

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas citri* SUBSP.
citri, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE
Xanthomonas fuscans SUBSP. *aurantifolii* E DETECÇÃO DE
Xanthomonas alfalfae EM CITRUMELO ‘SWINGLE’ (*Citrus*
paradisi Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) NO BRASIL

Fabício José Jaciani

Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE *Xanthomonas fuscans* SUBSP. *aurantifolii* E DETECÇÃO DE *Xanthomonas alfalfae* EM CITRUMELO ‘SWINGLE’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) NO BRASIL

Fabício José Jaciani

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Co-orientador: Dr. José Belasque Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2012

J12d Jaciani, Fabricio José
Diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, caracterização molecular e patogênica de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e detecção de *Xanthomonas alfalfae* em citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil. / Fabricio José Jaciani. – – Jaboticabal, 2012
xxii, 169 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Jackson Antônio Marcondes de Souza, Rui Pereira Leite, Nelson Arno Wulff
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Cancrose dos citros. 3. Mancha bacteriana dos citros. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.23

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABRÍCIO JOSÉ JACIANI – nascido em 21 de dezembro de 1980, em Araraquara, São Paulo, Brasil. Biólogo formado em dezembro de 2005 pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA. Realizou estágio no Departamento Científico do Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus entre janeiro de 2004 e março de 2006. Em fevereiro de 2008 obteve o título de Mestre em Agronomia (Microbiologia Agropecuária) pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal (FCAV/UNESP). Ingressou em março do mesmo ano no curso de Doutorado (Microbiologia Agropecuária, FCAV/UNESP). Desde 2008 trabalha no Fundecitrus atuando em projetos de pesquisa relacionados ao cancro cítrico.

"A melhor coisa que você pode fazer
por uma pessoa é inspirá-la"

Bob Dylan

Esta Tese é dedicada
à minha querida família:

meus pais, **Wilson e Maria Ester**;
meus avós, **Luiz e Orlanda**;
meus irmãos **Rita, André e Chiara**;
meus sobrinhos **Bruno, Gabriel,**
Manoela, André, Miguel,
Júlia e Murilo;
e minha futura esposa **Greice**.

Por vocês...

“...eu dançaria tango no teto,
eu limparia os trilhos do metrô,
eu iria a pé do Rio a Salvador...”

AGRADECIMENTOS

Não tenho dúvida que os parágrafos a seguir foram os mais difíceis de escrever em toda a minha Tese pois, embora tenha muito a agradecer e a tanta gente, tive receio de não fazê-lo como gostaria, ou até mesmo de fazê-lo pela metade. Contudo, tentarei aqui expressar toda minha gratidão às pessoas que me ajudaram ao longo desse tempo seja diretamente, na elaboração e desenvolvimento da Tese, ou indiretamente, simplesmente por compartilharem suas vidas com a minha. Se, por ventura, minhas palavras forem demasiadamente pequenas e não refletirem a importância de cada um de vocês para este trabalho, ou se minha memória me traiu e esqueci de agradecer a alguém, peço minhas sinceras e humildes desculpas.

Em primeiro lugar, sempre, agradeço a **Deus**, meu eterno orientador. Agradeço pela minha vida e por tudo que nela conquistei. Pela família e amigos que me deu. Pelos sucessos que me fizeram sentir grande e pelos fracassos que me deram a oportunidade de perseverar. Obrigado senhor!

Como quase tudo na vida depende de uma dose de sacrifício, abdiquei de muitas coisas para realizar meu sonho. Por esta razão devo à **minha família** um profundo agradecimento pelo modo como aturaram minha ausência durante os últimos anos, mesmo eu estando tão perto. Peço desculpas pelas inúmeras visitas que não fiz, pelos agradáveis passeios que deixei de ir e por muitas vezes estar apenas de corpo presente. Amo vocês!

Ao **Dr. José Belasque Jr.**, meu agradecimento vai além de um muito obrigado. Aliás, não há palavras que possam descrever o quanto sou grato por todos esses anos de ensinamentos, oportunidades e confiança. Por me apresentar ao mundo da pesquisa e acreditar que eu podia fazer parte dele. Espero um dia retribuir, pelos menos em parte, a enorme contribuição que você deu à minha carreira profissional. Se aqui estou, é graças a você. E me orgulho muito disso.

Agradeço profundamente a professora **Dra. Maria Inês T. Ferro** e o professor **Dr. Jesus A. Ferro**, ambos pela oportunidade que me concederam e a qual me permitiu chegar até aqui. À professora, pois foi com quem iniciei o Doutorado e quem primeiro acreditou que eu podia ir mais além. Ao professor, por ter assumido posteriormente a

orientação deste trabalho e, sobretudo, por ter me agraciado com o privilégio de ser seu orientado.

Ao doutor em entretenimento, humorista, comediante e piadista **Júlio Cesar Rodrigues**, a quem eu deveria agradecer enormemente por toda ajuda prestada, e que por sinal não foi pouca, eu nada direi. E por um simples motivo: amigos são pra estas coisas, e grandes e velhos amigos então...

Ao **Dr. Nelson A. Wulff** e à **Msc. Elaine C. Martins** agradeço pela indispensável colaboração em muitos momentos ao longo desse trabalho. Da mesma forma, agradeço ao meu cunhado **Michel H. Bolsoni** por sua enorme contribuição na formatação das imagens. Obrigado pelos valiosos ensinamentos e pela paciência que vocês tiveram com minhas intermináveis dúvidas.

Durante este caminho conheci várias pessoas e fiz novas amizades. Entre elas, devo um enorme agradecimento a três amigas em particular: **Juliana S. Abreu**, **Teresa Del Carmem G. Cofre** e **Roberta B. dos Santos**. O incentivo e o apoio de vocês me ajudaram a sempre acreditar, principalmente em mim mesmo. Tenham certeza que o prazer em conhecê-las foi, sem dúvida, meu.

Um agradecimento especial à **Aline C. Lopes**, **Cláudia D. Souza**, **Flávia H. Ambrozino**, **Marcela Coelho** e **Tamiris G. da Silva**. Com vocês, a palavra 'estagiário' ganhou novos sinônimos: dedicação, comprometimento, profissionalismo e amizade. Nunca deixarei de reconhecer a importância de vocês para este trabalho. Muito obrigado, meninas!

Ao **Fundecitrus**, em nome de **Antônio J. Ayres**, agradeço imensamente todo apoio e estrutura oferecida, não somente para realização deste trabalho, mas durante toda minha jornada acadêmica. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe.

Por fim, estendo meus agradecimentos aos inúmeros companheiros de Fundecitrus, se não tanto pela participação direta neste trabalho, mas com certeza pelo maravilhoso convívio diário que tornou esta tarefa muito mais agradável e divertida: **Deividson F. Rodrigues**, **Denis R. Marin**, **Eder A. Souza**, **Guilherme F. Frare**, **Jean M. Martins**, **Luiz H. Montesino**, **Marcos R. Felipe**, **Mateus A. Santos**, **Michelle Sousa**, **Priscilla M. Barsaglini**, **Renata Tuniati**, **Rodrigo S. Toloy**, **Sidnei F. Alkimin**, e a todos os outros que não citei, mas que nem por isso, são menos importantes.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xix
RESUMO.....	xxi
SUMMARY.....	xxii
 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	 1
A produção de laranja doce e de suco de laranja no Brasil.....	3
Doenças dos citros causadas por bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i>	4
Cancro cítrico (<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>).....	5
Cancroses dos citros (<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>).....	9
Mancha bacteriana dos citros (<i>Xanthomonas alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>).....	12
Interação planta-patógeno.....	14
Proteínas efetoras do Sistema de Secreção Tipo III de <i>Xanthomonas</i>	15
Métodos moleculares aplicados na identificação e no estudo da variabilidade genética de patógenos bacterianos.....	18
Taxonomia bacteriana.....	18
Diversidade genética em <i>Xanthomonas</i> spp.....	22
 CAPÍTULO 2 – DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> COM BASE EM GENES EFETORES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III.....	 26
Resumo.....	26
Summary.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	30
Isolados bacterianos.....	30

Extração de DNA genômico.....	35
Construção dos iniciadores e PCR ("Polymerase Chain Reaction").....	35
Digestão dos produtos amplificados com enzimas de restrição (PCR-RFLP).....	37
Clonagem e transformação bacteriana.....	38
"Southern blot".....	39
BOX e ERIC-PCR.....	39
Análise dos dados.....	40
Resultados.....	41
Discussão.....	55
Conclusões.....	60
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E GENÉTICA DE	
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	61
Resumo.....	61
Summary.....	62
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	65
Linhagens bacterianas.....	65
Caracterização patogênica.....	65
Preparo do inóculo e material vegetal.....	65
Testes de patogenicidade.....	67
Avaliação da agressividade.....	67
Avaliação da população bacteriana.....	68
Caracterização genética.....	69
Extração de DNA e PCR ("Polymerase Chain Reaction").....	69
Clonagem e sequenciamento.....	70
"DNA fingerprinting".....	71
AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism").....	71
BOX e ERIC-PCR.....	72
Análise dos dados.....	73

Integrans.....	73
Resultados.....	74
Caracterização patogênica.....	74
Patogenicidade.....	74
Agressividade.....	81
População bacteriana.....	83
Caracterização genética.....	83
Análise de sequências.....	83
AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).....	87
BOX e ERIC-PCR.....	88
Integrans.....	93
Discussão.....	95
Conclusões.....	102
CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DE <i>Xanthomonas alfalfae</i> DETECTADA EM CITRUMELO ‘SWINGLE’ (<i>Citrus paradisi</i> Macf. X <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.) NO BRASIL.....	104
Resumo.....	104
Summary.....	105
Introdução.....	106
Material e Métodos.....	108
Isolamento bacteriano e extração de DNA.....	108
Testes de patogenicidade.....	109
PCR, clonagem e análises de sequências.....	109
DNA ribossomal (rDNA).....	110
“Housekeeping genes”.....	111
AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).....	112
BOX e ERIC-PCR.....	113
Análise dos dados.....	114
Perfil de amplificação de cassetes gênicos associados à integrans.....	114

Resultados.....	114
Isolamento bacteriano, postulado de Koch e patogenicidade.....	115
Análise de sequências.....	119
“DNA fingerprinting”.....	125
Arranjo de cassetes gênicos.....	127
Discussão.....	128
Conclusões.....	133
 REFERÊNCIAS.....	 135
APÊNDICE.....	158

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Sintomas de cancro cítrico asiático em (A) folha, (B) fruto e (C) ramo de laranja doce (*Citrus sinensis*). Observa-se na folha e no fruto a presença de um halo amarelo característico ao redor das lesões. Fonte: Fundecitrus..... 6

Figura 2. Placas de Petri com meio de cultura nutriente ágar semeados com isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores e não produtores de pigmento escuro..... 11

Figura 3. Ilustração esquemática de integrons de (A) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (isolado ATCC33913) e (B) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (isolado 306), e os sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo (GILLINGS et al., 2005). Ambos os integrons estão localizados adjacentes ao gene *ilvD* e o cassete gênico do isolado 306 apresenta inserção de um transposon (*ISxac3*). Todos os iniciadores utilizados foram desenvolvidos com base em regiões conservadas dos integrons dos isolados ATCC33913 e 306 e podem ser utilizados para diversas espécies e patovares de *Xanthomonas*, com exceção do MRG23, desenvolvido a partir de sequências nucleotídicas específicas do isolado 306 (GILLINGS et al., 2005)..... 25

CAPÍTULO 2 – DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COM BASE EM GENES EFETORES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III

Figura 1. Localização geográfica dos municípios de origem (em preto) dos 157 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo..... 34

Figura 2. Perfil de amplificação por PCR de fragmentos de DNA do isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, contendo os genes (1) *avrXacE2*, (2) *avrXacE1*, (3) *avrXacE3*, (4) *pthA4*, (5) XAC3090, (6) *hpaF* e (7) *avrBs2*. M1: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). M2: marcador de massa molecular 1 kb *plus* (Invitrogen)..... 42

Figura 3. Padrão de amplificação de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por BOX e ERIC-PCR. Coluna (1) isolado 306, (2) IBSBF 1860, (3) IBSBF 1050, (4) FDC 605, (5) FDC 617 e (6) FDC 200. M1: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen). M2: marcador de massa molecular 1 kb *plus* (Invitrogen)..... 44

Figura 4. Diagramas de Venn ilustrando a distribuição geográfica dos haplótipos

identificados entre os 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* após hibridização (“Southern blot”) com (A) sondas de DNA baseadas nos genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *XAC3090*, *hpaF* e *pthA4*, e (B) apenas com a sonda correspondente ao gene *pthA4*..... 46

Figura 5. Perfis de hibridização por “Southern blot” com a sonda PthA4 de isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Colunas 1 (isolado 306), 3 (IBSBF 339), 4 (IBSBF 1050), 6 (IAPAR 714), 7 (IAPAR 13016), 8 (IAPAR 12969), 10 (IAPAR 12708) e 14 (IAPAR 12701): haplótipo #p1; colunas 2 (IBSBF 222), 5 (IAPAR 12992), 9 (IAPAR 12710), 13 (IAPAR 12833) e 15 (IBSBF 1992): haplótipos #p3, #p19, #p7, #p18 e #p16, respectivamente; e colunas 11 (IAPAR 13000) e 12 (IAPAR 12714): haplótipo #p12. M: marcador de massa molecular 1 kb (Invitrogen)..... 47

Figura 6. Dendrograma construído pelo método de “unweighted neighbor-joining” (DarWIN 5.0; CIRAD, Montpellier, France) ilustrando a diversidade genética de 49 haplótipos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por “Southern blot” com sondas de DNA baseadas em genes efetores do Tipo III..... 53

Figura 7. Dendrograma construído pelo método de “unweighted neighbor-joining” (DarWIN 5.0; CIRAD, Montpellier, France) ilustrando a diversidade genética de 30 haplótipos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por “Southern blot” com a sonda de DNA baseada no gene *pthA4*..... 54

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E GENÉTICA DE *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

Figura 1. Porções de tecido vegetal retiradas de folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, para avaliação do crescimento celular bacteriano após a infecção..... 69

Figura 2. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B..... 76

Figura 3. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* produtores de pigmento escuro em meio de cultura artificial..... 77

Figura 4. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* não produtores de pigmento escuro em meio de cultura artificial..... 77

- Figura 5. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*..... 78
- Figura 6. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (entre 3 e 26 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (FDC 763, 1559, 535 e 537), *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (FDC 1510) e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306)..... 80
- Figura 7. Sintomas de cancro cítrico em folhas de lima ácida ‘Galego’ (112 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (isolado 306) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C não produtor (FDC 867) e produtor (FDC 535) de pigmento escuro em meio de cultura. Inoculações com água deionizada estéril foram utilizadas como controle..... 81
- Figura 8. Diâmetro médio (mm) de lesões de cancro cítrico em folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306 e FDC 828) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, produtores (FDC 535 e 537) e não produtores (FDC 867 e 1559) de pigmento escuro em meio de cultura..... 82
- Figura 9. População bacteriana em lesões de folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* produtores (FDC 535 e 537) e não produtores (FDC 867 e 1559) de pigmento escuro em meio de cultura artificial, e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306 e FDC 828)..... 83
- Figura 10. Dendrogramas construídos pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), com base na sequência parcial do gene *lrp* (“leucine-responsive regulatory protein”) e da região intergênica 16S-23S de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros..... 85
- Figura 11. Dendrograma construído pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), com base na sequência parcial do gene *gyrB* de bactérias do gênero *Xanthomonas*..... 87
- Figura 12. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por AFLP. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura..... 89
- Figura 13. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando

a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por BOX-PCR. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura..... 90

Figura 14. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por ERIC-PCR. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura..... 91

Figura 15. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por BOX e ERIC-PCR. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura..... 92

Figura 16. Produtos de PCR gerados após amplificação com os iniciadores AJH73 e AJH95 (GILLINGS et al., 2005). A utilização desses iniciadores teve como objetivo averiguar a presença de integrons nos isolados analisados. Colunas 1 e 2: *X. citri* subsp. *citri* (isolados 306 e FDC 636, respectivamente); 3 e 4: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (11122 e FDC 1566); 5, 6, 7 e 8: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (10535, FDC 763, 725 e 751); 9: *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (FDC 1510). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas)..... 93

Figura 17. Padrão de amplificação de cassetes gênicos de integrons com os iniciadores MRG23 e AJH60 (GILLINGS et al., 2005) de isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros. Colunas 1 e 2: *X. citri* subsp. *citri* (isolados 306 e FDC 636, respectivamente); 3: *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (FDC 1510); 4 e 5: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (10535 e FDC 1558); 6 e 7: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (11122 e FDC 1566); 8 e 9: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (FDC 535 e 1560). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas)..... 94

CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas alfalfae* DETECTADA EM CITRUMELO ‘SWINGLE’ (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) NO BRASIL

Figura 1. Folhas de citrumelo ‘Swingle’ com sintomas característicos da mancha bacteriana dos citros (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*), coletados no município de Embaúba, São Paulo. Observa-se o enrolamento das folhas decorrentes da presença do minador dos citros [*Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) Stainton]..... 108

Figura 2. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados pelos isolados FDC 1637 (*Xanthomonas alfalfae*), FDC 1510 (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*) e 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) após perfuração do limbo foliar com agulhas imersas nas suspensões bacterianas..... 117

Figura 3. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (entre 4 e 12 dias após a inoculação) provocados pelos isolados FDC 1637 (*Xanthomonas alfalfae*), FDC 1510 (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*) e 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) após infiltração da suspensão bacteriana no limbo foliar com auxílio de seringas hipodérmicas sem agulha..... 118

Figura 4. Sintomas provocados pelos isolados FDC 1637 (*Xanthomonas alfalfae*) e FDC 1510 (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*) em folhas maduras de citrumelo ‘Swingle’ 30 dias após a inoculação..... 119

Figura 5. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas* com base na sequência parcial do gene *atpD*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações)..... 121

Figura 6. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas* com base na sequência parcial do gene *dnaK*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações)..... 122

Figura 7. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas* com base na sequência parcial do gene *gyrB*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações)..... 122

Figura 8. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas*, com base nas sequências parciais conectadas dos genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações)..... 125

Figura 9. Padrão de amplificação de isolados de *Xanthomonas* ssp por BOX e ERIC-PCR. Coluna (1) isolado FDC 1637 (*X. alfalfae*), (2) FDC 1510 (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*), (3) 306 (*X. citri* subsp. *citri*), (4) 11122 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B) e (5) 10535 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas)..... 126

Figura 10. Dendrogramas (“unweighted neighbor-joining”) ilustrando a

diversidade genética entre as espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros com base nos marcadores BOX e ERIC-PCR e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”). Além dos isolados FDC 1637 e 1638, as análises incluíram os isolados 306 de *X. citri* subsp. *citri*, 11122 de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* B, 10535 de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* C e FDC 1510 de *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*..... 127

Figura 11. Padrão de amplificação de cassetes gênicos de integrons observados em isolados de *Xanthomonas* ssp. Coluna (1) isolado FDC 1637 (*X. alfalfae*), (2) FDC 1510 (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*), (3) 306 (*X. citri* subsp. *citri*), (4) 11122 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B) e (5) 10535 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas)..... 128

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tabela 1. Genes efetores Tipo III de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> e <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> (tipos B e C).....	16
--	----

CAPÍTULO 2 – DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COM BASE EM GENES EFETORES DO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III

Tabela 1. Ano de isolamento e origem geográfica dos 157 isolados brasileiros de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> utilizados no presente estudo.....	31
---	----

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>avrXacE1</i> , <i>avrXacE2</i> , <i>avrXacE3</i> , <i>avrBs2</i> , <i>XAC3090</i> (<i>leucine rich protein</i>), <i>hpaF</i> e <i>pthA4</i>	36
---	----

Tabela 3. Sondas de DNA e enzimas de restrição utilizadas nas análises de “Southern blot”.....	39
--	----

Tabela 4. Haplótipos de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> identificados por “Southern blot” com as sondas <i>AvrXacE1</i> , <i>AvrXacE2</i> , <i>AvrXacE3</i> , <i>AvrBs2</i> , <i>Xac3090</i> (<i>leucine rich protein</i>), <i>HpaF</i> e <i>PthA4</i>	45
---	----

Tabela 5. Número de isolados, haplótipos, loci polimórficos, índices de diversidade genética de Nei e diferenças “pairwise” entre sub-coleções e populações de isolados brasileiros <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> identificados por “Southern blot” com as sondas <i>AvrXacE1</i> , <i>AvrXacE2</i> , <i>AvrXacE3</i> , <i>AvrBs2</i> , <i>Xac3090</i> (<i>leucine rich protein</i>), <i>HpaF</i> e <i>PthA4</i>	49
---	----

Tabela 6. Número e proporção de haplótipos identificados por “Southern blot” com sondas de DNA baseadas em genes efetores do Tipo III em sub-coleções e populações simpátricas de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	50
--	----

Tabela 7. Número e proporção de haplótipos identificados por “Southern blot” com as sondas <i>AvrXacE1</i> , <i>AvrXacE2</i> , <i>AvrXacE3</i> e <i>PthA4</i> em sub-coleções e populações simpátricas de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	51
--	----

Tabela 8. Valores <i>Fst</i> calculados para comparar a frequência de haplótipos nas sub-coleções e populações de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> identificados por “Southern blot” com as sondas <i>AvrXacE1</i> , <i>AvrXacE2</i> , <i>AvrXacE3</i> , <i>AvrBs2</i> ,	
--	--

Xac3090 (<i>leucine rich protein</i>), HpaF e PthA4.....	52
--	----

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO PATOGENICA E GENÉTICA DE *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

Tabela 1. Espécie, ano de isolamento, hospedeiro e origem geográfica das 29 linhagens de <i>Xanthomonas</i> isoladas de citros utilizadas no presente estudo.....	66
---	----

Tabela 2. Resultados dos testes de patogenicidade realizados em genótipos de citros por perfurações com agulhas imersas em suspensões bacterianas de linhagens de <i>Xanthomonas</i> isoladas de citros.....	75
--	----

Tabela 3. Diferenças no número de nucleotídeos (esquerda, abaixo) e porcentagem de similaridade de sequências (direita, acima) do gene <i>gyrB</i> de bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> : <i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> (Xfa) e <i>fuscans</i> (Xff), <i>X. axonopodis</i> pvs. <i>anacardii</i> (Xaa), <i>dieffenbachiae</i> (Xad), <i>rhynchosiae</i> (Xar), <i>sesbaniae</i> (Xas) e <i>vignicola</i> (Xav), <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (Xcc) e <i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> (Xacm).....	86
---	----

Tabela 4. Haplótipos de <i>Xanthomonas</i> isoladas de citros identificados por AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).....	88
--	----

Tabela 5. Perfis de amplificação de integrons e cassetes gênicos de linhagens de <i>Xanthomonas</i> isoladas de citros.....	95
---	----

CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas alfalfae* DETECTADA EM CITRUMELO ‘SWINGLE’ (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) NO BRASIL

Tabela 1. Adaptadores e oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”).....	113
--	-----

Tabela 2. Diferenças no número de nucleotídeos (esquerda, abaixo) e porcentagem de similaridade de sequências (direita, acima) do operon ribossômico, incluindo a sequência parcial do gene 16S rDNA, a região intergênica (ITS) e uma porção do gene 23S rDNA, e do gene <i>lrp</i> de isolados de <i>Xanthomonas</i> patogênicos aos citros.....	120
--	-----

Tabela 3. Diferenças no número de nucleotídeos (esquerda, abaixo) e porcentagem de similaridade de sequências (direita, acima) dos genes <i>atpD</i> , <i>dnaK</i> e <i>gyrB</i> de bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> : <i>X. alfalfae</i> (Xa), <i>X. alfalfae</i> subsp. <i>alfalfae</i> (Xaa), <i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> (Xacm), <i>X. axonopodis</i> pvs. <i>alii</i> (Xaal), <i>cassiae</i> (Xac), <i>desmodii</i> (Xad), <i>patelii</i> (Xap) e <i>ricini</i> (Xar), <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> e <i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipos B (Xfa-B) e C (Xfa-C).....	124
---	-----

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGÊNICA DE *Xanthomonas fuscans* SUBSP. *aurantifolii* E DETECÇÃO DE *Xanthomonas alfalfae* EM CITRUMELO ‘SWINGLE’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) NO BRASIL

RESUMO – Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de isolados brasileiros de *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) com base em genes efetores do Sistema de Secreção Tipo III (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *hpaF*, XAC3090 e *pthA4*). Um total de 49 haplótipos foi identificado entre os 157 isolados analisados por “Southern blot”, e o maior polimorfismo genético observado nas análises com a sonda PthA4. Esses efetores estão amplamente distribuídos na população do patógeno e podem ser úteis para uma melhor compreensão da interação patógeno-hospedeiro. Outro objetivo desse trabalho foi a caracterização patogênica e genética de isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B e C (Xfa-B e Xfa-C). Observou-se pequena agressividade dos isolados de Xfa-B e grande variação na patogenicidade de Xfa-C. Os isolados de Xfa-C produtores de pigmento escuro em meio de cultura foram menos agressivos que os isolados não produtores. Alguns isolados de Xfa-C foram patogênicos também a limões, limas ácidas, citrumelo ‘Swingle’ e tangerinas. Os isolados de Xfa-B e Xfa-C foram diferenciados pelas técnicas de AFLP, BOX e ERIC-PCR, com relativa diversidade entre isolados do mesmo patótipo, e análises da sequência do gene *gyrB* revelaram alta similaridade desses isolados com espécies de *Xanthomonas* patogênicas a outros hospedeiros (*X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pvs. *anacardii*, *dieffenbachiae*, *rhynchosiae*, *sesbaniae* e *vignicola*). No presente estudo também foi descrito o primeiro relato de *X. alfalfae* (Xa) no Brasil. Os isolados investigados demonstraram limitada patogenicidade e agruparam-se geneticamente com *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* e *citrumelonis* e *X. axonopodis* pvs. *allii*, *cassiae*, *desmodii*, *patelii* e *ricini*.

Palavras-chave: cancro cítrico, cancriose dos citros, mancha bacteriana dos citros

**GENETIC DIVERSITY OF *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*, MOLECULAR AND
PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas fuscans* SUBSP.
aurantifolii, AND DETECTION OF *Xanthomonas alfae* IN SWINGLE CITRUMELO
(*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) IN BRAZIL**

SUMMARY – In the present study, as one of the objectives, is showed the genetic diversity of Brazilian strains of *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) based on effector genes of the Type III Secretion System (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *hpaF*, *XAC3090* e *pthA4*). A total of 49 haplotypes were identified from 157 Xcc strains by Southern blot analysis using the cited genes as DNA probes. The highest polymorphism was observed with the PthA4. Those bacterium genes are extensively present in the Xcc population and can be used to a better comprehension of the Xcc-plant interaction. As a second objective, we present the genetic and pathogenic characterization of *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* types B and C strains (Xfa-B e Xfa-C). In the pathogenic testes carried out Xfa-B presented a very limited pathogenicity, weaker than Xfa-C. Strains of this last pathotype presented a relatively high degree of pathogenicity variation, and those Xfa-C strains producers of dark pigment on culture medium were less pathogen than those not producers. Also some Xfa-C strains are pathogens to limes, lemons, Swingle citrumelo, and mandarins. Strains of Xfa-B and C were clearly differentiated by the molecular techniques AFLP, BOX and ERIC-PCR. Sequences of the *gyrB* gene revealed a high similarity of Xfa strains and other pathovars of *Xanthomonas* not pathogens of citrus. Finally, we presented the first detection of *X. alfae* (Xa) in Brazil, detected on a single Swingle citrumelo tree in São Paulo state. The Brazilian Xa strains showed a very limited pathogenicity, similar of a *X. alfae* subsp. *citrumelonis*.

