

# Detecção de *Xylella fastidiosa* em cigarrinhas vetoras por meio da reação em cadeia da polimerase

Rubia de Oliveira Molina<sup>1</sup>, Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zuliani<sup>2</sup>, Carlos Alexandre Zanutto<sup>3</sup>, Larissa Siqueira Soares<sup>4</sup> e William Mário de Carvalho Nunes<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Rodovia Celso Garcia Cid, km 375,86047-902 - Londrina – PR. e-mail: rubiamolina@iapar.br

<sup>2,3,4,5</sup>Universidade Estadual de Maringá-NBA-Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, Av. Colombo, 5790, UEM, 87020-900, Maringá, PR (alineorb@hotmail.com, cazanutto@uem.br, paizinhos\_larissa@hotmail.com, wmcnunes@uem.br)

Resumo - A bactéria *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose variegada dos citros (CVC), é dependente da ação de insetos vetores para sua disseminação e infecção de plantas cítricas hospedeiras. Os insetos vetores (Hemiptera:Cicadellidae), conhecidos como cigarrinhas, transmitem a bactéria para plantas saudáveis depois de se alimentarem de plantas contaminadas. A detecção de *X. fastidiosa* nas cigarrinhas vetoras é dificultada pela pouca quantidade de células bacterianas além da presença de inibidores da PCR (*Reação em cadeia da polimerase*) nos extratos do inseto. O objetivo deste trabalho foi comparar as técnicas de extração de DNA genômico de cigarrinhas vetoras e desta maneira, estabelecer um protocolo eficiente que possibilite a detecção da bactéria *X. fastidiosa*, por meio da técnica de PCR. Foram comparados dois protocolos de extração de DNA: protocolo I, a base de fenol e clorofórmio, testado para 162 cabeças de espécies de cigarrinhas e o protocolo II, a base da resina Chelex 100, utilizadas 155 cabeças de espécies de cigarrinhas. Os resultados obtidos em relação aos testes moleculares apontaram para extração com protocolo I como sendo a melhor forma para a detecção de bactéria *X. fastidiosa* nas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina*.

Palavras-chave: Clorose variegada dos citros, extração de DNA, testes moleculares.

## Detection in *Xylella fastidiosa* sharpshooters by polymerase chain reaction

Abstract - The bacterium *Xylella fastidiosa*, the causal agent of Citrus variegated chlorosis (CVC), is dependent of the action of insect vectors for its dissemination and infection of citrus host. The insects (Hemiptera: Cicadellidae), known as leafhoppers, transmits the bacteria to healthy plants after feeding on infected plants. Detection of *X. fastidiosa* in sharpshooters is hampered by the small amount of bacterial cells and presence of inhibitors of PCR (polymerase chain reaction) in extracts of the insect. The objective this study was to compare the techniques of genomic DNA extraction sharpshooters and thus establish an efficient protocol that enables the detection of the bacterium *X. fastidiosa* by PCR. Compared two DNA extraction protocols: Protocol I, the basis of phenol and chloroform tested for 162 heads of leafhoppers and Protocol II, the base resin Chelex 100, used 155 heads leafhoppers. The results obtained with respect to molecular tests pointed to extraction protocol I as the best way to detect bacteria *X. fastidiosa* in sharpshooters *Dilobopterus costalimai* and *Acrogonia citrina*.

**Keywords:** Citrus variegated chlorosis (CVC), DNA extraction, molecular tests.

### Introdução

A Clorose variegada dos citros está presente no Brasil desde 1987, sendo os principais relatos de sua ocorrência na região norte do Estado de São Paulo (Rosetti et al., 1990). Segundo alguns autores, relatos ou levantamentos feitos à doença disseminou-se rapidamente pelas regiões citrícolas do Distrito Federal, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Goiás (Tubelis et al., 1993), no Paraná (Leite, Jacomino 1993; Nunes et al., 2001) e Santa Catarina (Leite Junior et al., 1996). Desde então, a doença vem trazendo sérios prejuízos para a citricultura brasileira. Causada pela bactéria *X. fastidiosa* (Wells), é transmitida para plantas suscetíveis de

laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] por meio de insetos vetores (Hemiptera: Cicadellidae), conhecidos como cigarrinhas, que se alimentam da seiva do xilema das plantas. As cigarrinhas podem transmitir a bactéria durante grande parte de sua vida, segundo Lopes (1996) elas perdem a capacidade de transmissão da bactéria durante o período de ninfa com as ecdises até a passagem para a fase adulta. Entre as diversas cigarrinhas que ocorrem em citros, as espécies comprovadamente vetoras são *Dilobopterus costalimai* Young, *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Plesiomata corniculata* Young, *Acrogonia virescens* (Metcalf), *Ferrariana trivittata* (Signoret),

