

BC/34756
IB/80916



T/UNICAMP

F413_p



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

Primers desenvolvidos através de hibridização subtrativa e RAPD
para a detecção de *Xylella fastidiosa*

23/05/98 Ymm
este exemplar corresponde à redação final
na tese de (a) candidato a)
Henrique Ferreira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Henrique Ferreira

Orientador: Dra. Yoko Bomura Rosato

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.

Campinas - São Paulo

1998



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
EDIC.	
V.º	
FOL.º	34756
PRO.º	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/98
N.º CPD	40011535C1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

F413p

Ferreira, Henrique

Primers desenvolvidos através de hibridização subtrativa e RAPD para a detecção de *Xylella fastidiosa* / Henrique Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Yoko Bomura Rosato.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.


1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Diagnóstico.
3. Citros. I. Rosato, Yoko Bomura. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e data da defesa pública: Campinas, 21 de Maio de 1998

Banca examinadora

Titulares:

Prof^a. Dra. Yoko Bomura Rosato (orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano



Assinatura

Dr. Rui Pereira Leite Jr.



Assinatura

Suplente:

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Assinatura

Dedico esta Tese ao meu falecido Pai

José Ferreira Neto.

*Agradeço-lhe por minha vida, por minha educação,
e pela convivência maravilhosa que proporcionou aos seus familiares.*

Que Deus lhe abençoe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais esta oportunidade.

Às minhas mães Dirce Maria Ferreira e Maria Lúcia Ferreira, que fizeram absolutamente todo o possível para que eu pudesse concluir meus estudos e realizar meus sonhos. Aos meus familiares e em especial à minha madrinha Rosa Meire Ferreira Vander Velden, que de forma paciente e carinhosa tem me apoiado durante toda minha vida.

À minha amada Ivy Freitas Lau, por seu companheirismo, seu amor, dedicação, paciência e pela presença sempre agradável e alegre.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela primeira acolhida, pelo estímulo e pelo constante acompanhamento.

À Prof^a. Dra. Yoko Bomura Rosato, por me receber em seu laboratório, por me ensinar a trabalhar e por sua atenção irrestrita. Agradeço-lhe a orientação, o apoio, as críticas sempre construtivas e a amizade.

Aos co-orientadores e amigos ("os ambos") Edmilson Ricardo Gonçalves e Sandra Toshico Tahara, que pacientemente me assistiram, não só durante meus primeiros anos no CBMEG, como durante todo o meu Mestrado.

Aos colaboradores e amigos do Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Luís Otávio Saggion Beriam, Júlio Rodrigues Neto, Valdemar Atilio Malavolta Jr. e Irene Maria Gatti de Almeida.

Às secretárias Teresinha Vieira Araújo de Pádua Chiodetto (pós-graduação do Depto. Genética e Evolução, IB) e Claudia Maria Pereira (CBMEG) pela atenção, carinho e colaboração, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao amigo Antônio C. D. Abreu, que sem dúvida colaborou de forma direta para a conclusão deste trabalho, e aos amigos do Centro Espirita Casa do Caminho e de sua Mocidade. Obrigado.

Aos demais amigos, professores e funcionários, com quem tive o prazer de conviver durante minha passagem pela UNICAMP e que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão de mais uma etapa em minha vida, ofereço os meus mais sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

	Página
Resumo	vi
Summary	viii
Introdução	1
Objetivos	3
Revisão Bibliográfica	4
<i>Xylella fastidiosa</i>	4
Hospedeiros e doenças causadas.....	7
Clorose Variegada do Citros (CVC).....	9
Métodos de detecção utilizados para <i>X. fastidiosa</i>	11
Hibridização subtrativa.....	16
Parte I - Coffee- and CVC-related <i>Xylella fastidiosa</i> detection using primers selected by subtractive hybridization with deletion enrichment method and RAPD	19
Parte II - Análises complementares: is f14 encoding for an extensin-like peptide?	49
Conclusões	54
Bibliografia Geral	55

RESUMO

Uma linhagem bacteriana de *Xylella fastidiosa*, isolada de *Citrus sinensis* apresentando sintomas de clorose variegada dos citros (CVC), foi submetida a um protocolo de hibridização subtrativa rápido e simples. Como resultado deste procedimento, foram clonados quatro fragmentos de DNA diferenciais, sendo estes testados como sondas para a detecção desta bactéria. Em experimentos de hibridização utilizando-se “dot-blot” e “Southern-blot”, somente amostras de DNA de *X. fastidiosa* hibridizaram com os quatro fragmentos marcados e utilizados como sondas, onde um deles, f14, foi escolhido para análises posteriores de seqüenciamento. A seqüência de nucleotídeos deste fragmento não apresentou homologias significativas com nenhuma seqüência de DNA depositada no banco de dados “GenBanK”. Entretanto, uma seqüência de aminoácidos deduzida (F14) mostrou similaridades com domínios específicos, ricos em prolina, característicos de extensinas, uma classe de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) constituinte de paredes celulares de plantas e algas. Prolina é o aminoácido mais abundante em F14, seguido por Arg, Thr, Ser, Val, Leu, Ala e Gly, todos comumente encontrados em proteína de parede celular. Com base na seqüência de nucleotídeos de f14 foram construídos primers para a utilização em testes diagnósticos para *X. fastidiosa* através de PCR. Estes primers foram capazes de amplificar DNAs de diferentes linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de ameixeira, videira, pereira, oleander e citros, além de outras linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Ca110), *X. axonopodis* pv. *citri* (223), *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (1297), *Burkholderia andropogonis* (166) e *E. coli* (DH5 α); porém, somente linhagens de *X. fastidiosa*

apresentaram um produto de amplificação específico de 600 pb. Estes primers não detectaram a bactéria em extratos obtidos de plantas de citros com sintomas de CVC. Um segundo par de primers foi desenvolvido baseado em um produto de RAPD-PCR específico para linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de citros. Com o uso do primer OPR-2 (Operon Technologies, Inc.) foi identificado um fragmento de cerca de 900 pb, existente em diferentes linhagens de *X. fastidiosa* e não detectado em outras bactérias fitopatogênicas. Esse fragmento foi clonado e 200 pb de cada uma de suas extremidades foram sequenciados. A partir destas sequências, um novo par de primers (JB1-1 e JB1-2) foi construído, onde, dependendo da temperatura de anelamento utilizada na reação de PCR, foi possível detectar somente linhagens de *X. fastidiosa* relacionadas com CVC e depauperamento das folhas de cafeeiros presentes em extratos de plantas infectadas.

SUMMARY

A CVC-related *Xylella fastidiosa* strain was submitted to a fast and simple protocol of subtractive hybridization. Four differential DNA fragments were cloned and tested as probes for *X. fastidiosa* detection. In dot and Southern hybridization experiments, only DNAs from *X. fastidiosa* strains hybridized with the labelled fragments and one of them, f14, was chosen for further analysis. The nucleotide sequence of f14 showed no homology to any sequence in the GenBank. One deduced amino acid sequence however revealed a putative peptide (F14) which shared similarities in specific proline-rich domains with extensins, hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) from plant and algae cell walls. Proline was the most abundant amino acid found in the F14 sequence, followed by Arg, Thr, Ser, Val, Leu, Ala and Gly, all of them commonly present in cell wall structural proteins. Using the f14 nucleotide sequence, a pair of primers was designed for PCR-based diagnosis of *X. fastidiosa* strains. These primers amplified DNAs from different *X. fastidiosa* strains isolated from citrus, plum, grapevine, pear and oleander, as well as from some pathogenic bacteria, but only *X. fastidiosa* strains presented a diagnostic amplification product of 600 bp long. These primers did not detect the bacteria in citrus symptomatic plant extracts. A second pair of primers was developed based on a RAPD-PCR differential product for *X. fastidiosa* strains. The designed primers (JB1-1 and JB1-2), amplified a fragment of 900 bp from all strains of *X. fastidiosa* at the annealing temperature of 62-68°C and only CVC and coffee-related strains at a more stringent temperature (68-70°C). The bacteria were also detected in extracts from symptomatic citrus and coffee plants, as well as from an asymptomatic citrus seedling artificially inoculated.

1. INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa (Wells *et al.*, 1987) é uma bactéria gram-negativa, que pode ser encontrada associada ao xilema de diversas plantas mono e dicotiledôneas, causando doenças (Hopkins, 1989). Dentre as doenças que têm sido atribuídas à esta bactéria, e que respondem por sérias perdas econômicas, pode-se citar: o Mal de Pierce (PD), redução do porte do pessegueiro (PPD), escaldadura das folhas de ameixeira (EFA), depauperamento das folhas do cafeeiro (CLS) e clorose variegada dos citros (CVC) (Hopkins, 1989; Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Beretta *et al.*, 1996). As duas últimas foram detectadas recentemente e apenas no Brasil (French & Kitajima, 1978; Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Beretta *et al.*, 1996). Os principais sintomas observados em plantas infectadas por *X. fastidiosa* são: necrose e abscisão das folhas, bem como retardo de crescimento, com queda da produção e redução de tamanho dos frutos (Hopkins, 1989); todos estes fatores sugerem uma disfunção do sistema de condução de água, mais especificamente, oclusões do xilema. A transmissão desta bactéria se dá por insetos sugadores do xilema de plantas, popularmente conhecidos por “cigarrinhas” (Purcell & Hopkins, 1996; Gravena *et al.*, 1997).

Métodos diagnósticos são importantes para a identificação e estudo do patógeno, além de fornecer subsídios para um melhor entendimento dos processos de transmissão e mecanismos de doença. Entretanto, diversas dificuldades têm sido encontradas no isolamento e cultivo destas bactérias (Hopkins, 1989), o que tem feito com que diversos pesquisadores busquem métodos mais diretos, sensíveis, e confiáveis para a detecção de *X. fastidiosa* (Chang *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994; Hartung *et al.*, 1994; Pooler &

Hartung, 1995b; Chen *et al.*, 1995; He *et al.*, 1996). Quanto ao cultivo, além de componentes específicos que devem ser adicionados aos meios de cultura (Wells *et al.*, 1987; Hopkins, 1989), estas bactérias apresentam um crescimento lento, possibilitando assim a contaminação por outros microrganismos. Microscopia, embora muito útil e amplamente utilizada, não é um método conclusivo, requerendo consideráveis quantidades de tecido para o diagnóstico (Purcell & Hopkins, 1996). Testes sorológicos, tais como ELISA, DIBA e “Western blot”, têm sido utilizados na detecção de *X. fastidiosa* em amostras de plantas e insetos hospedeiros, bem como na distinção entre diferentes isolados desta bactéria (Hartung *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1993; Hopkins & Adlerz, 1988; Sherald & Lei, 1991; Yonce & Chang, 1987; Machado *et al.*, 1997; Paradela-Filho *et al.*, 1997); entretanto tais procedimentos também apresentam limitações como baixa sensibilidade e resultados falso positivos (Hill & Purcell, 1995; Minsavage *et al.*, 1994). Recentemente, e em conjunto com o aparecimento da CVC no Brasil e sua rápida disseminação pelas plantações, técnicas de diagnóstico baseadas em PCR têm sido utilizadas com sucesso na detecção precoce de *X. fastidiosa* relacionadas a vários hospedeiros (Minsavage *et al.*, 1994) ou daquelas associadas à CVC (Pooler & Hartung, 1995b). Esta detecção precoce visa a implementação de estratégias de contenção do patógeno para evitar a disseminação no campo.

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método de PCR com propósito de diagnóstico rápido e altamente sensível para a detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* responsável pela clorose variegada dos citros.

Para tal, a metodologia de hibridização subtrativa descrita por Lamar & Palmer (1984) foi aplicada. Hibridização subtrativa (Lamar & Palmer, 1984; Kunkel *et al.*, 1985) é uma técnica que permite a identificação de pequenas diferenças existentes entre dois genomas, possibilitando, entre outras, o isolamento de fragmentos de DNA e sua utilização como sondas específicas na diagnose de linhagens bacterianas (Seal *et al.*, 1992; Cook & Sequeira, 1991; Darrasse *et al.*, 1994; Kuflu & Cuppels, 1997), bem como no estudo comparativo de genomas mais complexos (Lamar & Palmer, 1984; Kunkel *et al.*, 1985; Lisitsyn *et al.*, 1993). Com esta metodologia visou-se obter fragmentos de DNA específicos de *X. fastidiosa* de citros, cujas sequências pudessem ser utilizadas no desenvolvimento de primers capazes de amplificar sequências únicas desta bactéria em testes de reação de polimerização em cadeia (PCR).