Key words: citrus bacterial spot, citrus canker, citrus canker

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Três espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas* são patogênicas para citros (*Citrus* spp.): *X. citri* subsp. *citri* (Xcc), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm). Além de geneticamente diferentes, essas bactérias diferem em agressividade, gama de hospedeiros e distribuição geográfica. Causadores do cancro cítrico asiático, isolados de Xcc estão distribuídos mundialmente e são patogênicos a todas as variedades comerciais de citros. Restrita à América do Sul e com limitada gama de hospedeiros, a bactéria Xfa é o agente etiológico das cancroses B e C. A mancha bacteriana dos citros, causada por isolados de Xacm, ocorre predominantemente em viveiros de citros da Flórida, EUA, e afeta principalmente citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.). No primeiro capítulo deste trabalho são discutidos assuntos pertinentes a essas três espécies bacterianas, com ênfase na importância das cancroses para a citricultura brasileira e mundial, os mecanismos envolvidos na interação com os hospedeiros e os principais métodos moleculares utilizados para identificação e caracterização desses fitopatógenos.

O cancro cítrico foi descoberto no Estado de São Paulo em 1957 e desde então são adotadas medidas rigorosas de exclusão e erradicação de plantas e pomares afetados pela doença. No entanto, essas medidas não foram suficientes para a completa eliminação do patógeno, além da campanha de erradicação ser constantemente questionada por setores governamentais, ou da própria citricultura, quanto à sua necessidade ou rigor (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010). Com isso, o desenvolvimento de métodos alternativos de manejo do cancro cítrico torna-se cada vez mais necessário e a transformação genética de variedades comerciais de citros pela introdução de genes de resistência, por exemplo, é uma das mais promissoras estratégias para combater esta doença. Nesse sentido, compreender a estrutura populacional do patógeno, que pode ser estimada em estudos de diversidade genética, pode auxiliar a seleção e implantação de genes de resistência no hospedeiro

(MCDONALD & LINDE, 2002; OCHIAI et al., 2000). Por esta razão, no segundo capítulo é avaliada a diversidade genética de isolados brasileiros de Xcc por RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") com sondas de DNA baseadas em genes efetores do Sistema de Secreção Tipo III (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *pthA4*, *hpaF* e XAC3090).

Os sintomas apresentados pelas cancroses B e C são descritos como idênticos aos do cancro cítrico, contudo os isolados de Xfa possuem limitada gama de hospedeiros, são menos agressivos, estão restritos a determinados países sul americanos e, portanto, economicamente menos importantes para a citricultura quando comparados com Xcc. Entretanto, Xfa foi pouco caracterizada e a literatura concernente a esse patógeno e sua interação com o hospedeiro é relativamente escassa. Desta forma, estudos mais detalhados sobre a biologia e patogenicidade de Xfa, incluindo os mecanismos que regem sua interação com os hospedeiros, podem servir de modelo para elaboração de hipóteses relacionadas à patogenicidade de Xcc e identificação de possíveis alvos para o controle desse fitopatógeno. Neste sentido, o terceiro capítulo aborda a caracterização genética e patogênica de isolados de Xfa-B e Xfa-C.

No Brasil, além do cancro cítrico asiático, é encontrada a cancrose da lima ácida 'Galego' ou cancrose C. De acordo com a legislação vigente no Estado de São Paulo, a detecção de qualquer uma delas em pomares de citros paulistas culmina na eliminação das plantas contaminadas e nas demais em um raio de 30 metros, desde que as plantas circunvizinhas sejam hospedeiras do agente patogênico da doença (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010). No entanto, em novembro de 2009, no município paulista de Embaúba, sintomas similares aos apresentados pela mancha bacteriana dos citros foram observados em folhas de citrumelo 'Swingle'. A análise de sequências da região ITS (16S-23S rDNA) permitiu identificar o agente etiológico como pertencente à espécie *X. alfalfae* (Xa). Assim, o quarto capítulo relata a detecção de Xa no Brasil e sua caracterização genética e patogênica. Esse estudo é particularmente importante em razão das medidas adotadas no Estado de São Paulo para o controle das cancroses A e C exigirem um correto diagnóstico.

A produção de laranja doce e de suco de laranja no Brasil

Originárias da Ásia, as primeiras plantas cítricas introduzidas no Brasil foram trazidas da Espanha pelos portugueses. Desde então, o que se viu foi uma história de sucesso e conquistas. Atualmente o país é o maior produtor de laranja e o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, constituindo-se em uma das atividades de maior relevância do agronegócio nacional. O setor alcançou níveis inigualáveis de competitividade externa, gera milhares de empregos diretos e indiretos e traz, em média, US\$ 1,3 bilhão por ano em divisas ao país (NEVES & LOPES, 2005; NEVES et al., 2007; NEVES, 2010).

O Brasil é responsável por mais da metade de todo suco de laranja produzido no mundo, sendo 98% destinado à exportação e impressionantes 85% de participação no mercado mundial. Isto significa que de cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos em território nacional. Não há qualquer outro produto industrializado em que a soberania do Brasil seja tão expressiva (NEVES & LOPES, 2005; NEVES et al., 2007; NEVES, 2010). Com quase quatrocentos municípios dedicando-se ao cultivo da laranja e 70% de toda a área plantada do país (aproximadamente 560 mil hectares), o Estado de São Paulo detém 80% da produção nacional de laranja e 53% da produção mundial de suco, constituindo-se como maior polo citrícola do mundo (NEVES et al., 2007; NEVES, 2010).

Os números expressivos alcançados pelo agronegócio citrícola brasileiro podem ser atribuídos aos elevados padrões de qualidade do setor de produção, pesquisa de vanguarda e inovações em tecnologia e logística (NEVES et al., 2007; NEVES, 2010). No entanto, para manter a hegemonia no mercado internacional, o setor necessita constantemente estar atento, entre outros fatores, aos problemas fitossanitários que dizimam milhares de plantas anualmente. O aumento na incidência de pragas e doenças pode comprometer seriamente a economia e a competitividade de um dos setores agroindustriais mais importantes do país.

Doenças dos citros causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* (do grego, *xanthos* = amarelo; *monas* = unidade) compreende um grupo de bactérias fitopatogênicas de grande importância econômica em todo o mundo. Embora apresente ampla variedade de hospedeiros que incluem, pelo menos, 68 famílias de plantas e mais de 240 gêneros, individualmente cada espécie desse gênero possui limitada gama de hospedeiros. Essas bactérias podem incitar uma grande variedade de sintomas em diversos órgãos vegetais (BRUNINGS & GABRIEL, 2003; HAYWARD, 1993).

Aeróbias restritas, bastonetiformes e móveis por um único flagelo polar (monotríquia), essas proteobactérias tem como características a produção de pigmento amarelo, quando em colônia, denominado xantomonadina e a produção do polissacarídeo goma xantana (STALL & CIVEROLO, 1991). Acredita-se que a produção deste polissacarídeo desempenha um papel importante não só na patogenicidade como também na sobrevivência da bactéria, oferecendo proteção contra radiação UV, congelamento e dessecação (MEYER & BOGDANOVE, 2009).

Uma vez no hospedeiro, multiplicam-se nos espaços intercelulares produzindo polissacarídeos extracelulares, principalmente a goma xantana. A diminuição dos espaços intercelulares e o acúmulo de goma resultam em aspecto de encharcamento no tecido infectado, uma vez que ocorre o aprisionamento da água do xilema devido ao potencial higroscópico da goma (PADMANABHAM et al., 1974). Em algumas espécies e patovares de *Xanthomonas*, a bactéria invade o tecido vascular onde se multiplica e propaga-se na planta. Posteriormente, durante a infecção foliar ou vascular, as células vegetais adjacentes às colônias de bactérias começam a se degradar. As organelas vegetais se degeneram, as paredes celulares se fragmentam e finalmente as bactérias invadem e se multiplicam dentro da célula vegetal (RUDOLPH, 1993).

Doenças causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* constituem-se em um dos mais relevantes problemas fitossanitários da citricultura brasileira e mundial. Antes pertencentes a uma mesma espécie bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) e separados em patovares (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelo*) (VAUTERIN et al., 1995), a

classificação atual, baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e homologia DNA-DNA, considera esses organismos como sendo pertencentes a três espécies distintas: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (= *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (= *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (= *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*) (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

Cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

O cancro cítrico não é apenas uma das principais ameaças à cultura dos citros como também uma das mais importantes doenças de plantas cultivadas do mundo. Além de causar danos significativos para a planta, como queda prematura dos frutos e desfolha, gera enormes prejuízos econômicos para os produtores. Sintomas podem ser vistos em toda parte aérea da planta e, embora característicos, podem variar de acordo com o órgão afetado e sua idade no momento da infecção pela bactéria. Os sintomas em folhas constituem-se em lesões corticosas, geralmente salientes nas duas faces e circundadas por um halo amarelo (Figura 1A). A formação deste halo está associada ao decréscimo da produção de clorofilas a e b, caroteno e xantofila nessas regiões (PADMANABHAM et al., 1974).

Nos frutos os sintomas são semelhantes aos observados nas folhas podendo, em estágio avançado, provocar o rompimento da casca (Figura 1B). Lesões em ramos, geralmente, são encontradas apenas em variedades muito suscetíveis (Figura 1C). A fotossíntese é prejudicada em função da destruição da área foliar e ataques mais severos podem levar à desfolha e queda de frutos (LEITE JR., 1990). Sob condições naturais de infecção a disseminação ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas e de chuvas associadas com ventos, e a disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado. No Brasil o cancro cítrico é mais severo no início do verão, quando altas temperaturas, chuvas intensas e ventos ocorrem ao mesmo tempo e num período no qual as plantas hospedeiras apresentam

grande quantidade de tecidos imaturos (ramos, folhas e frutos) (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1992).

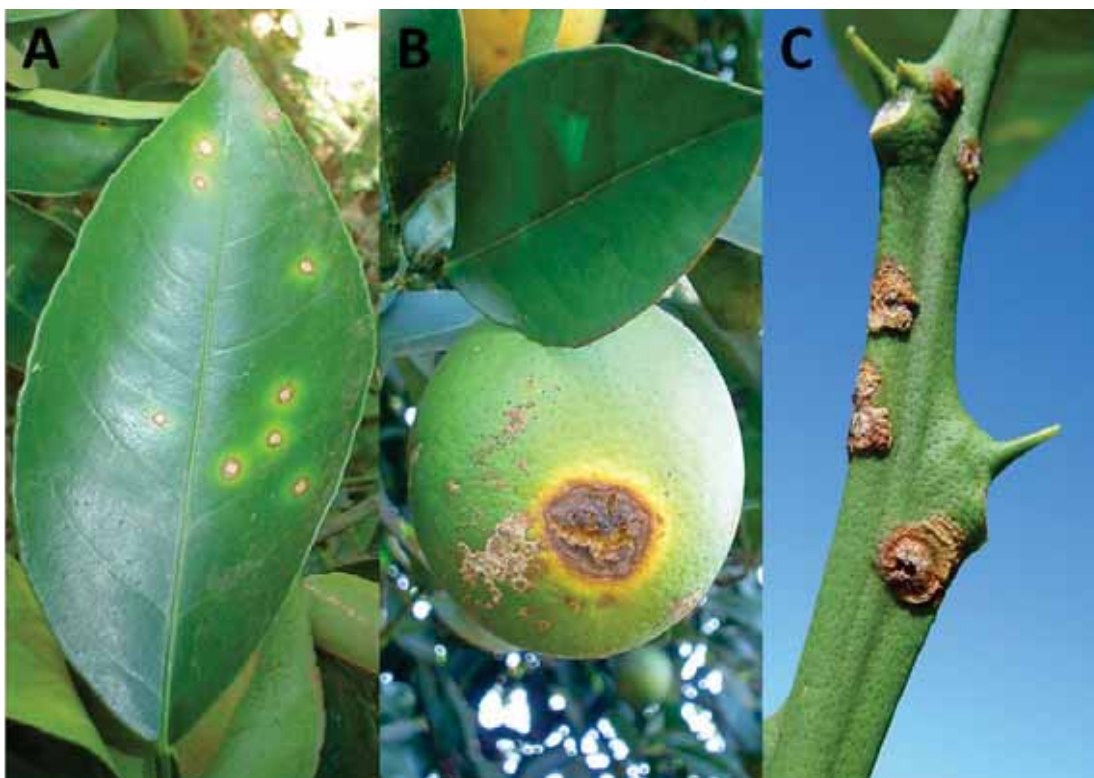


Figura 1. Sintomas de cancro cítrico asiático em (A) folha, (B) fruto e (C) ramo de laranja doce (*Citrus sinensis*). Observa-se na folha e no fruto a presença de um halo amarelo característico ao redor das lesões. Fonte: Fundecitrus.

Com a introdução no Brasil, em 1996, do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton), houve importante aumento na incidência do cancro cítrico (BERGAMIN FILHO et al., 2000; GIMENES-FERNANDES et al., 2000). Embora não seja um vetor da bactéria, os ferimentos provocados pelo minador facilitam sua penetração, intensificando, drasticamente, a disseminação da doença. Durante a alimentação, as larvas rompem a cutícula e a epiderme expondo o mesófilo foliar, tornando o hospedeiro mais suscetível à infecção (CHAGAS et al., 2001; GOTTWALD et al., 1997; JESUS JR. et al., 2006).

O principal método de controle do cancro cítrico em áreas onde a doença não ocorre endemicamente é a erradicação de plantas doentes e das suspeitas de estarem infectadas. Além disso, diversos países adotam rígidas medidas para prevenir sua introdução, como restrições de quarentena e embargo de frutos *in natura* provenientes de regiões afetadas. De acordo com a legislação vigente no Estado de São Paulo, a detecção de cancro cítrico em pomares de citros culmina na eliminação das plantas doentes e das demais em um raio de 30 metros (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010). Por este motivo, o diagnóstico impreciso do cancro cítrico pode acarretar prejuízos econômicos, gerados pela eliminação desnecessária de plantas ou impossibilidade de exportação de produtos cítricos decorrente de restrições fitossanitárias (GRAHAM et al., 2004).

Identificado em 1915, o agente causal do cancro cítrico asiático foi primeiro descrito como *Pseudomonas citri* por Clara Hasse (HASSE, 1915), e já no ano seguinte reclassificado como *Bacterium citri* (DOIDGE, 1916). Posteriormente foi renomeado de *Bacillus citri* (HOLLAND, 1920) e depois de *Phytomonas citri* (BERGEY et al., 1923). Com a criação do gênero *Xanthomonas* (DOWSON, 1939) foi reclassificado como *Xanthomonas citri*, e mais tarde como *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (DYE et al., 1980). Em 1989, GABRIEL e colaboradores propuseram o restabelecimento do nome *Xanthomonas citri*. No entanto, os dados apresentados foram considerados insuficientes, devido principalmente à ausência de análises de homologia DNA-DNA, e a proposta foi recusada (YOUNG et al., 1991).

Após análises de açúcares por BIOLOG, homologia DNA-DNA e características fenotípicas e patogênicas, VAUTERIN e colaboradores (1995) propuseram uma nova classificação para o gênero *Xanthomonas*. Com isso os isolados de *Xanthomonas campestris* foram alocados dentro de 16 novas espécies e a bactéria causadora do cancro cítrico passou a ser classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

O nome *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* chegou a ser proposto por SCHAAD e colaboradores em 2005, mas logo em seguida o mesmo grupo de pesquisadores, seguindo o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, propôs uma nova classificação, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a qual é aceita até o presente momento.

Esta nova classificação baseia-se em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e homologia DNA-DNA (SCHAAD, et al., 2005; SCHAAD, et al., 2006).

Duas variantes de Xcc foram identificadas nas duas últimas décadas. Denominadas de A* (A estrela) (VERNIÈRE et al., 1998) e A^w (SUN et al., 2004), ambas possuem limitada gama de hospedeiros e são consideradas menos severas para a citricultura quando comparadas com o tipo A. Produzem sintomas típicos do cancro cítrico e, apesar de possuírem patogenicidade restrita, semelhante à Xfa, são geneticamente similares à Xcc (SUN et al., 2004; VERNIÈRE et al., 1998).

Isolados do tipo A* são patogênicos apenas a *Citrus aurantifolia* e foram coletados inicialmente no sudeste asiático, entre 1986 e 1988, na Arábia Saudita, Omã, Ira e Índia (VERNIÈRE et al., 1998). Mais recentemente esse patótipo foi relatado na Tailândia (NGOC et al., 2007), Camboja (NGOC et al., 2008) e também no continente africano (DERSO et al., 2009). Análises fenotípicas, hibridações com sondas de DNA e PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos de Xcc, não permitiram a diferenciação dos tipos A e A* (VERNIÈRE et al., 1998).

O patótipo A^w foi identificado em Maio de 2000 nas cidades de Wellington e Lake Worth, Flórida, infectando unicamente *C. aurantifolia* e *C. macrophylla*. Por homologia DNA-DNA foi possível identificar este patótipo como pertencente à espécie Xcc. No entanto, além da gama de hospedeiros, diferenças com as estirpes A e A* foram observadas por ELISA, PCR, análises de ácidos graxos e eletroforese em campo pulsado. Devido a essas características diferenciais, os autores passaram a utilizar o termo “Wellington” (A^w) para distinguir essa variante dos demais isolados de Xcc (SUN et al., 2004).

O sequenciamento genômico completo da bactéria Xcc (isolado 306) foi descrito em 2002 por pesquisadores brasileiros da rede Onsa (“Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis”), um instituto virtual de genômica criado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). A linhagem sequenciada apresentou um cromossomo circular com 5.175.554 pares de base (pb) e dois plasmídeos, nomeados de pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb). No total foram identificadas 4.489 ORFs (“Open Reading Frames”), das quais 2.770 codificam

produtos homólogos a proteínas com funções conhecidas, e as demais atribuídas a proteínas hipotéticas ou desconhecidas (DA SILVA et al., 2002).

Cancrozes dos citros (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolia*)

O primeiro relato de uma cancrose dos citros com patogenicidade limitada a um pequeno número de hospedeiros foi em 1934 na província de Corrientes na Argentina, e posteriormente no Uruguai (1936) e no Paraguai (1940) (NAMEKATA, 1971). Chamada inicialmente de “falsa cancrose” (após observação de diferenças entre as bactérias causadoras do cancro cítrico e desta nova doença), FAWCETT & BITANCOURT (1940), sugeriram denominá-la de cancrose B ou cancrose sul-americana a fim de distingui-la do cancro cítrico, o qual denominaram de cancrose A ou cancrose asiática. Embora mais severa a limões verdadeiros, a cancrose B também infecta lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) e laranja azeda, e raramente laranja doce e pomelo (SCHUBERT, 2001).

Em 1963, uma nova cancrose afetando apenas lima ácida ‘Galego’ foi observada em diversos municípios do Estado de São Paulo. Após análises sorológicas, fisiológicas, morfológicas e patogênicas, NAMEKATA (1971) relatou que essa nova estirpe bacteriana diferia da bactéria causadora do cancro cítrico em nível intraespecífico, e portando, deveria ser considerada como uma forma especial de Xcc, sugerindo o nome *Xanthomonas citri* forma *specialis aurantifolia*.

Denominada atualmente de cancrose C, ou cancrose da lima ácida ‘Galego’, e restrita ao Estado de São Paulo, causa sintomas semelhantes ao cancro cítrico asiático em lima ácida ‘Galego’ e induz reação de hipersensibilidade quando inoculada em outras espécies cítricas (MALAVOLTA JR et al., 1987; NAMEKATA, 1971). Recentemente foi encontrado no município paulista de Severínia novos isolados de *Xanthomonas* geneticamente relacionados (polimorfismo da região 16S-23S rDNA e BOX e ERIC-PCR) à Xfa, mas incapaz de infectar outros cítricos a não ser citrumelo ‘Swingle’ (JACIANI et al., 2009).

Uma nova doença foi reportada no México em 1981 causando sintomas semelhantes aos do cancro cítrico em folhas e ramos de *Citrus aurantifolia*. A causa desta doença foi atribuída à Xcc e denominada de “bacteriose dos citros” por não causar sintomas em frutos (RODRIGUEZ et al., 1985). Embora semelhante ao cancro cítrico, a cancrose D, como ficou conhecida posteriormente, é atribuída atualmente ao fungo *Alternaria limicola* e, portanto, não classificada mais como cancrose (PALM & CIVEROLO, 1994).

GABRIEL e colaboradores (1989), baseados em análise de perfil de restrição por RFLP e patogenicidade, sugeriram uma nova classificação para as espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros. Com isso, os agentes causais das cancroses B e C foram classificados como *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii*. Em 1995, após uma nova revisão taxonômica do gênero *Xanthomonas*, foram classificados como *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (VAUTERIN et al., 1995).

SCHAAD e colaboradores (2005), baseados em análises moleculares (AFLP, homologia DNA-DNA e sequenciamento da região ITS), observaram alta similaridade entre Xfa e *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, e portanto, sugeriram que estes organismos fossem classificados como pertencentes à mesma espécie bacteriana e separados em subespécies de acordo com suas características fenotípicas. Como o termo “fuscans” foi descrito anteriormente a “aurantifolii”, os autores propuseram elevar a variante *fuscans* ao status de espécie e classificaram os agentes patogênicos do crestamento bacteriano comum do feijoeiro e da cancrose dos citros de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, respectivamente.

Alguns isolados de Xfa-C têm como característica a produção de pigmento escuro quando cultivados em meio de cultura (Figura 2). Com exceção de *X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. campestris* pv. *vignicola*, nenhuma outra espécie de *Xanthomonas* apresenta essa característica (SCHAAD et al., 2005). NOCITI e colaboradores (2006) relataram que isolados do tipo C produtores de pigmento são menos agressivos que isolados não produtores.

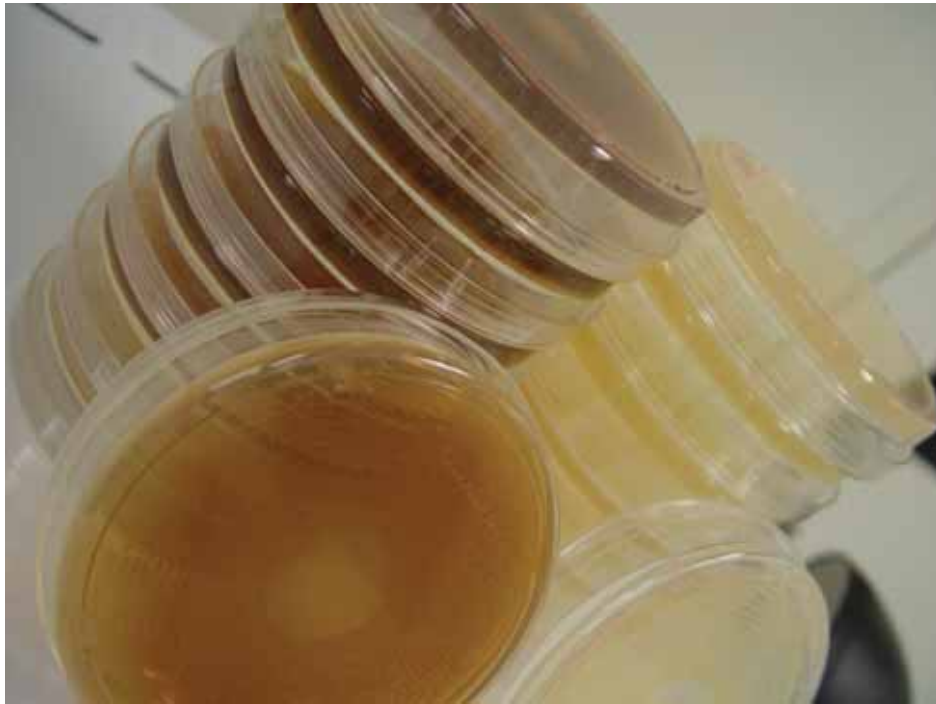


Figura 2. Placas de Petri com meio de cultura nutriente ágar semeados com isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores e não produtores de pigmento escuro.

Xfa difere da maioria dos outros membros do gênero *Xanthomonas* por homologia DNA-DNA, rep-PCR, polimorfismo da região ITS e características fenotípicas. Além das técnicas moleculares, é possível diferenciar Xfa de Xcc e Xacm por testes sorológicos e bioquímicos. Diferente das estirpes A e E, Xfa hidrolisa gelatina, mas não pectato, precipita leite Litmus e não utiliza maltose (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

Recentemente foi divulgado o sequenciamento de duas estirpes de Xfa (MOREIRA et al., 2010). Os genomas sequenciados foram do isolado 11122 (B-69) proveniente da Argentina (tipo B), e do isolado 10535 (IBSBF 338) do Estado de São Paulo (tipo C). As sequências obtidas foram comparadas com o genoma da Xcc e de outras *Xanthomonas*, o que possibilitou a identificação de inúmeras semelhanças e

diferenças entre esses patógenos, as quais auxiliarão na melhor compreensão da patogenicidade diferencial dessas bactérias.

Mancha bacteriana dos citros (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*)

Uma nova doença com características parecidas com o cancro cítrico foi encontrada em viveiros de citros da Flórida em agosto de 1984, cinquenta e sete anos após o último relato de cancrose no Estado (a Flórida foi declarada oficialmente livre do cancro cítrico em 1933) (SCHOULTIES et al., 1985; SCHOULTIES et al., 1987). A causa desta doença foi atribuída erroneamente à Xcc e identificada inicialmente como “cancro de viveiro”. Devido ao fato do cancro cítrico ser considerado uma doença de importância quarentenária, medidas de exclusão e erradicação do patógeno foram adotadas imediatamente pela Flórida. Estima-se que os gastos gerados por essa campanha chegaram a US\$250 milhões (GRAHAM & GOTTWALD, 1988; SCHOULTIES et al., 1987).

No entanto, GABRIEL e colaboradores (1989) observaram, por análise de polimorfismo genético por RFLP, que os isolados encontrados em viveiros da Flórida compreendiam um grupo heterogêneo de *Xanthomonas campestris*, distinto do patovar *citri* e inter-relacionado com os patovares *alfalfae*, *cyamopsidis* e *dieffenbachiae*. Com isso os autores sugeriram que esse patógeno fosse alocado em um patovar distinto, identificando-o como *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo*. Posteriormente, assim como as outras *Xanthomonas* patogênicas aos citros, foi reclassificado como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* (VAUTERIN et al., 1995).

Pela nomenclatura atual estes isolados pertencem à espécie *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm) (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006). Análises moleculares revelaram alta homologia entre isolados de Xacm com isolados de *X. campestris* pv. *alfalfae*, como observado anteriormente por RFLP (GABRIEL et al., 1989). Por apresentar menor importância econômica e ter sido descrito posteriormente,

os autores optaram pela inclusão do patovar *citrumelo* como subespécie de *Xanthomonas alfalfae*.