*Homalodisca ignorata* Melichar, *Macugonalia leuconelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Blanchard) e *Sonesimia grossa* (Signoret) (Roberto et al. 1996; Lopes, 1996).

Estudos de microscopia eletrônica de varredura têm mostrado que as células de *X. fastidiosa* se encontram concentradas em placas aderidas a alguns locais específicos (Lopes, 1996). Na espécie vetora *Graphocephala atropunctata*, a bactéria multiplica-se e liga-se ao canal de alimentação (precibário) e câmara de sucção (cibário) (Hopkins, 1983).

O uso da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) para detectar *X. fastidiosa* em amostras de tecido de plantas infectadas, baseado na especificidade dos "primers", teoricamente, permite a detecção de 10 a 100 bactérias por reação de PCR (Pooler, Hartung, 1995). A utilização desta técnica para detecção da bactéria em insetos vetores da CVC vem sendo utilizada amplamente por diversos autores (Hill, Purcell 1995; Ciapina et al., 2004; Marucci et al., 2003).

O teste de PCR duplo, chamado *nested* PCR é um eficiente método para detecção de organismos ou produtos das amostras com presença de baixas concentrações de DNA e altas concentrações de contaminantes que inibem a amplificação do DNA. A detecção da *X. fastidiosa* em amostras de insetos pode ser dificultada pelo baixo número de células bacterianas presentes nos insetos vetores (Ciapina et al., 2004).

Bextine et al. (2004), após analisarem diversos métodos de extração de DNA de *X. fastidiosa* a partir de amostras de insetos vetores, conseguiram melhores resultados utilizando um método com a resina quelante Instagene Matrix (BioRad®), do que com o uso de protocolo com fenol/clorofórmio. Avaliando-se fontes escassas de DNA, os autores determinaram que o tratamento com esta resina quelante pode agir como purificador das amostras de DNA.

Diversas dificuldades ainda são encontradas para extração de DNA de insetos e para a detecção de *X. fastidiosa* nestes vetores. Por isso, estudos para a comparação e estabelecimento de um protocolo eficiente são necessários para melhor entendimento do mecanismo de transmissão e da capacidade de infecção das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*.

O objetivo deste trabalho foi comparar técnicas de extração de DNA de cigarrinhas vetoras para o estabelecimento de um protocolo eficiente na extração de DNA genômico, que possibilite a detecção da bactéria *X. fastidiosa* por meio da técnica de PCR.

## Material e Métodos

As cigarrinhas vetoras foram coletadas em dois pomares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), variedade Pêra, localizados na região noroeste do estado Paraná, Brasil: sítio Laranjeiras I, no município de Nova Esperança (23° 12' 47.013" S e 52° 17' 59.391" O) e sítio Nossa Senhora Aparecida em Paranavaí (23° 03' 26.336" S e 52° 23' 33.672" O). O experimento foi realizado no período de junho de 2005 a setembro de 2006.

As espécies de cigarrinhas foram capturadas com armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®), cortadas em retângulos, medindo 9,0 cm x 12,0 cm, fixadas ao norte da copa das plantas cítricas a uma altura de 1,70 m do solo (Roberto et al. 1997). Para a amostragem empregou-se uma armadilha, em média, para cada 200 plantas. Foram avaliadas vinte armadilhas por pomar a cada trinta dias. As mesmas foram distribuídas na 5ª planta e na 25ª planta em 10 ruas no pomar, aleatoriamente. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação (Nunes et al., 2007).

