

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Xylella fastidiosa* DE CAFEIROS DO ESTADO DA BAHIA ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO

CARVALHO, F.M.S.<sup>1</sup>; MENEGUIM, L.<sup>2</sup>; SOUZA, S.E.<sup>3</sup> e LEITE Jr., R.P.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> IAPAR, C. P. 481, 86001-970, Londrina-PR; <sup>2</sup> UNIFIL, Rua Alagoas, 2050, 86020-430, Londrina-PR; <sup>3</sup> UESB, Vitória da Conquista-BA; <sup>4</sup> Bolsista CNPq; <flaviaregis@bol.com.br>

**RESUMO:** *Xylella fastidiosa* é agente causal de doenças em diversas plantas de interesse econômico. No Brasil, foi relatada como causadora de escaldadura da folha de ameixeira, clorose variegada dos citros e depauperamento do cafeeiro. Estudos de variabilidade genética indicam que *X. fastidiosa* se constitui em uma única espécie. Entretanto, são necessários mais estudos para verificar a diversidade genética de *X. fastidiosa* que ocorre no Brasil. No presente estudo, 12 isolados de *X. fastidiosa* procedentes de isolamentos de cafeeiros do Estado da Bahia foram analisados através de perfis genômicos, comparativamente com isolados de cafeeiro dos Estados do Paraná e São Paulo e isolados de videira, ameixeira, citros e de vinca. Todos os isolados utilizados no presente estudo foram caracterizados por meio da análise em gel de agarose em campo pulsado ("pulsed field"). Perfis genômicos obtidos a partir de restrição com a endonuclease *Swa* I permitiram diferenciar cinco grupos geneticamente distintos entre os 12 isolados da Bahia. A similaridade genética variou de 0,46 a 0,75, indicando alta variabilidade da bactéria *X. fastidiosa* proveniente de uma mesma planta hospedeira e uma única região geográfica. A similaridade genética entre isolados de videira, ameixeira, citros, cafeeiros de São Paulo e Paraná, vinca e os isolados de cafeeiros do Estado da Bahia variou de 0,12 a 0,95. Esses dados sugerem que existe especificidade bactéria-hospedeiro, assim como alta variabilidade genética, de isolados de *X. fastidiosa* no Estado da Bahia.

**Palavras-chave:** *Xylella fastidiosa*, café, *Coffea arabica*, diversidade genética, campo pulsado.

### GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF *XYLELLA FASTIDIOSA* FROM COFFEE THE BAHIA STATE BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS

**ABSTRACT:** *Xylella fastidiosa* is the causal agent of several economically important plant diseases. In Brazil, it causes the plum leaf scald, citrus variegated chlorosis and coffee leaf scorch. The main way of transmission of the bacterium is through xylem-feeding insects. There is a need for studies on the genetic diversity of *X. fastidiosa* that occurs in Brazil. In the present study, 12 strains of *X. fastidiosa* from coffee trees of the State of Bahia were analyzed comparatively based on the genomics

profiles. For comparative purposes, strains of coffee from the States of Paraná and São Paulo, and strains from grapevine, plum, citrus and vinca were included in the study. The isolates were characterized based on genomic analysis by pulsed field gel electroforesis. Genomic profiles were obtained by restriction with the endonuclease *Swa* I. Five groups genetically distincts were found for the 12 strains of *X. fastidiosa* from Bahia. The genetic similarity ranged from 0.46 to 0.75 among these 12 strains. The genetic variability among the coffee strains from Bahia and the strains of grapevine, plum, citrus, coffee of São Paulo and Panara and vinca ranged from 0.12 to 0.95. These results suggest host specificity for the *X. fastidiosa* in Brazil, as well as a high genetic variability among the strains of *X. fastidiosa* from coffee of the State of Bahia.