Foram também desenvolvidos primers com base em fragmentos únicos obtidos para *X. fastidiosa* de citros em experimentos de RAPD, procedimento similar ao descrito por Pooler & Hartung (1995b).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa (Wells *et al.*, 1987) é membro integrante de uma classe de bactérias limitadas ao xilema (XLB, de “xylem-limited bacteria”), sendo consideradas parasitas endofíticos que vivem associadas às plantas, ocupando exclusivamente o xilema ou elementos traqueófitos, causando inúmeras doenças (revisto por Purcell & Hopkins, 1996). Por terem sido inicialmente reportadas ao grupo das rickettsiae, com base em caracteres morfológicos e ultraestruturais (Goheen *et al.*, 1973; Hopkins & Mollenhaver, 1973), bactérias associadas ao Mal de Pierce foram isoladas com sucesso pela primeira vez utilizando-se meios de cultura contendo cloreto de hemina e soroalbumina bovina, componentes do meio desenvolvido para a rickettsiae *Rochalimaea quintana* (Davis *et al.*, 1978). Estudos subsequentes comparando o conteúdo de Guanina + Citosina (Kamper *et al.*, 1985) entre os dois microrganismos mostraram serem estes geneticamente diversos; resultados que foram posteriormente confirmados por experimentos de hibridização DNA-DNA e comparação de sequências de rRNA 16S (Wells *et al.*, 1987). Wells *et al.* (1987) propuseram a inclusão de *Xylella fastidiosa* no subgrupo gamma das eubactérias, que inclui as *Xanthomonas* (Wells *et al.*, 1987). Atualmente é considerada membro da subdivisão gamma, ordem Lysobacterales, família Lysobacteriaceae, grupo *Xanthomonas*, gênero *Xylella*, com uma única espécie.

Bactérias deste gênero não apresentam motilidade, são aflageladas, oxidase negativas, catalase positivas, estritamente aeróbicas, não fermentativas, não halofílicas e

sem pigmentação, sendo nutricionalmente fastidiosas, requerendo meios de cultura especiais para crescimento (Wells *et al.*, 1987). Outras características relevantes são: hidrolizam gelatina, sendo negativas em testes para H₂S, beta-galactosidase, lipase, amilase, coagulase e fosfatase. A descrição completa do gênero e da espécie pode ser vista em Wells *et al.* (1987).

Os sintomas observados para esta bactéria pode ser divididos em dois grupos: queimadura do limbo foliar, como acontece no Mal de Pierce, escaldaduras da amendoeira e ameixeira e depauperamento do cafeeiro (Purcell & Hopkins, 1996; Lima *et al.*, 1996), e redução do porte da copa em alfafa e pessegueiros (Raju & Wells, 1986). A queimadura do limbo foliar parece ser ocasionada por um prolongado estresse hídrico, resultante da oclusão dos vasos xilemáticos pela aglomeração do patógeno, e possivelmente produção de goma (Hopkins, 1989; Huang *et al.*, 1986). De fato, células bacterianas, tiloses e goma têm sido encontradas bloqueando os vasos do xilema de plantas infectadas por *X. fastidiosa* (Mircetich *et al.*, 1976; Mollehauer *et al.*, 1974, 1976). Entretanto, a presença de fitotoxinas (Lee *et al.*, 1982; Mircetich *et al.*, 1976) e desbalanço hormonal (French & Stassi, 1978) também tem sido considerados. Hopkins (1989) apontou em sua revisão evidências contrárias ao envolvimento de toxinas na patogenicidade de *X. fastidiosa*. Ainda com relação ao comportamento da bactéria *in planta*, observou-se a formação de agregados, firmemente unidos por fibras extracelulares chamadas glicocalix (revisto por Hopkins, 1989), que podem ter papel tanto na manutenção da integridade do patógeno, na nutrição, bem como na colonização e patogenicidade. Uma correlação entre patogenicidade de *X. fastidiosa* e habilidade em se mover sistemicamente na planta é sugerida por Hopkins (1989). Resultados de Fry &

Milholland (1990) foram concordantes com esta sugestão, onde cultivares Carlos (tolerante) e Noble (resistente) de *Vitis vinifera* apresentaram menor índice de colonização pelo patógeno. Hopkins (1989) também aventou o possível auxílio de enzimas extracelulares na patogenicidade de *X. fastidiosa*. Fry *et al.* (1994) isolaram e caracterizaram proteases de *X. fastidiosa* relacionadas ao Mal de Pierce; entretanto, nenhuma evidência do concurso destas enzimas na patogenicidade foi encontrada.

Quanto à forma de transmissão deste patógeno, estas bactérias têm como vetores insetos sugadores do xilema de plantas (“cigarrinhas”) das famílias Cicadellidae e Cercopidae da ordem Hemiptera, subordem Homoptera (Gravena *et al.*, 1997). Dentro da família Cicadellidae, grupo numeroso com cerca de 2000 gêneros e 15000 espécies, apenas a subfamília Cicadellinae apresenta espécies vetores da bactéria. Adaptações morfológicas e fisiológicas que possibilitam cigarrinhas destas duas famílias se alimentarem no xilema parecem estar relacionadas com o sucesso na transmissão de *X. fastidiosa*, onde cigarrinhas não especializadas no xilema não foram observadas transmitindo esta bactéria (Purcell, 1990). O vetor adquire a bactéria quando se alimenta em uma planta contaminada, passando assim a transmiti-la para outras plantas sadias até o final de sua vida (Purcell, 1979). A bactéria, além dos vasos xilemáticos, consegue sobreviver no aparelho bucal das cigarrinhas transmissoras. Aparentemente não existe especialidade para a transmissão de *X. fastidiosa* considerando-se estas duas famílias. Todas as espécies de cicadélídeos e cercopídeos avaliados quanto à transmissão das estirpes de PD e PPD foram confirmadas como vetores (revisto por Gravena *et al.*, 1997). Purcell & Frazier (1985) relataram que a estirpe de PD apresenta o maior número de espécies vetores conhecidas (24), destacando-se dentre estas *Graphocephala*

atropunctata, *Draculacephala minerva* e *Carneocephala fulgida*. Quanto às espécies comprovadamente vetores de *X. fastidiosa* em citros, ou seja, quando presentes no pomar, vivem predominantemente sobre as plantas cítricas, temos: *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia* sp. e *Oncometopia facialis* (Gravena *et al.*, 1997); outros vetores potenciais são apresentados nesta revisão. O processo pelo qual ocorre a passagem da bactéria, dos locais de retenção na parte anterior do tubo digestivo dos insetos, para a planta ainda permanece desconhecido, embora haja especulações quanto à possibilidade de que líquidos amostrados pelas cigarrinhas sejam expelidos, quando não aceitos pelo inseto, levando consigo o inóculo, ou ainda uma tensão negativa empregada pelo xilema no aparelho bucal do inseto (Purcell, 1990).

2.2. Hospedeiros e doenças causadas

Das doenças causadas por *X. fastidiosa* as mais conhecidas são o Mal de Pierce em videiras (PD) e a redução de porte do pessegueiro (PPD - “phony peach”), que estão geograficamente limitadas à áreas de climas tropicais ou subtropicais, não sendo conhecidos casos desta doença fora das Américas (Hopkins, 1989). Fora das Américas, a bactéria foi observada somente em Taiwan causando doença em pera (Leu & Su, 1993) e na Índia em ameixeira (Jindal & Sharma, 1987). O Mal de Pierce em videiras foi inicialmente descrita no sul da Califórnia, mas é também endêmica e limitante à produção de uvas no sudeste dos Estados Unidos. Essa doença já foi também detectada na Costa Rica, México e Venezuela (Hopkins, 1989). A redução de porte do pessegueiro ocorre nos estados do Sudeste e meio Oeste dos Estados Unidos (Hopkins, 1989). A escaldadura

da folha da ameixeira (EFA), causada pela mesma estirpe do PPD, foi inicialmente descrita na região do Delta do Paraná na Argentina em 1935 (Fernandez-Valiela & Bakarcic, 1954), mas também ocorre no Paraguai e Brasil (French & Kitajima, 1978; Hopkins, 1989; Mohan *et al.*, 1980). No Brasil, a EFA foi observada pela primeira vez no estado do Rio Grande do Sul em 1978 e posteriormente em Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (Carvalho & Souza, 1991; French & Kitajima, 1978; Kitajima *et al.*, 1981; Mohan *et al.*, 1980).

Esta bactéria apresenta especificidade patogênica, onde alguns grupos têm sido distinguidos dentre seus isolados (Hopkins, 1989; Pooler & Hartung, 1995a). Isolados de *X. fastidiosa* obtidos de videira com o Mal de Pierce (PD) constituem um grupo bastante uniforme geneticamente, mas possuem uma ampla gama de plantas hospedeiras (Hopkins, 1989; Leite *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994); dentre estas são reconhecidas pelo menos 28 famílias de mono e dicotiledôneas, porém a maioria não desenvolve sintomas de doença (Hopkins, 1989). Por outro lado, isolados de PPD, e da EFA, formam um grupo distinto e geneticamente mais diverso do que o anterior (Leite *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994).

Na Tabela 1, encontram-se relacionados os principais hospedeiros de *X. fastidiosa*, bem como as doenças a eles associadas. Certamente, e já discutido por Hopkins (1989) e ressaltado por Carlos *et al.* (1997), esta lista tende a crescer rapidamente à medida que hospedeiros alternativos são buscados, bem como hospedeiros naturais são descobertos. Muitas são também as espécies afetadas, embora assintomáticas, que deverão ser incluídas nesta listagem com o implemento de métodos diagnósticos, e com a concentração dos pesquisadores em determinadas espécies de plantas.

Tabela 1. Alguns hospedeiros de *Xylella fastidiosa* e doenças relacionadas.

Hospedeiro	Doença
<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	clorose variegada dos citros - CVC
<i>Coffea arabica</i>	requeima do cafeeiro (coffee leaf scorch)
<i>Vitis vinifera</i> L.	Mal de Pierce - PD (Pierce's disease)
<i>Morus rubra</i> L.	requeima da folha de amoreira (mulberry leaf scorch)
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	redução de porte do pessegueiro - PPD (phony peach)
<i>Prunus salicina</i> Lindl.	escaldadura da folha de ameixeira (plum leaf scald)
<i>Prunus amygdalus</i> Batsch	escaldadura da folha da amendoeira (almond leaf scald)
<i>Pyrus pyrifolia</i> (Burm) Nakai	requeima da folha da pereira (pear leaf scorch)
<i>Medicago sativa</i> L.	nanismo da alfafa (alfalfa dwarf)
<i>Ulmus americana</i> L.	requeima da folha do elmo americano (elm leaf scorch)
<i>Platanus occidentalis</i> L.	requeima da folha do Plátano (sycamore leaf scorch)
<i>Quercus rubra</i> L.	requeima da folha do carvalho (oak leaf scorch)
<i>Catharantus roseus</i> (L.) G. Don	definhamento da vinca (periwinkle wilt)

Adaptado de Carlos *et al.* (1997).

2.2.1. Clorose Variegada do Citros (CVC)

A clorose variegada dos citros ou “amarelinho” (Chang *et al.*, 1993; Leite & Leite, 1991), constatada pela primeira vez no Brasil em 1987 em Colina (SP), e posteriormente no Triângulo Mineiro e Norte e Noroeste do estado de São Paulo (De Negri, 1990), responde, juntamente com o cancro cítrico provocado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (<http://www.fundecitrus.com.br/fra-doensp.htm>), por um dos principais problemas enfrentados na citricultura nacional nos últimos anos. O agente etiológico desta doença foi descrito por pesquisadores franceses e brasileiros (Rossetti *et*

al., 1990) como sendo a bactéria *X. fastidiosa*; posteriormente o postulado de Koch foi confirmado por Chang *et al.* (1993) e Hartung *et al.* (1994).

Além de diversas localidades do estado de São Paulo, a CVC já se alastrou para fronteiras de Mato Grosso do Sul (Tubelis, 1992), Rio de Janeiro (Lee *et al.*, 1993), Goiás (Tubelis *et al.*, 1993), Paraná (Leite *et al.*, 1993), Zona da Mata de Minas Gerais (Mizubuti *et al.*, 1994), Sergipe, Santa Catarina, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (Tubelis *et al.*, 1993). *X. fastidiosa* também está associada com o depauperamento de plantas de cafeeiro nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Trabalhos recentes têm sugerido a possibilidade de que esta bactéria tenha sido disseminada de plantas de cafeeiro para as de laranjeira, devido à grande similaridade encontrada entre seus isolados e o fato de que a região onde apareceu a CVC era uma área de plantio de café (Beretta *et al.*, 1996; Paradela *et al.*, 1997).