Após a coleta, foi realizada a identificação das cigarrinhas, sendo que as cabeças foram retiradas e transferidas para microtubos de centrifuga de 1,5 mL, identificados com a data, o local e a planta onde foi coletada. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -4 °C, para posterior extração de DNA no laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a extração de DNA, foram utilizadas 317 cabeças de espécies de cigarrinhas (Tabela 1), sendo que cada amostra utilizada continha entre uma e duas cabeças. Para a avaliação da eficiência dos resultados no método de extração de DNA, foram utilizados dois protocolos diferentes: Protocolo I (Hung et al., 2004), foram usadas 162 cabeças de cigarrinhas; Protocolo II (Ciapina et al., 2004), 155 cabeças.

### a) Protocolos

Protocolo I: Hung et al. (2004). Foi utilizado para extração de DNA total de cigarrinhas de citros. Foram agrupadas em microtubos de centrifuga de 1,5 mL de uma a duas cabeças de cigarrinhas da mesma espécie coletadas na mesma etiqueta. Após este processo, foram adicionados 300µl de solução do tamponante de extração, contendo 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 0,05M NaCl, 1% de *N*-laurylsarcosyl nas amostras, que foram maceradas com auxílio de uma ponteira esterilizada de micropipeta e incubadas a 55 °C por 1 h. Em seguida, foram acrescentados a amostras 500 µl de

fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:2 mL) sendo centrifugadas por 10 min., 4 °C a 8.000 rpm. Foram retirados aproximadamente 500 µl de sobrenadante, transferidos para microtubos esterilizados de 1,5 mL, em seguida acrescentando-se clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugadas por 10 min. a (4° a 8.000 G). Novamente foi retirado o sobrenadante cuidadosamente e transferidos para microtubos novos e estéreis de 1,5 mL e acrescentados 800 de etanol 100%, mantidas over-night. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 min. 4 °C a 12.000 G para a precipitação de DNA e formação do pellet e o sobrenadante descartado. Logo após foram acrescentados 500 µl de etanol 70% nas amostras que foram centrifugadas por 10 min, 4° a 8.000 G e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi repetido o processo com etanol absoluto gelado. Após serem centrifugadas e o sobrenadante descartado, os tubos foram invertidos em uma superfície acéptica e, após 10 min., foi adicionado 25 µl de 1/10 TE (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) RNase e armazenados a temperatura de -4 °C.

Protocolo II: Ciapina et al. (2004) o procedimento inicial para separação das cigarrinhas foi o mesmo utilizado para o protocolo I, em seguida, as amostras foram maceradas com 200 µl de solução a 0,25% de Polyvinilpolipirrolidona (PVPP) com ajuda de ponteiros esterilizados de microcentrífuga e em seguida, centrifugadas a 12.000 G (temperatura ambiente) por 20 min. descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 100 µl de Chelex 100 (ativado), segundo Ciapina et al. (2004), e, então as amostras foram incubadas a 56 °C por 30 min. e posteriormente agitadas em agitador de tubos (vortex) por 10s, seguindo-se nova centrifugação a 12.000G (temperatura ambiente) por 3min., sendo as amostras fervidas durante 8min e novamente, agitadas por 10 s. Finalmente, as amostras foram centrifugadas por 3 min. a 12.000 G e o sobrenadante transferido para microtubos novos de 0,5 mL, mantidas a -4 °C para realização do teste de PCR.

## b) Reação de PCR

Para a reação de amplificação de DNA, utilizaram-se amostras dos dois métodos de extração, sendo testados os “primers” específicos para *X. fastidiosa*, CVC-P1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAAAA-3') e 272-2-int (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT-3') com produto da amplificação de 500 bp desenvolvidos por Pooler & Hartung (1995).

As reações de amplificação foram conduzidas com volume total de 25 µl utilizados do tampão 2,5 µl de 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl); e água milli-Q, MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), DNTP (10 mM) 15 ng de primer CVC-p1, e

272-2-int, 40 ng da amostra de DNA total; 1 U de *Taq*-DNA-polimerase (Invitrogen®).

A amplificação ocorreu na condição de um ciclo inicial a 94°, por 2min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C, por 2min; anelando a 62 °C, por 1min; e extensão a 72 °C, por 1,5 min, com um ciclo final de extensão a 72 °C, por 5 min, e estabilizando a 6 °C por tempo indeterminado (Marucci, 2003). O aparelho utilizado foi o Máster Cyler Gradient (Eppendorf). Após este processo, foi preparada outra reação de PCR, utilizando-se 6µl da primeira reação como molde para os oligonucleotídeos internos “primers” CVC-1 e 272-2 int, sendo a amplificação realizada como anteriormente descrito.

