



METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO DE XYLELLA FASTIDIOSA EM CIGARRINHAS

Vinícius Reginato **da Silva**¹, Henrique **Bergamo**, Carolina Francisco **Sardinha**², Helvécio Della **Coletta-Filho**¹

Nº 14139

RESUMO – O diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa* (XF), agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em plantas tem sido feito através de técnicas serológica (ELISA) e moleculares (PCR) sendo esta última a mais utilizada. Contrariamente ao bem estabelecido diagnóstico nas plantas, nos insetos vetores, as cigarrinhas, ainda tem-se dificuldade de se conduzir estes testes de forma rotineira e reprodutiva. Isto se deve provavelmente a baixa concentração deste patógeno naqueles vetores. Neste trabalho testou-se diferentes metodologias de diagnóstico e de extração de DNA objetivando-se otimizar a detecção de XF em cigarrinhas. Duas estratégias de imunocaptura utilizando-se de anticorpo policlonal contra XF foram testadas: 1. imunocaptura em placas de ELISA; 2. imunocaptura em 'beads' magnéticas (Dynabeads), ambas seguidas da PCR. Além destas testou-se duas metodologias de extração de DNA total de cigarrinhas utilizando-se dos kits comerciais (WIZARD – Promega) e DNeasy Blood Extraction kit (QIAGEN). Previamente a extração de DNA pelos kits as cigarrinhas foram trituradas in natura e congeladas a -80°C. Em todas as metodologias a PCR foi realizada com o primers RST31/33, específicos para XF. Imunocaptura magnética de XF proporcionou a melhor condição para a PCR quando comparada a imunocaptura em placas de ELISA. O DNA total obtido pelo kit Wizard utilizando-se de cigarrinhas previamente congeladas foi o método que apresentou maior frequência de PCR positivos, quando comparado as outras metodologias, muito embora as extrações com o kit DNeasy tenha obtido as maiores concentrações de DNA.

Palavras-chaves: diagnóstico molecular, bactéria, serologia,

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP; vreginato@live.com

2 Colaborador, Bolsista Ciência sem Fronteiras: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP.

3 Bolsista Fapesp: Mestranda em Genética e Melhoramento Vegetal, UNESP, Jaboticabal – SP.

4 Orientador: Pesquisador do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis – SP.; helvecio@lcentrodecitricultura.br



ABSTRACT- *The diagnosis of bacterium Xylella fastidiosa (XF), causal agent of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in plants have been done by both serologic (ELISA) and molecular (PCR) technics, the last more broadly used. Differently to well establish diagnosis of these bacteria in plant, in the vectors insect, sharpshooters, the diagnosis was not well established, yet. It could be consequence of low concentration of these bacteria in the insects. In this paper we tested different methodologies of diagnosis and DNA extraction aiming diagnosis of XF in the vectors. Two immucapture methodology using polyclonal antibodies against were tested: 1. by ELISA plate, and 2. by magnetic beads (Dynabeads), both followed by PCR. Besides were tested two methodologies of total DNA extraction from sharpshooters using commercial kits, Wizard (Promega) and DNeasy Blood extraction kit (Qiagen). Previously to extraction the sharpshooters were grinned in nature or freezer to -80°C. In all methodologies the PCR was done using the RST31/33 primers specific to XF. Magnetic beads used to capture XF cell was the best conditions for obtain the cells for PCR when compared to ELISA plates. Total DNA obtained by the Wizard kit from freezer sharpshooters was the method that showed higher frequency of positive PCR when compared to another methodology. However the DNA obtained by the DNeasy kit showed the higher DNA concentration.*

Key-words: molecular diagnoses, bacteria, citrus, serology.

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico molecular de *X. fastidiosa* causadora da CVC em plantas tem sido usado frequentemente e baseia-se principalmente na extração de DNA total de pecíolo das folhas das plantas seguindo-se da PCR, seja esta tradicional ou quantitativa (Pooler et al, 1995; Oliveira et al., 2002; Li et al., 2013). Alternativas as extrações de DNA total para obtenção de extrato que poderia conter o DNA do patógeno foram estudadas, como a imunocaptura seguida da PCR (Ciapina et al.2004; Buzkan, et al. 2003; Peronni et al., 2008). No entanto, face a alta sensibilidade da PCR tendo como substrato o DNA total e ao custo adicional da imunocaptura, a primeira metodologia tem sido mais amplamente utilizada no diagnostico desta bactéria em plantas.