Esta doença caracteriza-se pela formação de lesões não salientes, rodeadas por anasarca e halo amarelo em folhas, ramos e, raramente, em frutos. Não apresenta lesões corticosas e erumpentes típicas do cancro cítrico (SCHOULTIES et al., 1985; SCHOULTIES et al., 1987; SCHAAD et al., 2005). Devido a essa sintomatologia atípica e com o intuito de diferenciá-la do cancro cítrico, GRAHAM & GOTTWALD (1988) sugeriram denominá-la de “mancha bacteriana dos citros”.

Embora patogênica a diversas espécies de citros, é particularmente agressiva apenas para citrumelo ‘Swingle’ e ocorre basicamente em plantas jovens de viveiro. Além disso, populações de Xacm aumentam e se mantêm em números elevados apenas nas infecções em citrumelo ‘Swingle’, e tendem a diminuir rapidamente após um aumento inicial em pomelo ‘Grapefruit’ e outros porta-enxertos, cultivares e híbridos (EGEL et al., 1991; GRAHAM et al., 1992).

Pelo sequenciamento do gene *lrp* (“leucine responsive regulatory protein”) de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas* (CUBERO & GRAHAM, 2004), observou-se a separação dos isolados de Xacm dos demais isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros, e alta homologia com isolados de outros hospedeiros (*X. axonopodis* pvs. *dieffenbachia*, *fici* e *vesicatoria*). Resultados semelhantes foram observados em estudos patológicos, fenotípicos e genéticos (GRAHAM et al., 1990b), sugerindo que a mancha bacteriana dos citros, assim como outras doenças causadas por *Xanthomonas*, originou-se da adaptação de isolados relacionados a hospedeiros diferentes de citros (GRAHAM et al., 2004). Corrobora com esta hipótese o fato dos isolados de Xacm constituírem um grupo heterogêneo, com variações em agressividade, enquanto que os agentes patogênicos do cancro cítrico, por exemplo, exibem alta homologia (EGEL et al., 1991).

Recentemente foi publicado o sequenciamento completo do isolado F1 de Xacm (JALAN et al., 2011). O isolado sequenciado apresentou um cromossomo circular com 4.967.469 pb e 64,92% de conteúdo G+C. Além da ausência de plasmídeos, Xacm não

apresentou diversos genes efetores encontrados em Xcc e Xfa, tais como *pthA*, *xopE3* (*avrXacE3*) e *xopAI*.

Interação planta-patógeno

Bactérias fitopatogênicas infectam seus hospedeiros para suprir suas necessidades nutricionais e se reproduzirem. A maioria das fitobactérias, por não apresentarem estruturas ativas para penetração no tecido vegetal, necessita da presença de aberturas naturais ou ferimentos para colonizar a célula hospedeira. No entanto, a ocorrência do processo infeccioso dependerá da interação entre os mecanismos de patogenicidade e virulência da bactéria e os sistemas de defesa da planta (WULFF, 2008).

As interações planta-patógeno podem ser classificadas como compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal e é capaz de mascarar ou reprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro, desenvolvendo-se nos tecidos vegetais e levando à manifestação de sintomas pelos mecanismos de patogenicidade e virulência, que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta. Estes fatores são capazes de modular, interferir ou mesmo suprimir as respostas de defesa da planta (WHITE et al., 2000).

Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal é reconhecido e restringido ao sítio de infecção. Incompatibilidade acontece quando genes de resistência da planta codificam proteínas receptoras (R) capazes de interagir especificamente com proteínas efetoras (Avr) codificadas por genes de avirulência (*avr*) presentes no patógeno. Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque pela indução de proteínas de defesa, frequentemente gerando rápida morte de células no local da infecção, chamada de reação de hipersensibilidade (HR), impossibilitando a propagação do patógeno para outros tecidos da planta (GACHOMO et al., 2003; STASKAWICZ et al., 1995).

A diferença entre as interações compatíveis e incompatíveis está relacionada à presença e funcionalidade dos genes de resistência na planta e de virulência no patógeno. A evolução das interações gene-a-gene tem como consequência uma diversidade de genes R em diferentes indivíduos de uma espécie hospedeira e uma correspondente diversidade de genes de avirulência em diferentes raças do patógeno (STASKAWICZ et al., 1995).

Proteínas efetoras do Sistema de Secreção Tipo III de *Xanthomonas*

A patogenicidade e virulência da maioria das bactérias Gram-negativas dependem da translocação de um coquetel de proteínas efetoras do Tipo III (T3) para o interior da célula vegetal, onde conseguem romper as defesas do hospedeiro, permitindo assim a sobrevivência e multiplicação do patógeno no local invadido (MAROIS et al., 2002). A translocação dessas proteínas ocorre pelo sistema de secreção Tipo III (T3SS), um complexo proteico conservado na maioria das bactérias Gram-negativas patogênicas a animais e vegetais e codificado nos fitopatógenos pelos genes *hrp* (“hypersensitivity response and pathogenicity”). Genes *hrp* altamente conservados (existem pelo menos nove deles) são chamados de *hrc* (*hrp* “conserved”) (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). Estes genes encontram-se normalmente arranjados em sequência em regiões específicas do genoma, denominadas de ilhas de patogenicidade. Por estarem sempre associadas com espécies patogênicas e carregarem elementos geneticamente móveis, dentre outras características específicas, acredita-se que essas regiões podem ser transferidas horizontalmente (BRUNINGS & GABRIEL, 2003).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* abrigam um extenso repertório de efetores T3 de diferentes famílias. Recentemente, WHITE e colaboradores (2009) propuseram a distribuição desses efetores em 39 classes de acordo com a similaridade das sequências. Os sequenciamentos dos genomas dos tipos A (DA SILVA et al., 2002), B e C (MOREIRA et al., 2010) de *Xanthomonas* patogênicas aos citros revelaram a

presença de 27 famílias de efetores T3, sendo 17 encontradas nos três genomas, quatro presentes apenas nos tipos A e B, cinco exclusivas de Xfa e uma única família restrita ao tipo C (Tabela 1).

Tabela 1. Genes efetores Tipo III de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (tipos B e C).

Efetores	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	
		tipo B	tipo C
AvrBs2	XAC0076	XAUB_16770	XAUC_23650
AvrBs3/pthA	XACa0022 (<i>pthA1</i>)	XAUB_40130	XAUC_22430
	XACa0039 (<i>pthA2</i>)	XAUB_28490	XAUC_24060
	XACb0015 (<i>pthA3</i>)		XAUC_09900
	XACb0065 (<i>pthA4</i>)		XAUC_43080
			XAUC_00260
XopB (HopD1)	-	XAUB_09070	
XopC	XAC1210/XAC1209	-	-
XopE (HopX)			
XopE1	XAC0286 (<i>avrXacE1</i>)	XAUB_37010	XAUC_37580
XopE2	XACb0011 (<i>avrXacE2</i>)	XAUB_31660	-
XopE3	XAC3224 (<i>avrXacE3</i>)	XAUB_14680	XAUC_00040
XopE4	-	XAUB_23330	XAUC_31730
XopF			
XopF1	-	-	XAUC_20060
XopF2	XAC2785	XAUB_07540	XAUC_21000
XopI	XAC0754	XAUB_39080	XAUC_07100
XopJ (HopZ)	-	XAUB_20830	XAUC_08850
XopK	XAC3085	XAUB_34090	XAUC_12520
XopL	XAC3090	XAUB_34130	XAUC_02900/12488
XopN (HopAU)	XAC2786	XAUB_07520	-
XopP	XAC1208	XAUB_06720	-
XopQ (HopQ)	XAC4333	XAUB_10220	XAUC_14670
XopR	XAC0277	XAUB_36920	XAUC_37490
XopV	XAC0601	XAUB_23140	XAUC_21260
XopX	XAC0543	XAUB_14760	XAUC_20690
XopZ (HopAS)	XAC2009	XAUB_11532/13710	XAUC_25915
XopAD	XAC4213	XAUB_02510	XAUC_34870
XopAE	XAC0393	-	-
XopAF (HopAF)	-	XAUB_02310	XAUC_00300
XopAG (HopG)	-	XAUB_03570	XAUC_04910
XopAI (HopO1)	XAC3230	XAUB_26830	XAUC_23780
XopAK (HopK1)	XAC3666	XAUB_02580	XAUC_32490

Segundo MOREIRA e colaboradores (2010), os efetores encontrados apenas em Xfa podem explicar a limitada gama de hospedeiros dessa espécie em relação à Xcc. Assim como a capacidade do tipo C de infectar apenas lima ácida 'Galego' e citrumelo 'Swingle' pode ser consequência da ausência dos efetores que estão presentes apenas nos tipos A e B.

O mecanismo molecular pelo qual Xcc e Xfa induzem lesões em seus hospedeiros ainda não está totalmente esclarecido, entretanto sabe-se que as proteínas efetoras da família *avrBs3/pthA* são essenciais para que esses fitopatógenos provoquem sintomas de cancro nos citros (SWARUP et al., 1992). Membros desta família gênica estão amplamente distribuídos no gênero *Xanthomonas*, contudo nem todas as espécies desse gênero possuem genes desta família (BRUNINGS & GABRIEL, 2003) ou demonstraram efetiva contribuição na patogenicidade (SCHORNACK et al, 2006).

Assim como observado em fatores de transcrição eucarióticos, os membros da família *avrBs3/pthA* apresentam sinais de localização nuclear (NLSs) e um domínio ácido de ativação da transcrição (AAD) na região C-terminal, além de um domínio central, rico em leucina, formado por repetições de 102 pb arranjadas *in tandem*, praticamente idênticas e compostas de 34 aminoácidos cada (BRUNINGS & GABRIEL, 2003).

Proteínas dessa família gênica são altamente similares (80-97%) e as diferenças encontradas estão situadas principalmente na região central (SCHORNACK et al, 2006). Alterações nessas sequências repetitivas podem resultar tanto na perda de patogenicidade/virulência quanto na geração de novas especificidades e, conseqüentemente, em uma nova dinâmica da interação patógeno-hospedeiro (HERBES et al., 1992; YANG et al., 1994), uma vez que tanto a patogenicidade quanto a avirulência são determinadas por essa região (YANG & GABRIEL, 1995).

O sequenciamento do isolado 306 de Xcc (DA SILVA et al., 2002) identificou a presença de quatro genes da família *avrBs3/pthA*. Todos estão localizados em plasmídeos e foram denominados de *pthA1* (com 16,5 repetições no domínio central), *pthA2*, *pthA3* (ambos com 15,5 repetições) e *pthA4* (com 17,5 repetições, no qual a

segunda repetição é composta por 33 aminoácidos ao invés de 34, número geralmente encontrado nas repetições centrais dos membros desta família gênica).

O gene *pthA*, além de promover a divisão (hipertrofia) e o alargamento (hiperplasia) celulares, também está envolvido na morte celular programada ("programmed cell death"), sendo um determinante primário da gama de hospedeiros do patógeno (DUAN et al., 1999). Inserções deste gene em outras espécies de *Xanthomonas* não patogênicas em citros conferiram a habilidade dessas em romper a epiderme foliar e causar sintomas em citros (SWARUP et al., 1991). No entanto, segundo LIN e colaboradores (2011) a expressão dos sintomas característicos do cancro cítrico em folhas de pomelo 'Grapefruit' causados por Xcc, é alterada pela substituição de um único aminoácido (prolina pela serina) na posição 286 do PthA.

Com exceção de Xacm, que não causa lesões erupcentes típicas do cancro cítrico, todas variantes de *Xanthomonas* patogênicas aos citros (tipos A, A*, A^w, B e C) possuem ao menos um homólogo do gene *pthA*. Contudo, AL-SAADI e colaboradores (2007) demonstraram que provavelmente apenas os homólogos do *pthA* que apresentam 17,5 repetições na região central são essenciais para a patogenicidade de Xcc em citros.

Métodos moleculares aplicados na identificação e no estudo da variabilidade genética de patógenos bacterianos

Taxonomia bacteriana

A taxonomia é normalmente considerada como sinônimo de sistemática ou biosistemática e tradicionalmente dividida em três partes: (i) classificação (arranjo ordenado dos organismos em grupos taxonômicos, com base em similaridade); (ii) nomenclatura (rotulagem das unidades definidas na classificação); e (iii) identificação (processo para determinar a espécie e à qual grupo taxonômico pertence um organismo

desconhecido) (VANDAMME et al., 1996). Segundo STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) a identificação rápida e confiável de isolados é a tarefa mais importante da taxonomia bacteriana.

Abordagens morfológicas e fenotípicas tais como sintomatologia, isolamento e cultivo em meio de cultura constituem o primeiro passo para identificação de microrganismos. Características fisiológicas e patogênicas também são comumente utilizadas. No entanto, embora importantes, essas metodologias são ineficientes, demoradas e geralmente influenciadas pelo meio ambiente. Com isso, a utilização de técnicas moleculares tem sido o principal enfoque dos estudos taxonômicos modernos (a chamada taxonomia molecular), por tratar-se de uma metodologia altamente específica, sensível, reprodutível e rápida. Além disso, a confiabilidade do teste de identificação não depende das condições ambientais, idade ou do estado fisiológico do patógeno alvo (BENALI et al., 2011; VANDAMME et al., 1996; VINATZER & BULL, 2009).

A comparação do percentual de conteúdo de guanina (G) mais citosina (C) entre grupos bacterianos foi o primeiro método molecular empregado na classificação de microrganismos. Este método baseia-se na observação de que grupos distintos diferem no conteúdo G+C, enquanto organismos relacionados possuem relativa similaridade no percentual dessas bases. Embora eficaz na diferenciação de grupos genéticos, esta técnica não permite diferenciar organismos estreitamente relacionados, como nos táxons de gênero e espécie (VINATZER & BULL, 2009).

A técnica de homologia DNA-DNA é considerada o método padrão para definição de espécies bacterianas. Esta técnica baseia-se na capacidade, sob condições apropriadas, de hibridização entre DNAs de fita simples, considerando-se como pertencentes à mesma espécie isolados com valores de homologia iguais ou superiores a 70%. Entretanto, por se tratar de uma técnica demorada, já que as comparações entre isolados são feitas em pares ("pairwise"), esta metodologia não é a mais adequada quando o objetivo é analisar um grande número de indivíduos (amostras) (RADEMAKER et al., 2005). Com isso, outros métodos mais rápidos estão sendo

aplicados na caracterização e diferenciação de espécies bacterianas (CUBERO & GRAHAM, 2002).

RADEMAKER e colaboradores (2000) observaram que a genotipagem por AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") e também por amplificações via PCR ("Polymerase Chain Reaction") de elementos repetitivos do genoma (rep-PCR), apresentam resultados altamente correlacionados com os de homologia DNA-DNA. Por tratar-se de duas metodologias menos dispendiosas, as mesmas podem ser utilizadas rotineiramente na identificação de novas espécies (AH-YOU et al., 2009; RADEMAKER et al., 2005).

A técnica de rep-PCR envolve o uso de oligonucleotídeos iniciadores baseados em sequências altamente conservadas e dispersas em múltiplas cópias no genoma bacteriano (VERSALOVIC et al., 1991). As sequências REP ("Repetitive Extragenic Palindromic") e ERIC ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus") e o elemento BOX (referente às subunidades boxA, boxB e boxC) estão entre as famílias de sequências repetidas mais utilizadas na genotipagem de fitobactérias. Individualmente, as reações de PCR com iniciadores baseados nessas sequências são chamadas de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, respectivamente, e de rep-PCR quando utilizadas em conjunto (KOEUTH et al., 1995; VERSALOVIC et al., 1991).

Estudos taxonômicos utilizando o sequenciamento de genes evolutivamente conservados ganhou importância nas últimas décadas devido, principalmente, ao sequenciamento da região codificadora do RNA ribossômico (rDNA), por se tratar de uma região altamente conservada e essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos (VINATZER & BULL, 2009). O operon ribossômico dos procariotos é constituído pelos genes responsáveis pelas subunidades 16S, 23S e 5S, além de duas regiões intergênicas, ITS1 (16S-23S) e ITS2 (23S-5S).

Com cerca de 1550 pb de extensão e composto de regiões conservadas e variáveis, o gene ribossomal 16S rDNA constitui-se atualmente em um dos principais alvos utilizados na taxonomia de microrganismos. O sequenciamento completo ou parcial desse gene com oligonucleotídeos universais tem sido realizado para um grande número de espécies. O desenvolvimento dos métodos de sequenciamento de DNA e o

acúmulo de sequências disponibilizadas em banco de dados de domínio público tem permitido a comparação do 16S entre linhagens bacterianas e auxiliado na identificação de isolados desconhecidos. No entanto, a baixa variabilidade encontrada na sequência desse gene em alguns grupos bacterianos pode inviabilizar sua utilização, por exemplo, para distinguir isolados da mesma espécie que apresentam patogenicidade diferenciada (HAUBEN et al., 1997; VINATZER & BULL, 2009). No caso de *Xanthomonas*, por exemplo, as maiores dissimilaridades observadas foram encontradas na sequência de nucleotídeos do espaço intergênico 16S-23S (CUBERO & GRAHAM, 2002, 2004).

A tipagem molecular pelo sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST - “Multi Locus Sequence Typing”), baseada na análise de diferentes genes constitutivos, trouxe uma nova dimensão aos estudos taxonômicos de espécies estreitamente relacionadas (STACKEBRANDT et al., 2002). Os produtos desses genes, também conhecidos como genes de manutenção ou, em inglês, de “housekeeping genes”, estão envolvidos em processos celulares essenciais à sobrevivência dos organismos, atuando em funções básicas do metabolismo celular (VINATZER & BULL, 2009).

Cada vez mais utilizada na identificação de bactérias, esta metodologia é uma maneira rápida e confiável de obter informações em níveis inter e intraespecífico (PARKINSON et al., 2007). Desde 2002, o sequenciamento parcial de pelo menos cinco genes constitutivos passou a ser recomendado pelo comitê *ad hoc* para reavaliação da definição de espécies em bacteriologia (*Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics*, WAYNE et al., 1987) como um dos métodos de diferenciação de estirpes (STACKEBRANDTS et al., 2002).

Na técnica de MLST, os alelos analisados de cada um dos *locus* sequenciados são numerados aleatoriamente, independentemente da variação no número de nucleotídeos. Se a sequência obtida coincidir com alguma outra já depositada em banco de dados, atribui-se a esta uma numeração já existente, caso contrário, um novo número é conferido a este alelo. O perfil alélico gerado pela combinação de todas as sequências gênicas analisadas é chamado de “sequence type” (ST). O termo MLSA (“Multi Locus Sequence Analysis”) é utilizado quando, ao invés das STs, a comparação das sequências é realizada por similaridade de bases. Enquanto a MLST é utilizada em

estudos epidemiológicos de espécies já conhecidas, a técnica de MLSA é normalmente empregada na identificação ou caracterização de espécies ou em estudos filogenéticos (VINATZER & BULL, 2009).

Diversidade Genética de *Xanthomonas* spp.

Não há conhecimento de variedades comerciais de citros que sejam imunes ao cancro cítrico, e os métodos de controle adotados visam prevenir a introdução do patógeno em novas áreas e erradicar a doença das áreas contaminadas, ou o manejo integrado da doença em áreas endêmicas. Embora relativamente eficazes, a utilização exclusiva dessas medidas é constantemente contestada e novas estratégias para combater essa doença tornam-se cada vez mais necessárias (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010; BEHLAU et al., 2007). No entanto, para desenvolver novas estratégias de controle do cancro cítrico, como por exemplo, a criação de plantas resistentes por transformação genética, é fundamental compreender a estrutura genética do seu agente causal, que pode ser estimada em estudos de variabilidade genética dentro e entre populações (MCDONALD & LINDE, 2002; OCHIAI et al., 2000). Além disso, o estudo da diversidade de fitopatógenos pode auxiliar na compreensão da interação planta-patógeno, fornecer subsídios no estabelecimento de hipóteses a respeito da sua história evolutiva, determinar seu potencial de adaptação a condições adversas e na definição de estratégias de controle e diagnóstico da doença (ADHIKARI et al., 1995, 1999; RESTREPO et al., 2000; VERDIER et al., 1998).

Segundo ARBER (2004), o surgimento de variações genéticas em bactérias é decorrente de três fatores principais: mutação (substituição, deleção ou inserção de um ou poucos nucleotídeos), recombinação, e aquisição de sequências de DNA de outros organismos (transferência horizontal de genes). Níveis de variabilidade genética em populações de fitopatógenos bacterianos têm sido avaliados empregando-se diferentes técnicas moleculares, tais como, homologia DNA-DNA (EGEL et al., 1991; SCHAAD, et al., 2005; VAUTERIN et al., 1995), RFLP (BELASQUE JR., 2005; JACIANI, 2008;

GAGNEVIN et al., 1997), AFLP (RADEMAKER et al., 2000; VOS et al., 1995) e perfil de amplificação de elementos repetitivos do genoma (CUBERO & GRAHAM, 2002; LEE et al., 2008; RADEMAKER et al., 2000) e de cassetes gênicos associados a integrons (BARIONOVI & SCORTICHINI, 2008; GILLINGS et al., 2005; VALVERDE et al., 2007).

Análises de polimorfismo de fragmentos de restrição por RFLP com sondas de DNA baseadas em genes *avr*, *hrp* e elementos transponíveis têm fornecido uma adequada caracterização da estrutura genética de populações bacterianas (GAGNEVIN et al., 1997). A genotipagem de isolados de *Xanthomonas* por essa técnica tem sido utilizada objetivando identificar variabilidade entre isolados da mesma espécie/patovar, comparar isolados de espécies/patovares diferentes e para diferenciar cepas patogênicas de não patogênicas (ADHIKARI et al., 1999; BELASQUE, 2005; JACIANI 2008; GAGNEVIN et al., 1997; NELSON et al., 1994; OCHIAI et al., 2000; RESTREPO et al., 2000).

GAGNEVIN e colaboradores (1997) estudaram a diversidade genética de isolados de uma população mundial de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* por RFLP. Os grupos genéticos identificados após hibridização com sondas baseadas em genes *hrp* correlacionaram-se com a região de origem e o hospedeiro. Maior diversidade foi encontrada entre isolados provenientes da Ásia, o centro de origem do patossistema, e isolados com patogenicidade diferenciada e originários de outros hospedeiros agruparam-se distintamente.

Recentemente, JACIANI (2008) avaliou a diversidade de genes efetores T3 em isolados de Xcc e Xfa originários do Brasil por RFLP e PCR-RFLP. Observou-se a presença dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2* e XAC3090 em todos isolados de Xcc e Xfa e a ausência do gene *avrXacE2* no isolado de Xacm. Os perfis de restrição gerados por PCR-RFLP não revelaram polimorfismo nos genes amplificados e o uso de genes *avr* como sondas para RFLP mostrou-se efetiva na diferenciação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros e na identificação de relativo polimorfismo entre isolados da mesma espécie.

Como observado em outros patossistemas, a utilização de sequências de inserção como sondas de DNA para RFLP permitiu a identificação de polimorfismo

genético e a diferenciação de isolados de Xcc originários do Estado de São Paulo. A utilização das sondas correspondentes aos genes *ISxac1*, *ISxac2* e *ISxac3* é uma das técnicas de maior poder discriminante dentre as já testadas com Xcc (BELASQUE JR, 2005).

Diferentes marcadores moleculares baseados na técnica de PCR são empregados em estudos de diversidade genética de microrganismos. Entre as metodologias mais utilizadas na genotipagem de isolados de *Xanthomonas* destacam-se as PCRs baseadas na amplificação seletiva de fragmentos de DNA gerados pela digestão com enzimas de restrição (AFLP), amplificação de elementos repetitivos do genoma (rep-PCR), e mais recentemente, a amplificação de cassetes gênicos associados à integrons.

Integrons são elementos genéticos capazes de adquirir e expressar genes exógenos por um mecanismo de recombinação sítio-específica. Estruturalmente os integrons são divididos em duas regiões: uma conservada, composta pelo gene que codifica a enzima DNA integrase (*intI*) e por um sítio de recombinação (*attI*); e uma região variável que compreende uma família de elementos móveis conhecidos como cassetes gênicos, que podem ser transferidos horizontalmente entre espécies bacterianas (Figura 3). Esses cassetes são geralmente constituídos de um único gene associado a um segundo sítio de recombinação, denominado de “59-base element” (59-be) ou, mais recentemente, de *attC*. Os cassetes gênicos são capturados pelo integron por um recombinação sítio-específica entre os sítios *attI* e *attC*, mediante ação da enzima DNA integrase. Por serem desprovidos de promotores, acredita-se que a transcrição desses cassetes ocorra devido a presença de um promotor (Pc) no integron (BOUCHER et al., 2007; RECCHIA & HALL, 1995).

O perfil de amplificação desses cassetes gênicos foi recentemente utilizado para avaliar a variabilidade de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas* (BARIONOVI & SCORTICHINI, 2008; GILLINGS et al., 2005; VALVERDE et al., 2007). GILLINGS e colaboradores (2005) observam que, em geral, isolados de *Xanthomonas* pertencentes ao mesmo patovar possuem arranjos idênticos de cassetes gênicos, embora estudos com *X. axonopodis* pvs. *juglandis* e *pruni* (BARIONOVI &

SCORTICHINI, 2008) e *X. campestris* pv. *campestris* (VALVERDE et al., 2007) mostraram relativa diversidade entre isolados do mesmo patovar.

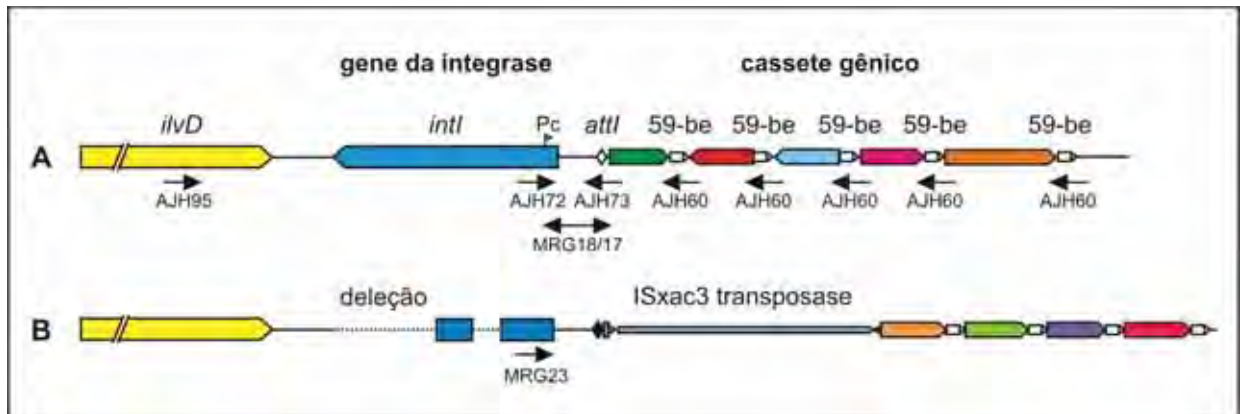


Figura 3. Ilustração esquemática de integrons de (A) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (isolado ATCC33913) e (B) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (isolado 306), e os sítios de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo (GILLINGS et al., 2005). Ambos os integrons estão localizados adjacentes ao gene *ilvD* e o cassete gênico do isolado 306 apresenta inserção de um transposon (ISxac3). Todos os iniciadores utilizados foram desenvolvidos com base em regiões conservadas dos integrons dos isolados ATCC33913 e 306 e podem ser utilizados para diversas espécies e patovares de *Xanthomonas*, com exceção do MRG23, desenvolvido a partir de sequências nucleotídicas específicas do isolado 306 (GILLINGS et al., 2005).