Em todos os testes de PCR, foram utilizados controles positivos amostras de cigarrinhas infestadas, ou seja, que se alimentaram em plantas-fonte infectadas pela CVC. Para o controle negativo utilizou-se cigarrinhas livres da bactéria. O produto da reação de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel a 1% de agarose, contendo 2 µl de brometo de etídio, visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

## Resultados e Discussão

Foram extraídos DNA de 317 amostras de “cabeças” de cigarrinhas através dos dois métodos diferentes de extração. Com o protocolo I, foram extraídos DNA de 155 cigarrinhas. Para o protocolo II extraíram DNA de 162 amostras (Tabela 1), comparando-se o primeiro método de extração com o segundo, os resultados apresentou-se mais eficiente para extração de DNA total das amostras realizada com o protocolo I.

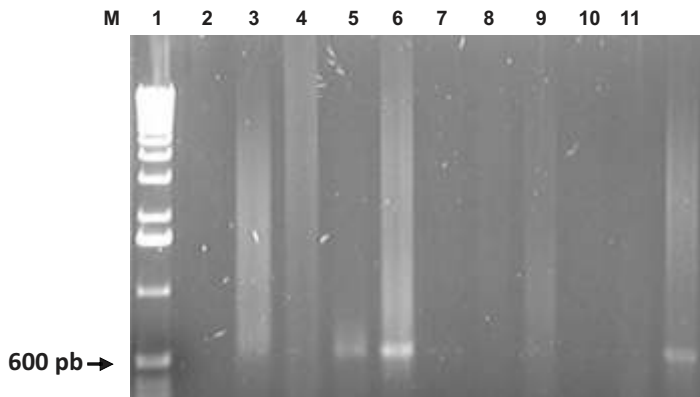
**Tabela 1.** Espécies de cigarrinhas com número total de amostras avaliadas por espécie seguida das cigarrinhas positivas para os testes de PCR, em Maringá, PR.

Espécies	Número de cigarrinhas	
	Protocolo I*	Protocolo II**
<i>Dilobopterus costalimai</i>	75/2	83/0
<i>Acrogonia citrina</i>	51/1	52/0
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	9/0	9/0
<i>Oncometopia facialis</i>	2/0	1/0
<i>Sonesimia grossa</i>	2/0	2/0
<i>Macugonália leucomelas</i>	3/0	3/0
<i>Homalodisca ignorata</i>	1/0	0/0
<i>Hortencia similis</i>	1/0	0/0
<i>Macugonália cavifrons</i>	11/0	12/0

\*Protocolo I = Hung et al. (2004)

\*\*Protocolo II = Ciapina et al. (2004)

Os resultados foram positivos para detecção de *X. fastidiosa* por meio da técnica de PCR, em apenas duas amostras: *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina*, amostra 4 e 5 (Figura 1).



**Figura 1.** Produtos de *Nested* PCR, obtidos após amplificação do DNA das amostras de cigarrinhas capturadas no sítio Laranjeiras I, Nova Esperança PR., entre junho de 2005 a setembro 2006.

M= marcador peso molecular (1-Kb DNA ladder (Invitrogen®)); 1= controle positivo de cigarrinha; 2= controle negativo de cigarrinha; 3 a 10 amostras de cigarrinhas; e 11=controle positivo de folhas com CVC.

Neste trabalho os protocolos testados utilizaram métodos distintos para extração, sendo que para o protocolo I a base de fenol/clorofórmio foi possível visualizar e quantificar o produto da extração, dentre estas amostra três foram positivas para detecção da bactéria.

Enquanto no protocolo II, que utiliza resina cheles 100 não foi possível à visualização e quantificação de DNA a partir das amostras extraídas das cigarrinhas vetores. Como também não ocorreu à amplificação do fragmento esperado de *X. fastidiosa* utilizando os “Primes” específicos em nenhuma das amostras realizadas. Sugerindo que provavelmente não ocorreu à extração de ácido nucleico para esta metodologia.