**Key words:** *Xylella fastidiosa*, coffee, *Coffea arabica*, diversity characterization, pulsed field.

## INTRODUÇÃO

*X. fastidiosa* (Wells et al., 1987) foi relatada causando depauperamento em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) no Estado de São Paulo em 1995 (Paradela et al., 1995). Atualmente, a associação de *X. fastidiosa* com cafeeiro foi constatada em diversas regiões produtoras dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (Paradela et al., 1995; Lima et al., 1996; Ueno & Leite, 1996; Carvalho et al., 2000). Os sintomas associados com infecção por *X. fastidiosa* em cafeeiro são freqüentemente atribuídos a outros problemas, como bicho-mineiro (*Perileucoptera coffeella* Guein. & Meneville), ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.), estresse hídrico ou destruição do sistema radicular por nematóides (Lima et al., 1998). Estudos de variabilidade genética de *X. fastidiosa* suportam a hipótese de que essa bactéria constitui uma espécie única (Wells et al., 1987; Chen et al., 1992). Trabalhos indicam variabilidade genética entre os isolados de *X. fastidiosa* suficiente para justificar a separação ao nível infra-subespecífico (Wells et al., 1987; Hopkins, 1989; Chen et al., 1992). Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para reforçar essas informações sobre a variabilidade da bactéria e melhor caracterizar a *X. fastidiosa* que ocorre no Brasil. O estudo realizado teve como objetivo examinar vários isolados de *X. fastidiosa* de cafeeiros de diferentes regiões geográficas. Outras estirpes da bactéria, estabelecidas de diferentes plantas cultivadas, foram incluídas no estudo para fins comparativos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Preparação do DNA bacteriano.** Doze isolados de *X. fastidiosa* procedentes de isolamentos de cafeeiros do Estado da Bahia e quatro do Estado do Paraná foram incluídos no estudo (Tabela 1). Também foram incluídos isolados de videira (EUA), ameixeira (PR), citros (SP, PR e SC) e vinca (PR), que fazem parte da coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônômico do Paraná (Tabela 1). Após crescimento e obtenção de culturas puras, células bacterianas foram utilizadas para extração de DNA em blocos de agarose. Para preparação de blocos de agarose contendo DNA bacteriano foram utilizadas suspensões de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL dos isolados de *X. fastidiosa*. O protocolo utilizado foi basicamente o descrito por Egel et al. (1991). Para a digestão de DNA bacteriano foi utilizada a endonuclease de sítio raro *Swa* I. Secções dos blocos contendo DNA bacteriano foram lavadas com tampão da enzima fornecido pelo fabricante. O tampão foi trocado após 15 minutos e, em seguida, foram adicionadas 30 unidades da enzima *Swa* I por um período mínimo de oito horas, a 25°C. Após esse período, foram feitas as lavagens das secções com solução de lise sem proteinase K, a 50°C (Egel et al., 1991).

**Eletroforese em campo pulsado.** A eletroforese em campo pulsado foi conduzida no equipamento Gene Navigator (Pharmacia, Uppsala, Suécia), contendo cerca de 2 litros de tampão TBE 0,5 X (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). As secções de agarose preparadas foram depositadas em poços gel de agarose a 1,2%, preparado com tampão TBE 0,5 X. Os poços foram selados com agarose 1% de baixo ponto de fusão, fundida no mesmo tampão. A corrida foi realizada a 185 V (14,8 v/cm), sob temperatura de 10°C. O programa de pulsos empregado foi de 3 segundos durante uma hora, seguido de 10 segundos durante 23 horas. Concatâmeros de fago lambda foram usados como marcadores moleculares. A coloração do gel foi feita com brometo de etídio (0,5 mg/L), e o gel foi fotografado com filme polaróide 667 preto e branco (Polaroid Corporation, MA, EUA).

**Análise dos dados.** Perfis genômicos únicos foram analisados conjuntamente através da determinação visual da presença ou ausência de bandas de DNA. A presença ou ausência de uma banda em cada posição ao longo do perfil de cada isolado foi convertida em dados binários (1 para a presença e 0 para ausência). Coeficientes de similaridade foram determinados aos pares, utilizando o coeficiente de Dice, comparando fragmentos maiores que 40 Kb. Para isso, foi utilizada a equação matemática proposta por Nei & Li (1979), que se baseia na proporção de fragmentos de DNA comuns entre os pares e representa o coeficiente de similaridade entre eles. As relações genéticas foram determinadas utilizando o programa computacional NTSYS e o método UPGMA (Rohlf, 1993).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

