16) apresentaram mais de uma leitura que poderiam pertencer aos dois grupos, caracterizando possivelmente uma cultura não pura contendo uma mistura de isolados. A possibilidade de erros no *tracking* do gel de seqüenciamento foi descartada pois as leituras vieram de geis diferentes. Quase todos os isolados que foram caracterizados pelo seqüenciamento da banda 2 como pertencentes a cada um dos grupos, foram caracterizados no mesmo grupo com o seqüenciamento da banda 1. Duas exceções foram obtidas, o isolado de Itápolis e Rep3 de Araraquara apresentaram resultados de seqüenciamento consistentes com a banda 1 do grupo A e banda 2 do grupo B. Para confirmar a presença desse tipo

de padrão entre os isolados de *Xylella* é necessário a inclusão de novos isolados para melhor definir esse padrão.

Quanto aos isolados de café e citros do estado do Paraná, os quais apresentaram uma única banda nas reações de PCR, os resultados foram diferentes. Os isolados de café apresentam perfil de grupo B e os de citros do Paraná de grupo A para a banda 1 (Tabela 3).

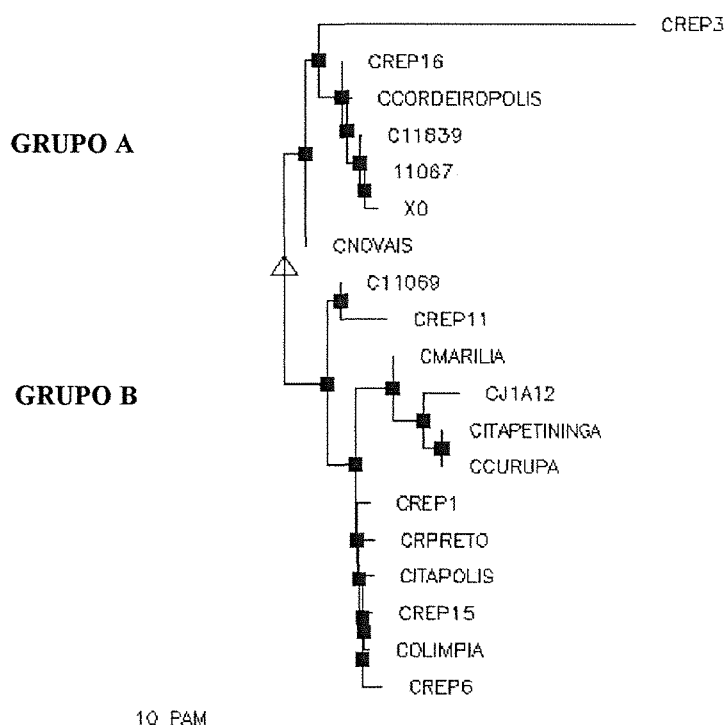


Figura 20. Dendrograma obtido do alinhamento múltiplo entre as seqüências parciais dos fragmentos de 1,2 kb obtidos com os *primers* C e D. A reação de seqüenciamento foi realizada com o *primer* C.

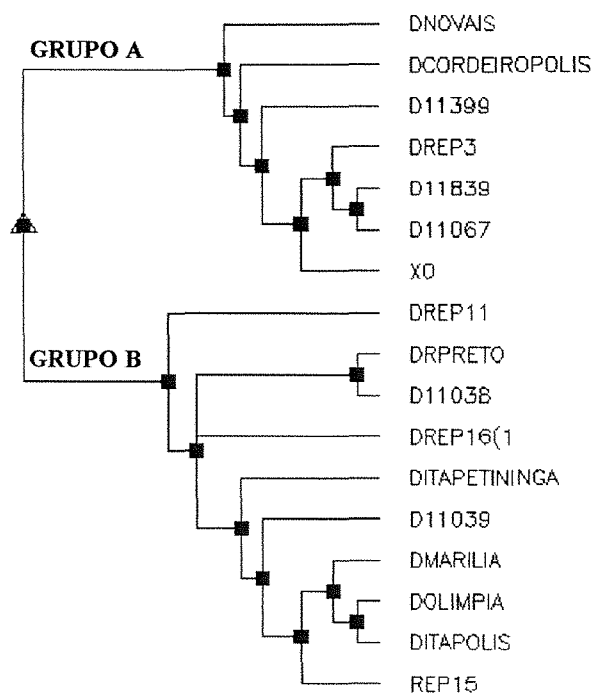


Figura 21. Dendograma obtido do alinhamento múltiplo entre as seqüências parciais dos fragmentos de 1,2 kb obtidos com os *primers* C e D. A reação de seqüenciamento foi realizada com o *primer* D.

Tabela 3. Agrupamento dos isolados de acordo com o seqüenciamento dos fragmentos de DNA das bandas 1 e 2.

Isolados	B1	B2
X0	A	A
Cordeirópolis	A	A
Curupá	B	B
Itápolis	A	B
Itapetininga	B	B
Olimpia	B	B
Araraquara (Rep1)	B	*
Araraquara (Rep3)	A	B
Matão (R11)	A	AB
Matão (R15)	B	B
Matão(Rep16)	A	AB
Paraná (11067)	A	0
Paraná (11399)	A	0
Paraná (11834)	A	0
Colina (11038)	B	B
Colina (11039)	B	B
Novais	A	A
café Marília	B	0
café Rio Preto	B	0

*não apresenta resultado de seqüenciamento.