A CVC ataca todas as variedades comerciais de laranja doce (Pêra, Natal, Hamlin, Valência, Folha Murcha, Baianinha, Barão, etc.) sobre diferentes porta-enxertos (limão cravo, Trifoliata, tangerinas Cleópatra e Sunki, laranja Caipira, etc.); tangerineiras comerciais, tangor Murcote, limões verdadeiros e lima ácida Galego não têm apresentado sintomas (revisto por Rossetti *et al.*, 1997). Como principal problema à citricultura observa-se o comprometimento da qualidade dos frutos (redução de tamanho), que são recusados para qualquer finalidade. De Negri (1990) considera a fase jovem das plantas como o período de maior severidade da doença. Os principais sintomas da CVC são: clorose das folhas na parte mediana e superior da copa, tomando depois toda a planta; folhas com sintomas de deficiência nutricional, e frutos miúdos (Rossetti *et al.*, 1997).

Atualmente, como medidas preventivas, visa-se evitar a entrada do patógeno em áreas onde não se observam sintomas de CVC, atenuar seus efeitos e dificultar sua disseminação no pomar, através do plantio de mudas sadias, fiscalizações periódicas para detecção precoce de focos de doença, poda de ramos sintomáticos, utilização de inseticidas (especialmente fosforados) nos viveiros, entre outros (revisto por Rossetti *et al.*, 1997). No tocante à resistência ou tolerância ao patógeno, Li (1997) observando diversas plantas cítricas (Kunquat, limão Siciliano, lima Mexicana, lima ácida Tahiti, laranja azeda, pomelos Marsh Seedless e Star Ruby, Tangerinas Poncan, Dancy e Satsuma Okitsu, e híbridos 1, 2 e 3 de Satsuma com laranja Natal) não detectou sintomas de doença, nem a presença da bactéria nas mesmas. Mourão Filho *et al.* (1997) aventaram que se houve multiplicação desta bactéria em algumas das plantas observadas por Li (1997), seu nível populacional estava tão baixo que não foi possível a detecção, sendo estes resultados classificados como resistência à CVC.

Outras formas de controle e contenção desta doença, bem como a situação atual da CVC no Brasil, podem ser encontrados no extenso trabalho de revisão, edição comemorativa dos 15 anos da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (1997), intitulado “Clorose Variegada dos Citros”, publicado com o apoio da FUNDECITRUS.

2.3. Métodos de detecção utilizados para *X. fastidiosa*

Métodos diagnósticos são de extrema importância para a identificação e estudo do patógeno, bem como no entendimento dos processos de transmissão, e seus mecanismos de patogenicidade. Devido às dificuldades no isolamento e cultivo de *X. fastidiosa*,

diversas pesquisas têm se concentrado na melhoria dos métodos de detecção *in planta* (Minsavage *et al.*, 1994; Beretta *et al.*, 1997).

Microscopia foi basicamente o ponto de partida na identificação deste patógeno, sendo a microscopia ótica um dos primeiros testes para a identificação de bactérias associadas aos tecidos vegetais. As primeiras detecções de *X. fastidiosa* em citros foram realizadas por microscopia eletrônica (Rossetti *et al.*, 1990; Chagas *et al.*, 1992). Bransky *et al.* (1993) utilizaram microscopia com imunofluorescência para a realização de estudos comparativos entre *X. fastidiosa* da CVC e uma doença semelhante na Argentina denominada “pecosita”, causada pelo mesmo patógeno. A sensibilidade do microscópio ótico na detecção de *Xylella* foi discutida por Lima (1995). Embora largamente empregado, algumas limitações devem ser ressaltadas, como a impossibilidade do uso de certos corantes histológicos e a quantidade de tecido que deve ser examinada para um diagnóstico seguro (veja revisão de Purcell & Hopkins, 1996).

Dos testes sorológicos empregados, o mais comumente utilizado é o ELISA (veja revisão de Purcell & Hopkins, 1996). Este teste, juntamente com exames microscópicos, tem auxiliado na detecção do patógeno em extratos de plantas infectadas, bem como em vetores, possibilitando estudos de dispersão e de identificação de hospedeiros naturais (Yonce & Chang, 1987; Sherald & Lei, 1991; Chang *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1994). Yonce & Chang (1987) isolaram e cultivaram *X. fastidiosa* de três diferentes vetores associados à PPD, e através de ELISA mediram a ocorrência sazonal desta bactéria em *Homalodisca coagulata*, bem como em suas plantas hospedeiras. Os autores observaram a bactéria frequentemente associada à este vetor, sendo a maior detecção, com relação aos hospedeiros, em ameixeiras comerciais (*Prunus salicina*). Hopkins & Adlerz (1988)

identificaram diversas plantas naturalmente infectadas por *X. fastidiosa* utilizando ELISA. Kits para ELISA foram testados em 47 elmos americanos com o intuito de medir o grau de detecção da técnica para o diagnóstico desta bactéria (Sherald & Lei, 1991). Examinando extratos, observou-se que 17 das 18 plantas infectadas resultaram positivo. Outras plantas foram examinadas, e pôde-se notar que o teste foi incapaz de detectar *Xylella* em vários extratos de plantas infectadas assintomáticas. ELISA tem também sido utilizado em estudos de multiplicação e movimentação do patógeno em videiras e demais hospedeiros, fornecendo dados importantes sobre a evolução desta doença (Hill & Purcell, 1995). Outro método bastante empregado tem sido o DIBA, devido sua praticidade e baixos custos. Este método, juntamente com Western blot foi utilizado em estudos de detecção do patógeno em diferentes espécies de citros (Machado *et al.*, 1997), e em conjunto com técnicas como ELISA, Western blot e PCR específico possibilitou a identificação de *X. fastidiosa* em cafeeiros no Brasil (Paradela Filho *et al.*, 1997). Dos problemas relacionados com técnicas sorológicas, e discutidas por Purcell & Hopkins (1996), pode-se citar os prováveis falso-positivos com componentes diversos presentes nos extratos de plantas e a baixa sensibilidade em alguns casos, cujos níveis de detecção foram medidos e comparados com PCR-diagnósticos no trabalho de Minsavage *et al.* (1994).

Testes moleculares foram inicialmente utilizados por Minsavage *et al.* (1994). Estes autores, através de digestão de DNA total de linhagens de *X. fastidiosa*, identificaram e clonaram um fragmento de 7,4 kb de uma linhagem de PD, que se mostrou conservado entre 18 linhagens em experimentos de hibridização. Um subclone de 1 kb foi isolado e primers foram desenvolvidos, com base em sua sequência, capazes

de amplificar um fragmento de 733 bp somente de linhagens de *Xylella*. Análise de restrição dos fragmentos produzidos por diferentes isolados de *X. fastidiosa* agrupou linhagens provenientes de PD e CVC, diferenciando-as de outras linhagens de *Xylella*; resultados semelhantes foram obtidos por Chen *et al.* (1992). Estes primers possibilitaram também a detecção da bactéria diretamente de extratos de plantas infectadas, bem como mostraram ser a diagnose por PCR 100 vezes mais sensível que ELISA.

Outra técnica que tem colaborado grandemente na detecção de variabilidade intraespecífica em *X. fastidiosa* é o RAPD. Chen *et al.* (1995) analisaram 17 linhagens de *Xylella*, dentre elas linhagens de PD e OLS (requeima da folha do carvalho), e observaram que estas constituíam grupos isolados (um de PD e outro de OLS). Os controles, isolados de ameixeira e vinca, compuseram um terceiro grupo, relacionado aos dois primeiros por um índice menor que 50%. No mesmo ano, Pooler & Hartung (1995a) analisaram 11 isolados provenientes de plantas de citros, amendoeira, ameixeira, elmo americano, videira, amoreira e “ragweed” (*Ambrosia artemisiifolia*), e propuseram 5 grupos: de citros, de ameixeira/elmo, videira/ragweed, amendoeira e amoreira. Os autores utilizaram neste estudo somente linhagens “tipo” (ATCC), reconhecendo a necessidade de testar um número maior de linhagens, inclusive de diferentes regiões geográficas para confirmar estas proposições. Pooler & Hartung (1995b) desenvolveram pares de primers baseando-se em sequências obtidas de produtos de RAPD em linhagens de *X. fastidiosa* de citros. Análises de alguns produtos levaram à identificação de uma inserção de 28 nucleotídeos no produto de *X. fastidiosa* de CVC quando amplificado com o par de primers 272-1 e 272-2, que foi usado no desenvolvimento de um novo par, CVC-1 e 272-1-int, capaz de distinguir linhagens de CVC daquelas de videira. Este último tem sido

usado correntemente em PCR-diagnósticos para *X. fastidiosa* de citros. He *et al.* (1996) utilizaram perfis produzidos por ERIC-PCR para detectar *X. fastidiosa* em plantas de citros infectadas e assintomáticas. Pooler *et al.* (1997) descreveram um método para detecção de *Xylella* em insetos vetores, utilizando PCR específico e primers desenvolvidos previamente. Recentemente, Beretta *et al.* (1997) utilizando primers dirigidos para regiões consenso de tRNA identificaram três grupos com base nos perfis produzidos por diferentes linhagens de *X. fastidiosa*: CVC, amoreira e demais linhagens (PD, amoreira, elmo, vinca, etc.). Um fragmento único no perfil de linhagens de CVC foi isolado, sequenciado e primers específicos foram desenvolvidos para uso em PCR-diagnósticos. Os autores, analisando plantas de citros acometidas por “declínio do citros” (Citrus Blight - CB), sugeriram não haver associação entre *X. fastidiosa* com CB.

2.4. Hibridização subtrativa

Hibridização subtrativa (Lamar & Palmer, 1984; Kunkel *et al.*, 1985) é uma técnica que permite a identificação de pequenas diferenças existentes entre dois genomas próximos, mesmo daqueles altamente relacionados. Embora tenha sido pouco utilizada no estudo de diferenças entre bactérias fitopatogênicas, alguns relatos têm mostrado sua grande utilidade (Cook & Sequeira, 1991; Seal *et al.*, 1992; Darrasse *et al.*, 1994; Kuflu & Cuppels, 1997). Esta técnica foi usada com sucesso por Cook & Sequeira (1991) no desenvolvimento de uma sonda específica para a identificação de *Ralstonia solanacearum* raça 3. Neste trabalho, DNA genômico da linhagem de *R. solanacearum* UW23 raça 3 foi marcado com [³²P]dATP pelo método de “random primer”, sendo a seguir hibridizado com um excesso de 1000 vezes de DNA genômico da linhagem UW25 raça 1 (não marcada). Os produtos desta hibridização foram usados diretamente como sondas para hibridizar DNAs das linhagens raça 3 e 1 digeridos com enzimas de restrição e imobilizados em membrana. Como resultado, foram identificadas regiões únicas de hibridização para as linhagens da raça 3, que foram isoladas e caracterizadas posteriormente por novas hibridizações.

Darrasse *et al.* (1994), utilizando estratégia de enriquecimento para sequências únicas descrita por Straus & Ausubel (1990), clonaram sequências capazes de detectar *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, onde uma linhagem de *E. c.* subsp. *carotovora* foi usada na subtração (DNA “driver”). Neste procedimento, o DNA driver foi quebrado em sonicador, marcado com biotina, e submetido à hibridização com DNA de *E. c.* subsp. *atroseptica* (“driver” sendo usado em excesso para forçar a reassociação entre todas as

sequências homólogas dos dois genomas). Após hibridização, sequências comuns, ou seja, aquelas que poderiam hibridizar entre si (homólogos: DNA biotilado + DNA de *E. c. subsp. atroseptica* ou DNAs biotilados de *E. c. subsp. carotovora*), foram removidas tratando-se a reação com esferas encapadas com avidina, restando sequências específicas de *E. c. subsp. atroseptica* que foram clonadas e usadas como sondas. Procedimento semelhante foi usado por Kuflu & Cuppels (1997) no isolamento de fragmentos específicos para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *Xanthomonas vesicatoria*. Seal *et al.* (1992) isolaram uma sequência única de *Ralstonia solanacearum* por hibridização subtrativa, e utilizaram dados de sequência deste para a construção de primers que possibilitassem o diagnóstico desta bactéria por PCR.

Técnicas de subtração têm sido amplamente empregadas no estudo e identificação de diferenças entre dois ou mais genomas eucarióticos complexos (Lamar & Palmer, 1984; Kunkel *et al.*, 1985). Lamar & Palmer (1984), estudando diferenças entre cromossomos X e Y de ratos, descreveram um protocolo simples para o isolamento de sequências por hibridização subtrativa, traduzido como banco enriquecido por deleção ou “Deletion Enrichment Technique” (DET). O protocolo DET consiste em digerir o DNA alvo com enzima de restrição que reconheça um sítio de 4 nucleotídeos, como *Sau3A*, e proceder à hibridização com um excesso de driver sonificado. Após a hibridização, somente DNAs específicos da linhagem alvo puderam se ligar à um vetor de clonagem digerido com *BamHI*, por terem seus fragmentos ao se reassociarem reconstituído sítios *Sau3A* funcionais. Kunkel *et al.* (1985) em seus estudos aplicaram ao protocolo de hibridização usado a técnica PERT, “Phenol Emulsion Reassociation Technique” (Kohne *et al.*, 1977), onde a adição de fenol, a 10% do volume total da reação de hibridização,

produziu uma emulsão capaz de acelerar a reassociação de DNAs simples fita, diminuindo o tempo do processo e permitindo que este fosse realizado à temperatura ambiente.