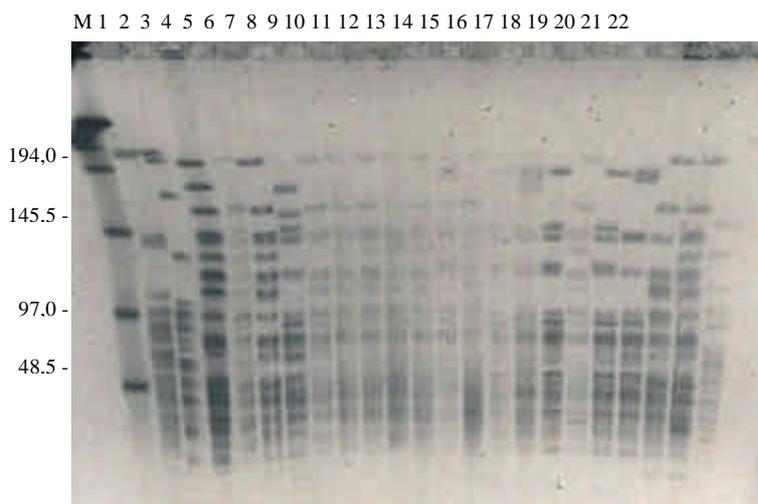
Foram comparados 12 isolados de *X. fastidiosa* de cafeeiros infectados do Estado da Bahia por meio de perfis genômicos de restrição do DNA bacteriano. Utilizando a endonuclease de restrição *Swa* I, foram observados cinco grupos geneticamente distintos entre os 12 isolados estudados (Figura 1). O grupo 1 foi representado por seis isolados (50,0%); o grupo 2, por apenas um (8,0%); o grupo 3, por três (25,0%); o grupo 4, por apenas um (8%); e o grupo 5, também por um único isolado (8%). Do total de isolados, cinco foram obtidos de cafeeiros procedentes do Planalto da Conquista; dentre esses isolados, foi verificado apenas um único perfil genético (grupo 1). Entre os cinco isolados obtidos da Chapada Diamantina, existem representantes para três diferentes grupos (grupos 3, 4 e 5). Os dois isolados do sul da Bahia representaram dois grupos genéticos (grupos 1 e 2). Esses resultados mostram que não existe correlação entre perfil genético e origem geográfica dos isolados de cafeeiros do Estado da Bahia. Também foram comparados perfis genômicos de restrição de um isolado de *X. fastidiosa* de videira, um de ameixeira, três de citros, quatro isolados de cafeeiros do Paraná e um isolado de vinca, totalizando 10 isolados da coleção de bactérias utilizadas como padrão comparativo. A análise eletroforética em campo pulsado revelou perfis geneticamente distintos entre esses isolados. O DNA genômico restringido com a endonuclease *Swa* I produziu de 8 a 13 fragmentos de tamanhos entre 48,5 a 200 Kb para todos os isolados utilizados neste estudo. Os isolados de videira, ameixeira, citros, cafeeiros de São Paulo e Paraná e o isolado de vinca apresentaram diferenças evidentes entre os perfis genômicos e distintos dos cinco perfis encontrados para os 12 isolados de *X. fastidiosa* de cafeeiro do Estado da Bahia, com exceção de um isolado de cafeeiro da Bahia (12728), que apresentou perfil genômico semelhante aos perfis dos isolados de cafeeiros do Estado do Paraná (Figura 2). A resolução de fragmentos únicos permitiu a análise numérica (1 para presença e 0 para ausência) entre os diferentes isolados de *X. fastidiosa*. Com base na proporção de fragmentos comuns, comparando-se fragmentos maiores que 40 Kb, foi possível determinar os coeficientes de similaridade entre os isolados estudados (Tabela 2). Os isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira e os isolados de citros 12307, 11067 e 11380 (SP, PR e SC) apresentaram-se geneticamente distantes entre si, bem como com os isolados de *X. fastidiosa* do Estado da Bahia. Entretanto, um isolado da Bahia (12729) apresentou similaridade de 67% com os isolados de citros do Paraná e Santa Catarina (Tabela 2). A similaridade genética entre os isolados de videira (8935), ameixeira (9746), citros de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (12307, 11067 e 11380), cafeeiro de São Paulo (11782) e os isolados de cafeeiros do Paraná (12735, 12737 e 12752) apresentaram similaridade genética que variou de 0,25 a 0,95. Entre eles e os isolados de cafeeiros do Estado da Bahia a variação foi de 0,25 a 0,93 (Tabela 2). O isolado de *X. fastidiosa* obtido de vinca (*Catharanthus roseus*) apresentou grande dissimilaridade entre todos os