Num segundo experimento de montagem, todas as seqüências obtidas para cada um dos isolados foram analisadas no programa Sequencher 3.0 (GeneCodes), em um único alinhamento. Utilizando parâmetros estringentes de montagem (80% de similaridade em 20 bases), duas seqüências contínuas de 1,4 kb (*contigs*) foram obtidas. Uma seqüência contínua equivalente a do isolado X0, com as ORFs e uma outra seqüência que não apresenta homologia na região central, como mostra o alinhamento a seguir.

	1				50
GrupoA	TCTACCAAGA	GACCTTCCYT	TSGGCCARCA	GCACCGCCCA	TCAGCCCTGC
GrupoBT	CGGGCCAGCA	GTACCGCCCA	CCAGCCCTGC
ConsensusT	cgGGCCArCA	GcACCGCCCA	cCAGCCCTGC
	51				100
GrupoA	CTGCTGTTTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TACGACCGCC	AAGCCACAC
GrupoB	CTGYTGTTTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TATGACCGCC	AAGCCACGC
Consensus	CTGcTGTTTG	GCGACGGCAC	ACGCATCACC	TAcGACCGCC	AAGCCACaC
	101				150
GrupoA	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
GrupoB	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
Consensus	CCTGACCGTG	GATGCCTCCG	CCGCATCCGG	CACCGTCACC	CTGATCTGCG
	151				200
GrupoA	CCACCGCCAC	CCTCACCGCT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACACCCAGC
GrupoB	CCAGCGCCAC	CCTCACCGCT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACGCCTAGC
Consensus	CCAcCGCCAC	CCTCACCGCT	AGCGACCGCC	TCACCTTGGA	CACaCCcAGC
	201				250
GrupoA	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
GrupoB	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
Consensus	CTCCACCTCA	CCGGCAACCT	CACCGTAGAC	GGCACCATTC	ACGCACAAGG
	251				300
GrupoA	CGACATCACC	GCCGCAGGCA	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
GrupoB	CGACATCACC	GCCGCAGGCG	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
Consensus	CGACATCACC	GCCGCAGGCa	TTGGCCTACA	ACGTCACCAC	CATACGGCCC
	301				350
GrupoA	AAGGACCCAA	TGCACCCACC	ACCCCAGCGC	AGGGGTAGGC	GCTCGAACAA
GrupoB	AAGGACCCAA	TGCACCGACC	ACCCCCGCGC	AGGGATAGGC	GTTCAAGCCA
Consensus	AAGGACCCAA	TGCACCcACC	ACCCCaGCGC	AGGGaTAGGC	GcTCaAaCaA
	351				400
GrupoA	AAGCGAACGT	GAGGCGATCG	CGAC.CATTG	ACT.GTTCAA	GCCAG.TACC
GrupoB	C.T.CGCGGAT	GAATCCGTGA	CAGCGCATCT	CCAAGATCAC	GTTTGGCACA
Consensus	aa.CGaacaT	GAagCcaTca	CaaC.CATcg	aCa.GaTCAa	GccaG.cACa

	401				450
GrupoA	TTTTAACGGT	TAGAAACTCT	TCACTTCGTT	GAGCAAATCG	GGGTGGCGAT
GrupoB	TTCCAACGCA	TAGTG.CTGT	TC.CAAATTC	AGYCAGCTTT	GCGGATCGGT
Consensus	TTccAACGca	TAGaa.CTcT	TC.CaaagTc	aagCAaaTcg	GcGgagCGaT
	451				500
GrupoA	CCAGAAGCTT	GAATAACTTA	TCCAAAGACA	GAGGCGGCTT	GGTTTTACCG
GrupoB	ACCGAAG.TA	GCGCGCCAGA	CGCAAAG.CA	GTATCTGC..	GGTGATCCCC
Consensus	aCaGAAG.Ta	GaacaaCagA	ccCAAAG.CA	GaagCgGC..	GGTgaTaCCG
	501				550
GrupoA	TTCTCGTAAC	GTGAGAAAAGC	ATTAACAC..	..CACCA...	.CCGAACAGT
GrupoB	CGCCGATCGC	GCACAATCTC	ATTGATGCGT	GCCGCCGTTA	TCCCAATGGC
Consensus	cgCccaTaaC	GcaaaAaagC	ATTaAcaC..	..CaCCa...	.CCcAAcaGc
	551				600
GrupoA	TCGGCAGCTT	GCCGCTGGTC	.GAGATCAAG	CTTCCG...G	CGTATCTTGG
GrupoB	TTAGCAGCGC	ATTACTGGAC	AGACCTAGAG	GGACCATAAA	CTCCTCCCGG
Consensus	TcaGCAGCgc	accaCTGGaC	.GAcaTaaAG	cgaCCa...a	CgcaTCccGG
	601				650
GrupoA	TAATGTAACC	AGGATCGACG	TAGGCCGAAT	TACCTGACGT	TGGAACAAGC
GrupoB	AGAATTTCCC	CTGGGTGAAT	GGGGGGAAAG	TGTTTTAAGA	CATACTCATC
Consensus	aaAagTaaCC	agGagcGAag	gaGGccaAAg	TaccTgAaGa	cagAacaAgC
	651				700
GrupoA	CGACCAATTC	GCTGTAACGA	TCACC.ATGT	TCACG...G	TCCAAGACGA
GrupoB	TCTTGAATC	TC...AACGC	ACACGGATT	TCACGCGTTT	TCCAGACAGC
Consensus	ccaccAAaTC	gC...AACGa	aCACc.ATgT	TCACG...g	TCCaAGaaca
	701				750
GrupoA	CTTCGCCACA	C.GCCGGGCA	GAAGTCGC.C	GGTCACCGTT	GGGATACTAG
GrupoB	ATGCAACAAA	CTGACAAGCT	TATTCCACSC	TGAATCGATC	TGGTTTAGAT
Consensus	aTgCaaCAaA	C.GaCaaGCa	gAagcCaC.C	gGaaaCcaTc	gGGaTaagAg
	751				800
GrupoA	TAGT...TTC	GCTCTTATAG	GTGTAAAGCA	TGTCGCG...CGTG
GrupoB	KCATYACTTC	AGAAATACGA	GTCCGAGGCA	CGCCGAGTTC	ATCAGCCAGT
Consensus	kaaT...TTC	acaaaTAcaa	GTccaAaGCA	cGcCGaG...Cagg
	801				850
GrupoA	TCGTGGATCA	GTTCTGCCGC	GCCGCAGCAT	GGACATCTCA	TGGTCAT..A
GrupoB	TCCTTGCTGC	TTTTTGCCAC	GCTTGGGTAA	TTCTTTTTCC	AGCGCGATCA
Consensus	TCcTgGaTca	gTTCtTGCCaC	GCcgcAaGcAa	ggaCaTcTca	aGcgCaa..A
	851				900
GrupoA	ACTCCTTGAA	GGAAACAATC	AACACGTCAT	CAATGACAGT	T..AACTTCA
GrupoB	ACAACGTTTC	ACGTGCCAGC	ATGGCGGCGG	CCTCATCAGG	GGGAAACCCA
Consensus	ACaaCgTgaa	acaaaCaAgC	AacaCGgCag	CaacaaCAGg	g..AAaccCA
	901				950
GrupoA	GGTACAC...	CTCATCACCG	C...TTGCCG	TCTTGGCGTG	GTACACATCC
GrupoB	GATCCTCGAA	CACGTTACCG	CAACTCACTG	TCATTTTTTC	GCTCATTTTA
Consensus	GaTaCaC...	CaCaTcACCG	C...TcaCcG	TCaTggcgTc	GcaCAcaTca
	951				1000
GrupoA	TGGAATACTG	TGT..GATCC	GCGTAGGTCG	TCATGCTCTT	GTAGAAGTCG
GrupoB	TTTTCCAATT	TGTTTGAATC	TCTGCTGACC	TAATGCAATG	TCCTTAG..G
Consensus	TggaacAaTg	TGT..GAacC	gCggagGaCc	TaATGCaATg	gcagaAG..G