Parte I

Coffee- and CVC-related *Xylella fastidiosa* detection using primers selected by subtractive hybridization with deletion enrichment method and RAPD.

Ferreira, H. and Rosato, Y.B.*

Dept. of Genetics and Evolution, IB and CBMEG, State University of Campinas, C.P. 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Running title: Primers for CVC-related *Xylella fastidiosa* detection.

Keywords: *Xylella fastidiosa*, subtractive hybridization, and PCR-detection.

Summary

A CVC-related *Xylella fastidiosa* strain was submitted to a fast and simple protocol of subtractive hybridization. Four differential DNA fragments were cloned and tested as probes for *X. fastidiosa* detection. In dot and Southern hybridization experiments, only DNAs from *X. fastidiosa* strains hybridized with the labelled fragments and one of them, f14, was chosen for further analysis. Nucleotide sequence of the two ends of this fragment was determined, and a pair of primers was designed for PCR-diagnosis of *X. fastidiosa* strains. These primers amplified DNAs from *X. fastidiosa* strains isolated from citrus, plum, grapevine, pear and oleander, as well as from some other pathogenic bacteria, but only *X. fastidiosa* strains presented a diagnostic amplification product of 600 bp. These primers did

not detect the bacteria in citrus symptomatic plant extracts. A second pair of primers was developed based on a RAPD-PCR differential product for *X. fastidiosa* strains. The designed primers (JB1-1 and JB1-2) amplified a 900 bp fragment from all *X. fastidiosa* strains at the annealing temperature of 62-68°C and only CVC- and coffee-related strains at a more stringent temperature (68-70°C). The bacteria were also detected in extracts from symptomatic citrus and coffee plants, as well as from an asymptomatic citrus seedling artificially inoculated.

* For correspondence: E-mail yrosato@obelix.unicamp.br; Tel. (019) 7881135; Fax (019) 7881089.

Introduction

The gram-negative and xylem-limited bacterium *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987) is the causal agent of several plant diseases, such as Pierce's disease of grapevine, phony disease of peach, periwinkle wilt, leaf scorch of almond, mulberry, elm, sycamore, oak and maple, leaf scald of plum and coffee, citrus variegated chlorosis (CVC) and others (Hopkins, 1989; Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Beretta *et al.*, 1996). The major symptoms produced by this bacterium in the infected plants, as the leaf marginal necrosis and abscission or a delayed growth, suggest a disfunction of the water-conducting system (Hopkins, 1989; Lima *et al.*, 1996). The way by which these symptoms evolve is not known yet, and it has been suggested xylem occlusions, followed by water stress. The transmission of this bacterium occurs by xylem-feeding suctorial insects (Hopkins, 1989; Purcell and Hopkins, 1996).

The development of a reliable and highly sensitive method for *X. fastidiosa* detection and identification has concentrated the efforts of many researchers in the last years (Hopkins, 1989; Chang *et al.*, 1993; Minsavage *et al.*, 1994; Hartung *et al.*, 1994; Pooler and Hartung, 1995; Chen *et al.*, 1995; He *et al.*, 1996; Beretta *et al.*, 1997). Culturing *X. fastidiosa* is a slow process enabling the growth of contaminants (Hopkins, 1989). Microscopy, although useful and largely used, is not conclusive and requires a considerable amount of tissue to be examined (reviewed by Purcell and Hopkins, 1996). Serological tests, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot immunobinding assay (DIBA), and western blot, have been used to detect this bacterium in plant and insect hosts, as well as to distinguish among different isolates of *X. fastidiosa* (Hartung *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1993; Hopkins and Adlerz, 1988; Sherald and Lei,

1991; Yonce and Chang, 1987; Machado *et al.*, 1997; Paradela Filho *et al.*, 1997). These procedures however present low sensitivities and false positive results (Hill and Purcell, 1995; Minsavage *et al.*, 1994). Recently due to the outbreak of CVC (citrus variegated chlorosis) in Brazil and the rapid dissemination of the disease in the field, PCR-based techniques have been developed for detection of *X. fastidiosa* from different hosts (Minsavage *et al.*, 1994) or from CVC symptomatic citrus (Pooler and Hartung, 1995). The employment of these techniques allow the early detection of *X. fastidiosa* in asymptomatic plants and therefore the establishment of wiser strategies to control the dissemination of the disease in the field.

Subtractive hybridization (Lamar and Palmer, 1984; Kunkel *et al.*, 1985) is a powerful tool to obtain specific DNA fragments from a target organism or tissue and it has been used successfully to isolate probes for the detection of *Ralstonia solanacearum* (Seal *et al.*, 1992; Cook and Sequeira, 1991), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Darrasse *et al.*, 1994), and *Xanthomonas vesicatoria* and *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Kuflu and Cuppels, 1997). In order to identify specific probes and to develop primers for *X. fastidiosa* detection, we have used the Deletion Enrichment Technique (DET; Lamar and Palmer, 1984) coupled to the Phenol Emulsion Reassociation Technique (PERT; Kohne *et al.*, 1977; Kunkel *et al.*, 1985), to selectively clone differential DNA fragments from a CVC-related *X. fastidiosa* strain. Four DNA fragments were cloned and tested as probes for *X. fastidiosa*. One of them, f14, was sequenced and primers were constructed for rapid PCR-diagnostic tests. A second pair of primers based on the sequence of a differential product obtained by RAPD-PCR was also designed.

Results

Subtractive hybridization

Ten µg of genomic DNA from *X. fastidiosa* A1 (tester) strain was exhaustively digested with *Sau3AI*, and fragments between 0.5-2.0 kb were isolated. They were mixed with sonicated driver DNAs from the strains *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* 604, *X. campestris* pv. *campestris* Ca110 and *X. fastidiosa* 788. After denaturation at 100°C and renaturation in the phenol emulsion, the whole products were ligated to *Bam*HI-digested pBLUESCRIPT KS+ cloning vector and electrotransformed into *E. coli* DH5α strain. In the first screening, forty seven white colonies were isolated and submitted to plasmid extraction and restriction analysis using *Hind*III + *Sst*I, which cut at the flanking edges. Most of the cloned fragments presented inserts of 200-300 bp. Four recombinant plasmids presented larger inserts between 600-700 bp, and these inserts (f9, f14, f40, f45), showing differences in the restriction sites for *Bgl*II and *Hae*II, were tested as specific probes for *X. fastidiosa*.

Probes for X. fastidiosa detection

In order to assess the specificity of each of the four fragments obtained as probes and the homology among them, dot blot experiments were carried out. Four membranes were prepared using DNAs from *X. fastidiosa* strains isolated from citrus (A1, C6, and E4), and plum (PL788). As controls were used DNAs from those strains used as DNA driver in the subtractive hybridization: *X. campestris* pv. *campestris* Ca110 and *B. gladioli* pv. *gladioli* 604. Each membrane was hybridized individually using as a probe one of the four labelled fragments (f9, f14, f40, and f45). Three probes, f9, f40 and f45, showed hybridization bands with DNAs from all *X. fastidiosa* strains used and the f14 did not hybridize to the *X.*

fastidiosa PL788 strain (used as driver). No hybridization was detected among the fragments indicating the lack of homology among them and to the DNAs from *X. campestris* pv. *campestris* Ca110 or *B. gladioli* pv. *gladioli* 604. Based on the difference observed for the fragment f14, i.e., the lack of homology to the driver DNA from PL788, a Southern blotting hybridization was carried out to confirm its specific ability to detect a larger number of CVC-related *X. fastidiosa* strains. DNAs from ten different strains isolated from citrus plants showing CVC, the plum strain PL788, and strains of different species and genera (*X. axonopodis* pv. *citri* 223, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 7455, *X. campestris* pv. *campestris* Ca110, *X. translucens* pv. *translucens* 876, *X. translucens* pv. *undulosa* 1026, *Pseudomonas cichorii* 587, *P. syringae* pv. *garcae* 1297, *P. syringae* pv. *syringae* 451, *Agrobacterium tumefaciens* 304; *B. gladioli* pv. *gladioli* 604, *B. andropogonis* 166, *Enterobacter dissolvens* 1289, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 863), were exhaustively digested with *Sau3AI*, separated in 0.8% agarose gel, blotted, and hybridized to the probe f14. The expected hybridization band of 670 bp with DNA from CVC-*Xylella* strains is shown in Figure 1; a second higher hybridization band of about 1.0 kb was also detected in the same membrane indicating the existence of a homologous fragment. No hybridization was seen with the DNAs from different bacterial species and genera.

Primers development and PCR-diagnosis tests

About 100 bp of each terminal side of the f14 fragment was sequenced and based on these flanking sequences, a pair of oligonucleotides was designed to develop a PCR-diagnostic method to identify *X. fastidiosa* strains. The chosen sequences were: **f14-1** 5'-ACC GTT GGC GTC CGT ATA GG-3', and **f14-2** 5'-GAC ATG GCT GCT CAC CTG G-3' (Figure

2). An amplification product of about 600 bp was expected by using these primers. After preliminary experiments, the following conditions were used: 10-20 ng of genomic DNA, 3 mM MgCl₂, 100 μM of dNTPs, 1-5 pmol of each primer, 0.5 Units Taq DNA polymerase (Gibco-Brl), and water to 25 μl. The PCR conditions were: 1 X 94°C/ 2 min; 40 X (94°C/ 30 s, 52°C/ 30 s, and 72°C/ 45 s). The amplification products of five strains of *X. fastidiosa* isolated from different hosts (A1, OL01, CF01, PL788, and GP01) using the primers f14-1 and f14-2 are shown in Figure 3. No amplification product was detected using these primers separately. The specificity of these primers were also tested using DNA from different bacterial species: *E. coli* DH5α, *X. axonopodis* pv. *citri* 223, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 7455, *X. campestris* pv. *campestris* Ca110, *X. translucens* pv. *translucens* 876, *X. translucens* pv. *undulosa* 1026, *P. cichorii* 587, *P. syringae* pv. *garcae* 1297, *P. syringae* pv. *syringae* 451, *A. tumefaciens* 304, *B. gladioli* pv. *gladioli* 604, *B. andropogonis* 166, *E. dissolvens* 1289, and *E. carotovora* subsp. *carotovora* 863. These bacteria did not show the specific amplification product, however fragments of different sizes were found in some strains: 2 kb in *X. campestris* pv. *campestris* Ca110, 1.5 kb in *B. gladioli* pv. *gladioli* 604, 0.5 and 1.1 kb in *P. syringae* pv. *garcae* 1297, 0.3 kb in *E. coli* DH5α, 0.7 and 1.4 kb in *B. andropogonis* 166, and 0.4 kb in *X. axonopodis* pv. *citri* 223 (Figure 3).

In order to measure the detection level of these primers, PCR amplifications were carried out using 2 μl of a cell suspension of *X. fastidiosa* A1 (OD₆₀₀ of 0.37) and tenfold serial dilutions. Bacteria could be detected until the dilution of 10³x (Figure 4, lane 6). Considering that OD₆₀₀ of 0.25 corresponds to 10⁷-10⁸ cfu ml⁻¹ (Minsavage *et al.*, 1994), the PCR reaction using f14 primers could detect 30-300 cfu ml⁻¹.

For detection of *X. fastidiosa* in plant extracts (citrus and coffee), 4 μl of each

extract were used in the amplification reaction using the primers f14-1 and f14-2. There was no amplification with the citrus extract, however, two bands of 1.0 and 1.4 kb were amplified, either from healthy or symptomatic coffee plants cv. Mundo Novo. No product was detected for the healthy or symptomatic coffee plants cv Catuaí. A checking reaction was performed using the same extracts and CVC-specific primers, CVC-1 and 272-2-int (Pooler and Hartung, 1995). There was an amplification of the 500 bp expected fragment in extracts from symptomatic coffee and citrus plants and none fragment was seen in healthy plants indicating that the f14 primers were not able to detect the bacteria in plant extracts.