A tipagem de bactérias do gênero *Xanthomonas* por rep-PCR permitiu a identificação de espécies e a observação de polimorfismo genético entre isolados da mesma espécie (CUBERO & GRAHAM, 2002; LOUWS et al., 1994). A genotipagem de isolados de *Xanthomonas* patogênicos a citros por BOX e ERIC-PCR permitiu relativa caracterização de grupos genéticos e separação parcial de isolados originários de diferentes países e regiões produtoras ou com patogenicidade diferenciada (CUBERO & GRAHAM, 2002).

CAPÍTULO 2 – Diversidade Genética de Isolados Brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com Base em Genes Efetores do Sistema de Secreção Tipo III

RESUMO – Embora exista variação nos níveis de resistência ao cancro cítrico, resistência completa (ou imunidade) não é encontrada entre as cultivares de laranja doce. Plantas com resistência derivada do patógeno têm sido desenvolvidas e aplicadas em diferentes culturas para obtenção de genótipos resistentes a fitopatógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de uma coleção de isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com base em genes efetores do Tipo III (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *hpaF*, *XAC3090* e *pthA4*). Um total de 49 haplótipos foi identificado entre os 157 isolados analisados por “Southern blot”. Não foi detectado polimorfismo genético nas análises por BOX e ERIC-PCR ou com sondas de DNA dos genes *avrBs2*, *hpaF* e *XAC3090*. Os índices de diversidade genética de Nei variaram de 0,65 a 0,96 entre as sub-coleções de isolados. Um ou poucos haplótipos foram observados com maior frequência na coleção de isolados, no entanto, vários haplótipos diferentes foram representados por somente um ou por poucos isolados. A sonda *PthA4* resultou no maior número de haplótipos identificados nas sub-coleções. Maior variação na frequência de haplótipos ocorreu dentro das sub-coleções (93,7%) do que entre sub-coleções. Somente alguns haplótipos apresentaram-se geneticamente distantes de todos os outros, principalmente os originários dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Estes efetores bacterianos estão amplamente distribuídos na população do patógeno e podem ser úteis para uma melhor compreensão da interação patógeno-hospedeiro e na busca de genes de resistência ao cancro cítrico em plantas hospedeiras e não-hospedeiras.

Palavras-chave: cancro cítrico, genes *avr/pth*, interação patógeno-hospedeiro

CHAPTER 2 – Genetic Diversity of a Brazilian Strain Collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Based on the Type III Effector Protein Genes

SUMMARY – Field tolerance or resistance to citrus canker is not found in the most important commercial sweet orange cultivars, and pathogen derived resistance has been developed and applied in different crops to obtain resistant genotypes to plant pathogens. This study aimed to evaluate the genetic diversity of a Brazilian collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains based on the type III effector genes (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *hpaF*, XAC3090, and *pthA4*). A total of 49 haplotypes were identified in 157 strains by Southern blot analysis. No genetic polymorphism was detected by BOX and ERIC-PCR analysis, nor with the genes *avrBs2*, XAC3090, and *hpaF*. Nei's genetic diversity indexes varied from 0.65 to 0.96 for sub collections of the pathogen. One or few haplotypes were most frequent in the strain collection, but several haplotypes were represented by solely one or few strains. The PthA4 probe resulted in the higher number of haplotypes identified in the Brazilian sub collections. Greater variation in the frequency of haplotypes occurred within sub collections (93.7%) than among sub collections. Only some haplotypes were genetically distant from all others, especially those originated from Rio Grande do Sul and Santa Catarina states. These bacterial effectors are widely spread in the studied collections and are useful for a better understanding of the host-pathogen interaction and the search for resistance genes in host and non host plants.

Key-words: *avr/pth* genes, citrus canker, host-pathogen interaction

Introdução

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), é uma das mais importantes doenças da cultura dos citros e está presente nas principais regiões produtoras de laranja doce do mundo - São Paulo e Flórida (GOTTWALD et al., 2001; 2002). Atualmente, o Estado de São Paulo, que representa 53% da produção mundial de suco de laranja, é a única região do Brasil onde a erradicação do cancro cítrico ainda é exclusivamente praticada (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010). Medidas de controle baseadas em exclusão e erradicação são as principais estratégias utilizadas para prevenir e controlar a doença em áreas não endêmicas (GOTTWALD et al., 2001). O manejo do cancro cítrico pela combinação de variedades menos suscetíveis, pulverizações de bactericidas à base de cobre e cortinas quebra-ventos, como praticado no Sul do Brasil, é uma alternativa sustentável para a erradicação em áreas onde o agente causal está amplamente estabelecido ou tornou-se endêmico (BEHLAU et al., 2007; 2008; 2010).

Teoricamente, a melhor estratégia para o controle de doenças bacterianas de plantas é a utilização de genótipos resistentes. Embora exista ampla variação nos níveis de resistência ao cancro cítrico entre espécies, híbridos e cultivares de *Citrus*, a resistência total (ou imunidade) não é encontrada entre as principais cultivares de laranja doce utilizadas em todo o mundo (PAVAN et al., 2007). Os genótipos de Rutaceae mais resistentes são algumas tangerinas (*C. reticulata* – Ponkan e Tankan; e *C. unshiu* – Satsuma), ‘Calamondin’ (*C. mitis*) e ‘Kumquats’ (*Fortunella* spp.). No entanto, os mecanismos envolvidos na resistência à Xcc ainda são desconhecidos.

O desenvolvimento de genótipos de citros mais resistentes baseia-se principalmente em transformação genética (YANG et al., 2011). Genes exógenos de insetos ou de *Arabidopsis* introduzidos em plantas cítricas aumentaram consideravelmente a resistência ao cancro cítrico (BOSCARIOL et al., 2006; YANG et al., 2011). Por outro lado, a resistência derivada de patógenos tem sido desenvolvida e aplicada em diferentes culturas para a obtenção de genótipos resistentes a fitopatógenos (BAULCOMBE, 1996; KAREN-BETH et al., 1993). Recentemente, YANG

e colaboradores (2011) demonstraram que a introdução em citros de um gene *pthA* interrompido nos sinais de localização nuclear (NLS) foi capaz de desencadear resistência no hospedeiro contra o cancro cítrico.

Muitas bactérias fitopatogênicas possuem uma série de proteínas efetoras que são injetadas diretamente nas células da planta por um mecanismo conhecido como Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS, em inglês) (ALFANO & COLLMER, 2004; GRANT et al., 2006). As interações destes efetores com a célula vegetal podem suprimir e/ou induzir as defesas do hospedeiro dependendo da interação planta-bactéria. O genoma de Xcc é conhecido por possuir um repertório de efetores de diferentes famílias: AvrBs3/PthA, HopX (AvrPphE), PopC e AvrBs2 (DA SILVA et al., 2002). As proteínas da família AvrBs3/PthA pertencem à família de efetores TALE (“Transcricional Activator Like Effectors”) e induzem hipertrofia e hiperplasia celular (ALFANO & COLLMER, 2004). Os membros da família HopX são proteínas modulares envolvidas na avirulência e na indução de reação de hipersensibilidade (NIMCHUK et al., 2007). A família PopC é composta por membros que apresentam repetições ricas em leucina (“Leucine-Rich Repeat”, LRR). Estes efetores estão envolvidos nas interações proteína-proteína e estão presentes nas principais classes de genes de resistência (GRANT et al., 2006). A função das proteínas PopC não é bem conhecida.

Variações genéticas em bactérias podem ocorrer devido a diferentes forças evolucionárias. A interação patógeno-hospedeiro é uma delas, e pode ser expressa na bactéria como diferentes habilidades patogênicas - gama de hospedeiros, agressividade e/ou adaptabilidade. O estudo da diversidade genética de um patógeno e da sua estrutura populacional pode auxiliar na compreensão da interação planta-patógeno, fornecer subsídios no estabelecimento de hipóteses a respeito da sua história evolutiva, determinar seu potencial de adaptação a condições adversas e na definição de estratégias de controle e diagnóstico da doença (ADHIKARI et al., 1999; OCHIAI et al., 2000; RESTREPO et al., 2000; VERDIER et al., 1998). Do mesmo modo, a caracterização da estrutura genética de populações de Xcc em pequena escala espacial pode gerar informações sobre a origem de focos da doença, migração de isolados entre regiões e países, variabilidade genética e os mecanismos envolvidos na

interação *Xanthomonas*-citros. Contudo, esse tipo de estudo ainda é limitado e novas abordagens relacionadas à resistência ao cancro cítrico podem ser desenvolvidas com base nestas informações. Por esta razão, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de uma coleção de isolados brasileiros de Xcc com base em genes efetores do Tipo III (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *hpaF*, XAC3090 e *pthA4*). Para fins de comparação, a diversidade desses isolados também foi avaliada por BOX e ERIC-PCR, técnicas usualmente utilizadas em estudos de diversidade genética de patógenos bacterianos.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Um total de 157 isolados de Xcc originários de 62 municípios e sete Estados brasileiros foi utilizado no presente estudo [Mato Grosso (n=5), Mato Grosso do Sul (n=4), Paraná (n=44), Roraima (n=3), Rio Grande do Sul (n=13), Santa Catarina (n=8) e São Paulo (n=80)] (Tabela 1, Figura 1), incluindo o isolado 306 sequenciado pelo projeto Genoma/FAPESP (DA SILVA et al., 2002). Na coleção de isolados analisada estão inclusas ainda duas populações simpátricas de isolados provenientes de dois pomares de citros, ambos com longo histórico de ocorrência de cancro cítrico, localizados em Presidente Prudente/São Paulo (n=37) e Ourizona/Paraná (n=27). Os isolados analisados são, em sua maioria, procedentes de plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*) naturalmente infectadas.

Tabela 1. Ano de isolamento e origem geográfica dos 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo.

(continua)

Isolado ^a	Ano de isolamento	Município	Estado
IBSBF 1843	2003	Campo Verde	Mato Grosso
IBSBF 1860	2003	Campo Verde	Mato Grosso
IBSBF 1861	2003	Campo Verde	Mato Grosso
IBSBF 1467	1999	Cuiabá	Mato Grosso
IBSBF1775	2002	Cuiabá	Mato Grosso
IBSBF 223	1980	Bataguassu	Mato Grosso do Sul
IBSBF 1050	1994	Itaquiraí	Mato Grosso do Sul
IBSBF 1767	2002	Paranaíba	Mato Grosso do Sul
IBSBF 1768	2002	Paranaíba	Mato Grosso do Sul
IAPAR 12870	1996	Alto Paraná	Paraná
IBSBF 987	1979	Corbélia	Paraná
IAPAR 12845	1996	Cruzeiro do Sul	Paraná
FDC 121	-	Goio Erê	Paraná
IAPAR 12856	1997	Guairacá	Paraná
IAPAR 12875	1996	Marilena	Paraná
IAPAR 12858	1996	Mirador	Paraná
IAPAR 12863	1996	Nova Aliança do Ivaí	Paraná
FDC 1182	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1183	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1184	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1186	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1187	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1188	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1189	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1190	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1192	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1194	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1195	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1257	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1258	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1259	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1260	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1261	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1262	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1265	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1266	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1267	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1268	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1269	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1270	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1272	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1273	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1274	2005	Ourizona	Paraná
FDC 1275	2005	Ourizona	Paraná
IAPAR 12859	1996	Paraíso do Norte	Paraná
IAPAR 12851	1996	Paranavaí	Paraná
FDC 636	1996	Paranavaí	Paraná
IAPAR 12864	1996	Paranavaí	Paraná

Tabela 1. Ano de isolamento e origem geográfica dos 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo.

continuação

Isolado ^a	Ano de isolamento	Município	Estado
306 ^b	1997	Paranavaí	Paraná
IAPAR 12967	1997	Santa Mônica	Paraná
IAPAR 12861	1996	São Carlos do Ivaí	Paraná
IAPAR 12873	1996	São João do Caiuá	Paraná
IAPAR 8905	-	Umuarama	Paraná
IBSBF 1991	2001	Aratiba	Rio Grande do Sul
FDC 625	2001	Aratiba	Rio Grande do Sul
IBSBF 1989	2001	Bom Princípio	Rio Grande do Sul
FDC 605	2001	Bom Princípio	Rio Grande do Sul
IAPAR 12973	1999	Crissiumal	Rio Grande do Sul
IBSBF 1669	2001	Maratá	Rio Grande do Sul
IBSBF 1990	2001	Mariano Moro	Rio Grande do Sul
FDC 608	2001	Mariano Moro	Rio Grande do Sul
FDC 629	2001	Mariano Moro	Rio Grande do Sul
IAPAR 14002	2001	Montenegro	Rio Grande do Sul
IAPAR 14004	2001	Montenegro	Rio Grande do Sul
IAPAR 14006	2001	Montenegro	Rio Grande do Sul
IAPAR 12976	1993	Palmeira das Missões	Rio Grande do Sul
IBSBF 1778	2002	Boa Vista	Roraima
IBSBF 1780	2002	Boa Vista	Roraima
IBSBF 1803	2002	Boa Vista	Roraima
FDC 616	2001	Águas de Chapecó	Santa Catarina
IBSBF 1636	2001	Chapecó	Santa Catarina
IBSBF 1637	2001	Chapecó	Santa Catarina
FDC 617	2001	Chapecó	Santa Catarina
IBSBF 1992	2001	Chapecó	Santa Catarina
FDC 626	2001	Chapecó	Santa Catarina
FDC 628	2001	Chapecó	Santa Catarina
IAPAR 714	1985	São Miguel do Oeste	Santa Catarina
FDC 1227	2005	Adolfo	São Paulo
IBSBF 1580	2001	Andradina	São Paulo
IBSBF 283	1980	Araçatuba	São Paulo
IAPAR 13013	2001	Araras	São Paulo
IAPAR 12710	1999	Bebedouro	São Paulo
IAPAR 12708	1999	Cafelândia	São Paulo
IBSBF 338	1981	Cândido Mota	São Paulo
IBSBF 1421	1998	Casa Branca	São Paulo
IAPAR 12333	1988	Cosmorama	São Paulo
IAPAR 12701	1999	Descalvado	São Paulo
IAPAR 12984	2001	Echaporã	São Paulo
FDC 1279	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1280	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1281	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1282	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1283	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1284	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1285	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1287	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo

Tabela 1. Ano de isolamento e origem geográfica dos 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo.

continuação

Isolado ^a	Ano de isolamento	Município	Estado
FDC 1288	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
FDC 1289	2005	Engenheiro Coelho	São Paulo
IBSBF 349	1981	Fernando Prestes	São Paulo
IAPAR 12826	2000	Guaimbê	São Paulo
IBSBF 222	1980	Guararapes	São Paulo
IBSBF 1474	1999	Guzolândia	São Paulo
IAPAR 12714	1999	Iacanga	São Paulo
IAPAR 12969	2001	Ibitinga	São Paulo
IAPAR 12833	2001	Ibitinga	São Paulo
IAPAR 12353	1998	Jaci	São Paulo
IBSBF 1568	2001	Lins	São Paulo
IAPAR 12405	1999	Lins	São Paulo
IBSBF 1422	1998	Novo Horizonte	São Paulo
IBSBF 1509	2000	Osvaldo Cruz	São Paulo
IAPAR 13016	2001	Ourinhos	São Paulo
IBSBF 245	1980	Palmital	São Paulo
IBSBF 339	1981	Palmital	São Paulo
IAPAR 12988	2001	Platina	São Paulo
FDC 200	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 201	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 202	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 210	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 213	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 214	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 217	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 274	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 276	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 277	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 278	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 279	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 281	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 282	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 284	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 285	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 287	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 288	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 291	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 292	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 293	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 294	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 295	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 296	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 297	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 299	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 300	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 302	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 304	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 306	2001	Presidente Prudente	São Paulo

Tabela 1. Ano de isolamento e origem geográfica dos 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo.

conclusão

Isolado ^a	Ano de isolamento	Município	Estado
FDC 307	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 308	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 309	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 310	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 312	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 359	2001	Presidente Prudente	São Paulo
FDC 363	2001	Presidente Prudente	São Paulo
IBSBF 1515	2000	Presidente Prudente	São Paulo
IAPAR 13000	2001	Salto Grande	São Paulo
IBSBF 1404	1998	São João da Boa Vista	São Paulo
IAPAR 12992	2001	Tarumã	São Paulo
FDC 828	1997	Ubarana	São Paulo
IAPAR 12418	1999	Uru	São Paulo

^aIsolados provenientes de três coleções de culturas fitopatogênicas: IBSBF – Instituto Biológico de São Paulo; IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná; e FDC – Fundecitrus.

^bIsolado sequenciado pelo Projeto Genoma/FAPESP.

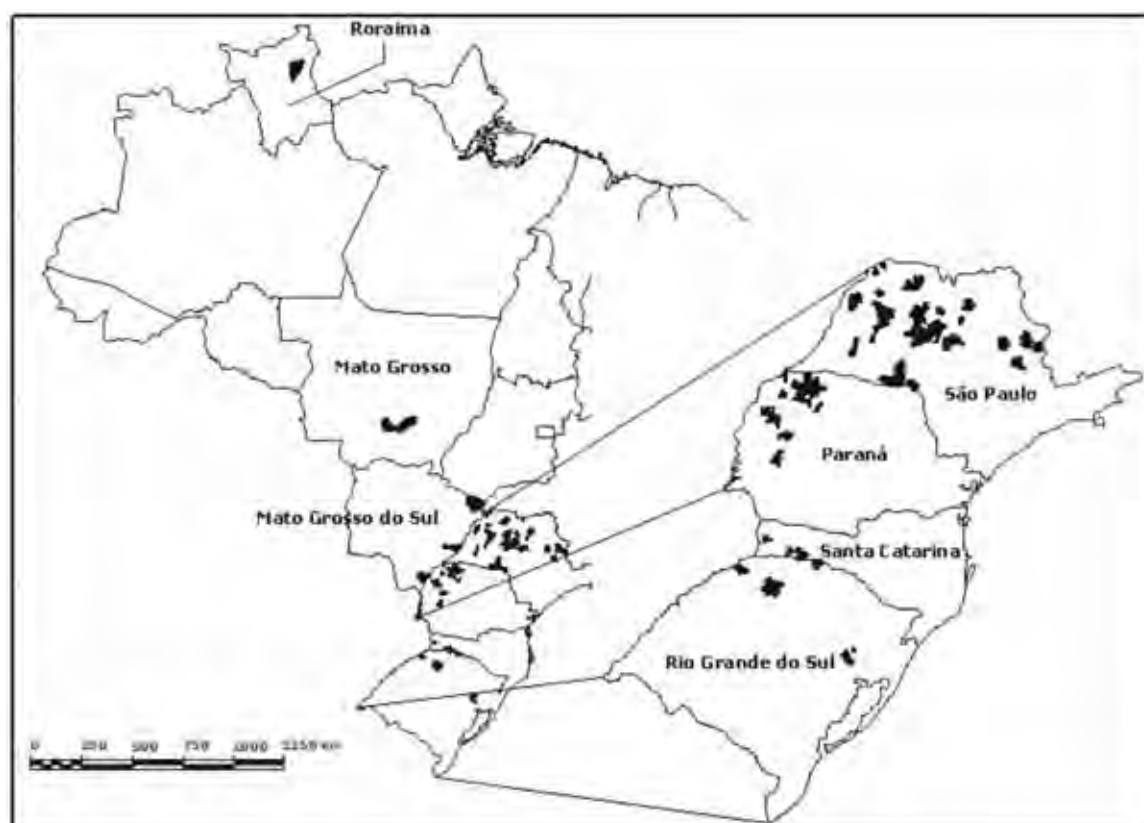


Figura 1. Localização geográfica dos municípios de origem (em preto) dos 157 isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo.

Extração de DNA genômico

Os isolados foram semeados em 4 mL de meio de cultura LP (7 g/L de extrato de levedura e 7 g/L peptona, pH 7,0) e incubados a 28°C, sob agitação de 200 rpm, por aproximadamente 16 horas. As extrações de DNA foram realizadas pelo método de CTAB (AUSUBEL et al., 1995), com algumas modificações. Após o crescimento bacteriano, as células foram precipitadas por centrifugação (4550 x *g*, 5 min, 20°C) e ressuspensas em tampão de lise contendo 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0), 30 µL de SDS 10% e 4 µL de proteinase K (10 mg/mL). Após 1 hora a 37°C, adicionou-se 100 µL de NaCl 5 M e 160 µL de CTAB 5%. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 30 minutos, acrescidas de 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas (25 min, 18000 x *g*, 20°C). Posteriormente, recuperou-se o sobrenadante e o DNA foi precipitado pela adição de 700 µL de isopropanol (-20°C). Após duas lavagens com etanol (70%), o precipitado foi seco, ressuspendido em 80 µL de tampão TE, acrescido de 1 µL de RNase A (2,5 mg/mL), e incubado a 37°C por 40 minutos. Para testar a reprodutibilidade das técnicas utilizadas foram realizadas duas extrações de DNA independentes para cada isolado.

A qualidade do DNA extraído foi averiguada por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM), corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. A concentração e a pureza das amostras obtidas foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

Construção dos iniciadores e PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes de interesse estão descritos na Tabela 2. Iniciadores específicos para os genes *avrXacE3*,

avrBs2, *hpaF* e *pthA4* foram construídos com auxílio do aplicativo Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), com base nas sequências nucleotídicas do isolado 306 (número de acesso do *GenBank*: NC_003919.1). Os iniciadores foram construídos para hibridarem nas regiões flangeadoras dos genes e gerar cópias completas das sequências alvo. As amplificações dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2* e XAC3090 (*leucine rich protein*) foram realizadas com os iniciadores descritos por JACIANI (2008).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, XAC3090 (*leucine rich protein*), *hpaF* e *pthA4*.

Gene efetor Tipo III	Locus Tag ^a	Iniciador	Sequência (5'→ 3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>avrXacE1</i>	XAC0286	AvrXacE1-F AvrXacE1-R	TGAACGATAGGCAGCTGTTC GGAGAGCGACATGGGACTAT	1251
<i>avrXacE2</i>	XAC3224	AvrXacE2-F AvrXacE2-R	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA CAGGACGGTTACGCCAGTA	1220
<i>avrXacE3</i>	XACb0011	AvrXacE3-F AvrXacE3-R	AAATGATCAGCCGCTTGG TCCATCGTCACCAACTCAAG	1222
<i>avrBs2</i>	XAC0076	AvrBs2-F AvrBs2-R	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA CAGGACGGTTACGCCAGTA	2220
<i>leucine rich</i>	XAC3090	Xac3090-F Xac3090-R	CAGCTCAGCGACATAGAACG TCGTGTTTGCCCTTTACTGA	1585
<i>hpaF</i>	XAC0393	HpaF-F HpaF-R	CATGCCTGCCGTTTAAAGT ACATCGACGATTGGCTTG	1725
<i>pthA4</i>	XACb0065	PthA4-F PthA4-R	GCGGGAGTTTATGGATGGT AGATTGCCAAGGATCTACGC	3987

^aLocus Tag do *GenBank*

As reações de amplificação com os iniciadores AvrXacE1-F/R, AvrXacE2-F/R, AvrXacE3-F/R e Xac3090-F/R foram realizadas em um volume total de 50 µL, em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 2 U (unidades) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂ (1,5 mM para AvrXacE3) e 0,5 µM de cada iniciador (Invitrogen). O programa utilizado para as amplificações foi o mesmo para todos os

pares de iniciadores e constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/3 min; seguido de 35 ciclos a 94°C/1 min, 65°C/1 min e 72°C/3 min; e um ciclo de extensão final a 72°C/10 min.

Reações de PCR com os iniciadores AvrBs2-F/R, HpaF-F/R e PthA4-F/R foram elaboradas em 50 µL (volume final) com 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion, Finnzymes), tampão da enzima 1X, 5% de DMSO (exceto para AvrBs2), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador (Invitrogen) e 50 ng de DNA genômico. As condições de amplificação com os iniciadores AvrBs2-F/R foram: 98°C/30 s; 30 ciclos a 98°C/35 s, 62°C/35 s e 72°C/45 s; e 72°C/10 min. Com os iniciadores HpaF-F/R e PthA4-F/R as condições de termociclagem foram: 98°C/30 s; 30 ciclos a 98°C/10 s, 66°C/10 s e 72°C/50 s; e 72°C/10 min.

Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

Digestão dos produtos amplificados com enzimas de restrição (PCR-RFLP)

Reações de PCR-RFLP foram realizadas com 5 µL do produto da PCR, 5 U de enzima e tampão da enzima 1X. As enzimas de restrição utilizadas foram: *EcoRI*, *EcoRII*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HincII*, *PstI*, *PvuII* e *SphI* (Invitrogen); *AluI*, *BbvI*, *PvuI* e *NspI* (New England BioLabs); *BglI* (Promega) e *CfrI*, *Clal* e *TaqI* (Fermentas). A escolha das enzimas foi realizada com ajuda do aplicativo pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>). Os perfis de restrição obtidos foram observados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

Clonagem e transformação bacteriana

Para clonagem e manipulação dos genes de interesse, os fragmentos amplificados do isolado 306 foram purificados (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) e inseridos em plasmídeo vetor (pGEM-T Easy Vector Systems, Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA recombinante (plasmídeo + inserto) foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α competentes por eletroporação (Gene Pulser II, Bio-Rad).

Após aplicação do pulso elétrico (200 Ω a 2,5 kV), que tem como objetivo desestabilizar a membrana celular permitindo a entrada do vetor na bactéria, as células foram inoculadas em 800 μ L de meio de cultura LB e incubadas a 37°C sob agitação (100 rpm) por uma hora. Posteriormente, as bactérias foram semeadas em meio LB sólido, acrescido de 50 μ g/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPTG (isopropiltiogalactosídeo) e 50 mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo), e incubadas a 37°C por 16 horas. A clonagem com o vetor pGEM-T Easy envolve a inativação do gene *lacZ'* que codifica parte da enzima β -galactosidase. A seleção dos transformantes foi realizada em meio com ampicilina e a identificação dos recombinantes pela ausência da atividade da β -galactosidase na presença de X-Gal. Colônias não-recombinantes apresentaram coloração azul, enquanto as recombinantes, incapazes de produzir β -galactosidase, ficaram brancas.

As colônias transformadas foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL), por 16 horas a 37°C, sob agitação constante (200 rpm). Extrações de DNA plasmidial foram realizadas com kit comercial (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System), seguindo as instruções do fabricante (Promega). O sucesso das clonagens foi confirmado pela clivagem do plasmídeo recombinante com a enzima *EcoRI* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os clones que apresentaram o inserto de tamanho correspondente aos genes clonados foram conservados em glicerol 20% e estocados em ultra congelador a -80°C.