isolados estudados, com similaridade variando entre 12% e 37%. Os 12 isolados do Estado da Bahia utilizados neste estudo apresentam cinco perfis genômicos distintos e similaridade que variou de 0,46 a 0,75 (Tabela 2). O isolado 12728 do Estado da Bahia que apresentou apenas 46% de similaridade genética com os demais isolados deste Estado mostrou maior similaridade com os isolados de cafeeiros do Paraná, variando de 0,86 a 0,93 (Tabela 2). Este resultado indica uma possível introdução da estirpe encontrada no Estado da Bahia para o Estado do Paraná. Além disso, os isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira e 12307, 11067 e 11380 de citros dos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina e 12309 de vinca apresentam coeficientes de similaridade que revelaram grande variabilidade genética, o que sugere a existência de especificidade bactéria-hospedeiro (Tabela 2), assim como alta variabilidade genética de isolados do Estado da Bahia. No entanto, a utilização de outra endonuclease de sítio raro poderá esclarecer melhor essas relações genéticas entre os isolados estudados.

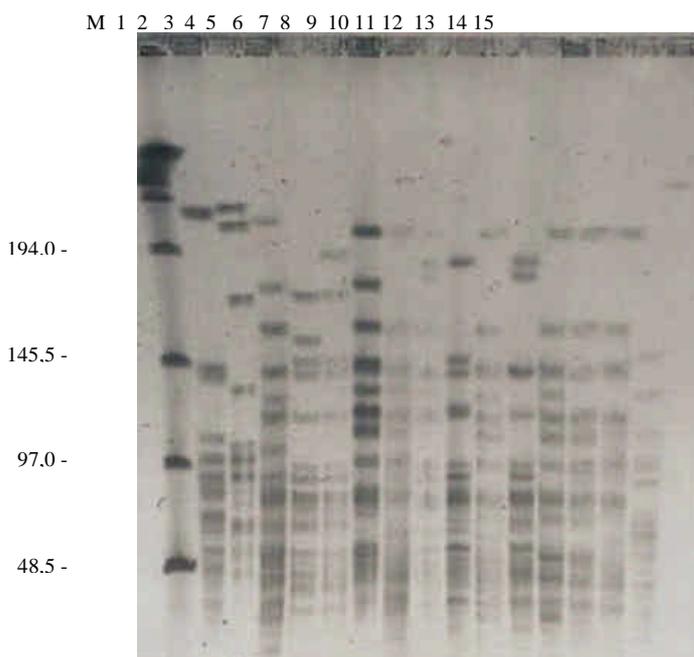
O dendograma obtido com base no método UPGMA apresentou seis grandes ramificações, compreendendo ramificações únicas os isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira, 12307 de citros e 12309 de vinca (Figura 3). Os isolados 11067 de citros (PR), 11380 de citros (SC), 12729, 12721 e 12732 de cafeeiros da Bahia estão em uma mesma grande ramificação (Figura 3). Os isolados 11782, 12735, 12737 e 12752 de cafeeiros do Estado do Paraná e os isolados 12720 e 12728 de cafeeiros da Bahia também estão em uma mesma ramificação (Figura 3). Portanto, a análise de cluster dos perfis genômicos dos isolados de *X. fastidiosa* estudados sugere que a distância genética entre eles está relacionada com a planta hospedeira, embora dois isolados de citros, 11067 e 11380 (PR e SC), tenham-se apresentado dentro de uma grande ramificação juntamente com os isolados de cafeeiros da Bahia. Além disso, também é possível verificar por este dendograma que o isolado 12309 de vinca do Estado do Paraná está geneticamente mais distante de todos os isolados estudados.

**Tabela 1** - Isolados de *Xylella fastidiosa* utilizados neste estudo

<b>Isolado</b>	<b>Região</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>
8935	-	Videira	EUA
9746	-	Ameixeira	Paraná
12307	-	Citros	São Paulo
11067	-	Citros	Paraná
11380	-	Citros	Santa Catarina
11782	-	Cafeeiro	Paraná
12717	Planalto da Conquista	Cafeeiro	Bahia
12718	Planalto da Conquista	Cafeeiro	Bahia
12719	Planalto da Conquista	Cafeeiro	Bahia
12720	Planalto da Conquista	Cafeeiro	Bahia
12721	Sul da Bahia	Cafeeiro	Bahia
12722	Sul da Bahia	Cafeeiro	Bahia
12726	Chapada Diamantina	Cafeeiro	Bahia
12728	Chapada Diamantina	Cafeeiro	Bahia
12729	Chapada Diamantina	Cafeeiro	Bahia
12730	Planalto da Conquista	Cafeeiro	Bahia
12731	Chapada Diamantina	Cafeeiro	Bahia
12732	Chapada Diamantina	Cafeeiro	Bahia
12735	Norte	Cafeeiro	Paraná
12737	Norte	Cafeeiro	Paraná
12752	Norte	Cafeeiro	Paraná
12309	Norte	Vinca	Paraná