	1001				1050
GrupoA	GCAGACGTGA	GCGCCAAGAC	AACGG.TGCA	CATTCCAGTT	AAATCTTTGA
GrupoB	GCTAGTTGTT	GCGTCTTCTT	GACAAATGCA	TGTAGCACAT	AAA.CAGCGT
Consensus	GCaacgga	GCGcCaacac	aACaa.TGCA	caTacCAcaT	AAA.CagcGa
	1051				1100
GrupoA	TGCCAA.GCT	CACGTGCTCC	TTGGTAGGCG	GTCGCTGTAG	CCC...TGAC
GrupoB	TACCAATGTT	CGTGACGTAA	AAGGCCCGG	AACGCTCCGC	CCCGCATGGA
Consensus	TaCCAA.GcT	CacGaccTaa	aaGGcaccCG	aaCGCTccac	CCC...TGaa
	1101				1150
GrupoA	CTTGC.CAGC	TTTTACCAAG	GCTTTGACGA	CTGGTAGCT.	TGTAGTGGGG
GrupoB	TACGCACCTC	ACGAACCCCA	GGACCGATGG	TTTTCATCGG	TTTCCAGTCC
Consensus	cacGC.CagC	acgaACCaaa	GcaccGAcGa	cTggcAgCg.	TgTacaGgcc
	1151				1200
GrupoA	TGTGCCTTTC	TCCATGCACC	ATTTTAACTT	ATTAGGTTAA	TTTAT.CAAG
GrupoB	TGTGGATCTA	ACCCTTCTTG	TAATCGCAGA	AGTTGACGGC	CTAATGCTTG
Consensus	TGTGcaTcTa	aCCaTgCacc	aaaTcaaaga	AgTaGacgaa	cTaAT.CaaG
	1201				1250
GrupoA	TAG.GTTAAT	TTGAGATTT	TCAGCAATTC	CT.....G	CTTAACGTGC
GrupoB	GCGCGCAGAT	GTGGGAAAT	TACGGATATC	CTCCAGAGTG	CTCCCCATGA
Consensus	gaG.GcaaAT	gTTGaGAaaT	TaaGcAaaTC	CT.....G	CtcaaCaTGA
	1251				1300
GrupoA	GA.....CGT	..GCGTTGCG	ATCCGTTTCC	TGAGACGACG	TTATCAGAAC
GrupoB	AAATAATCGT	CTGCATGAAA	ATGAATGTAC	AAAAATAACG	ACATTTTGTG
Consensus	aA.....CGT	..GCaTgaaa	ATcaaTgTaC	aaAaAcaACG	acATcagaaC
	1301				1350
GrupoA	CTTTCACCTT	CATTAATTCC	GCTGTTGCAT	TAGT.TTCTT	GAGCCTTCGG
GrupoB	TAATATTTTG	TACATCATCA	TGTGTTGAAT	CCCCCATGGA	AGGGCTTTGG
Consensus	caaTaaccTg	cAcaaaaTCa	gCTGTTGaAT	cacc.aTcga	aaGcCTTcGG
	1351				1400
GrupoA	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGTGAG	TCCCCCAAG	CTGCTGAGTA
GrupoB	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGTGAG	TCCCCCAAG	CTGCTGACCA
Consensus	AAAACCCGCC	ACAGGACACC	GCCCAGTGAG	TCCCCCAAG	CTGCTGAcca
	1401				1450
GrupoA	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	ACCGGAAAGC	CGCTTGATGG	CATCGACCAC
GrupoB	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	ACCGGAAAGC	CGCTTGATGG	CATCGACCAC
Consensus	TGCGCGGAAT	GAACATGCAC	ACCGGAAAGC	CGCTTGATGG	CATCGACCAC
	1451		1479		
GrupoA	.TGCGCAAK	SGRTGCAGAA	CATCTTGAG		
GrupoB	GTGCGCAYCA	GCRAA.....		
Consensus	.TGCGCaaaa	gcRaa.....		