As cigarrinhas também são hospedeiras de *X. fastidiosa*, sendo muito importantes na disseminação planta-a-plantas desta bactéria em condições naturais (Redak et al. 2004). Dada a esta importância, são objetos de estudos nos experimentos visando um melhor entendimento do patossistema *X. fastidiosa* – planta – cigarrinhas (Marrucci et al., 2008), onde as etapas de aquisição da bactéria pelo vetor precisam ser criteriosamente monitoradas, além do próprio sucesso da etapa de transmissão. Diferentemente do diagnostico em plantas, poucos trabalhos foram feitos quando se tem a cigarrinha como hospedeiro da *X. fastidiosa*. Pooler et al., 1997



obteve sucesso na amplificação de *X. fastidiosa* em cigarrinhas através de imunocaptura seguida de nested –PCR num limite mínimo de detecção de 5 células.

Os focos no diagnóstico desta bactéria tem sido as plantas (Coletta-Filho et al. 2007; Oliveira et al., 2002). No entanto, para um entendimento mais amplo deste patossistema tem-se procurado parcerias científicas onde os vetores desta bactéria venham a fazer parte das pesquisas.

Neste sentido o objetivo principal deste trabalho foi estabelecer um sistema de diagnóstico de *X. fastidiosa* em cigarrinhas para que possa ser usado como rotina nos trabalhos de pesquisa desenvolvido por nosso grupo de pesquisa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Imunocaptura: testou-se a metodologia de imunocaptura utilizando anticorpo específico contra *X. fastidiosa*, que reconhece a proteína XadA1, com objetivo de capturar células desta bactéria para serem usadas nas amplificações via PCR com primers específicos para o patógeno. Dois sistemas de capturas foram testados;

- primeiro através de imunocaptura convencional em placas de ELISA sensibilizada com o anticorpo;

- o segundo método foi baseado no trabalho desenvolvido por Pooler, et al., (1997), através de imunocaptura magnética utilizando complexo Dynabeads® Magnetic Beads (Invitrogen) revestidas com IgG anti coelho, uma vez que o anticorpo em uso (XadA1) foi produzido em coelhos.

Os testes descritos abaixo foram realizados utilizando-se substrato plantas sintomáticas, cigarrinhas que se alimentaram de plantas infectadas com *X. fastidiosa* e a própria bactéria em suspensão.

Imunocaptura convencional em placas de ELISA

O anticorpo foi diluído em duas diferentes concentrações 1:400 e 1:1000, respectivamente anticorpo:PBS. Em uma placa de ELISA foi adicionado 100µL do anticorpo diluído em cada poço e incubado “overnight” a 4°C. Após 18h de incubação, cada poço foi lavados 2x com tampão PBS-T. Quatro diferentes substrato foram preparados para testar a eficiência de captura deste sistema, sendo: 1) extrato de planta sintomática macerado em tampão PBS; 2) duas cabeças de cigarrinhas maceradas em tampão PBS; 3) duas cabeças de cigarrinhas maceradas em tampão PBS e homogenizadas com suspensão de *X. fastidiosa*; 4) diluições de suspensão de *X. fastidiosa* a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 5) Água estéril como controle negativo. Cem µL dos substratos foram adicionados em cada poço da placa de ELISA já sensibilizado com anticorpo e novamente a placa foi incubada overnight a 4°C. Após as 18h de incubação, a placa foi lavada duas vezes com tampão PBS,



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

seguido de centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, adicionando-se ao poço 50 µL TE $1/_{10}$ + RNase, incubando-se a 37°C por 30 minutos. Dois µL foi usado como template para PCR através dos primers RST31 e RST33 (Minsavage et al., 1993).