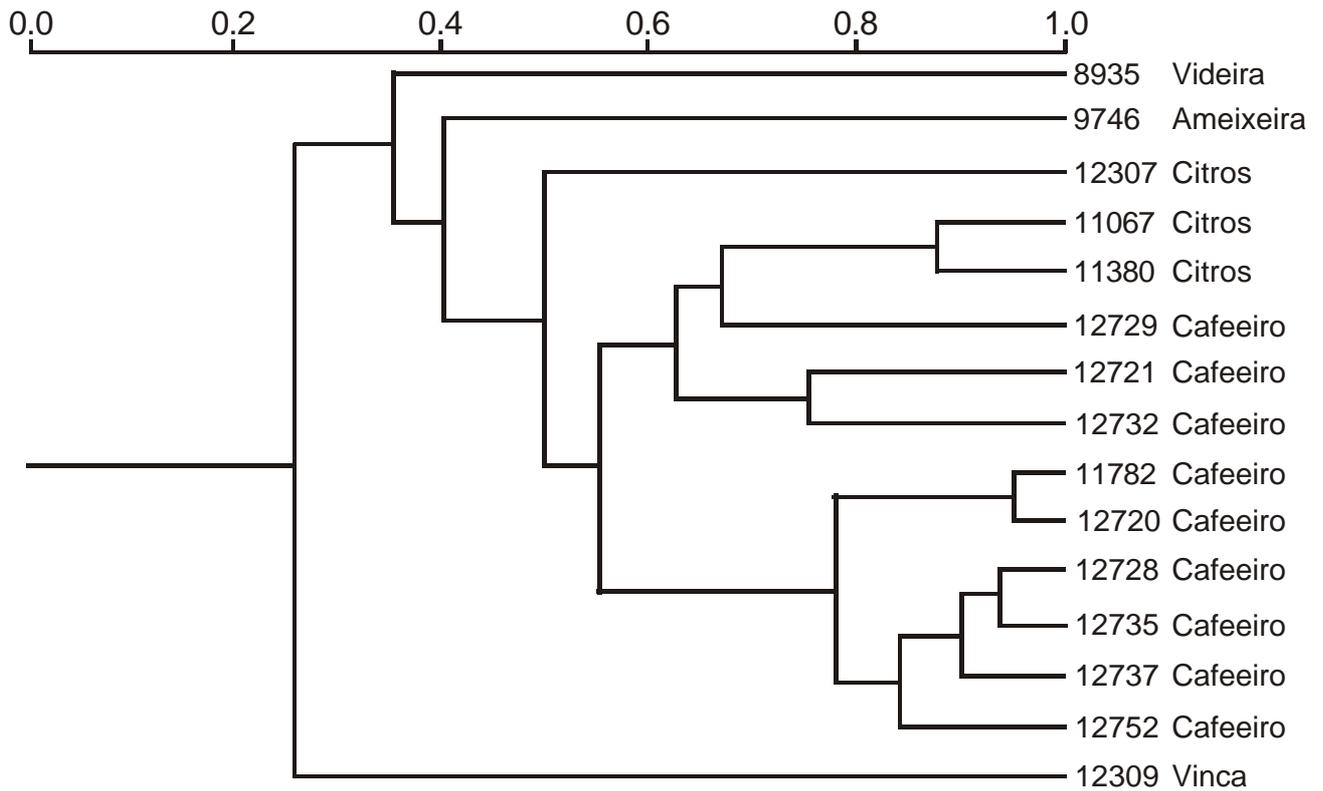
**Figura 1** - Perfis genômicos de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando a endonuclease de restrição *Swa* I. Coluna M corresponde ao marcador molecular Lambda. Colunas 1 a 22 correspondem, respectivamente, aos isolados 8935 (videira), 9746 (ameixeira), 11782 (café PR), 9712 (café SP), 12288 (café PR), 11067 (citros PR), 12723 (café PR), 12717 (café BA), 12718 (café BA), 12719 (café BA), 12720 (café BA), 12721 (café BA), 12722 (café BA), 12726 (café BA), 12728 (café BA), 12729 (café BA), 12730 (café BA), 12731 (café BA), 12732 (café BA), 12734 (café PR), 12735 (café PR) e, 12309 (vinca). Marcador molecular está apresentado em kilobases.