Na análise desta última seqüência no ORF finder, são encontradas as ORFs Xf719 e XF722 nas extremidades e ORFs pequenas na região central. A análise de BlastX da região central apresenta similaridade com a proteína VapI de *Dichelobacter nodosus* (sp|Q46560) e as proteínas associadas a fagos XF1573 e XF1678 de *Xylella* (Figura 22). Essas últimas proteínas são idênticas e estão localizadas na região dos profagos XfP3 e XfP4 no genoma do clone 9a5c (X0).

A proteína VapI apresenta 45% de identidade com a ORF XF720 de *Xylella*, neste caso então todas as seqüências que foram encontradas nos diferentes isolados de *Xylella* que diferem do clone 9a5c provavelmente foram geradas por recombinação interna do genoma.

```

>sp|Q46560|VAPI_BACNO VIRULENCE-ASSOCIATED PROTEIN I
gb|AAB00945.1|(L31763) virulence-associated protein I [Dichelobacter nodosus]
      Length = 108

Score = 67.0 bits (162), Expect(2) = 3e-16
Identities = 32/53 (60%), Positives = 43/53 (80%)
Frame = -1

Query: 524 AIGITAARINEIVRDRRGITADTALRLARYFGTDPQSXLNLEQHYALECAKRD 366
      A+ ++ +RINEIVR++RGITADTALRL RYFG D QS LN++ Y L+ A++D
Sbjct: 37 ALHVSPSRINEIVREQRGITADTALRLVRYFGGDAQSWLNMQTAYDLKMAEQD 89

Score = 41.2 bits (95), Expect(2) = 3e-16
Identities = 17/24 (70%), Positives = 22/24 (90%)
Frame = -3

Query: 600 PPIHPGEILREEFMVPLGLSSNAL 529
      P IHPGEILREE++ P+GLS++AL
Sbjct: 11 PAIHPGEILREEYLLKPMGLSAHAL 34

>pir||C82664 phage-related protein XF1573 XF1678 [imported] - Xylella
fastidiosa
      (strain 9a5c)
gb|AAF84382.1|AE003986_12 (AE003986) phage-related protein [Xylella
fastidiosa]
gb|AAF84487.1|AE003993_6 (AE003993) phage-related protein [Xylella fastidiosa]
      Length = 112

Score = 68.6 bits (166), Expect(2) = 5e-14
Identities = 34/63 (53%), Positives = 41/63 (64%)
Frame = -2

Query: 1225 IIFMGSTLEDIRNFPTSARQALGRQLLRLQEGLDPDQDWKPMKTIGPGVREVRIHAGRSVP 1046
      I F GS L+D+R FP S R+ G QL ++Q G DP DWKPM T+G GVRE+RI R
Sbjct: 7 IEFRGSALDDLRAFPVSVRREAGYQLHQVQNGRDPDDWKPMPTVGRGVREIRI---RDAD 63

Query: 1045 GPF 1037
      G F
Sbjct: 64 GAF 66

Score = 32.0 bits (71), Expect(2) = 5e-14
Identities = 18/52 (34%), Positives = 27/52 (51%), Gaps = 3/52 (5%)
Frame = -1

Query: 1055 ERSGAF---YVTNIGNAVYVLHAFVKKKTQQLALRTLH*VSRDSNKLENKMSE 909
      + GAF YV + AVYVLH F KKT++ L ++ L N++ +
Sbjct: 61 DADGAFRVIYVAKLSEAVYVLHCFQKKTEKTKGDLVDAAKRYRDLFNEVGQ 112

```

Figura 22. Resultado do BLASTX no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

da seqüência consenso de nucleotídeos do fragmento de DNA da banda 1 dos isolados do Grupo B.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise da presença de profagos em isolados de *Xylella fastidiosa*

Os resultados de PCR indicam claramente que todos os isolados de *Xylella* utilizados nesse trabalho apresentam seqüências de fagos no genoma, descartando a hipótese de que a presença de fagos no genoma do clone 9a5c utilizado para o seqüenciamento poderia ser um evento específico daquela população.

Os resultados encontrados nos isolados de citros provenientes do Paraná diferiram dos isolados de citros do estado de São Paulo. Todos os isolados apresentaram um único produto amplificado pelos *primers* C e D nas condições experimentais utilizadas, em contraste com os isolados de citros do estado de São Paulo, onde foram amplificados dois fragmentos. Poucas substituições de bases no sítio de anelamento em um ou nos dois *primers* podem ser responsáveis por esse evento. Resultados semelhantes foram encontrados para os isolados de café. Para o isolado de videira, onde não houve amplificação pelos *primers* A e B. Neste caso os resultados de hibridização confirmam que não existe região de 1 kb amplificada pelos *primers* A e B no genoma do isolado de videira.