“Southern blot”

Os DNAs dos clones obtidos foram utilizados como moldes em reações de PCR para amplificação dos genes de interesse para uso como sondas de DNA em “Southern blot”. As condições de amplificação e os iniciadores utilizados foram os mesmos citados anteriormente. Amostras de DNA total (10 µg) dos 157 isolados de Xcc foram clivadas com as enzimas *AccI* (Invitrogen), *AflIII* (New England BioLabs), *AvaI* (New England BioLabs) ou *BstXI* (New England BioLabs), seguindo as recomendações dos fabricantes (Tabela 3).

Tabela 3. Sondas de DNA e enzimas de restrição utilizadas nas análises de “Southern blot”.

Gene efetor Tipo III	Sonda de DNA	Enzimas de restrição
<i>avrXacE1</i>	AvrXacE1	<i>AccI</i> , <i>BstXI</i>
<i>avrXacE2</i>	AvrXacE2	<i>AvaI</i> , <i>BstXI</i>
<i>avrXacE3</i>	AvrXacE3	<i>AccI</i> , <i>BstXI</i>
<i>avrBs2</i>	AvrBs2	<i>AccI</i> , <i>BstXI</i>
XAC3090	Xac3090	<i>AccI</i> , <i>BstXI</i>
<i>hpaF</i>	HpaF	<i>AccI</i> , <i>AflIII</i>
<i>pthA4</i>	PthA4	<i>AflIII</i> , <i>AvaI</i>

Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (50 V a 22 h) e transferidos para membranas de nylon (Hybond N+, GE Healthcare) por pressão a vácuo, com equipamento apropriado (Vacuum Blotter, Bio-Rad). A marcação das sondas, a hibridização das membranas e a detecção em filmes de raio-X (Kodak) foram realizadas com o kit ECL (Direct Nucleic Acid Labeling), de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

BOX e ERIC-PCR

Análises de BOX e PCR-ERIC foram realizadas com os iniciadores BOX1R, ERIC1R e ERIC2 (CUBERO & GRAHAM, 2002; LOUWS et al., 1994). Todas as

reações foram elaboradas em um volume final de 25 µL em termociclador Eppendorf (Mastercycler), contendo 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 1 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 min; 40 ciclos a 94°C/30 s, 48°C/30 s e 72°C/1 min; e um ciclo final de 72°C/10 min. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

Os perfis genéticos identificados por “Southern blot” foram comparados quanto à ausência (0) e presença (1) de bandas. Somente bandas reproduzíveis foram consideradas positivas. Cada perfil único de sequência de bandas foi considerado como um haplótipo. Matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os dendrogramas construídos pelo método de UNJ (“unweighted neighbor joining”) (GASCUEL, 1997), através do aplicativo DarWIN 5.0 (CIRAD, Montpellier, France). O nível de confiança dos agrupamentos formados nos dendrogramas foi estimado por análise de bootstrap, utilizando o mesmo programa, com 2000 repetições.

As correlações entre as matrizes de distância foram testadas globalmente pelo coeficiente de concordância de Kendall (W), em testes de permutação (9999 permutações) pela função 'CADM.global' do pacote 'ape', do aplicativo 'R' (CAMPBELL et al., 2009). O coeficiente de Kendall (W) é uma estatística não paramétrica (não são feitas suposições sobre a distribuição de probabilidade dos valores) que avalia a congruência entre os vários sistemas de notação, com W variando de 0 (nenhum acordo) a 1 (concordância completa) (KENDALL & BABINGTON-SMITH, 1939). As matrizes de distância concordantes e discordantes no grupo foram identificadas por testes de Mantel, realizados pela função 'CADM.post' no "ape" (CAMPBELL et al., 2009). O método de correção de Holm para múltiplos testes foi aplicado à lista de P-valores produzida nos testes de Mantel *a posteriori*.

A riqueza alélica entre as coleções de isolados foi calculada pelo método de rarefação, utilizado para estimar o número de alelos entre amostras de tamanhos diferentes (KALINOWSKI, 2004). As análises foram realizadas com o programa HP-RARE versão 1.0 (KALINOWSKI, 2005), a partir dos dados de RFLP obtidos dos dois Estados brasileiros (São Paulo e Paraná) para os quais um grande número de isolados estava disponível ($n_{\min}= 44$). Foram utilizados os dados derivados das análises por “Southern blot” com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3 e PthA4.

A coleção de isolados brasileiros foi dividida em seis sub-coleções, considerando a região de origem e também as diferentes estratégias aplicadas para o controle do cancro cítrico no Brasil. Somente os Estados com mais de sete isolados foram utilizados para as análises. Seis sub-coleções foram utilizadas para as análises genéticas e foram nomeadas de acordo com o município, Estado ou região de origem. As sub-coleções ‘Santa Catarina’ e ‘Rio Grande do Sul’ foram compostas por 8 e 13 isolados, respectivamente. A sub-coleção ‘São Paulo’ foi composta de 42 isolados de 30 municípios. Também do Estado de São Paulo, mas não inclusos na sub-coleção ‘São Paulo’, 38 isolados de Presidente Prudente formaram uma população a parte com o nome do município, uma vez que todos os isolados deste município (com exceção de um) foram isolados em 2001 de 37 plantas do mesmo pomar. O mesmo raciocínio foi usado para os isolados do município de Ourizona, Estado do Paraná, que formaram uma população de 27 isolados provenientes do mesmo pomar de citros. A sub-coleção ‘Paraná’ foi composta por 17 isolados, não incluindo os isolados de Ourizona. A diversidade genética entre e em cada sub-coleção foi avaliada pelo índice de diversidade genética de Nei e por análise molecular de variância (AMOVA), ambos calculados pelo aplicativo Arlequin versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005).

Resultados

O perfil de amplificação do isolado 306 com os sete pares de iniciadores dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *AvrXacE3*, *pthA4*, *XAC3090*, *hpaF* e *avrBs2*, foi o mesmo

observado nas análises *in silico* (Figura 2). As amplificações dos fragmentos de 1251, 1220, 2220, 1725 e 1585 pb contendo os genes *avrXaE1* (1206 pb), *avrXaE2* (1071 pb), *avrBs2* (2145 pb), *hpaF* (1644 pb) e *XAC3090* (1482 pb), respectivamente, ocorreram para todos os isolados utilizados neste estudo. Somente um isolado (FDC 636) não apresentou o fragmento de 1222 pb com o gene *avrXacE3* (1143 pb) por PCR ou nas análises por “Southern blot”. Nenhuma amplificação ou amplificações de bandas inespecíficas para o gene *pthA4* (3492 pb) foram observadas em 13 isolados (IAPAR 14004 e 14006; IBSBF 1636, 1669, 1989, 1991 e 1992; e FDC 605, 616, 617, 625, 626 e 1182), e bandas de tamanhos diferentes do isolado 306 (3987 pb) ocorreram para oito isolados (IAPAR 12826, 12833 e 12967; IBSBF 1778, 1780 e 1803; e FDC 828 e 1227).

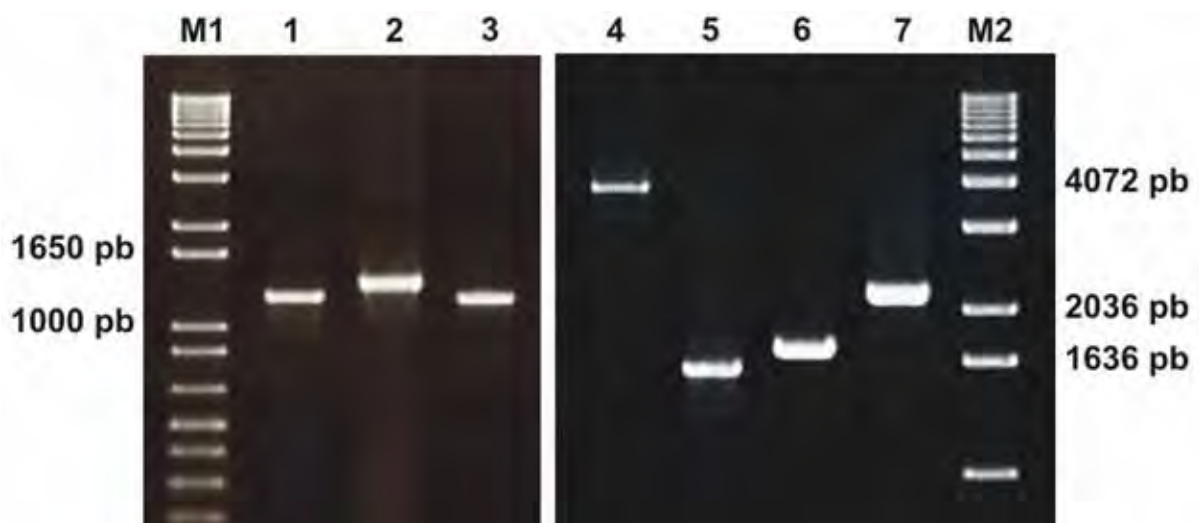


Figura 2. Perfil de amplificação por PCR de fragmentos de DNA do isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, contendo os genes (1) *avrXacE2*, (2) *avrXacE1*, (3) *avrXacE3*, (4) *pthA4*, (5) *XAC3090*, (6) *hpaF* e (7) *avrBs2*. M1: marcador de massa molecular 1 Kb (Invitrogen). M2: marcador de massa molecular 1 kb plus (Invitrogen).

Os resultados de PCR-RFLP dos produtos amplificados correspondentes aos genes *avrXacE1* (clivado com as enzimas *BglI*, *HincII*, *PstI*, *CfrI* e *NspI*), *avrXacE2* (*BglI*, *HincII*, *PstI*, *EcoRI* e *EcoRV*), *avrXacE3* (*BbvI*, *BglI*, *HaeIII*, *HincII* e *EcoRV*), *avrBs2* (*BglI*, *Clal*, *EcoRV*, *HincII* e *PstI*), *hpaF* (*HincII*, *NspI*, *PstI*, *PvuII* e *SphI*) e *XAC3090*

(*HincII*, *PstI*, *HaeIII*, *BbvI* e *PvuI*) não revelaram polimorfismo em suas sequências nucleotídicas. Todos os fragmentos amplificados e clivados para estes seis genes apresentaram perfis de restrição idênticos aos esperados pelas análises *in silico* com o isolado 306. Resultado semelhante foi observado nas análises do gene *pthA4* com a maioria dos isolados, exceção para nove isolados que apresentaram perfis diferentes do isolado 306 com as enzimas *AluI*, *NspI*, *TaqI* e *PvuI* (IAPAR 12826, 12833 e 12967; IBSBF 1778, 1780 e 1803; FDC 828, 1227 e 1273) e 13 isolados com *BglI* (IAPAR 12826, 12833 e 12967; IBSBF 1778, 1780 e 1803; FDC 306, 308, 310, 312, 828, 1227 e 1273).

Os 157 isolados analisados apresentaram o mesmo perfil genético nas análises de BOX e ERIC-PCR (Figura 3). Cinco fragmentos foram amplificados para cada isolado por BOX-PCR e 10 fragmentos por ERIC-PCR. Quarenta e nove haplótipos foram identificados nas análises por “Southern blot” com a combinação dos resultados das sete sondas. As sondas correspondentes aos genes *avrBs2*, XAC3090 e *hpaF* não revelaram polimorfismo nas comparações dos isolados (Tabela 4). As sondas *AvrXacE1*, *AvrXacE2* e *AvrXacE3* permitiram a identificação de sete, três e oito haplótipos, respectivamente. Com a sonda *PthA4* observou-se alta diversidade, com a identificação de 43 posições de bandas e 30 haplótipos. As posições das bandas relacionadas com os homólogos do *pthA* identificados no isolado sequenciado (306) foram observadas na maioria, mas não em todos os isolados de Xcc do Brasil, sugerindo variação nas sequências das regiões flangeadoras desses genes e/ou a ausência nesses isolados de alguns homólogos descritos no isolado 306.

Considerando a origem geográfica dos isolados, os Estados de São Paulo e do Paraná apresentaram as maiores diversidades haplotípicas, possivelmente em razão do maior número de isolados desses dois Estados. Considerando a combinação dos resultados de todas as sondas, nenhum haplótipo em comum foi identificado em todas as regiões estudadas (Figura 4A). O haplótipo #38 foi o mais frequente, não tendo sido identificado apenas em Santa Catarina. Por outro lado, cada sonda isoladamente permitiu a identificação de haplótipos comuns a todos os Estados, como por exemplo, o haplótipo #p1, identificado com a sonda *PthA4* (Figura 4B).

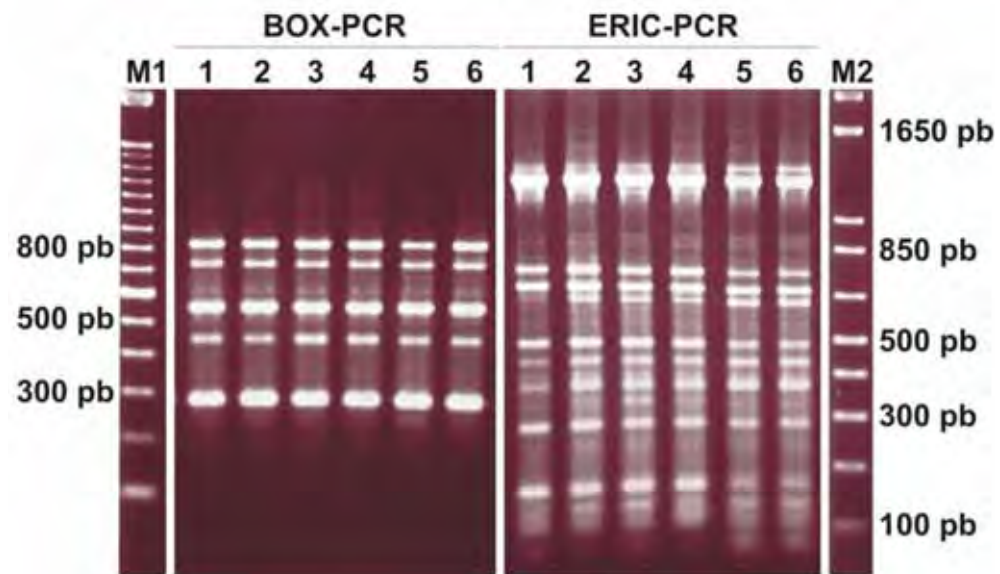


Figura 3. Padrão de amplificação de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por BOX e ERIC-PCR. Coluna (1) isolado 306, (2) IBSBF 1860, (3) IBSBF 1050, (4) FDC 605, (5) FDC 617 e (6) FDC 200. M1: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen). M2: marcador de massa molecular 1 kb *plus* (Invitrogen).

Tabela 4. Haplótipos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por “Southern blot” com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090 (*leucine rich protein*), HpaF e PthA4.

Sondas de DNA	Haplótipos ^a	Número total de haplótipos
AvrXacE1	1 (2), 2 (8), 3 (1), 4 (1), 6 (5), 7 (52) e 8 (88)	7
AvrXacE2	1 (1), 2 (90) e 3 (66)	3
AvrXacE3	1 (10), 3 (3), 4 (2), 5 (60), 6 (79), 7 (1), 8 (1) e 10 (1)	8
AvrBs2	1 (157)	1
Xac3090	1 (157)	1
HpaF	1 (157)	1
PthA4	p1 (90), p2 (1), p3 (1), p4 (2), p5 (1), p6 (1), p7 (12), p8 (2), p9 (1), p10 (1), p11 (3), p12 (1), p13 (1), p14 (1), p15 (1), p16 (1), p17 (1), p18 (11), p19 (1), p20 (1), p21 (1), p22 (2), p23 (11), p24 (1), p25 (1), p26 (2), p27 (1), p28 (2), p29 (1) e p30 (1)	30

^aOs números entre parênteses correspondem ao número total de isolados pertencente ao haplótipo relacionado.

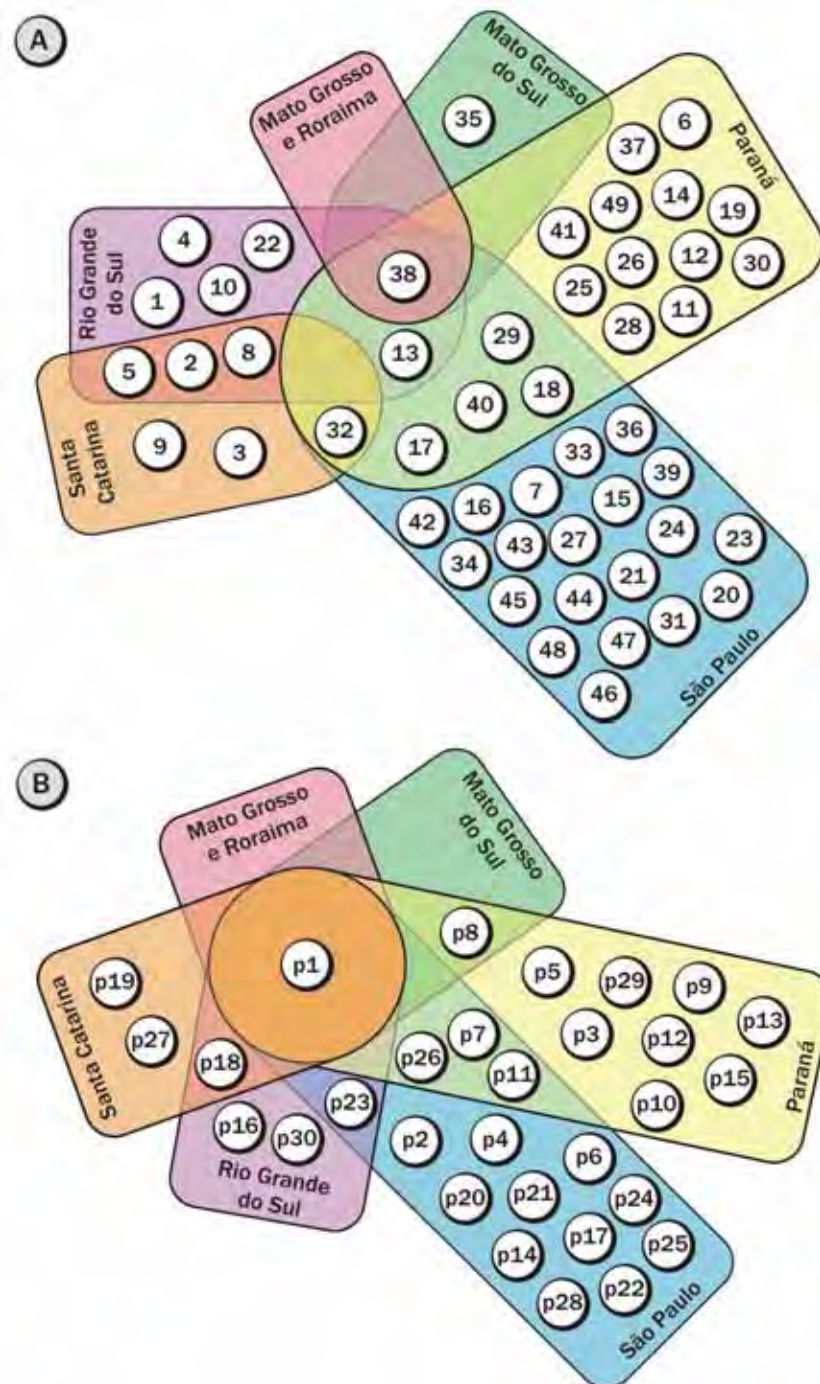


Figura 4. Diagramas de Venn ilustrando a distribuição geográfica dos haplótipos identificados entre os 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* após hibridização (“Southern blot”) com (A) sondas de DNA baseadas nos genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *XAC3090*, *hpaF* e *pthA4*, e (B) apenas com a sonda correspondente ao gene *pthA4*.

A maioria dos haplótipos identificados com as sondas *AvrXacE*/*PthA4* foram representados por apenas um ou poucos isolados por sonda. Além disso, para a maioria das sondas utilizadas, um ou dois haplótipos ocorreram com maior frequência na coleção de isolados, como os haplótipos #7 e #8 (*AvrXacE1*), #2 e #3 (*AvrXacE2*), #5 e #6 (*AvrXacE3*) e #p1 (*PthA4*) (Tabela 4). O número de cópias de cada gene identificado por “Southern blot” variou entre os isolados, exceto para *avrBs2*, *XAC3090* e *hpaF*, que apresentaram uma única cópia para cada isolado. De uma a três cópias ocorreram para *avrXacE1*, uma ou duas para *avrXacE2*, de zero a três para *avrXacE3* e de duas a cinco para *pthA* (Figura 5).

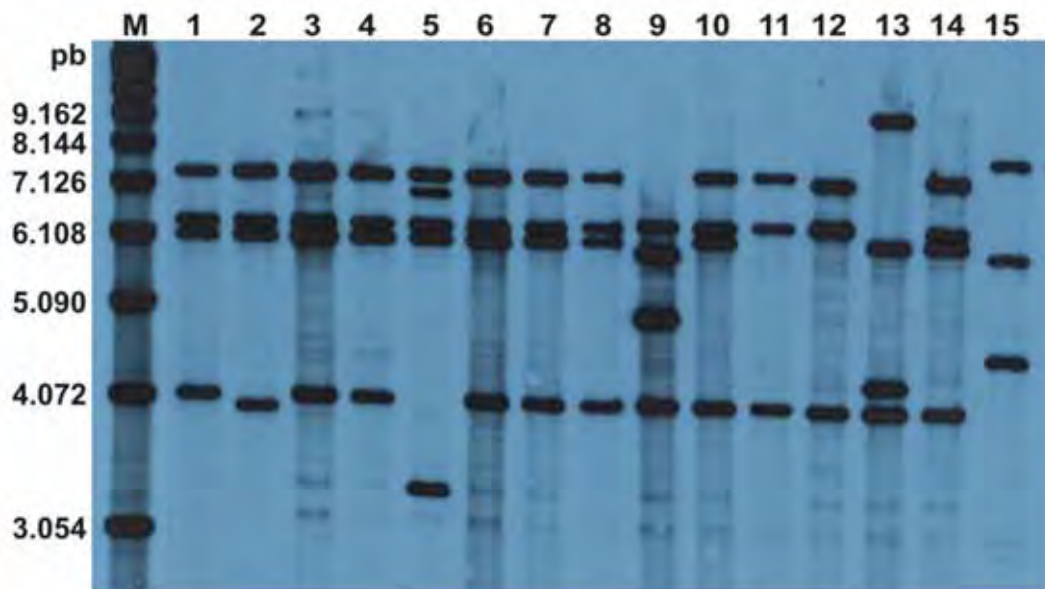


Figura 5. Perfis de hibridização por “Southern blot” com a sonda *PthA4* de isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Colunas 1 (isolado 306), 3 (IBSBF 339), 4 (IBSBF 1050), 6 (IAPAR 714), 7 (IAPAR 13016), 8 (IAPAR 12969), 10 (IAPAR 12708) e 14 (IAPAR 12701): haplótipo #p1; colunas 2 (IBSBF 222), 5 (IAPAR 12992), 9 (IAPAR 12710), 13 (IAPAR 12833) e 15 (IBSBF 1992): haplótipos #p3, #p19, #p7, #p18 e #p16, respectivamente; e colunas 11 (IAPAR 13000) e 12 (IAPAR 12714): haplótipo #p12. M: marcador de massa molecular 1 kb (Invitrogen).

Os testes de Kendall ($W=0,5171$; $p=0,0001$) indicaram uma congruência global entre os dados de RFLP derivados das quatro sondas para as quais foram observados polimorfismo (AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3 e PthA4). As comparações *a posteriori* com base nos testes de Mantel indicaram falta de correlação positiva entre os dados derivados da sonda AvrXacE2 com as demais sondas. Isto pode ser explicado pelo baixo número de haplótipos revelados com a sonda AvrXacE2. Todas as outras comparações “pairwise” entre as sondas, com base em testes de Mantel, apresentaram correlação significativa entre as distâncias dos haplótipos ($p \leq 0,0004$). Quando todos os dados foram considerados, a riqueza alélica total foi 4,29 e 4,86 para São Paulo e Paraná, respectivamente. A maioria da riqueza alélica global foi relatada nos dados provenientes da sonda PthA4 (dados não mostrados).

De seis a 17 haplótipos foram identificados nas sub-coleções ou nas populações formadas por isolados de um mesmo pomar (Tabela 5). O maior polimorfismo foi observado nas sub-coleções ‘São Paulo’ e ‘Paraná’, e o menor nas populações de Ourizona e Presidente Prudente. Os índices de diversidade genética de Nei foram relativamente altos e variaram de 0,65 (Ourizona) a 0,96 (Paraná). O número médio de diferenças entre todos os pares de haplótipos (diferenças “pairwise”) variou de 1,52 (Ourizona) a 12,62 (Rio Grande do Sul). Considerando os resultados combinados das sete sondas utilizadas, a sub-coleção ‘São Paulo’ apresentou 17 haplótipos, o maior número entre todas as coleções de isolados (Tabelas 5 e 6). Observou-se também que em todas as sub-coleções foi identificado apenas um ou poucos haplótipos com maior frequência (#13, #32 e #38) (Tabela 6).

A sonda PthA4 resultou no maior número de haplótipos identificados nas sub-coleções de isolados, especialmente em São Paulo e no Paraná (Tabela 7). Para cada sub-coleção/população foram identificados entre dois e cinco haplótipos com as sondas Avr e de dois a 12 com a sonda PthA4. Apenas em Ourizona a sonda AvrXacE3 revelou maior polimorfismo do que a sonda PthA4, considerando-se o número de haplótipos identificados. Maior variação na frequência de haplótipos ocorreu dentro das sub-coleções (93,72%) do que entre sub-coleções (6,28%). Comparações “pairwise” não revelaram diferenças entre as sub-coleções do Sul do Brasil, exceto na comparação de

Santa Catarina com Paraná (Tabela 8). As populações simpátricas, formadas por isolados originários de um mesmo pomar (Presidente Prudente e Ourizona), e a sub-coleção 'São Paulo', diferiram entre si e de todas as outras sub-coleções.

Tabela 5. Número de isolados, haplótipos, *loci* polimórficos, índices de diversidade genética de Nei e diferenças "pairwise" entre sub-coleções e populações de isolados brasileiros *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por "Southern blot" com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090 (*leucine rich protein*), HpaF e PthA4.

Coleções de isolados ^a	Número de isolados ^b	Número de haplótipos ^c	Número de <i>loci</i> polimórficos (e %) ^d	Diversidade genética (Nei) ^e	Número médio de diferenças pairwise ^f
Sub-coleções					
São Paulo	42	17	38 (54%)	0,91	5,90
Paraná	17	14	34 (49%)	0,96	7,25
Santa Catarina	8	6	26 (37%)	0,93	9,29
Rio Grande do Sul	13	9	28 (40%)	0,94	12,62
Populações simpátricas					
Presidente Prudente	38	13	16 (23%)	0,87	2,78
Ourizona	27	6	6 (9%)	0,65	1,52

^aIndicam as coleções de isolados analisadas, formadas por isolados de diferentes Estados brasileiros (sub-coleções), e também as populações formadas por isolados provenientes de um único pomar de citros dos municípios de Presidente Prudente e Ourizona.

^bNúmero total de isolados de cada sub-coleção ou população.