Imunocaptura Magnética

Para estes testes utilizou-se os mesmos substratos testados para a *Imunocaptura em placas de ELISA*. Em um tubo tipo eppendorf adicionou 100µL do anticorpo 1:500 (anticorpo:PBS) juntamente com 100µL de cada substrato. Os eppendorf foram incubados em shaker á 28°C por 30 minutos. Após incubação, centrifugou-se por 2 min a 12.000 rpm, descartando o sobrenadante cuidadosamente. Na sequência, o pellet foi ressuspensionado em 300µL de tampão PBS 1x + 0,1% de leite desnatado e novamente centrifugado por 2 min a 12.000 rpm. Esta etapa se repetiu mais uma vez seguindo-se; centrifugação, descaret do sobrenadante. O pellet então foi ressuspensionado em 300µL de tampão PBS 1x + 0,1% de leite desnatado e adicionado 5µL Dynabeads® Magnetic Beads. Os tubos foram incubados por 30 min em shaker a 28°C. Após período de incubação, os tubos foram colocados em “cama magnéticas” que atraem o complexo beads+anticorpo+bactéria para a parede dos tudo, sendo possível a remoção do sobrenadante. Ressuspensão final do pellet foi em 300µL de tampão PBS. Para validação da técnica, reação de PCR foi realizada utilizando 2 µL como DNA template com o conjunto de primer RST31 e RST33 (Minsavage et al., 1995).

2.2. Extrações de DNA: anteriormente ao inicio das análises ensaios preliminares foram realizados para determinar o melhor protocolo de extração de DNA total das cigarrinhas. Uma cigarrinha foi colocada em tubo plástico de 2 mL junto com 2 beads de 3mm. A trituração das amostras foi realizada via Tyssue Lyzer ajustando-se o aparelho a 30 Hz/min. Duas condições foram testadas; i. amostras processadas previamente mantidas a -80°C por 15 min. e ii. amostras processadas in natura adicionando-se a mesma 10 µL de STE (10mM Tris-HCK, 1mM EDTA, 25 mM NaCl). Seguindo-se a trituração dois protocolos de extração de DNA foram testados; iii. Através do kit total DNA Wizard (Promega) e iv. Através do kit total DNA Tyssue and Blood (Qiagen). No total 4 condições foram testadas:

1. Amostra pré congelada + extração DNA Wizard ;
2. Amostra pré congelada + extração DNA Qiagen;
3. Amostra in natura + extração DNA Wizard;
4. Amostra in natura + extração DNA Qiagen

2.3. PCR

Os DNA purificados e os extratos de immucaptura foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os primers RST31/RST33 e os internos a este fragmento (Minsavage et al., 1995). O volume final da reação foi estabelecido em 12,5 µL utilizando-se de 6,25 µL do master mix DreaNtaq (Fermentas), 10 pmol de cada par de primer testado (RST31-



CGGTTAATTTTCGAAGTGATTGCGATTGC / RST33 - CACCATTTCGTATCCCGGTG) e (RST31 int - CGACTCCACGGAATTGGC / RST33 int. GGCAATGCCGCATCAACATC) e 4 µL do DNA total.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diagnóstico de Imunocaptura seguida da PCR

Utilizando-se de imunocaptura em placas de ELISA os resultados da PCR mostraram ampliações nos controles negativos que acredita-se ser consequência da forma incorreta de lavagem das placas onde provavelmente os substratos positivos acabaram por contaminar os poços onde substratos foram adicionados. A metodologia foi repetida e o problema de contaminação resolvido.

Quando a imunocaptura foi realizada em Beads magnéticas (DynaBeads) as ampliações positivas com os primers RST31/33 foram obtidas para os substratos contendo cabeças de cigarrinhas que passaram por aquisição em plantas fonte assim como para os controles positivos (cigarrinhas + bactéria em suspensão e bactéria em suspensão). Ausência de ampliações foram observadas para o controle negativo (água) assim como foi observada ausência em uma amostra de cigarrinha que passou por aquisição (Figura 2). Portanto, a metodologia de imunocaptura de *X. fastidiosa* em cigarrinha foi padronizada, podendo ser utilizada nos estudos epidemiológicos para fins de diversidade ou infectividade dos vetores. Porém, a repetibilidade destes testes foi muitas vezes insatisfatória o que levou a também testar vários métodos de extração de DNA total de cigarrinhas.