Trabalhos anteriores mostram que a variabilidade entre os isolados de citros é baixa, mas existente em regiões específicas. Leite *et al.* (1998) encontraram variação nos

perfis obtidos pelas endonucleases *NotI* e *SfiI* em isolados de citros e entre isolados de citros, café e videira. Em contraste, no trabalho de Xioting e Hartung (1999), nenhuma variação foi encontrada entre 64 isolados de citros analisados por rep-PCR. Com relação aos isolados de diferentes espécies hospedeiras Minsavage *et al.*(1994) encontrou um sítio de restrição *RsaI* que acontece em isolados ameixeira e outras espécies arbóreas que não em citros e videira no fragmento de DNA amplificado pelos *primers* RST31 e 32. Além disso, na análise da seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA amplificado pelos *primers* RST31 e 32 de isolados de videira, cafeeiro e amexeira demonstrou que existe polimorfismos do tipo substituição e de adição de bases a uma seqüência de 28 nucleotídeos (Pooler & Hartung, 1995). Como pode ser observado *Xylella fastidiosa* deve compreender uma única espécie com variações a nível sub e até infrasubespecífico.

Nossos resultados do seqüenciamento dos fragmentos amplificados pelos *primers* C e D corroboraram os resultados anteriores onde devem ocorrer variações discretas nos diferentes isolados de citros e café e variações maiores entre esses e o isolado de videira. A seqüência de nucleotídeos de 707 bases na região interna do fragmento de 1,2 kb do isolado de videira é totalmente diferente das mesmas bases em citros, sendo esta ausente em café. A seqüência deste fragmento em isolados de citros diferenciou dois grupos pelo polimorfismo encontrado em apenas 15 nucleotídeos.

O seqüenciamento, apesar de parcial do fragmento de 1,4 kb, reforçou as diferenças encontradas dentro dos isolados de citros, continuando a existir dois grupos separados, desta vez com diferenças significativas em 999 bases. Os isolados de citros do Paraná e os de café, apesar de apresentarem somente a banda de 1,4 kb, pertencem a

grupos diferentes quanto comparados a seqüências dos demais isolados de citros. Os isolados de citros do Paraná pertencem ao mesmo grupo do clone 9a5c (X0). Entre todos os isolados de citros avaliados, somente o isolado de Novais apresenta o mesmo perfil do clone. O isolado apresentado aqui como sendo de Cordeirópolis é o mesmo isolado do clone 9a5c proveniente do laboratório do Dr. Marcos Machado do Instituto Agrônomico de Campinas.

Os isolados de Itápolis e Rep3 de Araraquara podem fazer parte de um quarto grupo de isolados de citros, pois apresentam uma combinação entre os grupos definidos pelo seqüenciamento dos fragmentos amplificados pelos *primers* C e D. Entretanto, seria necessário a confirmação desses resultados através da obtenção de colônias isoladas de cada um deles e novas reações de PCR e seqüenciamento.

Um levantamento recente realizado pela Fundecitrus sobre a incidência da CVC no estado de São Paulo revelou uma redução de cerca de 10% na região Sul do estado (<http://www.fundecitrus.com.br/escvc.html>). Todos os isolados utilizados nesse trabalho, com exceção do isolado de Itapetininga, pertencem a região Norte. Seria interessante observar se existem diferenças significativas no perfil dos diferentes isolados quanto a presença do profagos nas duas regiões do estado de São Paulo.

5.2. Análise da seqüência de nucleotídeos das regiões amplificadas nos diferentes isolados de *Xylella fastidiosa*

Vários são os exemplos onde bacteriófagos são responsáveis pela aquisição de novas características pelos genomas hospedeiros. (Levin & Bergstrom, 2000). No caso específico do genoma da *Xylella fastidiosa*, na região interna do profago XfP1,

encontram-se duas ORFs (XF720 e XF721) com alto grau de similaridade a proteínas associadas a virulência em *Dichelobacter nodosus*. Mais especificamente, essas proteínas produzem uma toxina e um antídoto a essa toxina (Bloomfield et al., 1997). Acredita-se que nesta bactéria essas proteínas sejam responsáveis por manter toda a região Vap (*virulence associated protein*) com cerca de 5 genes no genoma de isolados virulentos (Bloomfield et al., 1997). O papel dessas ORFs no genoma da *Xylella* ainda precisa ser estudado, mas essa foi uma das regiões examinadas neste trabalho. Essas ORFs encontram-se no fragmento de 1,2 kb amplificados pelos *primers* C e D. Além disso, essa é a única região totalmente diferente a nível de nucleotídeos entre os pares de profagos Xfp1 e Xfp2. No profago Xfp2 essas duas ORFs estão substituídas por duas ORFs (XF2490 e XF2491) com alto grau de similaridade com proteínas do transposon de *Ralstonia eutropha*. Essas duas últimas ORFs estão localizadas no fragmento de 1,4 kb amplificado pelos *primers* C e D.

À exceção dos isolados de citros do Paraná e dos isolados de café, todos os demais isolados apresentam o fragmento amplificado de 1,2 kb. O polimorfismo encontrado nesse fragmento entre os diferentes isolados de citros é baixa, sendo que são mantidas as ORFs XF720 e XF721 com 100% de identidade e as ORFs XF719 e XF722 apresentam 92% e 89% de identidade respectivamente com as mesmas ORFs encontradas no genoma do clone 9a5c (X0). Essas ORFs apresentam similaridade com as proteínas da base gpV e gpW do fago ϕ CTX de *Pseudomonas aeruginosa* (Nakayama et al., 1999).

O isolado de videria por outro lado não apresenta as ORFs XF720 e XF721, que foram substituídas por uma região semelhante as ORFs XF2080 e XF2081 do genoma do clone 9a5c, que foram identificadas como codificando uma proteína hipotética e a proteína dinJ, envolvida no reparo de DNA. Entretanto essas ORFs não estão completas em videira. Resultados de hibridização seriam necessários para confirmar a ausência dessa região no genoma desse isolado, que poderia ser utilizada como alvo em estudos para determinar a especificidade pelo hospedeiro.