^cNúmero total de haplótipos identificados por "Southern blot" com as sondas correspondentes às sequências completas dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *XAC3090* (*leucine rich protein*), *hpaF* e *pthA4*.

^dNúmero de fragmentos polimórficos identificados por "Southern blot" em cada coleção ou população, e porcentagem de fragmentos polimórficos a partir do número total de fragmentos considerados.

^eÍndice de diversidade genética de Nei calculado pelo aplicativo Arlequin, versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005).

^fRepresenta o número de alelos diferentes entre dois haplótipos identificados por "Southern blot", calculado pelo aplicativo Arlequin, versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005).

Tabela 6. Número e proporção de haplótipos identificados por “Southern blot” com sondas de DNA baseadas em genes efetores do Tipo III em sub-coleções e populações simpátricas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Haplótipo ^a	Sub-coleções ^b				Populações simpátricas ^c		Todos isolados ^d
	São Paulo	Paraná	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Presidente Prudente	Ourizona	
1				2 (15.38)			2 (1.27)
2			1 (12.50)	2 (15.38)			3 (1.91)
3			1 (12.50)				1 (0.64)
4				1 (7.69)			1 (0.64)
5			2 (25.00)	1 (7.69)			3 (1.91)
6		1 (5.88)					1 (0.64)
7	1 (2.38) ^e						1 (0.64)
8			2 (25.00)	1 (7.69)			3 (1.91)
9			1 (12.50)				1 (0.64)
10				1 (7.69)			1 (0.64)
11						1 (3.70)	1 (0.64)
12		1 (5.88)					1 (0.64)
13	5 (11.90)	4 (23.53)		3 (23.08)	1 (2.63)	15 (55.56)	28 (17.83)
14		1 (5.88)					1 (0.64)
15					1 (2.63)		1 (0.64)
16					1 (2.63)		1 (0.64)
17		1 (5.88)			3 (7.89)		4 (2.55)
18	1 (2.38)	1 (5.88)					2 (1.27)
19		1 (5.88)					1 (0.64)
20	1 (2.38)						1 (0.64)
21	1 (2.38)						1 (0.64)
22				1 (7.69)			1 (0.64)
23	1 (2.38)						1 (0.64)
24	5 (11.90)						5 (3.18)
25		1 (5.88)					1 (0.64)
26		1 (5.88)					1 (0.64)
27	1 (2.38)						1 (0.64)
28		1 (5.88)					1 (0.64)
29					3 (7.89)	3 (11.11)	6 (3.82)
30		1 (5.88)					1 (0.64)
31					1 (2.63)		1 (0.64)
32	4 (9.52)		1 (12.50)		9 (23.68)	1 (3.70)	15 (9.55)
33					1 (2.63)		1 (0.64)
34					2 (5.26)		2 (1.27)
35							1 (0.64)
36	1 (2.38)						1 (0.64)
37						1 (3.70)	1 (0.64)
38	10 (23.81)			1 (7.69)	9 (23.68)	6 (22.22)	37 (23.57)
39	1 (2.38)						1 (0.64)
40		1 (5.88)			5 (13.16)		6 (3.82)
41		1 (5.88)					1 (0.64)
42	1 (2.38)						1 (0.64)
43					1 (2.63)		1 (0.64)
44	2 (4.76)						2 (1.27)
45	5 (11.90)						5 (3.18)
46	1 (2.38)						1 (0.64)
47	1 (2.38)						1 (0.64)
48					1 (2.63)		1 (0.64)
49		1 (5.88)					1 (0.64)
Número de isolados ^f	42	17	8	13	38	27	157

^aHaplótipos identificados por “Southern blot” com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090, HpaF e PthA4.

^bColeções de isolados brasileiros procedentes dos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

^cCompostas por isolados de dois pomares de citros localizados nos municípios de Presidente Prudente/SP e Ourizona/PR.

^dReferente aos 157 isolados brasileiros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estudados, incluindo os Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Roraima.

^eNúmero de isolados para cada haplótipo identificado e, entre parênteses, a porcentagem do haplótipo na sub-coleção ou população.

^fNúmero total de isolados de cada sub-coleção ou população simpátrica.

Tabela 7. Número e proporção de haplótipos identificados por “Southern blot” com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3 e PthA4 em sub-coleções e populações simpátricas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Sonda/haplótipo ^a	Sub-coleções ^b				Populações simpátricas ^c	
	São Paulo	Paraná	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Presidente Prudente	Ourizona
AvrXacE1						
1				2 (15.39)		
2			4 (50.00)	4 (30.77)		
3		1 (5.88)				
4	1 (2.38) ^d					
6			3 (37.50)	2 (15.39)		
7	15 (35.72)	11 (64.71)		4 (30.77)	6 (15.79)	16 (59.26)
8	26 (61.90)	5 (29.41)	1 (12.50)	1 (7.68)	32 (84.21)	11 (40.74)
AvrXacE2						
1		1 (5.88)				
2	18 (42.86)	13 (76.47)	6 (75.00)	10 (76.92)	22 (57.90)	20 (74.07)
3	24 (57.14)	3 (17.65)	2 (25.00)	3 (23.08)	16 (42.10)	7 (25.93)
AvrXacE3						
1			4 (50.00)	6 (46.16)		
3			2 (25.00)	1 (7.69)		
4		1 (5.88)				1 (3.70)
5	16 (38.10)	10 (58.82)		5 (38.46)	10 (26.32)	19 (70.37)
6	25 (59.52)	5 (29.42)	1 (12.50)	1 (7.69)	28 (73.68)	7 (25.93)
7	1 (2.38)					
8			1 (12.50)			
10		1 (5.88)				
PthA4						
1	21 (50.00)	5 (29.41)	1 (12.50)	4 (30.77)	22 (57.90)	26 (96.30)
2	1 (2.38)					
3		1 (5.88)				
4					2 (5.26)	
5						1 (3.70)
6					1 (2.63)	
7		2 (11.77)			10 (26.32)	
8		1 (5.88)				
9		1 (5.88)				
10		1 (5.88)				
11	2 (4.76)	1 (5.88)				
12		1 (5.88)				
13		1 (5.88)				
14	1 (2.38)					
15		1 (5.88)				
16				1 (7.69)		
17					1 (2.63)	
18			5 (62.50)	6 (46.15)		
19			1 (12.50)			
20	1 (2.38)					
21	1 (2.38)					
22	2 (4.76)					
23	10 (23.81)			1 (7.69)		
24	1 (2.38)					
25	1 (2.38)					
26	1 (2.38)	1 (5.88)				
27			1 (12.50)			
28					2 (5.26)	
29		1 (5.88)				
30				1 (7.69)		
Número de isolados ^e	42	17	8	13	38	27

^aHaplótipos identificados por “Southern blot” com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090, HpaF e PthA4.

^bColeções de isolados brasileiros originários dos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

^cCompostas por isolados de dois pomares de citros localizados nos municípios de Presidente Prudente/SP e Ourizona/PR.

^dNúmero de isolados para cada haplótipo identificado e, entre parênteses, a porcentagem do haplótipo na sub-coleção ou população.

^eNúmero total de isolados de cada sub-coleção ou população simpátrica.

Tabela 8. Valores F_{st} calculados para comparar a frequência de haplótipos nas sub-coleções e populações de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por “Southern blot” com as sondas AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090 (*leucine rich protein*), HpaF e PthA4.

Coleções de isolados	Paraná	São Paulo	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Presidente Prudente
São Paulo	0.0429 ^{*a}	-	-	-	-
Santa Catarina	0.0566 ^{**}	0.0741 [*]	-	-	-
Rio Grande do Sul	-0.0004	0.0367 [*]	0.0105	-	-
Presidente Prudente	0.0705 ^{**}	0.0314 [*]	0.0756 [*]	0.0756 ^{**}	-
Ourizona	0.0837 [*]	0.1099 ^{**}	0.2360 ^{**}	0.0840 [*]	0.1634 ^{**}

^aOs valores de F_{st} foram calculados por Análises de Variância Molecular (AMOVA) com o aplicativo Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005). * indica $P=0.05$ e **indica $P=0.01$ para cada comparação.

Embora um número relativamente elevado de haplótipos foi identificado na coleção de isolados brasileiros de Xcc, com os resultados combinados das sete sondas, apenas alguns haplótipos mostraram-se geneticamente distantes de todos os outros, especialmente aqueles originários do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, conforme observado na Figura 6. Valores de bootstrap acima de 70 foram observados apenas nos braços formados por nove haplótipos (#1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 22), cada um deles representados por apenas um a três isolados, originários de São Paulo (#7), Rio Grande do Sul (#1, 2, 4, 5, 8 e 22) e Santa Catarina (#2, 3, 5, 8 e 9). Padrão de ramificação semelhante para esses Estados foi observado com a sonda PthA4 (Figura 7).

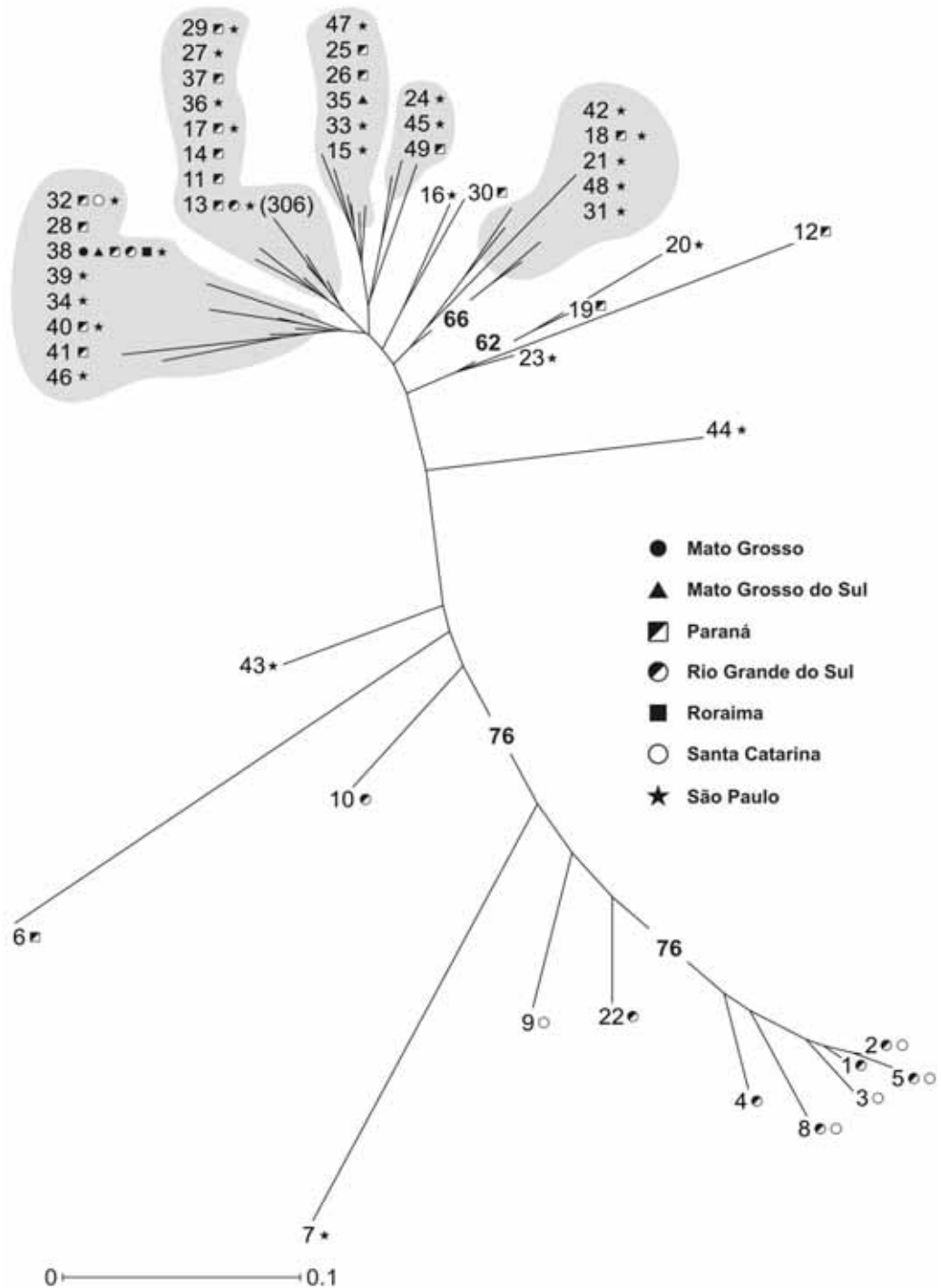


Figura 6. Dendrograma construído pelo método de “unweighted neighbor-joining” (DarWIN 5.0; CIRAD, Montpellier, France) ilustrando a diversidade genética de 49 haplótipos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por “Southern blot” com sondas de DNA baseadas em genes efetores do Tipo III.

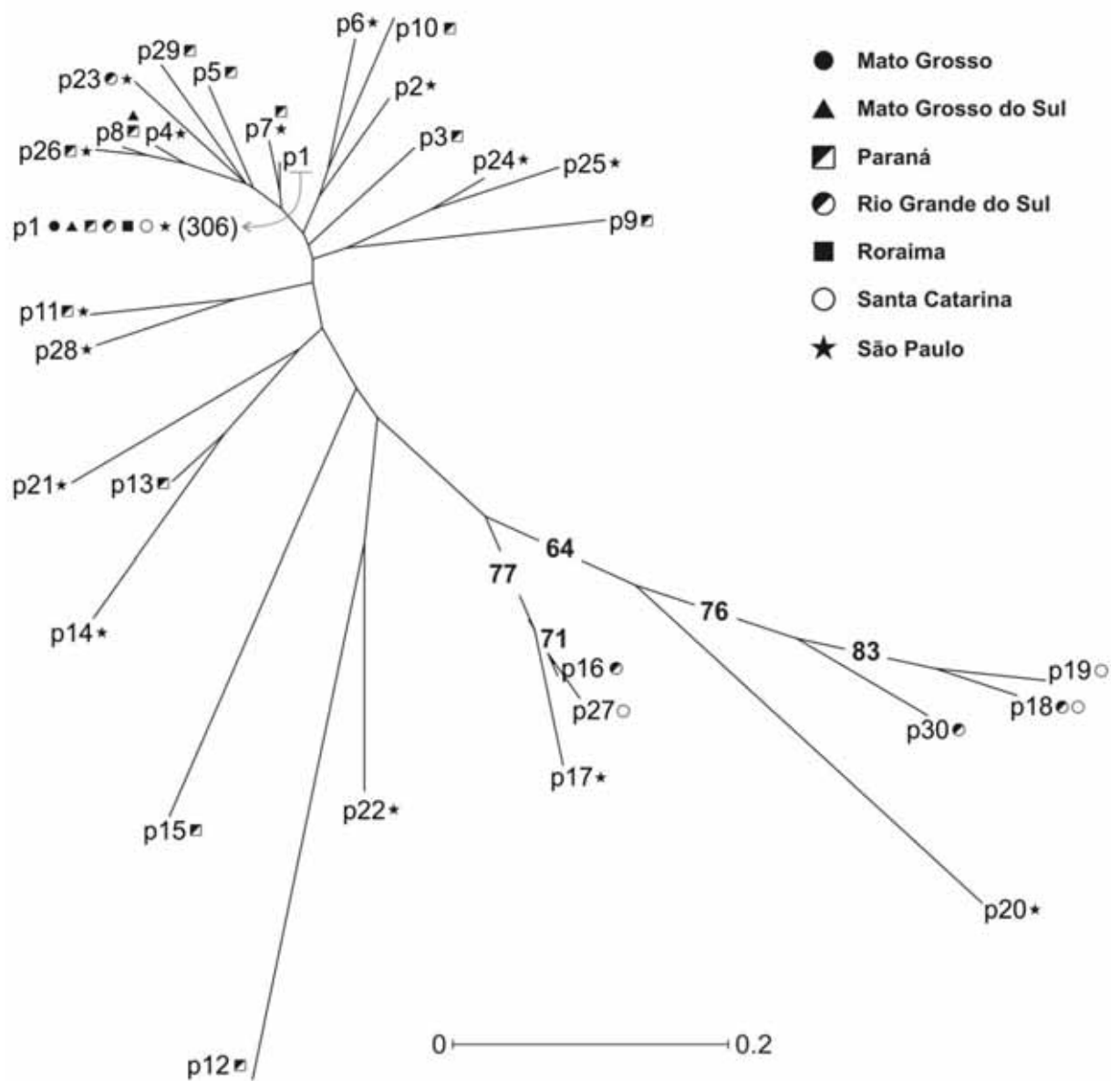


Figura 7. Dendrograma construído pelo método de “unweighted neighbor-joining” (DarWIN 5.0; CIRAD, Montpellier, France) ilustrando a diversidade genética de 30 haplótipos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identificados por “Southern blot” com a sonda de DNA baseada no gene *pthA4*.

Discussão

Os Estados de São Paulo e da região Sul do Brasil abrigam as principais áreas produtoras de citros do Brasil. Essas regiões são afetadas pelo cancro cítrico há várias décadas e adotam diferentes medidas para controlar e prevenir a disseminação da doença. No Estado de São Paulo, onde foi registrada a primeira ocorrência de cancro cítrico no país, em 1957, o controle é realizado pela erradicação dos focos da doença (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010; BEHLAU et al., 2008; 2009). Nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, o manejo da doença, praticado há quase três décadas, envolve basicamente o uso de genótipos menos suscetíveis, cortinas quebra-ventos e pulverizações com bactericidas cúpricos, não sendo obrigatória a eliminação das plantas doentes. No entanto, um programa nacional de erradicação foi adotado por estes Estados durante alguns anos após o primeiro relato da doença. A primeira constatação de cancro cítrico no Paraná foi em 1957 e no Rio Grande do Sul e Santa Catarina na década de 1980 (BEHLAU et al., 2008; 2010).

Teoricamente, os métodos de erradicação reduzem drasticamente o tempo de interação entre o patógeno e o hospedeiro, enquanto o manejo integrado da doença permite períodos mais extensos dessa interação. No entanto, uma relativa diversidade genética foi encontrada entre todos os isolados analisados, independentemente da estratégia utilizada para o controle do cancro cítrico. Entre 1999 e 2010 o método de controle do cancro cítrico adotado no Estado de São Paulo manteve a incidência da doença abaixo de 0,45%, sendo que mais de 99,9% das plantas de laranja doce dos pomares paulistas não estavam infectadas com Xcc nesse período (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010). O cancro cítrico é endêmico nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde desde os anos 90 não são realizadas oficialmente erradicações de plantas e pomares infectados. Apesar dos baixos níveis da doença em São Paulo, a riqueza alélica, calculada a partir das análises por “Southern blot” dos isolados provenientes de São Paulo (onde a erradicação ainda é realizada) e Paraná (onde é praticado o manejo integrado), apresentou valores semelhantes. Os isolados

originários de São Paulo e Paraná foram coletados no período de 1980-2005 e 1979-2005, respectivamente.

O maior polimorfismo genético foi observado nas análises com a sonda PthA4, que permitiu a identificação de 30 haplótipos, os quais diferiram no número de homólogos e tamanho dos fragmentos de hibridização. Em todos os isolados analisados observou-se a presença de pelo menos dois homólogos do *pthA* e 133 isolados apresentaram uma cópia do gene *pthA4*, identificada através da similaridade do fragmento (tamanho) com o isolado 306. A região central do gene *pthA4*, rica em leucina e formada por 17,5 repetições de 102 pb, arranjadas *in tandem*, é essencial para a bactéria causar o cancro cítrico (AL-SAADI et al., 2007). Além disso, essa região é conhecida como um sítio ativo para crossing-over desigual e recombinação homóloga (PETES & HILL, 1988).

Os quatro homólogos do *pthA* do isolado 306 estão localizados em plasmídeos (DA SILVA et al., 2002). Assim, a diversidade genética observada ocorre, provavelmente, devido à variação no número e posição relativa dos genes *avr/pthA* no genoma de Xcc, aos rearranjos de plasmídeos por transferência horizontal e à recombinação dentro e fora das sequências repetidas da região central dos genes *pthA*. Curiosamente, apenas poucos haplótipos ocorreram em frequências mais elevadas em cada sub-coleção com as sondas AvrXacE/PthA4 e parecem ser todos geneticamente semelhantes entre si e com a maioria dos haplótipos (Figuras 6 e 7). No entanto, a frequência da maioria dos haplótipos geneticamente distantes foi baixa e estes haplótipos são provenientes quase que exclusivamente do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sugerindo que isolados com origens diferentes podem ter sido introduzidos nestes Estados.

A coleção de 157 isolados de Xcc analisada no presente estudo é composta por duas populações simpátricas com 37 e 27 isolados coletados no mesmo momento em cada um dos dois pomares de citros localizados, respectivamente, em Presidente Prudente, São Paulo em 2001, e Ourizona, Paraná em 2005. As técnicas aqui descritas permitiram identificar 19 haplótipos nessas duas populações (13 em Presidente Prudente e 6 em Ourizona), uma quantidade inesperadamente alta de diversidade.

Baseado nas análises por “Southern blot” e PCR-RFLP com o gene *pthA4*, seis e dois haplótipos foram identificados em Presidente Prudente e Ourizona, respectivamente. Os índices de diversidade genética de Nei para estas populações foram de 0,87 e 0,65, respectivamente, quando considerado os resultados combinados. No entanto, estas duas populações apresentaram os menores valores de *loci* polimórficos e diferenças “pairwise” entre os haplótipos em comparação com as coleções compostas pelos demais isolados desses Estados.

Estas duas áreas foram infectadas naturalmente por Xcc, tendo permanecido infestadas pelo patógeno por pelo menos duas décadas, e, portanto, compartilharam uma história relativamente longa de epidemia da doença. As plantas de Ourizona estavam localizadas em um pomar comercial, enquanto em Presidente Prudente o pomar pertencia a uma estação experimental que foi utilizada para estudos de epidemiologia do cancro cítrico sob ocorrência endêmica simulada. Esta estação experimental foi inaugurada no início dos anos 80 e as primeiras árvores de citros, plantadas logo em seguida, foram submetidas a uma única inoculação de Xcc, em 1982. Todas as outras árvores cítricas plantadas posteriormente na estação foram infectadas “naturalmente”. Assim, a hipótese é que a alta diversidade genética observada entre os isolados de Xcc de ambos os pomares é reflexo da história relativamente longa da doença nessas áreas.

Embora tenham sido identificados 49 haplótipos entre os 157 isolados de Xcc, os resultados aqui apresentados revelaram pequena distância genética entre quase todos os haplótipos, especialmente aqueles identificados em cada sub-coleção ou população, e baixos valores de bootstrap nos dendrogramas formados. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para avaliar a diversidade genética de Xcc com base em marcadores moleculares neutros (CUBERO & GRAHAM, 2002; LI et al, 2007; BUI THI NGOC et al, 2008; 2010). Relativo polimorfismo foi observado recentemente em coleções mundiais de Xcc utilizando rep-PCR (CUBERO & GRAHAM, 2002), LM-PCR com sequências de inserção (BUI THI NGOC et al., 2008), AFLP e “Multi Locus Variable number of tandem repeats Analysis” (MLVA) (BUI THI NGOC et al., 2009; 2010). Comparativamente, as análises dos genes efetores utilizados no presente trabalho foram úteis para a

identificação de variabilidade entre os isolados de Xcc originários de regiões geográficas próximas e revelaram a presença constante de genes *avr/pth* na população do patógeno.

No Brasil, Xcc foi detectada pela primeira vez no final de 1950, em São Paulo e no Paraná, na década de 1980 na maioria dos Estados do sul e somente em 2003 em Roraima. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os haplótipos #13, #32 e #38 estão relativamente dispersos no Brasil. A ocorrência de haplótipos idênticos em regiões brasileiras distantes pode ser explicada pelo transporte de material vegetal infectado. Além disso, várias introduções independentes de Xcc podem ter ocorrido ao longo do tempo, como ocorrido na Flórida, Estados Unidos (GRAHAM et al., 2004). A população de Xcc no Brasil originou-se, provavelmente, de um ou poucos isolados introduzidos em São Paulo na década de 1950 ou anteriormente. Imediatamente após a primeira detecção oficial do cancro cítrico em São Paulo, Xcc também foi detectada nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul. Provavelmente, as populações de Xcc de São Paulo e Paraná foram originadas por uma mesma linhagem genotípica.

No entanto, as populações do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Estados onde Xcc foi detectada anos mais tarde, podem ter sido formadas ou influenciadas por introduções posteriores do patógeno. A geografia e a relativa proximidade dos Estados do Sul, especialmente Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com países vizinhos com ocorrência endêmica do cancro cítrico na América do Sul (Argentina, Paraguai e Uruguai), pode ter facilitado a troca de material vegetal infectado, que por sua vez, levou ao estabelecimento de populações relativamente diversas de Xcc. Esta hipótese pode explicar a maior diversidade observada entre as sub-coleções do Rio Grande do Sul/Santa Catarina com as demais sub-coleções brasileiras. Uma ampla caracterização genética de isolados de Xcc de países sul-americanos empregando-se diferentes metodologias, como feito recentemente com isolados da Ásia (BUI THI NGOC et al., 2009), é necessária para melhor entender a estrutura genética deste patógeno no continente Sul Americano.

A identificação dos componentes da interação gene-a-gene e sua associação com fenótipos bem definidos (suscetível ou resistente) permite o estabelecimento de

estratégias para a implantação de genes selecionados em diferentes variedades como fontes de resistência (ADHIKARI et al., 1995). Os genes *avr* utilizados no presente estudo provavelmente não estão diretamente envolvidos na indução dos sintomas do cancro, como o *pthA* da família AvrBs3/PthA (SWARUP et al., 1991). Como demonstrado por AL-SAADY e colaboradores (2007), o gene *pthA* é essencial para a indução do cancro cítrico, mas não para a variação da gama de hospedeiros. No entanto, YANG e colaboradores (2011) demonstraram que a interrupção dos sinais de localização nuclear (NLS) de genes *pthA* induziu resistência do hospedeiro contra o cancro cítrico. Efetores do Tipo III são transportados para a célula hospedeira e interferem nas respostas de defesa. Exceto para o *pthA*, o fenótipo da interação envolvendo o efetores bacterianos utilizados como sondas de DNA no presente trabalho com o hospedeiro não é conhecido. Como demonstrado, os efetores bacterianos das famílias AvrBs3/PthA, HopX (AvrPphE), PopC e AvrBs2 estão amplamente distribuídos na coleção Xcc, indicando a sua eventual participação na interação patógeno-hospedeiro. Genes essenciais para a patogenicidade e interação com o hospedeiro são alvos candidatos na busca de genes de resistência correspondentes em plantas hospedeiras e não hospedeiras e na geração de plantas com resistência durável e eficaz (LEACH & WHITE, 1996).

A inesperada alta diversidade do *pthA* observada em São Paulo pode ser explicada por pelo menos duas hipóteses, não-exclusivas, que seriam dependentes do modo primário de propagação de Xcc neste Estado. A dispersão da bactéria por atividades humanas, como por exemplo, poda, colheita e pulverizações, implicaria na ocorrência de múltiplos eventos de migração do patógeno ao longo dos anos. Por outro lado, a disseminação sob condições naturais, principalmente pela ação de chuvas associadas com ventos, a partir de focos não detectados ou parcialmente erradicados, implicaria em uma relativa proximidade para transferência de plasmídeos entre isolados e/ou reorganização genética dos efetores da família TALE ou das regiões flangeadoras desses genes. Esta questão deve ser mais estudada e um sistema de monitoramento mais abrangente de complexos clonais, com a combinação de métodos de genotipagem em larga escala, como o MLVA ("Multi Locus Variable number tandem

repeat Analysis”) e a tipagem de genes TALE, seria de interesse para uma melhor compreensão da epidemiologia de Xcc.