Como visto, existem grandes dificuldades para padronizar uma metodologia eficiente de extração de ácido nucleico dos vetores, assim como a detecção da bactéria nestes vetores. Ciapina et al. (2004), sugerem que a detecção da *X. fastidiosa* em amostras de insetos pode ser dificultada pelo número de células bacterianas presente nos insetos. Em muitos casos, a metodologia de extração de DNA não é eficiente, podendo liberar agentes que inibem a reação de PCR, gerando um resultado falso-negativo.

Marucci (2003) testando 450 cigarrinhas, obteve 34 resultados positivos com o teste de *Nested*-PCR, sendo que seis amostras que deram resultados positivos eram da espécie *D. costalimai*. Talvez, após a aquisição da bactéria

pelo inseto vetor, seja preciso um período maior de permanência da mesma dentro do inseto para um aumento da população, melhorando as chances de detecção da *X. fastidiosa* (Hill, Purcell, 1995).

Pooler et al. (1997) utilizando a técnica de duplo-PCR para amostras de cigarrinhas *Graphocephala versuta*, conseguiram 15 resultados positivos de 60 exemplares capturados em espécies de *Ulmus americana* (L.).

Diante dos resultados obtidos com técnicas moleculares para detecção e estudo de DNA da bactéria *Xylella fastidiosa* presente em cigarrinhas, espera-se que algumas metodologias devam ser mudadas e/ou melhoradas para que os resultados obtidos tenham um maior grau de confiabilidade.

## Conclusões

Os resultados obtidos, em relação aos testes moleculares, apontaram para extração com protocolo I, a base de fenol e clorofórmio, como sendo a melhor forma para a detecção de bactéria *X. fastidiosa* nas cigarrinhas *D. costalimai* e *A. citrina*.

## Referências

- BEXTINE, B.; SHU-JEN, T.; HARRIS, S.; MATTHEW, B.; MILLER, T.A. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the Glassy-Winged Sharpshooter. **Entomological Society of America**, v.97, p.757-763, 2004.
- CIAPINA, L.P.; CARARETO ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. A nested-PCR assay for detection of *Xylella fastidiosa* in citrus plants and sharpshooter leafhoppers. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.546-551, 2004.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movimento of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, v.85, p.1368-1372, 1995.
- HUNG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus Huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology**, v.53, p. 96-102, 2004.
- HOPKINS, D.L. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease **Phytopathology**, v.73, p.347-350, 1983.
- LEITE, R.M.V.B.C.; JACOMINO, A.P. Ocorrência de clorose variegada dos citros no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v.19, p. 35-36, 1993.

LEITE JÚNIOR, R.; HUANG, G.F.; UENO, B. Ocorrência da Clorose variegada dos citros causada por *Xylella fastidiosa* no Estado de Santa Catarina. In congresso Brasileiro de Fitopatologia. Campo Grande MS. **Fitopatologia Brasileira**, v.1 (suplemento), p.335, 1996.

LOPES, J.R.S. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinhas. **Laranja**, v.17, p.79-92, 1996.

MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas vetoras (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L.** 2003. 139p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

NUNES, W.M.C.; MOLINA, R.O., ALBUQUERQUE F.A.; CORAZZA-NUNES M.J., ZANUTTO, C.A.; MACHADO M.A. Flutuação populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* em pomares comerciais de citros no noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**. v.36, n.2, p.254-260, 2007.

NUNES, W.M.C.; MACHADO, M.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; FURTADO, E. Dinâmica espacial de foco da clorose variegada do citros (CVC) avaliada por meio da sintomatologia e serologia. **Acta Scientiarum**, v.23, p.1215-1219, 2001.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus

variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.134-137, 1995.

POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J.; SHERALD, J.; HARTUNG, J.S. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunogenetic separation and polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.123-126, 1997.

ROBERTO, S.R.; LIMA, J.E.O.; COUTINHO, A.; MIRANDA, V.S.; CARLOS E.F. Avaliação de métodos de monitoramento de cigarrinhas transmissoras de Clorose Variegada dos Citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 19, p. 227-233, 1997.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O. de; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* (Hemiptera Cicadellidae) em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.517-518, 1996.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; BATTAGLIA, O.C.; GOMES, M.P.; DE NEGRI, J.D. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Summa Phitopathologica**, v.16, p.1-13, 1990.

TUBELIS, A.; BARROS, J.C.; LEITE, R.M.V.B. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. **Laranja**, v.14, p.239-254, 1993.