O seqüenciamento parcial do fragmento de 1,4 kb amplificado pelos *primers* C e D foi avaliado somente nos isolados de citros e café. Este foi o fragmento cujo seqüenciamento apresentou uma grande variação a nível de nucleotídeos. A análise da seqüência consenso obtida entre os dois grupos revelou que as ORFs 2490 e 2491 encontradas no clone 9a5c (grupo A) não estão presentes nos isolados do grupo B. O resultado do BLASTX da seqüência de nucleotídeos apresenta similaridade parcial com a proteína VapI de *Dichelobacter nodosus* e com as proteínas de fagos XF1573 e XF1678 localizadas nos profagos Xfp3 e Xfp4.

Os resultados encontrados com o seqüenciamento dos produtos de PCR sugerem que o que acontece com o genoma dos diferentes isolados de *Xylella* são eventos de recombinação interna. O seqüenciamento do genoma da *Xylella* revelou muitas regiões de repetições exatas e parciais, sendo que a maioria delas estavam associadas a regiões de fagos que podem estar envolvidas nesses eventos (Simpson *et al.*, 2000). A principal contribuição desta pesquisa reside no fato de que existem fagos nos isolados de *Xylella* de diferentes regiões e hospedeiros, e que estes estão organizados de maneira diferente.

5. A análise das seqüências de DNA que diferem das encontradas no clone 9a5c mostrou que essas regiões apresentam similaridade com outras regiões do genoma deste clone, sugerindo que foram originadas através de rearranjos internos no DNA.

6.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram as seguintes conclusões:

1. A análise por PCR e seqüenciamento mostrou a existência de regiões de profagos semelhantes às encontradas no clone 9a5c em populações naturais de *Xylella fastidiosa* isoladas de diferentes hospedeiros e de diferentes localidades.
2. A análise dos fragmentos amplificados pelos *primers* A-B e C-D mostrou que existe polimorfismo quanto a amplificação do número de fragmentos obtidos dentro dos diferentes isolados de citros e entre os isolados de citros, café e videira.
3. A análise da seqüência de nucleotídeos obtida da região amplificada pelos *primers* C e D mostrou que existe polimorfismo nas seqüências de 1,2 e 1,4 kb dentro dos isolados de citros e entre os isolados de citros, café e videira.
4. As análises dos fragmentos amplificados por PCR e de seqüenciamento definiram três grupos dentro dos isolados de citros. Um grupo diferenciado pela Amplificação de um único fragmento de DNA pelos *primers* C e D, e outros dois grupos diferenciados pelo polimorfismo de bases encontrados nas seqüências de DNA do fragmento amplificado pelos *primers* C e D.O isolado de videira apresenta as maiores diferenças em relação aos isolados de citros e café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALFANO, J.R.; CHARKOWSKI, A.O.; DENG, W.L.; BADEL, J.L.; DIJK, K.V, COLLMER, A. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. **Proceeding of National Academy of Science, USA**, v.97, n. 9, p. 4856-4861, 2000.

ALFANO, J.R; COLMER, A. The Type III (Hrp) Secretion Pathways of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking harpins, Avr Proteins, and Death. **Journal of Biotechnology**. p. 5655-5662, 1997.

ALM, R.A.; TRUST, T.J. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *Journal Molecular – JMM*. v. 77, p. 834-846, 1999.

AOYAMA A, HAMATAKE RK, MUKAI R, HAYASHI M. Purification of phi X174 gene C protein. **J Biol Chem.** V. ;258, p. 5798-5803, 1985.

BERETTA,M.J.G; BARTHE, G.A; CECCARDI, T.L; LEE, R.F; DERRICK, K.S. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease.**v.81, p. 1196-1198, 1997.

BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; CHAGAS,C.M; DERRICK, K.S; BARTHE, G.A; CECCARDI, T.L; LEE, R.F; PARADELA, O.; SUGIMORI, M.; RIBEIRO, I. First reported of *Xylella fastidiosa* in coffe. **Plant disease**, v.80, p.821, /Resumo/.1996.

BLATTNER, F. R; PLUNKETT, G.; BLOCH, C.A. et al.,. The complete genome of *Escherichia coli* K-12. **Science.** v. 277, p. 1453-1474, 1997.

BLOOMFIELD, G.A; WHITTLE, G.; MCDONAGH, M.B; KATZ, M.E; CHEETHAM, B.F. Analysis of sequences flanking the vap regions of *Dichelobacter nodosus*: evidence for multiple integration events, a killer system, and a new genetic element. **Microbiology**, v.143, p. 553-562, 1997.

CASJENS, S. The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. **Annu. Rev. Genetics**, v.32, p. 339-377, 1998.

CHAGAS, C.M; ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.134, p.306-312, 1992.

CHANG, C.J.; DONALDSON, R.C. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. **Phytopathology**, v.83, p.192-194, 1993.

CHANG, C.J; GARNIER, M.; ZREIK,L.; ROSSETTI,V.; BOVÉ,J., Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, p.137-142, 1993.

CHANG,C.J; WALKER, .JT. Bacterial leaf scorch of northern red oak: isolation, cultivation and pathogenicity of a xylem-limited bacteria. **Plant Disease**, v.72, p. 730-733, 1988.

CHEETHAM, B.F; KATZ, M. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. **Molecular Microbiology**, v.18, p. 201-208, 1995.

CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C.J; HOPKINS, D.L. Randomly amplified polymorphic DNA analys of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**,v.61, p. 1688-1690, 1995.