Conclusões

As análises dos genes efetores utilizados no presente estudo foram úteis na identificação de variabilidade entre os isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) originários de regiões geográficas brasileiras e revelaram a presença constante de genes *avr/pth* na população do patógeno.

Todos os isolados de Xcc analisados apresentaram, por PCR ou “Southern blot”, ao menos uma cópia dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *hpaF*, XAC3090 e *pthA*, com exceção do isolado FDC 636 que não apresentou o gene *avrXacE3*.

Não foi detectado polimorfismo genético nas análises por PCR-RFLP (exceto para o gene *pthA4*), BOX e ERIC-PCR ou com as sondas de DNA correspondentes aos genes *avrBs2*, *hpaF* e XAC3090. Maior polimorfismo genético foi observado nas análises com a sonda PthA4.

Uma relativa diversidade genética foi encontrada entre todos os isolados analisados, independentemente da estratégia utilizada para o controle do cancro cítrico no Brasil. Contudo, apenas alguns haplótipos mostraram-se geneticamente distantes de todos os outros, especialmente aqueles originários do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Considerando a origem geográfica dos isolados, os Estados de São Paulo e do Paraná apresentaram as maiores diversidades haplotípicas, possivelmente em razão do maior número de isolados desses dois Estados.

CAPÍTULO 3 – Caracterização Patogênica e Genética de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

RESUMO – As bactérias *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) são responsáveis pelo cancro cítrico, uma das principais doenças da cultura dos citros, e pelas cancroses tipos B e C, respectivamente. Do ponto de vista econômico, Xfa apresenta menor importância que Xcc em razão de sua restrita localização geográfica, baixa agressividade e limitada gama de hospedeiros. Em razão dessas diferenças entre Xcc e Xfa, estudos mais detalhados desses patógenos podem ser úteis para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação *Xanthomonas*-citros. Neste sentido, o presente trabalho objetivou a caracterização patogênica e genética de isolados de Xfa-B e Xfa-C. Observou-se pequena agressividade dos isolados de Xfa-B e grande variação na patogenicidade de Xfa-C. Os isolados de Xfa-C produtores de pigmento escuro em meio de cultura foram menos agressivos que os isolados não produtores. Análises das sequências parciais do gene *lrp* e da região ITS 16S-23S permitiram distinguir as três espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros e os isolados dos tipos B e C de Xfa. A comparação de sequências do gene *gyrB* revelaram sequências idênticas entre todos os isolados de Xfa e alta similaridade desse patógeno com espécies de *Xanthomonas* patogênicas a outros hospedeiros (*X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pvs. *anacardii*, *dieffenbachiae*, *rhynchosiae*, *sesbaniae* e *vignicola*). As técnicas de AFLP, BOX e ERIC-PCR permitiram a diferenciação dos tipos B e C de Xfa, e relativa diversidade entre isolados do mesmo patótipo. Amplificações por ERIC-PCR e de cassetes gênicos associados à integrons permitiram distinguir os isolados de Xfa-C de acordo com a capacidade de produção de pigmento.

Palavras-chave: cancro cítrico, cancroses dos citros, interação patógeno-hospedeiro

CHAPTER 3 – Pathogenic and Genetic Characterization of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

SUMMARY – *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) and *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) cause citrus canker, a serious disease of citrus crops, and the canker types B and C, respectively. From an economic standpoint, Xfa has less importance than Xcc due to its restricted geographical location, low aggressiveness and limited host range. The reason for these limitations is still unknown and further studies on this pathogen may be useful for better understanding of the mechanisms involved in the *Xanthomonas*-citrus interaction. In this sense, this study aimed to characterize genetic and pathogenic of Xfa-B and Xfa-C strains. In the pathogenic tests carried out Xfa-B presented a very limited pathogenicity, weaker than Xfa-C. Strains of this last pathotype presented a relatively high degree of pathogenicity variation, and those Xfa-C strains producers of dark pigment on culture medium were less pathogen than those not producers. Analyses of partial *lrp* gene and 16S-23S ITS region sequences to distinguish the three species of *Xanthomonas* pathogenic to citrus and Xfa-B and Xfa-C strains. Comparison of *gyrB* gene sequences shared 100% relatedness among all strains of Xfa analyzed and high similarity this pathogen with *Xanthomonas* species pathogenic to other hosts. DNA fingerprint analysis by AFLP, BOX and ERIC-PCR allowed differentiation of types B and C of Xfa with relative diversity among strains of the same pathotype. ERIC-PCR and amplification of integron gene cassette arrays allowed to distinguish strains of Xfa-C according to the capacity to produce pigment.

Key-words: canker, citrus canker, host-pathogen interaction

Introdução

O cancro cítrico é considerado em todo o mundo como uma das principais ameaças ao agronegócio citrícola. Afeta todas as variedades cítricas de importância comercial, tais como laranjas (*Citrus sinensis*), limões (*C. limon*) e tangerinas (*C. reticulata*), além de plantas de outros gêneros da família Rutaceae. Os prejuízos econômicos causados pela presença do cancro cítrico são decorrentes, principalmente, do fato de se tratar de uma doença de difícil manejo e que apresenta como únicos métodos eficientes de controle a eliminação das plantas doentes e das suspeitas de infecção, em áreas indenes, e o manejo integrado, em áreas endêmicas. Além disso, o comércio mundial impõe restrições à importação de cítricos originários de áreas infestadas pela doença (STALL & CIVEROLO, 1991; STALL & SEYMOUR, 1983).

Existem três tipos de cancro cítrico, ou cancroses, descritos na literatura (tipos A, B e C), causados por duas espécies filogeneticamente distintas de bactérias do gênero *Xanthomonas* (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). A forma asiática do cancro cítrico (tipo A), causada por *X. citri* subsp. *citri* (Xcc), é a mais disseminada, com maior número de espécies hospedeiras e, conseqüentemente, de maior importância econômica. É a mais agressiva dentre as doenças incitadas por *Xanthomonas* em citros. Os tipos B e C, causados por *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa), estão restritos à América do Sul e possuem limitada faixa de hospedeiros. O tipo B foi descrito na Argentina, Paraguai e Uruguai e é mais agressivo a limões verdadeiros e limas ácidas. Restrito ao Estado de São Paulo, o tipo C foi descrito como patogênico somente a lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*), e mais recentemente, também relatado em plantas de citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) no campo (JACIANI et al., 2009; NAMEKATA, 1971). Alguns isolados de Xfa-C têm como característica a produção de pigmento escuro quando cultivados em meio de cultura artificial (DESTÉFANO & RODRIGUES NETO, 2001; SCHAAD et al., 2006). A mancha bacteriana dos citros, causada por *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), é conhecida como uma distinta forma de cancro cítrico encontrada em viveiros de citros da Flórida, Estados Unidos.

Os sintomas causados por Xcc e Xfa em hospedeiros suscetíveis são muito similares e constituem-se em lesões circulares, salientes, de coloração amarronzada, aspecto eruptivo e, geralmente, circundadas por um halo amarelo característico (BRUNINGS & GABRIEL, 2003). Alguns desses sintomas são atribuídos aos fenômenos de divisão (hipertrofia) e alargamento celular (hiperplasia), que ocorrem no tecido vegetal após a infecção, ocasionados por proteínas efetoras da família *avrBs3/pthA* (SWARUP et al., 1992). Os sintomas apresentados pela mancha bacteriana dos citros diferem dos do cancro cítrico por serem completamente achatadas (não erumpentes) e com anasarca geralmente indefinida (GRAHAM & GOTTWALD, 1988; SCHOULTIES et al., 1987).

O estudo da estrutura genética de um patógeno, assim como de suas características patogênicas, pode fornecer subsídios quanto sua história evolutiva, interação com o hospedeiro, patogenicidade e na definição de estratégias de controle. Recentemente foi divulgado o sequenciamento genômico de dois isolados de Xfa (tipos B e C) (MOREIRA et al., 2010). A comparação com o genoma de Xcc e de outras espécies de *Xanthomonas* possibilitou a identificação de inúmeras semelhanças e diferenças entre esses patógenos. No entanto, os mecanismos envolvidos na interação *Xanthomonas*-citros ainda são relativamente desconhecidos. Não são conhecidas, por exemplo, as razões pelas quais apenas um pequeno número de hospedeiros é suscetível à Xfa, assim como pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de Xcc. Desta forma, estudos mais detalhados sobre a biologia de Xfa, incluindo os mecanismos que regem sua interação com hospedeiros e não hospedeiros, podem servir de modelo para elaboração de hipóteses relacionadas à patogenicidade de Xcc e identificação de possíveis alvos para o controle desse fitopatógeno. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização genética e patogênica de isolados de Xfa-B e Xfa-C.

Material e Métodos

Linhagens bacterianas

Vinte e nove linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros foram utilizadas no presente estudo, sendo 20 de Xfa-C, quatro de Xfa-B, quatro de Xcc e uma de Xacm (Tabela 1). Entre as linhagens de Xfa-C, 10 são produtoras (PP) e 10 não são produtoras (NP) de pigmento escuro em meio de cultura artificial. Estão inclusos nesta lista os isolados de Xcc (306), Xfa-B (11122) e Xfa-C (10535) que tiveram seus genomas sequenciados (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010).

Caracterização patogênica

Preparo do inóculo e material vegetal

Os 29 isolados foram cultivados em meio de cultura LPGa (contendo por litro, 7g de extrato de levedura, 7g de peptona, 7g de glicose e 16g de ágar, pH 7,0) por aproximadamente 48–72 horas a 28°C. Posteriormente, suspensões bacterianas foram preparadas em água deionizada estéril e as respectivas concentrações ajustadas para aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias por mL⁻¹ (UFC/mL) em espectrofotômetro (0,3 de absorbância a 600 nm).

As plantas utilizadas para caracterização patogênica foram cultivadas durante todo o experimento em casa de vegetação em vasos de 20 litros contendo terra e substrato orgânico (1:1). Aproximadamente 40 dias antes das inoculações, as plantas foram podadas para obtenção de folhas homogêneas e imaturas (entre 75 e 100% da completa expansão foliar) (VILORIA et al., 2004).

Tabela 1. Espécie, ano de isolamento, hospedeiro e origem geográfica das 29 linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros utilizadas no presente estudo.

Espécie	Isolado ^a	Ano de isolamento	Hospedeiro	Município	Estado	País
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B	1561 (IBSBF 409)	1981	<i>C. limon</i>	-	-	Argentina
	1565 (IBSBF 1583)	1990	<i>C. limon</i>	-	-	Argentina
	1566 (IBSBF 1610)	-	<i>C. aurantifolia</i>	-	-	-
	11122 ^c	-	<i>C. limon</i>	-	-	Argentina
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C Produtora de pigmento ^c	535 (IBSBF 1479)	2000	<i>C. aurantifolia</i>	José Bonifácio	São Paulo	Brasil
	536 (IBSBF 1473)	1999	<i>C. aurantifolia</i>	Santa Rita do Oeste	São Paulo	Brasil
	537 (IBSBF 1481)	2000	<i>C. aurantifolia</i>	José Bonifácio	São Paulo	Brasil
	725 (IBSBF 1472)	1999	<i>C. aurantifolia</i>	Santa Rita D'Oeste	São Paulo	Brasil
	751 (IBSBF 1496)	2000	<i>C. aurantifolia</i>	Mesópolis	São Paulo	Brasil
	766 (IBSBF 1497)	2000	<i>C. aurantifolia</i>	Mesópolis	São Paulo	Brasil
	791 (IBSBF 1495)	2000	<i>C. aurantifolia</i>	Mesópolis	São Paulo	Brasil
	1560 (IBSBF 392)	1981	-	-	-	-
	1609	2009	<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Severínia	São Paulo	Brasil
	1630	2009	<i>C. aurantifolia</i>	Três Fronteiras	São Paulo	Brasil
	578 (IBSBF 1683)	2001	<i>C. aurantifolia</i>	Promissão	São Paulo	Brasil
	752 (IBSBF 434)	2002	<i>C. aurantifolia</i>	Ibirá	São Paulo	Brasil
	763 (IBSBF 382)	1981	<i>C. aurantifolia</i>	Américo de Campos	São Paulo	Brasil
	867 (IBSBF 417)	2002	<i>C. aurantifolia</i>	Votuporanga	São Paulo	Brasil
	1558 (IBSBF 380)	1981	<i>C. aurantifolia</i>	Américo de Campos	São Paulo	Brasil
	1559 (IBSBF 381)	1981	<i>C. aurantifolia</i>	Américo de Campos	São Paulo	Brasil
	1563 (IBSBF 1353)	1997	<i>C. aurantifolia</i>	Ubarana	São Paulo	Brasil
	1564 (IBSBF 1382)	1997	<i>C. aurantifolia</i>	Barbosa	São Paulo	Brasil
	1568	-	-	-	-	-
	10535 ^b	1981	<i>C. aurantifolia</i>	-	São Paulo	Brasil
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	306 ^b	1997	<i>C. sinensis</i>	Paranavaí	Paraná	Brasil
	636 (IAPAR 12853)	1996	<i>C. sinensis</i>	Paranavaí	Paraná	Brasil
	828 (IBSBF 1350)	1997	<i>C. aurantifolia</i>	Ubarana	São Paulo	Brasil
	1567	-	-	-	-	-
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	1510 (IBSBF 1925)	1989	<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	-	Flórida	Estados Unidos

^aIsolados pertencentes à Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Fundecitrus (FDC, Araraquara/São Paulo). Os números entre parênteses representam o código original do isolado (IBSBF – Instituto Biológico de São Paulo; IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná).

^bIsolados que tiveram seus genomas sequenciados (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010). Neste caso, a numeração do isolado é a mesma utilizada nas referidas publicações, e não representam, necessariamente, o código original do isolado.

^cLinhagens produtoras de pigmento escuro em meio de cultura artificial.

Testes de patogenicidade

Os isolados foram inoculados em folhas de citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), limão 'Cravo' (*C. limonia*), limão 'Siciliano' (*C. limon*), limas ácidas 'Tahiti' (*C. latifolia*) e 'Galego' (*C. aurantifolia*), tangerinas 'Ponkan', 'Cravo' (*C. reticulata*) e 'Cleópatra' (*C. reshni*), laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*) e pomelo 'Grapefruit' (*C. paradisi*). Água deionizada estéril foi utilizada como controle.

Para realização dos testes foram empregados dois métodos de inoculação: i) ferimento do limbo foliar com agulhas imersas nas suspensões bacterianas, e (ii) infiltração das suspensões bacterianas diretamente no mesófilo foliar. Neste caso, realizava-se um único furo com uma agulha, e a suspensão era injetada no tecido vegetal com auxílio de seringas hipodérmicas. A patogenicidade dos isolados que não incitaram sintomas nítidos de infecção foi confirmada por exames microscópicos de porções do material vegetal infectado, na qual a presença do patógeno foi observada pela exsudação de aglomerados bacterianos do tecido vegetal para o meio líquido (corrida bacteriana), e reisolamento do patógeno em meio de cultura NA (28°C, 48–72 horas).

Avaliação da agressividade

Dois isolados de: a) Xfa-C PP (FDC 535 e 537); b) Xfa-C NP (FDC 867 e 1559); e c) Xcc (306 e FDC 828), foram inoculados em plantas de lima ácida 'Galego' para avaliar a agressividade dos mesmos. Inoculações apenas com água deionizada estéril foram utilizadas como controle. As inoculações foram realizadas por perfuração do limbo foliar com agulhas de 0,55 mm de diâmetro imersas nas suspensões bacterianas. Para cada isolado foram inoculadas três folhas, com aproximadamente cinco perfurações por folha. Dois experimentos foram realizados para garantir a confiabilidade dos resultados.

As avaliações dos diâmetros das lesões de cancro cítrico foram feitas com auxílio de um micrômetro aos 39, 68, 81, 95 e 112 dias após a inoculação (DAI), no primeiro experimento, e aos 32, 61, 74, 88 e 105 DAI no segundo. Em cada avaliação, para cada um dos isolados inoculados, mensurou-se o diâmetro de seis lesões, escolhidas aleatoriamente, com posterior cálculo das médias. A presença de halo amarelo ao redor da necrose, quando existente, foi desconsiderada nas avaliações.

Avaliação da população bacteriana

Os mesmos isolados utilizados na avaliação de agressividade (306, FDC 535, 537, 828, 867 e 1559) foram submetidos a novas inoculações em lima ácida 'Galego', para avaliação do crescimento celular bacteriano no tecido vegetal, após a infecção. As inoculações consistiram de perfuração do limbo foliar com agulhas de 0,55 mm de diâmetro imersas nas suspensões bacterianas. Para cada isolado foram inoculadas cinco folhas, com oito perfurações por folha, sendo quatro de cada lado da nervura central. Em cada avaliação (aos 0, 1, 4, 8, 11, 14 e 18 DAI), com um cortador de aproximadamente 1 cm de diâmetro, foram retirados, aleatoriamente, quatro discos foliares contendo o sítio de inoculação, conforme observado na Figura 1. Imediatamente, o tecido vegetal foi macerado em 1 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e plaqueado em meio de cultura NA (contendo por litro, 3g de extrato de carne, 5g de peptona, 5g de NaCl e 15g de ágar, pH 7,0) com auxílio de um plaqueador automático em espiral (Autoplate 4000, Spiral Biotech). Após 72 horas a 28°C procedeu-se a contagem do número de colônias típicas de *Xanthomonas*.



Figura 1. Porções de tecido vegetal retiradas de folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, para avaliação do crescimento celular bacteriano após a infecção.

Caracterização genética

Extração de DNA e PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

Extrações de DNA foram realizadas pelo método de CTAB (AUSUBEL et al., 1995), com modificações. Para cada isolado analisado foram realizadas duas extrações de DNA independentes para garantir a reprodutibilidade das técnicas utilizadas. Reações de PCR para amplificação parcial dos genes *lrp* (“leucine-responsive regulatory protein”) e *gyrB* (subunidade β da girase do DNA) e da região intergênica 16S-23S foram realizadas em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler, de acordo com os protocolos descritos abaixo.

Para amplificação do gene *lrp* utilizou-se os iniciadores *J-lrp6b* e *J-lrp5* (CUBERO & GRAHAM, 2004). As reações de PCR (50 μ L) continham 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,5 mM de dNTPs, 2,0 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as

amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 min; seguido de 40 ciclos a 94°C/1 min, 64°C/1 min e 72°C/1 min; e um ciclo de extensão final a 72°C/10 min.

O gene *gyrB* foi amplificado com os iniciadores descritos por Ah-You e colaboradores (2009). As PCRs foram preparadas em reações de 50 µL (volume final) com 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion, Finnzymes), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador e 50 ng de DNA genômico. Os parâmetros utilizados para as amplificações foram: 98°C/30 s; 35 ciclos a 98°C/10 s, 68°C/15 s e 72°C/15 s; e 72°C/10 min.

Reações de PCR para amplificação da região intergênica 16S-23S foram conduzidas com os iniciadores 1493f e 23r (LI & DE BOER, 1995). As reações foram elaboradas em um volume final de 50 µL, com 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,1 mM de dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. As condições para amplificação foram: 94°C/3 min; 35 ciclos a 94°C/1min, 62°C/45 s e 72°C/90 s; e 72°C/5 min.

Clonagem e Sequenciamento

Os “amplicons” gerados nas PCRs foram analisados em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL), e visualizados em luz ultravioleta. Posteriormente, foram purificados (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) e clonados em plasmídeo vetor (PGEM-T Easy Vector Systems), de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). Os sequenciamentos foram conduzidos em equipamento capilar automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) com os iniciadores T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-TATTTAGGTGACA CTATAG-3'), flanqueadores ao sítio de clonagem do vetor.

Os cromatogramas obtidos foram analisados no aplicativo CodonCode Aligner versão 3.7.1 e as sequências comparadas pelo algoritmo ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Sequências do gene *gyrB*, obtidas do *GenBank*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de *X. fuscans* subsp. *fuscans* [isolado LMG 7511 (número de acesso: EU015378.1)] e *X. axonopodis* pvs. *anacardii* [CFBP 2913 (EU015357.1) e LA 100 (EU015358.1)], *dieffenbachiae* [LMG 7399 (EU015332.1)], *rhynchosiae* [LMG 8021 (EU015381.1)], *sesbaniae* [LMG 867 (EU015382.1)] e *vignicola* [LMG 8139 (EU015383.1)] foram utilizadas como referência (“outgroup”). Análises filogenéticas foram realizadas pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood), baseado no modelo de Tamura-Nei (1993), através do aplicativo MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A confiança dos agrupamentos formados foi estimada pelo mesmo programa por bootstrap com 2000 repetições.

“DNA fingerprinting”

AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)

As análises de AFLP foram realizadas de acordo com VOS e colaboradores (1995), com pequenas modificações. O protocolo utilizado constituiu-se em quatro etapas:

(a) Digestão enzimática: 250 ng do DNA genômico de cada isolado foi clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI* (Invitrogen). As reações de digestão foram realizadas em um volume final de 50 µL, seguindo as instruções do fabricante.

(b) Ligação de adaptadores: adaptadores específicos (complementares às extremidades resultantes da clivagem) foram ligados aos fragmentos de DNA com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Para tanto, foram utilizados 0,5 µM dos adaptadores *EcoRI*-1 e *EcoRI*-2, 5 µM dos adaptadores *MseI*-1 e *MseI*-2, 0,5 U da enzima e tampão da enzima 10X, em reações de 10 µL, adicionando-se em seguida o DNA digerido (50 µL). As amostras foram incubadas por 4 horas a 37°C.

(c) Amplificações via PCR: Pré-amplificações não seletivas foram elaboradas em reações de 25 µL (volume final) com 0,2 µM dos iniciadores E00 (5'-GACTG

CGTACCAATTC-3') e M00 (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,06 mM de dNTPs, 1,6 mM MgCl₂ e 5 µL da reação digestão/ligação diluída 10X. Os parâmetros utilizados para as pré-amplificações foram os seguintes: 94°C/2 min; 35 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/30 s e 72°C/1 min; e 72°C/10 min. Amplificações seletivas foram realizadas em um volume final de 30 µL com 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM dos iniciadores E12 (5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3') ou E21 (5'-GACTGCGTACCAATTCGG-3'), 1.2 µM do iniciador M16 (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') e 5 µL do produto da PCR não-seletiva diluído 20X. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial a 94°C/2 min; seguido de duas etapas de termociclagem (15 ciclos a 94°C/30 s, 65°C/30 s e 72°C/30 s; e 25 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/30 s e 72°C/1 min); e um ciclo final a 72°C/10 min.

(d) Eletroforese: A separação e visualização dos fragmentos amplificados ocorreram por eletroforese em cuba vertical (Sequi-Gen GT System, Bio-Rad) com gel desnaturante de poliácridamida (6%) e coloração à base de nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

BOX e ERIC-PCR

As reações de BOX e ERIC-PCR foram realizadas com os iniciadores BOX1R, ERIC1R e ERIC2 (CUBERO & GRAHAM, 2002; LOUWS et al., 1994). As reações foram elaboradas em um volume final de 25 µL, contendo 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 1 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 min; 40 ciclos a 94°C/30 s, 48°C/30 s e 72°C/1 min; e um ciclo final de 72°C/10 min. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

Os perfis genéticos identificados por AFLP, BOX e ERIC-PCR foram comparados quanto à ausência (0) e presença (1) de bandas. As matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os dendrogramas construídos pelo método “unweighted neighbor-joining” (GASCUEL, 1997) no aplicativo DarWIN 5.0. O nível de confiança dos agrupamentos formados foi calculado por análise de bootstrap utilizando o mesmo programa (2000 repetições).

Integrans

Para averiguar a presença de integrans nos isolados analisados e o perfil de amplificação de cassetes gênicos associados a esses integrans, reações de PCR foram elaboradas com os iniciadores descritos por GILLINGS e colaboradores (2005). A presença de integrans foi investigada com os pares de iniciadores MRG18/ AJH72, complementares, respectivamente, aos genes *intl* e *attI*, localizados no integron, e AJH73/AJH95, específicos dos genes *intl* e *ilvD* (localizado adjacente ao integron), respectivamente. Nas reações de PCR com estes dois pares de iniciadores é esperada a amplificação de fragmentos de 300 e 1700 pb, respectivamente. O perfil de amplificação de cassetes gênicos foi observado após amplificação com os iniciadores MRG17 (*attI*) ou MRG23 (*intl*) e AJH60 (complementar ao sítio de recombinação *attC* do cassete gênico). Com estes iniciadores é esperada a amplificação de várias bandas de diferentes tamanhos.

Todas as amplificações foram realizadas em um volume final de 50 µL com 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM MgCl₂ (1,8 mM para MRG23/AJH60), 0,5 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. Os parâmetros utilizados para as amplificações foram: 94°C/3 min; 35 ciclos a 94°C/45 s, 57°C/45 s (62°C para MRG23/AJH60 e 65°C para AJH72/ MRG18) e

72°C/2 min; e 72°C/10 min. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

Resultados

Caracterização patogênica

Patogenicidade

Todos os isolados utilizados no presente estudo provocaram algum tipo de sintoma em pelo menos um dos dez genótipos de citros testados, com pelo menos um dos métodos de inoculação, com exceção do isolado FDC 1564 de Xfa-C. Esse isolado não se apresentou patogênico para qualquer um dos genótipos testados. Os sintomas decorrentes das inoculações por perfurações com agulhas imersas nas suspensões bacterianas estão apresentados na Tabela 2.

Nos testes realizados com perfurações com agulhas imersas nas suspensões bacterianas observou-se limitada patogenicidade dos isolados de Xfa-B (Tabela 2). Os isolados 11122 e FDC 1565 não foram patogênicos para qualquer dos genótipos testados e os sintomas provocados pelo isolado FDC 1561 em lima ácida 'Galego' e tangerina 'Ponkan', e pelo isolado FDC 1566 em pomelo 'Grapefruit', constituíram-se em pequenas lesões esparsas sobre o sítio de inoculação (Figura 2). Em relação aos isolados de Xfa-B, somente o FDC 1566 apresentou-se patogênico em citrumelo 'Swingle'.

Tabela 2. Resultados dos testes de patogenicidade realizados em genótipos de citros por perfurações com agulhas imersas em suspensões bacterianas de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros.