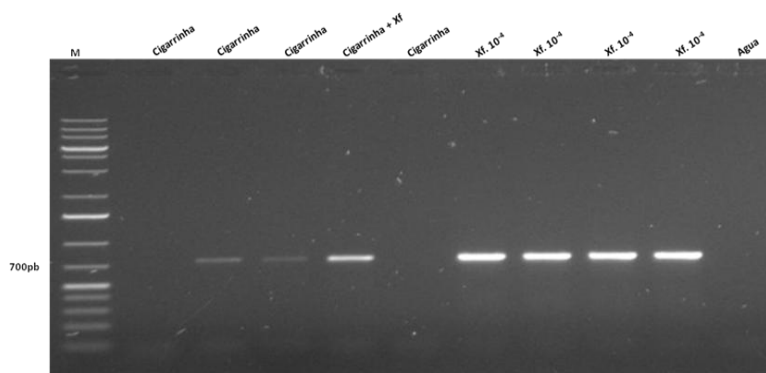


Figura 2. Gel de agarose 1% apresentando resultados de imunocaptura magnética. M= marcador 1Kb (Fermentas); Cigarrinha = cigarrinhas que passaram por período de aquisição; Cigarrinha+Xf = cigarrinha + suspensão de *X. fastidiosa*; 10^{-4} = diluição serial de *X. fastidiosa*.

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

As extrações de DNA foram conduzidas utilizando 3 cigarrinhas por tratamento. Após o término das etapas de extração foi verificada a concentração de DNA obtidos de cada um dos tratamentos, assim como a qualidade dos mesmos por meio de espectroscopia, através do aparelho NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) utilizando-se o comprimento de onda de 260 nm.

As maiores concentrações de DNA foram obtidas quando as amostras foram trituradas *in natura*, juntamente como o tampão de extração (preparo *in natura*). Embora as amostras pré congeladas tenham apresentado uma menor concentração de DNA, os valores de relação da absorbância entre 260 nm e 280 nm ($A_{260/280}$) que são indicativos da pureza dos ácidos nucleicos obtidos, apresentaram-se mais próximos de 1,8, indicando melhor qualidade do DNA obtido (Tabela 1). De um modo geral a purificação do DNA total foi satisfatória independentemente do protocolo utilizado, porém as maiores concentrações foram obtidas quando as amostras foram trituradas juntamente com o tampão de extração.

Tabela 1. Análise das extrações de DNA por protocolo de extração.

Amostras	Metodologia de extração de DNA total	Concentração (ng/μL)	Razão 260/280 nm
01	Wizard + tampão extração a temp. ambiente	175,5	1,63
02	Wizard + tampão extração a temp. Ambiente	105,2	1,68
03	Wizard + tampão extração a temp. Ambiente	106,5	1,88
04	Wizard + sem tampão extr. e pré congelamento -80°C	62,92	1,47
05	Wizard + sem tampão extr. e pré congelamento -80°C	33,91	1,83
06	Wizard + sem tampão extr. e pré congelamento -80°C	62,13	1,52
07	Qiagen + tampão extração a temp. Ambiente	178,9	2,07
08	Qiagen + tampão extração a temp. Ambiente	236,8	2,12
09	Qiagen + tampão extração a temp. Ambiente	159,0	2,03
10	Qiagen + sem tampão extr. e pré congelamento -80°C	82,93	1,65
11	Qiagen + sem tampão extr. e pré congelamento -80°C	127,0	1,97
12	Qiagen + sem tampão extr. e pré congelamento -80°C	44,61	1,80

As amplificações dos DNA obtidos foram conduzidas utilizando-se diferentes os conjuntos de primers RST 31/ RST 33 e RST 31 interno/ RST 33 interno (Tabela 1). Como controles negativos foram utilizados água MiliQ autoclavada (NTC - no template control) e DNA de plantas

não contaminadas com *X. fastidiosa*. Como controle positivo foi utilizado DNA total de plantas com sintomas de *X. fastidiosa*.

Insucessos nas ampliações do DNA de *X. fastidiosa* foram observados em todas as amostras quando utilizou-se o conjunto de primers RST 31/ RST 33, tendo como exceções as amostras positivas (Figura 3).

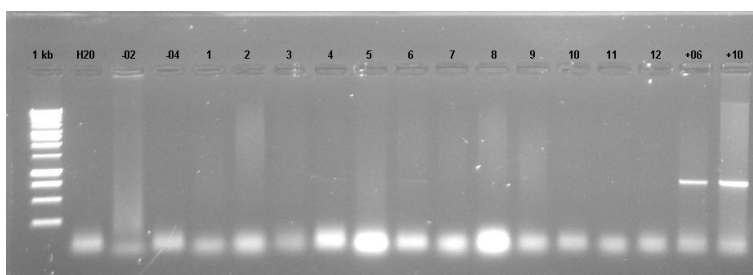


Figura 3. Gel de agarose 1% mostrando as ampliações de *X. fastidiosa* em amostras de DNA total de cigarrinhas obtidas com diferentes metodologias de extrações. -02 e 04 – controles negativos, 1 a 12 – amostras obtidas com diferentes metodologias de extração. +06 e +10 – controles positivos. Banda próximo a 730 bp é a esperada para as ampliações com os primers RST31 e RTS33.