RAPD-derivative primers for X. fastidiosa detection

Another strategy used to develop primers for *X. fastidiosa* detection was the search for some differential RAPD-PCR product. Using the 10-mer primer OPR-2 (Operon Technologies Inc.) a specific amplification fragment of approximately 0.9 kb was observed in a series of amplifications using CVC-related *X. fastidiosa* strains. This fragment was amplified from the strain *X. fastidiosa* JB1, isolated from agarose gel, purified and cloned into pBLUESCRIPT KS+ vector, using the *EcoRV* restriction site. After electrotransformation of *E. coli* DH5 α strain a clone showing the expected size insert of 0.9 kb was selected and sequenced in its flanking ends. Based on these sequences, primers were designed by adding bases to the left or to the right from the OPR-2 sequence. The best sequences found by analysis using the software Oligo were: **JB1-1** 5'-CAC AGC TGC CGT ATC GCT GTT C-3', and **JB1-2** 5'-CAC AGC TGC CAA AAA CAC CAA GG-3', where the underlined bases correspond to the primer OPR-2. These primers were used to amplify DNAs from *X. fastidiosa* strains isolated from citrus (A1, B1, B7, JB1, E4, C10,

F5, H9), oleander (OL01), coffee (CF01, CF11782), grapevine (GP01) and plum (PL9746 and PL788). The amplification conditions used were: 10-20 ng of genomic DNA, 1 mM MgCl₂, 100 μM of each dNTP, 1-5 pmol of each primer, 0.5 Units Taq DNA polymerase (Gibco-Brl), and water to 25 μl. Cycling conditions for PCR were: 1 X 94°C/ 2 min; 40 X (94°C/ 1 min, 64°C/ 1 min, 72°C/ 1 min and 15 s). An expected amplification product of 0.9 kb was obtained in the PCR reactions for the fourteen *X. fastidiosa* strains tested. Other bacterial species were also tested (*E. coli* DH5α, *X. axonopodis* pv. *citri* 223, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 7455, *X. campestris* pv. *campestris* Ca110, *X. translucens* pv. *translucens* 876, *X. translucens* pv. *undulosa* 1026, *P. cichorii* 587, *P. syringae* pv. *garcae* 1297, *P. syringae* pv. *syringae* 451, *A. tumefaciens* 304; *B. gladioli* pv. *gladioli* 604, *B. andropogonis* 166, *E. dissolvens* 1289, and *E. carotovora* subsp. *carotovora* 863) and fragments of similar size were detected for *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 7455 and *X. translucens* pv. *translucens* 876. However raising the annealing temperature from 64°C to 68-70°C there was a restriction in the range of detectable strains and in this condition only citrus and coffee-related *X. fastidiosa* strains presented the 0.9 kb amplification fragment. To test the detection level of these primers, tenfold serial dilutions were prepared from a initial cell suspension of *X. fastidiosa* JB1 (OD₆₀₀ of 0.98), and 5 μl of each dilution was used in PCR reactions at the annealing temperature of 64°C. The expected fragment was detected until the dilution of 10⁶x, corresponding to 1-2 cfu ml⁻¹ (Figure 4A). The same PCR conditions were employed to test plant extracts. The 0.9 kb fragment was amplified from extracts prepared from symptomatic, asymptomatic/inoculated citrus and coffee plants. No bands were amplified when extracts were prepared from healthy hosts (Figure 4B).

The amplification fragments obtained with the primers JB1 and *X. fastidiosa* strains isolated from citrus, grapevine, plum, coffee and oleander were digested with the enzymes *Sau3AI*, *HaeIII*, and *HinfI*, in order to detect some variation in these fragments. The digested products were separated in 7% acrylamide gel and the patterns obtained with *Sau3AI* and *HaeIII* showed no differences among the strains from different hosts. Digestion with *HinfI* restriction enzyme presented two distinct patterns: citrus-coffee and plum-oleander-grapevine (Figure 5).

Discussion

This study is the first report using subtractive hybridization method to identify specific DNA sequences in *X. fastidiosa*. It is reported here an adapted protocol for fast and easy genomic subtraction, using Deletion Enrichment Technique (Lamar and Palmer, 1984), plus phenol reassociation technique (Kohne *et al.*, 1977; Kunkel *et al.*, 1985). No specific buffers were required, nor long-time consuming purification steps to obtain clean materials to ligate after renaturation. Using this procedure four differential DNA fragments were cloned from a CVC-related *X. fastidiosa* strain, and one of them, f14, was chosen for primers development based on its ability to detect only CVC-*X. fastidiosa* strains in hybridization experiments.

The f14 fragment showed a CVC-specific hybridization signal of about 600 bp in Southern blotting hybridization, however the designed primers (f14-1 and f14-2) were capable of amplifying fragments of *X. fastidiosa* from different hosts. These result suggests some internal nucleotide differences among the fragments produced by different *X. fastidiosa* strains. Although the specificity of f14 as a probe for CVC-isolated *X. fastidiosa* detection, the use of the primers f14-1 and f14-2 in routinely examination of infected plants presented some drawbacks. The major problem was related to the lack of resolution to detect *X. fastidiosa* in plant extracts. It can be attributed to the presence of PCR inhibitors in the extracts, such as phenolic compounds and polysaccharides (Minsavage *et al.*, 1994; Rowhani *et al.*, 1993). However the more likely explanation would be the lower detection level presented by these primers (30-300 cfu ml⁻¹) when comparing to the levels described by Minsavage *et al.* (1994). The second problem was the amplification of two bands (1.0 and 1.4 kb) in healthy coffee extracts prepared from the cv. Mundo Novo. We do not know

yet if this amplification is due to the cultivar used or to the presence of an unknown microorganism in this cultivar but not in cv. Catuaí.

As the primers f14 were unable to detect *X. fastidiosa* in plant extracts, a new pair of primers were developed based on the sequence of a differential RAPD product obtained from the CVC-related *X. fastidiosa* JB1. These new primers amplified a 0.9 kb fragment of *X. fastidiosa* from different hosts at the annealing temperatures ranging from 64 to 68°C. Temperatures above 68°C were specific for detection of CVC and coffee-related *X. fastidiosa*. A possible explanation for these results may be the existence of mismatches in the annealing regions. The primers JB1 could successfully detect the presence of the bacteria in the citrus (symptomatic or asymptomatic/artificially inoculated) and coffee extracts. The specificity of these primers for amplification of coffee and CVC-related *X. fastidiosa* at a more stringent temperature indicates the existence of similarities between strains infecting both hosts. This similarity has already been suggested (Beretta *et al.*, 1996, Paradella Filho *et al.*, 1997) and confirmed in the present work by the identical *Hinf*I-restriction pattern presented by strains isolated from coffee and citrus plants. Paradella Filho *et al.* (1997) suggested the possible interchange of this pathogen between these plants. The presence of *X. fastidiosa* in coffee plants in areas where citrus are not cultivated, and the fact that the CVC appeared in areas in which in the past were used to grow coffee plants, have led these authors to suggest that this pathogen could have disseminated from coffee to citrus plants.

Experimental procedures

Bacterial strains, growth conditions and plasmids

The strains used in the present work are listed in Table 1. *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, and *Escherichia coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories) strains were grown in LB medium (Sambrook *et al.*, 1989), *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Xanthomonas* strains in NYG-agar medium (Turner *et al.*, 1984), and *Xylella* strains in SPW-agar medium (Hartung *et al.*, 1994). The incubation temperature was 30°C for all strains, except for *E. coli* (37°C). The plasmid pBLUESCRIPT KS+ (Stratagene) was used as a cloning vector.

DNA preparation

Total DNA extraction was carried out according to Goss *et al.* (1990), with some modifications. Ten milligrams of *Xylella* bacterial mass were collected from SPW-agar plates, and placed into 1.5 ml microfuge tubes. The cellular mass was washed once in 500 μ l of TAS buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA and 150 mM NaCl), centrifuged and the pellet was resuspended in 500 μ l of lysis buffer (TAS, plus 1% SDS and 150 μ g ml⁻¹ Proteinase K). The tubes were incubated at 50°C for one hour. The cell debris were extracted once with phenol and twice with chloroform, and dialysed for 48 h against TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA). DNA concentration was determined by comparison with lambda DNA in an ethidium bromide-stained 0.8% agarose gel (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid extraction was carried out using the alkaline lysis method (Sambrook *et al.*, 1989).

DNA manipulation and DNA hybridization

Restriction enzymes digestion and ligation of DNA molecules were carried out following manufacturer's specifications (Gibco-Brl). General DNA manipulation procedures were carried out according to Sambrook *et al.* (1989). Small DNA fragments were visualized in 7% acrylamide/bis-acrylamide gels (29:1, w/w) in a Tris-borate-EDTA buffer system (Sambrook *et al.*, 1989), using a silver staining method (Moreno *et al.*, 1985). In the Dot blot hybridization experiments, 1 µg of genomic DNA was placed onto nylon membranes (HybondTM-N, Amersham), denatured for 5 min (1.5 M NaCl and 0.5 NaOH), and baked 2 h at 80°C. For Southern blot hybridization, 2 µg of digested genomic DNA were separated in 0.8% agarose gel and blotted onto nylon membranes using the alkaline transfer method. Plasmid vectors harboring DNA fragments to be labelled were extracted, digested with *Pst*I and *Xba*I and separated in 0.8% low melting agarose gel (Gibco-Brl); purification was as described by the manufacturer. Purified fragments were labelled using the DIG DNA labeling kit (Boehringer-Mannheim, FRG). Detection of bands was carried out using the chemiluminescent substrate CSPD as recommended by the manufacturer (Boehringer-Mannheim, FRG).

Plant extracts preparation

Plant extracts were obtained as described by Doyle and Doyle (1990). Extracts from *Citrus sinensis* petioles were prepared from symptomatic and asymptomatic adult plants growing in the field, as well as from healthy seedlings. Asymptomatic citrus seedlings artificially inoculated with *X. fastidiosa* were also used. These asymptomatic seedlings were inoculated

six month ago using different procedures (J. Rodrigues Neto, unpublished data) and microscopic examination revealed bacterial cells resembling *X. fastidiosa* in high number. Leaves from symptomatic and healthy coffee (*Coffea arabica*) adult plants or seedlings cv. Mundo Novo and cv. Catuaí were provided by Instituto Biológico, Campinas, SP, Brazil and O. Guerreiro Filho (IAC, Campinas, SP, Brazil). About 300 mg of petioles of citrus or coffee samples were ground under liquid nitrogen in a chilled mortar and pestle. The following steps are the same as described by Doyle and Doyle (1990).

Deletion enrichment library

The protocol used was adapted from Lamar and Palmer (1984). Tester genomic DNA (from a CVC-related *X. fastidiosa*) was totally digested with *Sau3AI* and the digestion products were separated in 0.8% low melting agarose gel. Fragments between 0.5-2.0 kb were purified from the gel. About 1 mg of driver DNA was sheared by sonication until fragments of 0.5 kb were obtained. Aliquots of 10 µg of driver DNA (DNA samples from different strains were equally mixed to 10 µg) were mixed to 100 ng of tester DNA (100:1), and denatured at 100°C for 10 min. The mixture was transferred to a 50 ml centrifuge tube, 50 µl of phenol (10% of the final volume) (Kohne *et al.*, 1977; Kunkel *et al.*, 1985) was added and the final volume adjusted to 500 µl with TE buffer. After 48 h of vigorous shaking at 28°C, the mixture was extracted twice with chloroform, precipitated, and the recovered DNA was ligated to the pBLUESCRIPT KS+ cloning vector previously digested with *BamHI*. After ligation, the products were used to electrotransform *E. coli* strain DH5α prepared as described (Ferreira *et al.*, 1995). White colonies were selected by plating the cells after transformation onto LB-agar medium supplemented with 60 µg ml⁻¹ of ampicilin,

and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of X-gal (Sambrook *et al.*, 1989).

DNA sequencing and analysis

Fragments cloned into the *Bam*HI or *Eco*RV sites of pBLUESCRIPT KS+ vector were sequenced by a variant of the dideoxy method, using the Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit (Amersham), and the primers M13 and Reverse (Gibco-Brl). The samples were read in an automatic sequencer ABI PrismTM 377 (Perkin Elmer, Norwalk, USA). The softwares used for sequence analysis and primers development were: Gene Runner, version 3.0, 1994, Hastings Software, Inc; DNASIS, version 6.00, 1990, Hitachi Software Engineering co., and Oligo structure, version 3.3, 1989.

Table 1. Bacterial strains used.