CHEN, J.; CHANG,C.J.L; JARRET,R.L. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**, v.82, p.973-977, 1992b.

CHEN, J.; CHANG, C.J; JARRET, R.L; GAWEL, N. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**. v.81, p.1209, 1991.

COSTERTON, J.W.; IRVIN, RT.; CHENG, K.J. The bacterial glycocalix in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiology**. v.35, p.299-324, 1981.

CRUZ, F.; DAVIES, J. Horizontal gene transfer and the origen of species: lessons from bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 8. n. 3, p. 128-133, 2000.

DAVIS, M.J; FRENCH, W.J; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phonydisease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, p.309-314, 1981a.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for Pierce's disease bacterium. *Phytopatology*, v.70, p. 425-429, 1980.

DAVIS, MJ; PURCELL, AH; THOMSON, SV. Pierce's disease of grapevine: isolation of the causal bacterium. **Science**. v.199, p.75-77, 1978.

DELCHER, A.L; SIMON, K.; FLEISCHMANN, et al.,. Alignment of whole genomes. **Nucleic Acids Research**. v. 27, p.2369-2376, 1999.

DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Citrus variegated chlorosis**. Bebedouro, SP.166p. 1998.

DONADIO, L.C; MOREIRA, C.S. Clorose variegada dos citros. In: Edição Comemorativa do 15^o Aniversário da Estação Experimental Citricultura de Bebedouro. Apoio Fundecitrus.p.27, 1997.

DOW, J.M; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants.

Yeast, v.17, p. 263-271, 2000.

FLEISCHMANN, R.D , et.al.; Whole- genome random sequencing and assembly of

Haemophilus influenzae. **Science**, v.269, p. 496-512, 1995.

FRASE, C.M.; GOCAYNE, J.D.; WHITE, O. et al.,. He minimal gene complement of

Mycoplasma genitalium. **Science**. v. 270, p. 397-403, 1995.

FRASER, C.M.& FLEISCHANN, R.D. Strategies for whole microbial genome

sequencing and analysis. **Electrophoresis**, v.18, p. 1207-1216, 1997.

FRASER, CM; EISEN, J; FLEISCHMANN, RD; KETCHUM, KA; PETERSON, S.

Comparative Genomics and Understanding of Microbial Biology. **Emerging**

Infectious Diseases, v.6,n.5, p. 505-512, 2000.

FROHME, M; CAMARGO, A; HEBER, S; CZINK, C; SIMPSON, JD; HOHEISEL,

JD, SOUZA,AP. Mapping Analysis *Xylella fastidiosa* genome. **Nucleid Acids**

Research, v. 28, n.16, p. 3100- 3104, 2000.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, v.80, p. 61-65, 1990

FRY, S.M.; Milholland, R.D; HUANG, P.Y. Isolation and growth of strains of *Xylella fastidiosa* from infected grapevines on nutrient agar media. **Plant disease**, v.74, p. 522-524, 1990.

FUNDECITRUS. SITE: <http://www.fundecitrus.com.br>. 2000.

GALLAN, J.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**. v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GIBBS, RA. Hares and tortoises in the race to sequence the human genome: expectations and realities. **Trends in Genetics**. v. 13, p.381-383, 1997.

HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRALANSKY, R.H., SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological

relationship with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.64, p. 591-597, 1994.

HEALY, F.G.; BUKHALID, R.A.; LORIA, R. Characterization of an Insertion Sequence Element Associated with Genetically Diverse Plant Pathogenic *Streptomyces* spp. v. 181, n.5, p. 1562-1568, 1999.

HENDRIX, R.W.; SMITH, M.C.M.; BURNS, R.N.; FORD, M. E.; HATFULL, G.F. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. **Proceeding of National Academy of Science, USA**. v. 96, p. 2192-2197, 1999.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, v. 85, p. 1368-1372, 1995.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H., PLAGENS, H., PIRKL, E, and HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.** v. 24, p. 4420-4449, 1996.

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

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* xylem- limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p. 271-290, 1989.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, v.75, p. 713-717, 1985.

JAIN, R; RIVERA, MC; LAKE, JA. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. **Proceeding of National Academy of Science, USA**, v.96, p. 3801-3806, 1999.

KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H. et al., Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Rese.** v. 3, p. 109-136, 1996.

KELUME, S., COLLMER, A. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, p1756-1761, 1993.

KUNST, F. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**. v. 390, p. 249-256, 1997.

LACAVAL, Isolamento, caracterização genética por RAPD e resistência a antibióticos em *Xylella fastidiosa*. Piracicaba, 2000, 108p. **Dissertação (M.S)**- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LAINE, M.J.; ZHANG, Y-P.; METZLER, M.C. IS1237, a Repetitive Chromosomal Element from *Clavibacter*

LAWRENCE, JG; OCHMAN, H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. **Proceeding of National Academy of Science, USA**. v. 95, p. 9413-9417, 1998.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S.

Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the agent causal.

Summa Phytopathologica, v.19, n.2, p. 123-125, 1993.

LEITE Jr, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose

variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.35, 1993.

LEIMAN, P.G.; KOSTYUCHENKO, V.A.; SHNEIDER, M.M. Structure of

bacteriophage T4 gene product 11, the interface between the baseplate and short tail

fibers. **Journal Molecular Biology**. v. 301, p. 975-985, 2000.

LEVIN, RB; BERGSTRON, CT. Bacteria are different: Observations, interpretations,

speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in

prokaryotes. **Proceeding o**

f National Academy of Science, USA. v. 97, n.13, p.6981-6985, 2000.