**Figura 2** - Perfis genômicos de isolados de *Xylella fastidiosa* utilizando a endonuclease de restrição *Swa* I. Coluna M corresponde ao marcador molecular Lambda. Colunas 1 a 15 correspondem respectivamente aos isolados 8935 de videira, 9746 de ameixeira, 12307, 11067 e 11380 de citros (SP, PR e SC), 11782 de cafeeiro (PR), 12720 (grupo 1), 12721 (grupo 2), 12729 (grupo 3), 12728 (grupo 4), 12732 (grupo 5), 12735, 12737 e 12752 de cafeeiros do PR e 12309 de vinca. Marcador molecular está apresentado em kilobases.

**Tabela 2** - Valores do coeficiente de similaridade genética entre isolados de *Xylella fastidiosa* estimados com base em perfis de restrição utilizando a endonuclease *Swa* I

Isolado	Isolado														
	8935	9746	12307	11067	11380	11782	12720	12721	12729	12728	12732	12735	12737	12752	12309
	videira	ameixeira	citros			cafeeiro						vinca			
8935	-														
9746	0,40	-													
12307	0,26	0,33	-												
11067	0,43	0,47	0,47	-											
11380	0,43	0,47	0,47	0,87	-										
11782	0,25	0,42	0,42	0,55	0,55	-									
12720	0,27	0,44	0,44	0,59	0,59	0,95	-								
12721	0,37	0,53	0,53	0,55	0,55	0,70	0,74	-							
12729	0,46	0,37	0,50	0,67	0,67	0,59	0,62	0,59	-						
12728	0,31	0,25	0,50	0,40	0,40	0,71	0,75	0,59	0,57	-					
12732	0,50	0,53	0,53	0,71	0,71	0,50	0,53	0,75	0,61	0,46	-				
12735	0,29	0,35	0,59	0,50	0,50	0,78	0,82	0,67	0,53	0,93	0,57	-			
12737	0,31	0,37	0,50	0,53	0,53	0,82	0,87	0,71	0,57	0,86	0,61	0,93	-		
12752	0,31	0,25	0,50	0,40	0,40	0,71	0,75	0,59	0,57	0,86	0,46	0,80	0,85	-	
12309	0,15	0,37	0,12	0,27	0,27	0,35	0,37	0,35	0,14	0,14	0,31	0,27	0,28	0,14	-



**Figura 3** - Dendrograma dos isolados de *Xylella fastidiosa* utilizados neste estudo, inferido a partir de perfis genômicos de DNA digeridos com endonuclease de restrição *Swa* I e construído através do pacote computacional NTSYS, utilizando o método UPGMA

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, F.M.S., MENEGUIM, L. & LEITE JR., R.P. Levantamento da distribuição de *Xylella fastidiosa* associada a *Coffea* spp. em regiões cafeeiras do Paraná. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Resumos Expandidos**: 287-290. 2000.
- CHEN, J., CHANG, C.J., JARRET, R.L. & GAWEL, N. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. **Phytopathology**. 82: 973-977. 1992.
- EGEL, D.S., GRAHAM, J.H. & STALL, R.E. Genoeic relatednes of *Xanthomonas campestris* causing diseases of citrus. **Appl. Eviron. Microbiol.**,57: 2724-2730. 1991.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 27: 271-290. 1989.
- LIMA, J.E.O., MIRANDA, V.S., COUTINHO, A., ROBERTO, S.R. & CARLOS, E.F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*. **Fitopatol. bras.**, 21: 392-393. 1996.
- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R. & CARLOS, E.F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Dis**, 82: 94-97. 1998.
- NEI, M. & LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 75: 5269-5273. 1979.
- PARADELA FILHO, O., SUGIMORI, M.H., RIBEIRO, I.J.A., MACHADO, M.A., LARANJEIRA, F.F., GARCIA JR., A. & BERETTA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros, **Laranja**. 1: 135-136. 1995.
- ROHLF, F.S. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied **Biostatistics Inc. Setauket, NY**, 18, p.191. 1993.
- UENO, B. & LEITE JR., R.P. Estudo da variabilidade de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de cafeeiros e citros através da análise de proteínas totais. **Fitopatol. bras.**, 21: p.341. 1996.
- WELLS, J.M., RAJU, B.C., JUNG, H;Y., WEISBURG, W.G., MANDELCO-PAUL, L. & BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 37: 139-143. 1987.