Strains	Hosts	Origin and other references
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		¹ IBSBF 304 = ICMP 5793; ATCC 4720
<i>Burkholderia andropogonis</i>	from <i>Coffea arabica</i> cv. Catuí amarelo	IBSBF 166 = ICMP 6779; NCPPB 6943
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	from <i>Gladiolus</i> sp.	IBSBF 604 = ICMP 9382
<i>Enterobacter dissolvens</i>	from <i>Zea mays</i>	IBSBF 1289* = ICMP 1570
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	from <i>Solanum tuberosum</i>	IBSBF 863* = ICMP 5702; ATCC 15713; LMG 2404
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. cichorii</i>	from <i>Coffea arabica</i>	IBSBF 587 = ICMP 9276; NCPPB 3109
<i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	from <i>Coffea arabica</i>	IBSBF 1297
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	from <i>Syringa vulgaris</i>	IBSBF 451* = ICMP 3023; LMG 1247; ATCC 19310
<i>Xanthomonas</i>		
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	from <i>Citrus sinensis</i>	IBSBF 223
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	from <i>Phaseolus vulgaris</i>	LMG 7455*
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	from crucifers	Ca110 (Destefano and Rosato, 1991)
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	from <i>Hordeum vulgare</i>	LMG 876*
<i>X. translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	from <i>Triticum aestivum</i>	IBSBF 1026
<i>Xylella fastidiosa</i>		
A1	from <i>Citrus sinensis</i>	² Fundecitrus
A4	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
E4	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
E6	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
F5	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
H9	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
B1	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
B7	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
B9	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
JB1	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
C6	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
C10	from <i>Citrus sinensis</i>	Fundecitrus
CF01	from <i>Coffea arabica</i>	Fundecitrus
CF11782	from <i>Coffea arabica</i>	IAPAR 11782
GP01	from <i>Vitis vinifera</i>	IBSBF 789 = ATCC 33107
OL01	from <i>Nerium oleander</i>	Fundecitrus
PL9746	from <i>Prunus salicina</i>	IAPAR 9746
PL788	from <i>Prunus salicina</i>	IBSBF 788 = ICMP 8735

¹ IBSBF - Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Campinas, SP, Brazil.

² Fundecitrus - Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP, Brazil.

³ IAPAR - Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR, Brazil.

* Type strain; ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA; ICMP = International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; LMG = Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Rijksuniversiteit, Gent, Belgium; NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England.

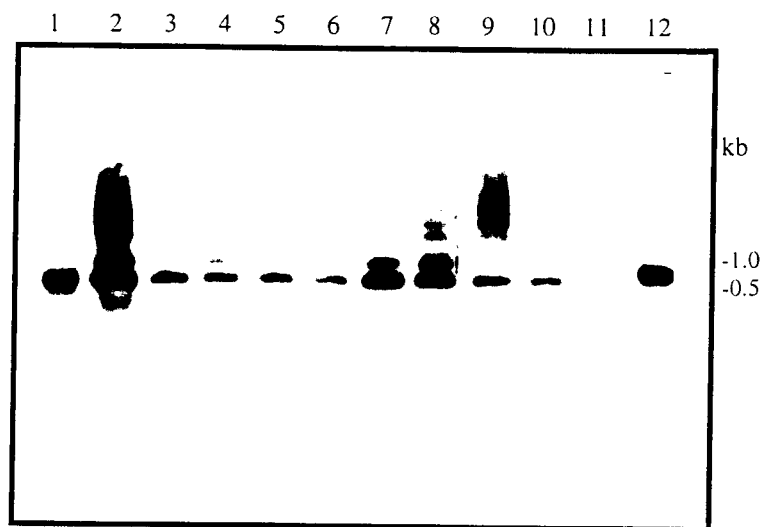


Figura 1. Southern blotting hybridization of *Sau3AI*-digested DNA from *X. fastidiosa* strains probed to f14. 1-10: A4, A1, B7, B9, C6, C10, E4, E6, F5, and H9, respectively; 11: PL788; 12: f14.

A

1 **GATC**CAGCAGA CCGTTGGCGT CCGTATAGGT CAGGGTGCCG CCTTCCAGGG AATACGCCGC
f14-1
61 GCTGGCAAAG TGCGCCGCAG TGAGCTGCAC GCCAGCAACG GCAGAGAGTG ...

B

... CACCTGTGCC TCATACGTCC ACGTGGCGAC TTGACCGGCC AGCGACGCCA GGTGAGCAGC 40
f14-2
CATGTCAGGG ACCAGGACGT GTGCGCCCTG CGGCG**GATC** 1

Figure 2. Partial nucleotide sequence of the fragment f14 isolated from the CVC-related *X. fastidiosa* A1. The annealing positions to the primers f14-1 and f14-2 are underlined, and the *Sau*3AI sites are in bold.

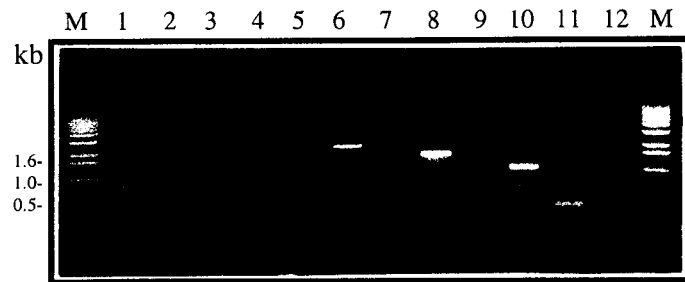


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of amplification products obtained from different strains of *X. fastidiosa*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, and *E. coli* DH5 α using f14 primers. M: DNA molecular weight marker (1.0 kb ladder, Gibco-Brl). 1-5: *X. fastidiosa* strains A1, OL01, CF01, PL788, and GP01, respectively. 6-11: *X. campestris* pv. *campestris* Ca110, *X. axonopodis* pv. *citri* 223, *B. gladioli* pv. *gladioli* 604, *B. andropogonis* 166, *P. syringae* pv. *garcae* 1297, and *E. coli* DH5 α , respectively.

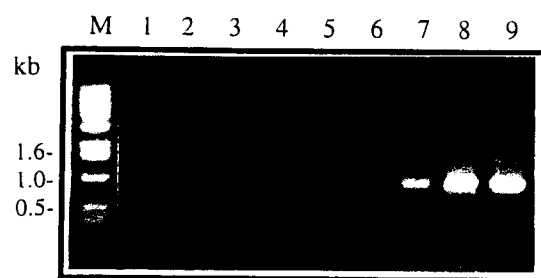


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of amplification products obtained from cell suspension of *X. fastidiosa* A1 (OD_{600} of 0.37, and tenfold dilutions) using primers f14-1 and f14-2. 1-9: 10^8 x to 1x, respectively. M: DNA molecular weight marker (1.0 kb ladder, Gibco-Brl).

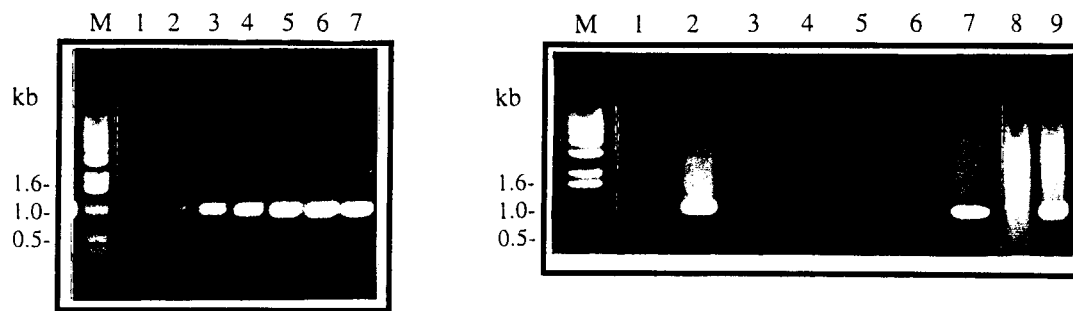


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of amplification products of cell suspension of *X. fastidiosa* JB1 (OD_{600} of 0.98, and tenfold dilutions), and plant extracts using primers JB1. M: DNA molecular weight marker (1.0 kb ladder, Gibco-Brl). A) 1-7: dilutions 10^7 x to 10x, respectively. B) 1-2: healthy and symptomatic citrus, respectively; 3-7: healthy coffee seedlings cv. Catuaí and cv. Mundo Novo, healthy coffee adult plants cv. Catuaí and cv. Mundo Novo, and symptomatic coffee adult plant cv. Mundo Novo, respectively.

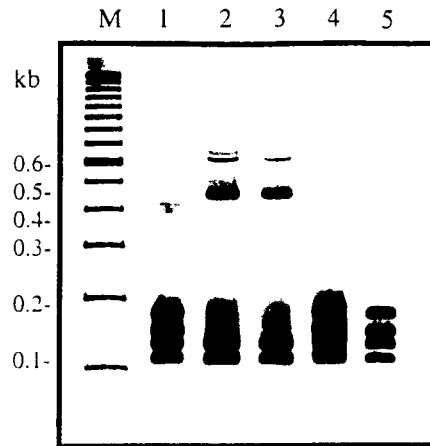


Figure 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of amplified fragments from different *X. fastidiosa* strains, using primers JB1, digested with *Hinf*I restriction enzyme. M: DNA molecular weight marker (100 bp ladder, Gibco-Brl). 1-5: PL788, CF01, JB1, OL01, GP01, respectively.

Acknowledgements

We would like to thank FUNDECITRUS for providing CVC strains of *X. fastidiosa*; to CAPES for the fellowship to H. Ferreira, and to Dr. O. Guerreiro Filho for supplying the coffee plants.

References

- Beretta, M.J.G., Harakawa, R., Chagas, C.M., Derrick, K.S., Barthe, G.A., Ceccard, T.L., *et al.* (1996) First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Dis.* **80**: 821.
- Beretta, M.J.G., Barthe, G.A., Ceccardi, T.L., Lee, R.F. and Derrick, K.S. (1997) A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Dis.* **81**: 1196-1198.
- Chang, C.J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. and Bové, J.M. (1993) Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **27**: 137-142.
- Chen, J., Lamikanra, O., Chang, C.J. and Hopkins, D.L. (1995) Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1688-1690.
- Cook, D. and Sequeira, L. (1991) The use of subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race 3. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 401-410.
- Darrasse, A., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y. (1994). Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 298-306.
- Destefano, S.A.L. and Rosato, Y.B. (1991) Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. *Rev. Bras. Genét.* **14**: 599-607.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Ferreira, H., Barrientos, F.J.A., Baldini, R.L. and Rosato, Y.B. (1995) Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 651-

655.

- Goss, T.J., O'Hara, G.W., Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. (1990) Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *J. Bacteriol.* **172**: 5173-5179.
- Hartung, J.S., Beretta, M.J.G., Brlansky, R.H., Spisso, J. and Lee, R.F. (1994) Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **84**: 591-597.
- He, C.X., Ciapina, L.P., Li, W.B., Donadio, L.C. and Lemos, E.G.M. (1996) ERIC-PCR for early detection of bacterium (*Xylella fastidiosa*) of citrus variegated chlorosis. In *42nd Annu. Meeting Int. Soc. Tropical Hort.*, Curitiba, PR, Brazil.
- Hill, B.L. and Purcell, A.H. (1995) Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. *Phytopathology* **85**: 1368-1372.
- Hopkins, D.L. (1989) *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 271-290.
- Hopkins, D.L. and Adlerz, W.C. (1988) Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Dis.* **72**: 429-431.
- Kohne, D.E., Levison, S.A. and Byers, M.J. (1977) Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousands: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry* **16**: 5329-5341.
- Kuflu, K.M. and Cuppels, D.A. (1997) Development of a diagnostic DNA probe for Xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4462-4470.
- Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Ochs, H.D. and Latt, S.A. (1985) Specific

- cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with na X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4778-4782.
- Lamar, E.E. and Palmer, E. (1984) Y-encoded, species-DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* **37**: 171-177.
- Lee, R.F., Beretta, M.J.G., Hartung, J.H., Hooker, M.E. and Derrick, K.S. (1993) Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathol.* **19**: 123-125.
- Lima, J.E.O., Miranda, V.S., Coutinho, A., Roberto, S.R. and Carlos, E.F. (1996) Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras e seu isolamento in vitro. *Fitopatol. Bras.* **21**: 392-393.
- Machado, M.A., Targon, M.L.P.N, Beretta, M.J.G., Laranjeira, F.F. and Carvalho, S.A.D. (1997) Detection of *Xylella fastidiosa* in species and varieties of citrus top-grafted to 'Pera' sweet orange infected with citrus variegated chlorosis. *Fitopatol. Bras.* **22**: 30-33.
- Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R.M.V.B.C. and Stall, R.E. (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**: 456-461.
- Moreno, M.R., Smith, J.F. and Smith, R.V. (1985) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined coomassie blue-silver stain procedure. *Anal. Biochem.* **151**: 466-470.
- Paradela-Filho, O., Sugimori, M.H., Ribeiro, I.J.A., Garcia-Junior, A., Beretta, M.J.G., Harakawa, R., *et al.* (1997). Occurrence of *Xylella fastidiosa* in coffee plants in Brazil. *Summa Phytopathol.* **23**: 46-49.
- Pooler, M.R. and Hartung, J.S. (1995) Genetic relationships among strains of *Xylella*

- fastidiosa* from RAPD-PCR data. *Curr. Microbiol.* **31**: 134-137.
- Purcell, A.H. and Hopkins, D.L. (1996) Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 131-151.
- Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A. and Flak, B.W. (1993) Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine Fanleaf Virus in grapevine tissue. *Phytopathology* **83**: 749-753.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seal, S.E., Jackson, L.A. and Daniels, M.J. (1992) Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3751-3758.
- Sherald, J.L. and Lei, J.D. (1991) Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees. *Plant Dis.* **75**: 200-203.
- Turner, T., Barber, C. and Daniels, M.J. (1984) Behaviour of the transposons Tn5 e Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 101-107.
- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., Weisburg, W.G., Mandelco-Paul, L. and Brenner, D.J. (1987) *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 136- 143
- Yonce, C.E. and Chang, C.J. (1987) Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter

leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolations and ELISA technique. *Environ. Entomol.* **16**: 68-71.