As mesmas amostras foram amplificadas com os primers RST31/33 internos que amplificam um fragmento interno ao amplificado pelo primer RST descrito por Misanvage et al. (1995). Contrariamente ao resultado anterior, ampliações positivas, porém de baixa intensidade, foram obtidas para as amostras 4, 5, 6, 7 e 12, além dos controles positivos (Figura 4). Esta baixa intensidade de amplificação é reflexo do baixo título de *X. fastidiosa* no inseto vetor, que poderia contribuir para a baixa eficiência de transmissão observada neste patossistema *X. fastidiosa* – CVC.

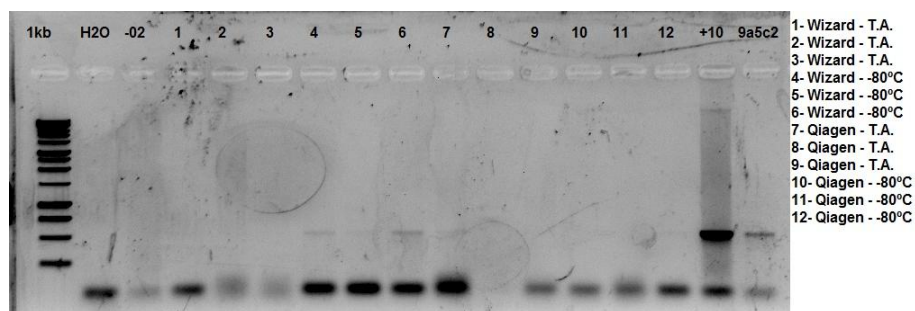


Figura 4. Gel de agarose 1% mostrando as ampliações de *X. fastidiosa* em amostras de DNA total de cigarrinhas obtidas com diferentes metodologias de extrações. H₂O e -02 – controles negativos, 1 a 12 – amostras obtidas com diferentes metodologias de extração. +10 e 9a5c – controles positivos. Banda próximo a 500 bp é a esperada para as ampliações com os primers RST31 e RTS33 internos.

4. CONCLUSÃO



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Com a análise dos dados obtidos através dos experimentos acima descritos, pode-se concluir que, dentre os protocolos e tratamentos testados, o que se mostrou mais eficiente foi o Kit Wizard Promega, com as amostras sendo trituradas congeladas, pois foram as amostras que mais amplificaram nos testes com PCR tradicional.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Helvécio Della Coletta Filho e a Carolina Sardinha, por terem sido pacientes e me direcionado em todos os momentos em que estive errado. Agradeço também a CNPq pelo apoio e financiamento do meu projeto de pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BUZKAN, N.; KRIVANEK, A. F.; ESKALEN, A. and WALKER, M. A. Improvements in sample preparation and polymerase chain reaction techniques for detection of *Xylella fastidiosa* in grapevines tissue. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 54, p.4, 2003.

COLETTA-FILHO, H. D.; PEREIRA, E. O.; SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; CRISTOFANI, M. and MACHADO, M. A. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. **Plant Pathology**, v.56, p. 661 – 668, 2007.

MISANVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C. and STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v. 84, p. 446-461, 1994.

OLIVEIRA, C. A.; VALLIM, M. A.; SEMIGHINI, C. P.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H. and MACHADO, M. A.. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. **Phytopathology**, v. 92:1048-1054, 2002.

PERONI, L. A.; REIS, J. R. R. DOS; COLETTA-FILHO, H. D.; SOUZA, A. A. DE; MACHADO, M. A. and STACH-MACHADO, D. R.. Assessment of the diagnostic potential of Immunocapture-PCR and Immunocapture-PCR for Citrus Variegated Chlorosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 302-307, 2008.

POOLER, M. R.; MYUNG, I. S.; BENTZ, J.; SHERALD, J. and HARTUNG, J. S.. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 123-126, 1997.

REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZELL III, R. F. and ANDERSEN, P. C.. The Biology of Xylem Fluid – Feeding Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* and their Relation to Disease Epidemiology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 243-270, 2004.