MARAIS, A.; BOVE, J.M.; REINAUDIN, J. Spiroplasma citri virus Sp-V1- derived

cloning vector: delection formation by illegitimate and homologous recombination

in a spiroplasmal host strain which probably lacks a functional recA gene. **Journal Bacteriology**. v. 178, p. 862-870, 1996.

MASZER, I; ROCHA, EPC; DANCHIN, A. Codon Usage and lateral gene transfer in *Bacillus subtilis*. **Current Opinium in Microbiology**. v.2, p. 524-528, 1999.

MHLANGA-MUTANGADURA, T; MORLIN, G; SMITH, AL; EISENSTARK, A; GOLOMB, M. Evolution of the Major Pilus Gene Cluster of *Haemophilus influenzae*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.17, p.4693-4703, 1998.

MIAO, E.A., MILLER, S.I. Bacteriophages in the evolution of pathogen-host interactions. **Proceeding of National Academy of Science**, v. 96, p. 9452-9454, 1999.

MINSAVAGE, GV; THOMPSON, CM; HOPKINS, DL; LEITE, RMVBC; STALL, RE. Developmente of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathogenic**, v. 84, p.456-461, 1994.

MUSCHEGIAN A.R.; KOONIN, E.V. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. **Proceeding of National Academy of Science, USA** .v.93, p. 1068-10273, 1996.

NAKAYAMA, K.; TAKASHIMA, K.; ISHIHARA, H, et al.,. The T-type pyocin of *pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. **Mol. Microbiological**. v. 38, p.213-231, 2000.

NAKAYAMA, K.; KANAYA, S.; MAKOTO, O., et al., . The complete nucleotide sequence of ϕ CTX, a cytotoxin- converging phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. **Molecular Microbiology**. v. 31, p. 399-419, 1999.

NELSON, KE; CLAYTON, RA; GILL, SR; GWINN, ML; DODSON, RJ; et al.,.
Evidence for lateral gene transfer between Archae and bacteria from genome
sequence of *Thermatoga maritima*. **Nature**, v.399, 1999.

OLIVER, S.G. From DNA sequence to biological function. **Nature**. v.15, p. 597-600,
1996

PAUL, JH. Microbial gene transfer: An Ecological Perspective. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v.1, p. 45-50, 1999.

PELLEGRINI, M; MARCOTTE, EM; THOMPSON, MJ; EISENBERG, D; YEATES, T.O. Assigning protein functions by comparative genome analysis: Protein phylogenetic profiles. **Proceeding of National Academy of Science, USA**. v.96, p.4285-4288, 1999.

POOLER, MR & HARTUNG, JS. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strain causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**. v. 31, p.377-381, 1995.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Especific detection and indetification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995a.

POOLER, MR & HARTUNG, JS. Genetic Relationships among strain of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR Data. **Current Microbiology**. v. 31, p.134-137, 1995b.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S.; FENTON, R.G. Sequence analysis of a 1296-nucleotide plasmid from *Xylella fastidiosa*. **Microbiology Letters**, v.155, p. 217-222, 1997.

PRESTON, GM; HAULBOLD, B; RAINEY, PB. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**. v.1, p. 589-597, 1998.

PURCELL, AH & HOPKINS, DL Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.34, p.131-151, 1996.

RAVEN, J.A. Phytophages of xylem and phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. **Advances in Ecology Research**, v.13, p.135-234, 1984.

ROSATO, Y.B.; NETO, J.R.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F.; MANFIO, G.P. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, p.593-598, 1998.

RHAME, L.G.; AUSUBEL, F.M.; CAO, H.; et al.,. Plantas and animals share functionally common bacterial virulence factors. . **Proceeding of National Academy of Science, USA**. v. 97, p. 8815-8821, 2000.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros- revisão. **Laranja**, v.11, p.1-14, 1990.

SALVA, A.M.; IBE, B.O.; CLIBORN, E.; REYES, G.; ROJ, J.U. Hypoxia attenuates metabolisms of patelet activating factor by fetal and newcorn lamb lungs. **Proceeding of National Academy of Science, USA**, v.37, p. 723-129, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C. et al. ARRUDA, P. The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-159, 2000.

STERKY, F; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, v.76, p.1-31, 2000.

STRAUSS, EJ; FALKOW, S. Microbial Pathogenesis: Genomics and Beyond. **Science**, v.276, p.707-712, 1997.

SULLIVAN, J.T.; RONSON, C.W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe- tRNA gene. **Proceeding of National Academy of Science, USA**. v.95, p. 5145-5149, 1998.

TETTELIN, H.; SAUNDERS, N.J; HEIDELBERG, J. et al.,. Complete Genome of *Neisseria meningitides* Serogroup B strain MC58. **Science**. v. 287, p. 1809-1815, 2000.

VOGEL, JP; ANDREWS, HL; WONG, SK; ISBERG, RR. Conjugative Transfer by the virulence System of *Legionella pneumophila*. **Science**. v.279, p.873-876, 1998.

WELLS, JM; RAJU, BC; HUNG, H; WEISBURG, WG; MANDELCO- PAUL, L; BRENNER, DJ. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. Nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas spp.* Int. J. of System. **Bacteriology**, v.37,p.136-143, 1987.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p.357-363, 1981.

WOLF, YI; ARAVIND, L; KOONIN, EV. *Rickettsiae* and *Chlamydiae* evidence of horizontal gene transfer and gene exchange. **Tig**, v.15, p.173-175, 1999.

WRAY, GA; ABEUHEIF, E. When is homology not homology? . **Current Opinion in Genetics & Evolution**, v.8, p.675-680, 1998.