Parte II

Análises complementares:

Is f14 encoding for an extensin-like peptide?

Sequencing analysis

By using a subtractive hybridization protocol we have cloned a DNA fragment (called f14) from *X. fastidiosa* related to citrus, which showed specific hybridization to CVC-related *X. fastidiosa* strains in dot and Southern blot experiments (Parte I). The fragment f14 was entirely sequenced and it presented 669 bp. This sequence was deposited in the GenBank data base under accession number AF052587. Computer analysis showed G+C content of 63.8%, and a search for open reading frames revealed a partial ORF, lacking the 5' end, and encoding for a 183-residues polypeptide (called F14). The f14 nucleotide sequence (flanked by two *Sau3AI* restriction sites) and the deduced amino acid sequence are shown in Figure I. A BLASTX (Altschul *et al.*, 1990; Gish & States, 1993) search of the PIR protein sequence database revealed homology between F14 and the N-terminal amino acid sequence of the protein Algal-CAM from the green algae *Volvox carteri* (Huber & Sumper, 1994). The N-terminal domain of Algal-CAM (amino acids 17-116) exhibits proline-rich domains characteristic of extensins, which are hydroxyproline-rich glycoproteins found in cell walls of plants and algae (Cassab & Varner, 1988). In these domains, proline residues are usually organized in Ser-(Hyp)₄ motifs and other amino acids like His, Lys, Tyr, Val,

Thr, Leu, Arg, Gln, Ala, Phe and Asn may be associated to them (Cassab & Varner, 1988; Kieliszewski & Lamport, 1994). In the overall F14 amino acid composition, proline was the most frequent (15%), followed by Arg (11%), Thr (10%) and Ser (10%); Val, Leu, Gly and Ala were present each one with ~7%. Tyrosine residues, which probably participate in covalent links between different extensin molecules (Kieliszewski & Lamport, 1994; Schnabelrauch *et al.*, 1996), were almost absent in F14 sequence. Multiple alignments using the F14 peptide, the N-terminal portion of Algal-CAM and three other extensins from *Arabidopsis thaliana*, *Catharanthus roseus* and *Nicotiana glauca*, revealed three proline-rich domains in F14 sequence (Figure II, boxes numbered 1 to 3), which were tentatively boxed considering also the amino acids commonly associated to the Ser-Hyp motifs. Despite the existence of these proline-rich domains, no similarities were found among the amino acid sequences from the extensins group. Although no characteristic extensin motif Ser-(Hyp)₄ have been found in the F14 sequence, a possible X[Hyp]_n variant motif (Kieliszewski & Lamport, 1994) was detected (GPPP - Figure II, first box underlined), and other shorter proline-blocks embedded in the sequence. Blocks of (hydroxy)proline contribute to molecular inflexibility and act as major glycosylation sites (Kieliszewski & Lamport, 1994).

Diverse extensins has been isolated from different plants and algae (reviewed by Cassab & Varner, 1988), and the roles for these hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) in the cell wall have been related to their chemistry, which is dependent on extensive post-translational modifications like hydroxylation, glycosylation, and cross-linking (reviewed by Kieliszewski & Lamport, 1994). The characteristic repetitive motifs Ser-(Hyp)₄ in association with other amino acids seem to constitute functional sites involved in many aspects of cell wall assembly (Kieliszewski & Lamport, 1994). Despite

the Ser-(Hyp)₄ sequence had been considered diagnostic for extensins, Kieliszewski & Lamport (1994) have also discussed in their review the possibility of disruption of the tetrahydroxyproline motif based on other extensins characterized from beet and maize. This disruptions can alter significantly the structure and the role of these molecules. Besides structural function, proline-rich proteins seem to have other activities (Hoon *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 1992).

Considering the great variability that has been observed among different (hydroxy)proline-rich (glyco)proteins (Cassab & Varner, 1988; Kieliszewski & Lamport, 1994) and the detection of some proline-rich domains in F14, it might be suggested that F14 has some structural function. Another evidence could be the abundance and the clustering of amino acids like Pro, Arg, Thr, Ser, Val, Leu, Ala and Gly, all of them commonly found in these (hydroxy)proline-rich (glyco)proteins.

This is the first report about a proline-rich polypeptide in prokaryotes sharing similarities with structural proteins from cell walls of plants and algae. Further studies, using the complete F14 coding sequence, are needed to clarify its function, as well as its expression and cellular location. If F14 has some structural role in cell wall of *X. fastidiosa*, it could contribute in cell wall reinforcement against plant defensive products or stress-conditioning environments. This defensive strategy is well known in plants, where (hydroxy)proline-rich (glyco)proteins are considered members of the gene expression-dependent defensive response, which present as main function the formation of structural barriers against the entrance of pathogens (Dixon *et al.*, 1994; Baron & Zambryski, 1995).

```

1  GATCCAGCAGA CCGTTGGCGT CCGTATAGGT CAGGGTGCCG CTTCCAGGG AATACGCCGC
                                f14-1
61 GCTGGCAAAG TGCGCCGCAG TGAGCTGCAC GCCAGCAACG GCAGAGAGTG TGCCGCTCAC
                                *
121 TCCACTGCCG GAGAGCGCCA CGGTGATGCT GCTGCCCTCC TCCAAGCCGG TGACATCACT
    E V A P   S R W   P S A   A A R R   W A P   S M V
181 GAGTACCAAC GCAGAACGTC TGGTGTAGGT GACTGACCAG GCGGTTCCAC TGTGTTGCAT
    S Y W R   L V D   P T P   S Q G P   P E V   T N C
241 CGTGCAGGCC GCTGGGCGTC GTCCCAACTG AAGCCGGAGG GAGGAACCAC CGGCAGCCTG
    R A P R   Q A D   D W S   F G S P   P V V   P L R
301 TGACACCCAG TCATAGGCGT CATAGGCCTG CATGATGGTG GCCGTGCCTT GCCCGCGCTT
    H C G T   M P T   M P R   C S P P   R A K   G A S
361 GGGCCACGCT CCCAGTGGCA CACGCTACCA GCGGTGATTC CCTCAGTCGT GTTGAGCACC
    P G R E   W H C   V S G   A T I G   E T T   N L V
421 GCTACGGTGC CAAAGAGTGC CGTCACAGTG CCCGTGGTGT GCAATACCAT CGGCGGCGGT
    A V T G   F L A   T V T   G T T H   L V M   P P P
481 CCAGTGCAGC ACGGTCCCCA CGGCAATGGC GGTGACGTTG TTGAGCCTGA CATGGAATTT
    G T C C   P G W   P L P   P S T T   S G S   M S N
541 AAGAACAGAG GCGACGGTTC CAGAGTGCGG CACCTGTGCC TCATACGTCC ACGTGGCGAC
    L F L P   S P E   L T R   C R H R   M R G   R P S
601 TTGACCGGCC AGCGACGCCA GGTGAGCAGC CATGTCAGGG ACCAGGACGT GTGCGCCCTG
                                f14-2
    K V P W   R R W   T L L   W T L S   W S T   H A R
661 CGGCGGATC
    R R I

```

Figure I. Nucleotide sequence of the fragment f14 (669 bp) isolated from the CVC-related *X. fastidiosa* A1. The aminoacid sequence corresponding to the putative peptide F14 is represented below. Annealing positions to the primers f14-1 and f14-2 are underlined, and the *Sau*3AI restriction sites are in bold.

```

                                1
1  IRRRAHTSWSLTWLLTWRWRPVKSPRGRMRHRCRTLEPSP-----LFLNSMSGSTTSPPLPWGPCCTGPPFMVLHTTGTVTALFGTV
2  -MRMAIAAFMNYLLACAGLLFLTPAWKSINVLAFTYPP-----LIASPSSTSPPLPSTPSPPPPLLPALASPPPPENEDVD-----
3  -----KSPPHPHVCXFPPPP-----CYSNSPKXHYKSPPTPYVXHSPPPPPXXSXSPKPAYNFXPPP
4  MTPFLTALVIALVALCCLPSQTTADYKYSSPPPP-YHYSSPPPPVH-----SPPPPPVYKYKSPPPPPIHKSPPPPPYVYKSPPPPPVYKY
5  MAVIISVKVLLIQLFVLVLGFSFKLSHGYYQAQFFLTLPLPFDLPPAKIPLLPTRGVPSISLVPPPPPPSPRSPPPSPSPPPSPSPF---

                                2                                3
1  AVLNTTEGITAGSVCHWERGPS---AGKARPP---SCRPMTP--MTGCHRLPVVPPSGFSWDDAQRPARCNTVEPPGQSPTPDVLRHWYSVMSPAWRRAAASPWRSPAVE
2  -----RPP---LVKDNTF--TSPASSQPAIPPP-----SPPSPSTPPTPPV.....
3  YVYSSPPPPYX-----SPAPK---PVYKFPF---PPYVYNS--PP.....
4  KSPPPPPPVHKYPPYIYKSPPPPPHIYKSPPPPVYKSPPPK--NPYVYKSPPPPPVYKYLHHLHQKPYVYKSP--PPPFVHK---SPPPPVYKSPPPKPYVY
5  ---PPTSPPPPPSTLIPFIPPF---TGGLLPP---LPGSMLPGLLPLIPNLDPVPHTGG-GPPVNRPKPSAPSPPVKPPPPPPSECKP-SPPDQSAKQPPPAKQPPPP

```

Figure II. Alignment of amino acid sequences of different extensins from plant and algae cell walls and F14. 1: F14; 2: Algal-CAM from *Volvox carteri* (reference PID g1076222); 3: extensin precursor from *Arabidopsis thaliana* (PID 17370); 4: extensin from *Catharanthus roseus* (PID g1486265); and 5: pistil extensin-like protein from *Nicotiana glauca* (PID g1184100). Proline-rich domains are boxed; the variant motif GPPP from F14 is underlined in box 1.

CONCLUSÕES

1. A técnica de hibridização subtrativa, descrita por Lamar & Palmer (1984), foi adaptada e empregada pela primeira vez na bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa*, objetivando a identificação e clonagem de fragmentos específicos desta.
2. Foram identificados quatro fragmentos de DNA de *X. fastidiosa* A1 que apresentaram hibridização específica para linhagens de *X. fastidiosa*. Um deles, f14, atuou como sonda específica para *X. fastidiosa* isoladas de citros, em experimentos de “dot” e “Southern blotting”.
3. Uma sequência de aminoácidos designada F14, deduzida da sequência de nucleotídeos de f14, apresentou domínios ricos em prolina similares a domínios de (glico)proteínas ricas em (hidroxi)prolina, como extensinas, constituintes de paredes celulares de plantas e algas.
4. Primers desenvolvidos com base na sequência nucleotídica de f14 não detectaram a presença da bactéria em extratos de citros com sintomas de CVC. Entretanto, em reações de PCR utilizando-se amostras de DNA, somente isolados de *X. fastidiosa* apresentaram um produto de amplificação específico de cerca de 600 pb.
5. Um produto de RAPD-PCR de cerca de 900 pb característico para linhagens de *X. fastidiosa* isoladas de citros foi sequenciado e novos primers foram construídos para a detecção da bactéria em extratos de plantas. Estes primers mostraram ser temperatura-restritivos, onde em reações de PCR-diagnóstico utilizando-se a temperatura de anelamentos entre 68-70°C, somente linhagens de *X. fastidiosa* relacionadas à CVC e depauperamento das folhas do cafeeiro foram detectadas.

BIBLIOGRAFIA GERAL

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Baron, C. & Zambryski, P.C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu. Rev. Gen.* 29: 107-129.
- Brlansky, R.H.; Davis, C.L.; Lee, R.F. & Timmer, L.W. 1993. Immunogold localization of xylem-inhabiting bacteria affecting citrus in Argentina and Brazil. *Proc. 12th Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, New Delhi, L.W.T.P. Moreno, J.V. DaGraca. Riverside, CA: 311-319.
- Beretta, M.J.G.; Harakawa, R.; Chagas, C.M.; Derrick, K.S.; Barthe, G.A.; Ceccard, T.L.; Lee, R.F.; Paradela, O.; Sugimori, M. & Rubiero, I.A. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Dis.* 80: 821.
- Beretta, M.J.G.; Barthe, G.A.; Ceccardi, T.L.; Lee, R.F. & Derrick, K.S. 1997. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Dis.* 81: 1196-1198.
- Carlos, E.F.; Rodrigues Neto, J. & Beretta, M.J.G. 1997. A bactéria *Xylella fastidiosa*. In: Donadio, L.C. & Moreira, C.S., eds., Clorose variegada dos citros, 1ª ed., v. 1, p. 22, Bebedouro, SP.
- Carvalho, S.A. & Souza, M. 1991. Escaldadura das folhas da ameixeira: provável responsável pelo declínio da cultura no sul do estado de Minas Gerais. *Pes. Agrop. Bras.* 26: 2015-2020.
- Cassab, G.I. & Varner, J.E. 1988. Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 321-353.
- Chagas, C.M.; Rossetti, V. & Beretta, M.J.G. 1992. Electron microscopy studies of xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus chlorosis disease in Brazil. *J. Phytopathol.* 134: 306-312.
- Chang, C.J.; Garnier, M.; Zreik, L.; Rossetti, V. & Bové, J.M. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated

- chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* 27: 137-142.
- Chen, J.; Chang, C.J.; Jarret, R.L. & Gawel, N. 1992. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. *Phytopathology* 82: 973-977.
- Chen, J.; Lamikanra, O.; Chang, C.J. & Hopkins, D.L. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and Oak leaf scorch pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1688-1690.
- Cook, D. & Sequeira, L. 1991. The use of subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race 3. *Mol. Gen. Genet.* 227: 401-410.
- Darrasse, A.; Kotoujansky, A. & Bertheau, Y. 1994. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 298-306.
- Davis, M.J.; Purcell, A.H. & Thompson, S.V. 1978. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 70: 425-429.
- De Negri, J.D. 1990. Clorose variegada dos citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais. Com. Tec. n° 82, 6p., Ext. Rural, CATI, Campinas, SP.
- Destefano, S.A.L. & Rosato, Y.B. 1991. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. *Rev. Bras. Genét.* 14: 599-607.
- Dixon, R.A.; Harrison, M.J. & Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 479-501.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Fernandez-Valiela, M.V. & Bakarcic, M. 1954. Nuevas enfermedades del ciruelo em el Delta del Parana. *Inf. Investigaciones Agricolas* 84: 2-7.
- Ferreira, H.; Barrientos, F.J.A.; Baldini, R.L. & Rosato, Y.B. 1995. Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 651-655.
- French, W.J. & Kitajima, E.W. 1978. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguai. *Plant Dis. Rep.* 63: 1035-1038.

- French, W.J. & Stassi, D.L. 1978. Response of phony-infected peach trees with gibberellic acid. *HortScience* 13: 158-159.
- Fry, S.M. & Milholland, R.D. 1990. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathology* 80: 61-65.
- Fry, S.M.; Huang, J.S. & Milholland, R.D. 1994. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. *Phytopathology* 84: 357-363.
- Gravena, S.; Lopes, J.R.S.; Paiva, P.E.B.; Yamamoto, P.T. & Roberto, S.R. 1997. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: Donadio, L.C. & Moreira, C.S., eds., Clorose variegada dos citros, 1ª ed., v. 1, p. 37, Bebedouro, SP.
- Gish, W. & States, D.J. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 3: 266-272.
- Goldman, M.H.; Pezzotti, M.; Seurinck, J. & Mariani, C. 1992. Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell* 4: 1041-1051.
- Goheen, A.C.; Nyland, G. & Lowe, S.K. 1973. Association of a rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63: 341-345.
- Goss, T.J.; O'Hara, G.W.; Dilworth, M.J. & Glenn, A.R. 1990. Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *J. Bacteriol.* 172: 5173-5179.
- Hartung, J.S.; Beretta, M.J.G.; Brlansky, R.H.; Spisso, J. & Lee, R.F. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84: 591-597.
- He, C.X.; Ciapina, L.P.; Li, W.B.; Donadio, L.C. & Lemos, E.G.M. 1996. ERIC-PCR for early detection of bacterium (*Xylella fastidiosa*) of citrus variegated chlorosis. 42nd Annu. Meeting Int. Soc. Tropical Hort., Curitiba, PR.
- Hill, B.L. & Purcell, A.H. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. *Phytopathology* 85: 1368-1372.

- Hoon A.J.; Choi Y.; Kim S.G.; Myung K.Y.; Do C.Y. & Seob L.J. 1998. Expression of a Soybean Hydroxyproline-Rich Glycoprotein gene is correlated with maturation of roots. *Plant Physiol.* 116: 671-679.
- Hopkins, D.L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22: 271-290.
- Hopkins, D.L. & Adlerz, W.C. 1988. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Dis.* 72: 429-431.
- Hopkins, D.L. & Mollenhauer, H.H. 1973. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. *Science* 179: 298-300.
- Huang, P.Y.; Milholland, R.D. & Daykin, M.E. 1986. Structural and morphological changes associated with the Pierce's disease bacterium in bunch and muscadine grape tissue. *Phytopathology* 76: 1232-1238.
- Huber, O. & Sumper, M. 1994. Algal-CAM: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga *Volvox* with homology to *Drosophila* fasciclin I. *EMBO J.* 13: 4212-4222.
- Jindal, K. K. & Sharma, R. C. 1987. Outbreaks and new records: India almond leaf scorch a new disease from India. *F.A.O. Plant Prot. bull.*, 64-65.
- Kamper, S.M.; French, W.J. & Dekloet, S.R. 1985. Genetic relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 185-188.
- Kieliszewski, M.J. & Lamport, D.T.A. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.* 5: 157-172.
- Kitajima, E.W.; Mohan, S.K.; Tsuneta, M. Bleicher, J.; french.. W.J. & Leite Jr., R.P. 1981. Ocorrência da escaldadura das folhas da ameixeira nos estados do Paraná e Santa Catarina. *Fitopatol. Bras.* 6: 285-292.
- Kohne, D.E.; Levison, S.A. & Byers, M.J. 1977. Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousands: the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry* 16: 5329-5341.
- Kuflu, K.M. & Cuppels, D.A. 1997. Development of a diagnostic DNA probe for Xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4462-4470.

- Kunkel, L.M.; Monaco, A.P.; Middlesworth, W.; Ochs, H.D. & Latt, S.A. 1985. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with na X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4778-4782.
- Lamar, E.E. & Palmer, E. 1984. Y-encoded, species-DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 37: 171-177.
- Lee, R.F.; Beretta, M.J.G.; Hartung, J.H.; Hooker, M.E. & Derrick, K.S. 1993. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathol.* 19: 123-125.
- Lee, R.F.; Raju, B.C.; Nyland, G. & Goheen, A.C. 1982. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 72: 886-888.
- Leite, R.M.V.B.C.; Stall, R.E.; Hopkins, D.L. & Minsavage, G.V. 1993. Caracterização de estirpes de *Xylella fastidiosa* através de análise de DNA genômico e plasmídeo. *Summa Phytopathol.* 19: 46.
- Leite Jr, R.P. & Leite, R.M.V.B.C. 1991. Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathol.* 17: 7.
- Leu, L.S. & Su, C.C. 1993. Isolations, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Dis.* 6: 642-646.
- Li, W.B. 1997. Estudo de resistência ou tolerância à clorose variegada dos citros. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- Lima, J.E.O. 1995. A pesquisa sobre o amarelinho no Fundecitrus. *Laranja* 16: 137-144.
- Lima, J.E.O.; Miranda, V.S.; Coutinho, A.; Roberto, S.R. & Carlos, E.F. 1996. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras e seu isolamento in vitro. *Fitopatol. Bras.* 21: 392-393.
- Lisitsyn, N.; Lisitsyn, N. & Wigler, M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951.
- Machado, M.A.; Targon, M.L.P.N; Beretta, M.J.G.; Laranjeira, F.F. & Carvalho, S.A.D. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in species and varieties of citrus top-grafted to 'Pera' sweet orange infected with citrus variegated chlorosis. *Fitopatol. Bras.* 22: 30-33.

- Minsavage, G.V.; Thompson, C.M.; Hopkins, D.L.; Leite, R.M.V.B.C. & Stall, R.E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- Mircetich, S.M.; Lowe, S.K.; Moller, W.J. & Nyland, G. 1976. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66: 17-24.
- Mizubuti, E.S.G.; Matsuoka, K. & Parizzi, P. 1994. Association of *Xylella*-like bacteria with sweet orange with variegated chlorosis symptoms in the Zona de Mata de Minas Gerais. *Fitopatol. Bras.* 19: 241-244.
- Mohan, S.K.; Leite Jr., R.P.; Tsuneta, M. & Havagge, R. 1980. Problema de escaldadura da folha de ameixeira no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR-Informe de Pesquisa: 31.
- Mollenhauer, H.H. & Hopkins, D.L. 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease-infected bacterium in grape xylem tissue. *J. Bacteriol.* 119: 612-618.
- Mollenhauer, H.H. & Hopkins, D.L. 1976. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 95-100.
- Moreno, M.R.; Smith, J.F. & Smith, R.V. 1985. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined coomassie blue-silver stain procedure. *Anal. Biochem.* 151: 466-470.
- Mourão Filho, F.A.A.; Coutinho, A.; Donadio, L.C.; Mendes, B.M.J. & Li, W. 1997. Melhoramento dos citros para resistência à CVC. In: Donadio, L.C. & Moreira, C.S., eds., Clorose variegada dos citros, 1ª ed., v. 1, p. 54, Bebedouro, SP.
- Paradela-Filho, O.; Sugimori, M.H.; Ribeiro, I.J.A.; Garcia-Junior, A.; Beretta, M.J.G.; Harakawa, R.; Machado, M.A.; Laranjeira, F.F.; Rodrigues-Neto, J. & Beriam, L.O.S. 1997. Occurrence of *Xylella fastidiosa* in coffee plants in Brazil. *Summa Phytopathol.* 23: 46-49.
- Pooler, M.R. & Hartung, J.S. 1995a. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. *Curr. Microbiol.* 31: 134-137.
- Pooler, M.R. & Hartung, J.S. 1995b. Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.* 31: 377-381.

- Pooler, M.R.; Myung, I.S.; Bentz, J.; Sherald, J. & Hartung, J.S. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 123-126.
- Purcell, A.H. 1979. Leafhopper vectors of xylem-borne plant pathogens. In: Maramorosch, K. & Harris, K.F., eds., Leafhopper vectors and plant disease agents, Academic Press, New York.
- Purcell, A.H. 1990. Homopteran transmission of xylem-limited bacteria. In: Harris, K.F., ed., Advances in vector research, v. 6, Springer-Verlag, New York.
- Purcell, A.H. & Frazier, N.W. 1985. Habitats and dispersal of the leafhopper vectors of Pierce's disease in the San Joaquin Valley, *Hilgardia*, Oakland, n. 53, p. 1-32.
- Purcell, A.H. & Hopkins, D.L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 131-151.
- Raju, B.C. & Wells, J.M. 1986. Diseases caused by fastidious Xylem-limited. *Plant Dis.* 70: 182.
- Rossetti, V.; Garnier, M.B.; Beretta, J.M.; Teixeira, M.J.G.; Quaggio, A.R.R. & DeNegri, J.A. 1990. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chorose variegée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *C.R.S. Acad. Sci.* 3: 345-349.
- Rossetti, V.; Gonzales, M.A. & Donadio, L.C. 1997. Histórico. In: Donadio, L.C. & Moreira, C.S., eds., Clorose variegada dos citros, 1^a ed., v. 1, p. 1, Bebedouro, SP.
- Rowhani, A.; Chay, C.; Golino, D.A. & Flak, B.W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine Fanleaf Virus in grapevine tissue. *Phytopathol.* 83: 749-753.
- Sambrook, J.; Fritsh, E.F. & Maniats, T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Schnabelrauch L.S.; Kieliszewski M.; Upham B.L.; Alizedeh H. & Lamport D.T. 1996. Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* 9:

477-489.

- Seal, S.E.; Jackson, L.A. & Daniels, M.J. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3751-3758.
- Sherald, J.L. & Lei, J.D. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees. *Plant Dis.* 75: 200-203.
- Straus, D. & Ausubel, F.M. 1990. Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1889-1893.
- Tubelis, A. 1992. Difusão temporal da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranjas doces no estado de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. In: Encontro sobre amarelinho dos citros (ou CVC), Piracicaba, SP.
- Tubelis, A.; Barros, J.C. & Leite, R.M.V.B.V. 1993. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. *Laranja* 14: 239-254.
- Turner, T.; Barber, C. & Daniels, M.J. 1984. Behaviour of the transposons Tn5 e Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 195: 101-107.
- Wells, J.M.; Raju, B.C.; Hung, H.Y.; Weisburg, W.G.; Mandelco-Paul, L. & Brenner, D.J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 136-143
- Yonce, C.E. & Chang, C.J. 1987. Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolations and ELISA technique. *Environ. Entomol.* 16: 68-71.