Patótipo ^a	Isolado	Citrumelo 'Swingle'	Laranja 'Hamlin'	Lima ácida		Limão		Pomelo 'Grapefruit'	Tangerina		
				'Galego'	'Tahiti'	'Cravo'	'Siciliano'		'Cleópatra'	'Cravo'	'Ponkan'
Xfa-B	1561	- ^b	-	±	-	-	-	-	-	-	±
	1565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1566	+ ^d	-	-	-	-	-	±	-	-	-
	11122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xfa-C PP	535	+	±	++	-	-	-	-	-	±	±
	536	+	±	+	-	-	-	-	-	±	±
	537	+	±	++	-	-	-	-	-	±	±
	725	+	±	++	-	-	-	-	-	±	±
	751	+	±	+	-	-	-	-	-	±	±
	766	+	±	±	-	-	-	-	-	±	±
	791	+	±	±	-	-	-	-	-	±	±
	1560	± ^c	±	±	-	-	-	-	-	±	±
	1609	+	±	+	-	-	-	-	-	±	-
	1630	-	±	+	-	-	-	-	-	±	±
Xfa-C NP	578	+	±	++	-	-	-	-	-	±	±
	752	++ ^e	±	++	-	-	-	-	-	+	±
	763	++	±	+++	±	-	±	±	±	+	±
	867	++	±	+	±	-	-	-	±	±	±
	1558	±	±	±	-	-	-	-	-	-	±
	1559	++	±	+++	±	-	±	±	±	++	+
	1563	++	±	+++	-	-	-	±	-	±	±
	1564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1568	++	±	++	±	-	+	-	+	+	+
	10535	+	±	±	-	-	-	-	±	±	±
Xcc	306	+++ ^f	++	+++	++	+++	+	++	+	++	++
	636	+	++	+	±	+	±	+	±	±	+
	828	+++ ^g	+++ ^h	+++	±	+++	+	+++	±	+++	+++
	1567	+++	+++	+++	++	+++	++	+	++	+++	++
Xacm	1510	+++	-	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-

^aPatótipos de *Xanthomonas* patogênicos aos citros: Xfa-B (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B), Xfa-C (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C) produtor (PP) e não produtor (NP) de pigmento escuro em meio de cultura artificial, Xcc (*X. citri* subsp. *citri*) e Xacm (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*).

^b- isolado não patogênico: ausência de lesão;

^c ± isolado com patogenicidade duvidosa: provoca pequenas lesões, não definidas, esparsas ao redor do sítio de inoculação;

^d+ isolado patogênico, pouco agressivo: provoca lesões levemente salientes sem anasarca e halo amarelo;

^e++ isolado patogênico, moderadamente agressivo: provoca lesão levemente saliente e, em alguns casos, circundada por anasarca e halo amarelo;

^f+++ isolado patogênico, altamente agressivo: provoca lesão saliente, de aspecto eruptivo e, em alguns casos, circundada por anasarca e halo amarelo;

^gla provoca lesão achatada, sem saliência.

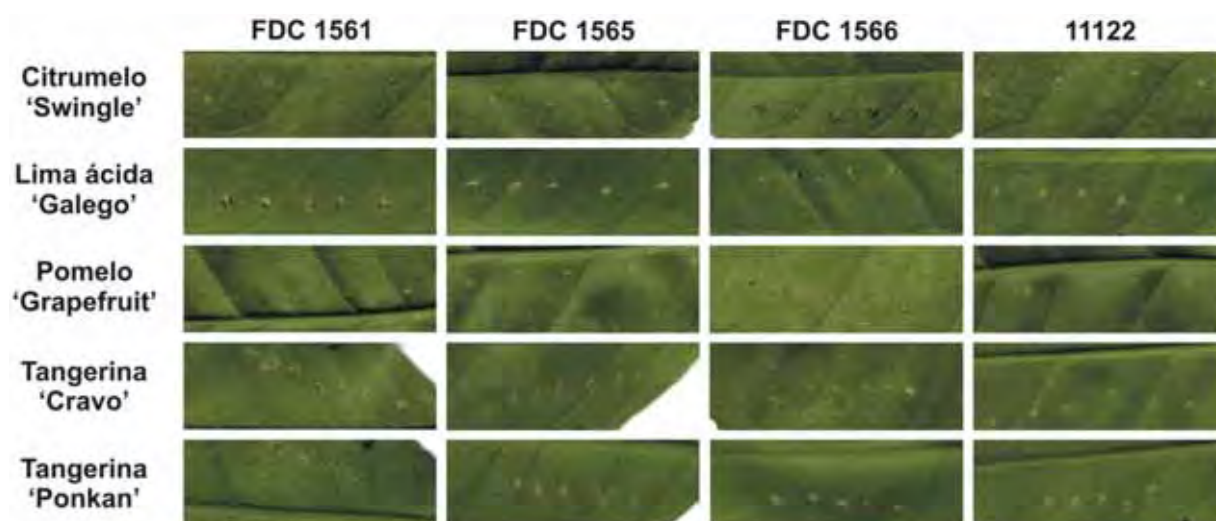


Figura 2. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B.

Os isolados de Xfa-C PP inoculados com agulhas imersas nas suspensões bacterianas, em sua maioria, provocaram lesões salientes, típicas de cancrose, em lima ácida 'Galego' e citrumelo 'Swingle', e apresentaram patogenicidade duvidosa, caracterizada por pequenas lesões não características de cancrose, em laranja 'Hamlin' e tangerinas 'Cravo' e 'Ponkan' (Figura 3). Resultados semelhantes foram observados para os isolados de Xfa-C NP (Figura 4). No entanto, alguns isolados deste patótipo também foram patogênicos para o limão 'Siciliano' (FDC 1568) e para as tangerinas 'Cleópatra' (FDC 1568), 'Cravo' (FDC 752, 763, 1559 e 1568) e 'Ponkan' (FDC 1559 e 1568), e apresentaram patogenicidade duvidosa para lima ácida 'Tahiti' (FDC 763, 867, 1559 e 1568), limão 'Siciliano' (FDC 763 e 1559), pomelo 'Grapefruit' (FDC 763, 1559 e 1563) e tangerina 'Cleópatra' (10535, FDC 763, 867 e 1559). Como observado na Tabela 2, os isolados NP foram mais agressivos que os isolados PP em lima ácida 'Galego' e citrumelo 'Swingle'.

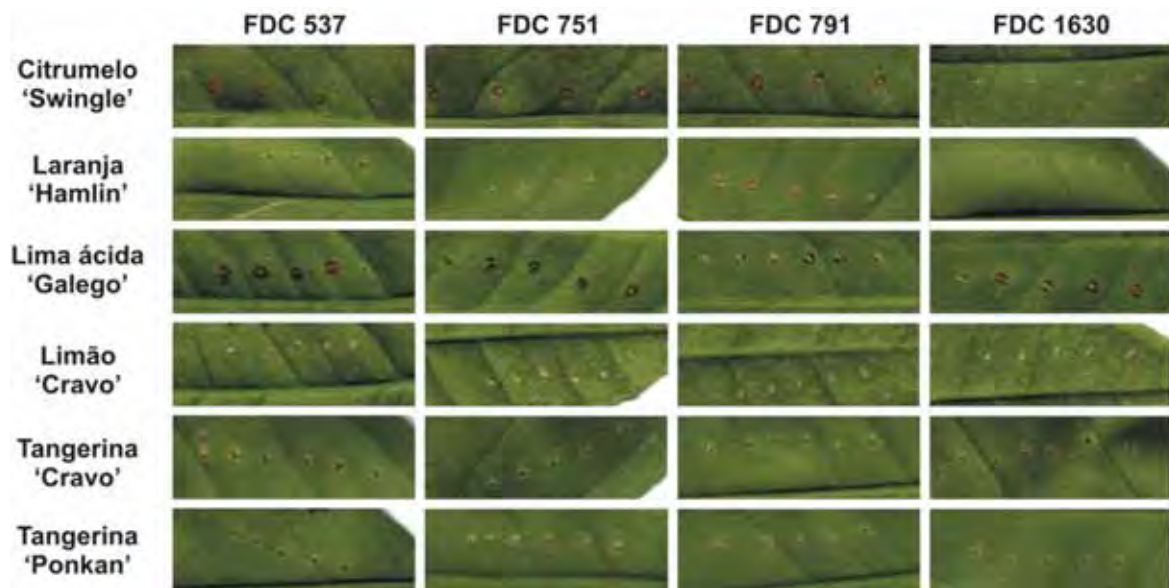


Figura 3. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* produtores de pigmento escuro em meio de cultura artificial.

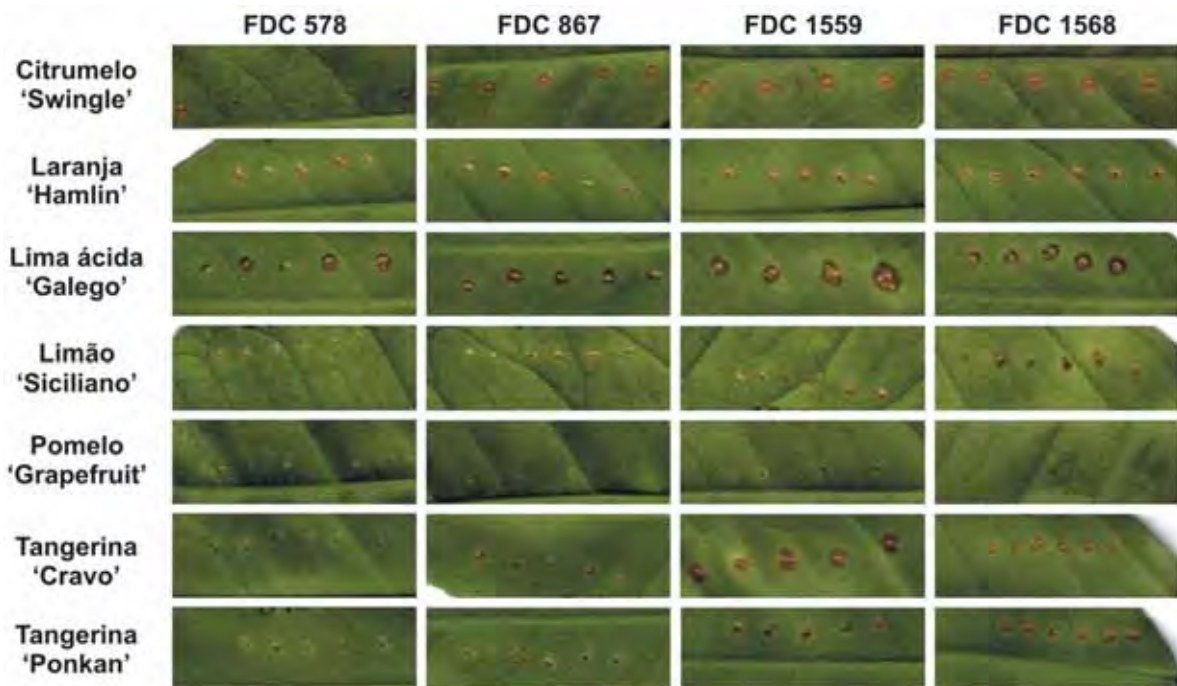


Figura 4. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* não produtores de pigmento escuro em meio de cultura artificial.

Os isolados 306 e 1567 de Xcc foram patogênicos para todos os genótipos de citros testados. Os sintomas provocados por estes isolados, quando inoculados por ferimento com agulhas, caracterizaram-se por lesões erumpentes e algumas vezes circundadas por anasarca e halo amarelo (Figura 5). O isolado FDC 636 foi menos agressivo que os demais isolados de Xcc analisados. Este isolado causou sintomas em todos os genótipos testados, exceto quando inoculado em lima ácida 'Tahiti', limão 'Siciliano' e tangerinas 'Cleópatra' e 'Cravo', nos quais sua patogenicidade não ficou evidente. Entretanto, foi possível reisolar o patógeno desses genótipos quatro semanas após a inoculação. O isolado FDC 828 apresentou sintomatologia atípica, caracterizada por lesões achatadas (lisas em ambas as faces) com o centro necrótico na maioria dos genótipos e apresentou patogenicidade duvidosa em lima ácida 'Tahiti' e tangerina 'Cleópatra'. O isolado FDC 1510 de Xacm provocou sintomas típicos da mancha bacteriana em limão e tangerina 'Cravo', limas ácidas 'Galego' e 'Tahiti' e citrumelo 'Swingle' (resultados não apresentados).

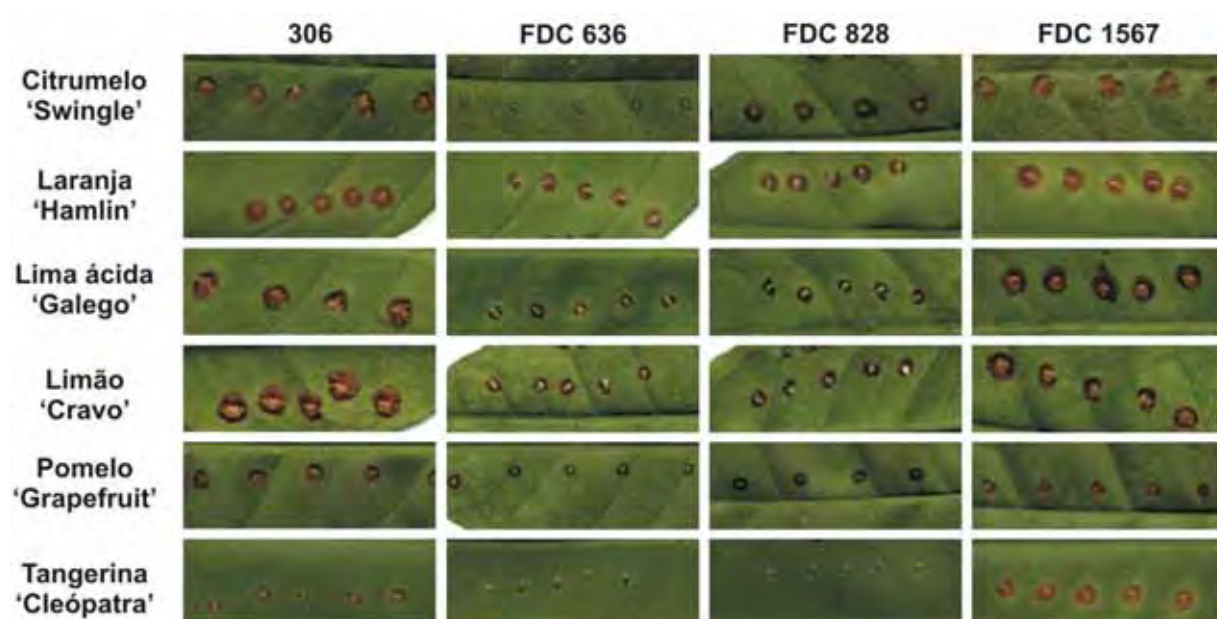


Figura 5. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Os testes realizados por infiltração das suspensões bacterianas demonstraram grande variação na patogenicidade dos isolados analisados (Figura 6). Os isolados de Xfa-B apresentaram baixa agressividade. O isolado FDC 1561 não infectou qualquer dos genótipos testados, e os sintomas causados pelos isolados FDC 1565, em lima ácida 'Galego', FDC 1566, em lima ácida 'Galego' e citrumelo 'Swingle', e 11122 em limão 'Cravo' e tangerina 'Cravo', caracterizaram-se por pequenas lesões ao redor do sítio de inoculação ou nas margens do tecido encharcado.

De modo geral, os isolados de Xfa-C inoculados por infiltração infectaram citrumelo 'Swingle', lima ácida 'Galego', limão 'Cravo' e tangerina 'Cravo', e provocaram, aparentemente, reação de hipersensibilidade em tangerina 'Ponkan'. Nenhuma reação foi observada em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Tahiti', e para os demais genótipos testados (limão 'Siciliano', pomelo 'Grapefruit' e tangerina 'Cleópatra') observou-se uma fraca reação do hospedeiro, sem características de infecção. No entanto, alguns isolados NP demonstraram patogenicidade diferenciada dos demais isolados de Xfa-C. Além de infectarem citrumelo 'Swingle', lima ácida 'Galego', limão 'Cravo' e tangerina 'Cravo', os isolados FDC 763 e 1559 foram patogênicos para lima ácida 'Tahiti', limão 'Siciliano', pomelo 'Grapefruit' e tangerina 'Cleópatra'; FDC 578 para lima ácida 'Tahiti' e limão 'Siciliano'; FDC 1568 para limão 'Siciliano' e tangerina 'Cleópatra'; FDC 867 para limão 'Siciliano'; e 10535 para tangerina 'Cleópatra'.

Os isolados de Xcc (306, FDC 636, 828 e 1567) foram patogênicos para todos os genótipos de citros testados quando inoculados por infiltração. No entanto, apenas os isolados 306, FDC 636 e 1567 provocaram sintomas hiperplásticos, característicos de Xcc. Os genótipos infectados pelo isolado FDC 828 apresentaram lesões achatadas, não erumpentes (resultados não apresentados). O isolado FDC 1510 de Xacm foi patogênico para citrumelo 'Swingle', lima ácida 'Galego', limões 'Cravo' e 'Siciliano' e pomelo 'Grapefruit' (Figura 6). Uma fraca reação foi observada após inoculação deste isolado em tangerina 'Cleópatra', no entanto, foi possível reisolar o patógeno desse genótipo três semanas após a inoculação.

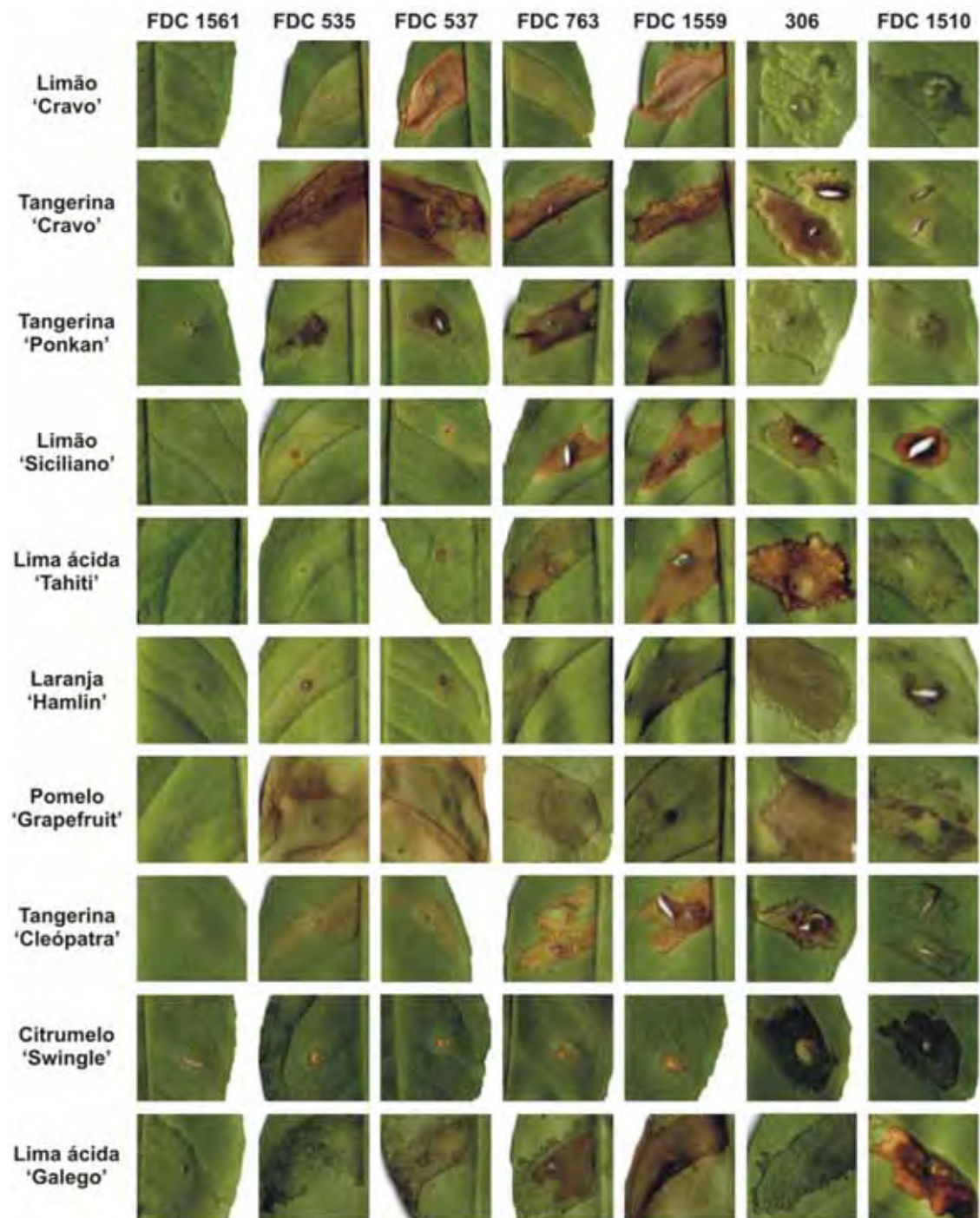


Figura 6. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (entre 3 e 26 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (FDC 763, 1559, 535 e 537), *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (FDC 1510) e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306).

Agressividade

Nos dois experimentos realizados observou-se claramente a formação de três grupos distintos de isolados em termos de agressividade (Figura 7). O isolado 306 de *Xcc* apresentou-se mais agressivo que os demais isolados em todas as avaliações. Os diâmetros das lesões causadas pelos isolados FDC 535 e 537 (*Xfa*-C PP) e FDC 828 (*Xcc*) foram semelhantes entre si e inferiores aos observados para os isolados FDC 867 e 1559 (*Xfa*-C NP). O diâmetro médio das lesões na última avaliação variou de 1,58 a 4,10 mm no primeiro experimento (112 DAI), e de 1,33 a 3,13 mm no segundo experimento (105 DAI) (Figura 8).

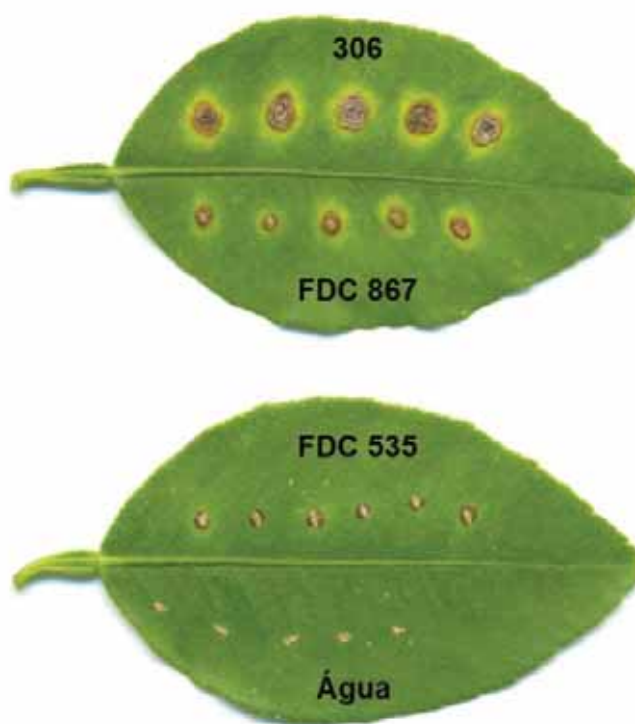


Figura 7. Sintomas de cancro cítrico em folhas de lima ácida 'Galego' (112 dias após a inoculação) provocados por isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (isolado 306) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C não produtor (FDC 867) e produtor (FDC 535) de pigmento escuro em meio de cultura. Inoculações com água deionizada estéril foram utilizadas como controle.

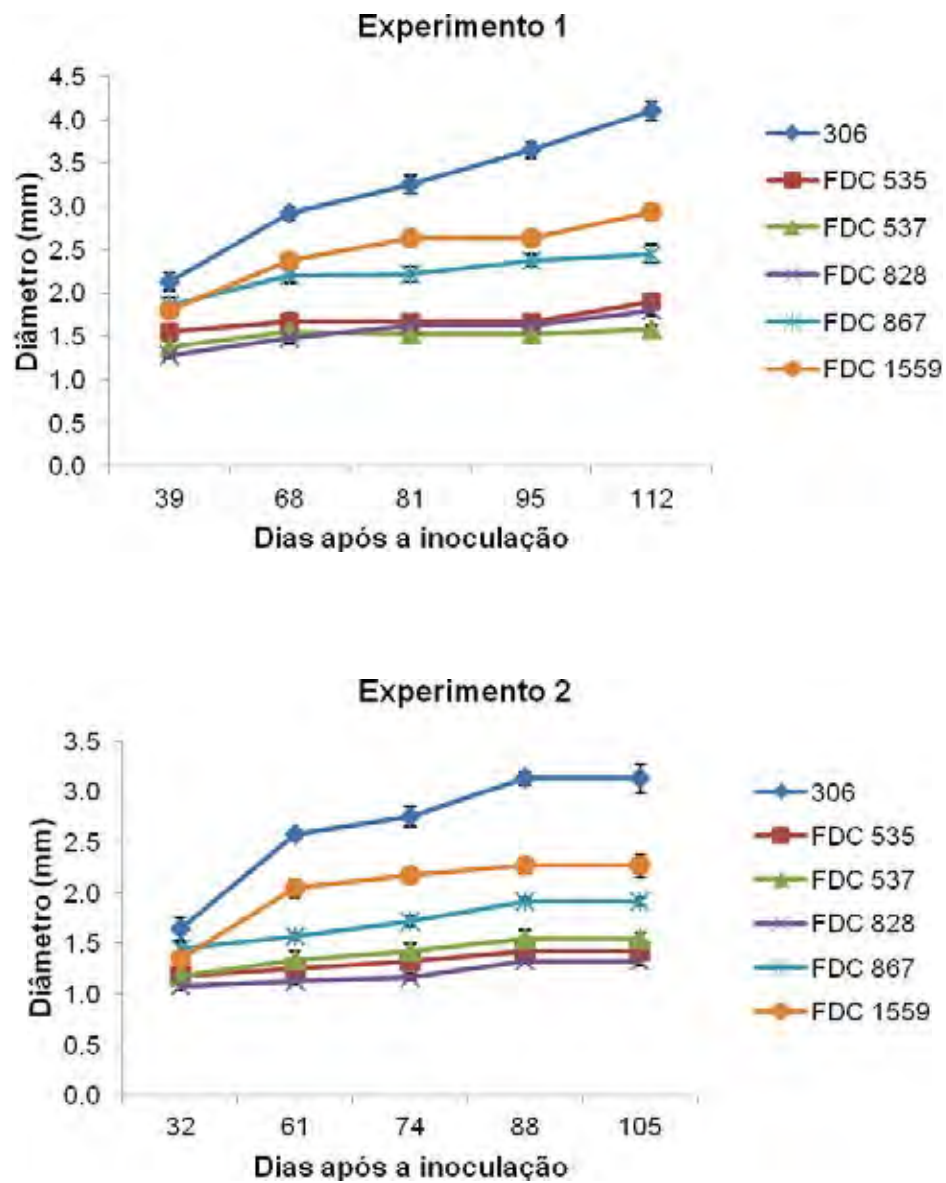


Figura 8. Diâmetro médio (mm) de lesões de cancro cítrico em folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306 e FDC 828) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, produtores (FDC 535 e 537) e não produtores (FDC 867 e 1559) de pigmento escuro em meio de cultura.

População bacteriana

A população bacteriana nas lesões causadas pelos isolados de Xfa-C NP (FDC 867 e 1559) e de Xcc (306 e FDC 828) em folhas de lima ácida 'Galego' foram maiores que as observadas para os isolados de Xaf-C PP (FDC 535 e 537), principalmente após 7 DAI (Figura 9).

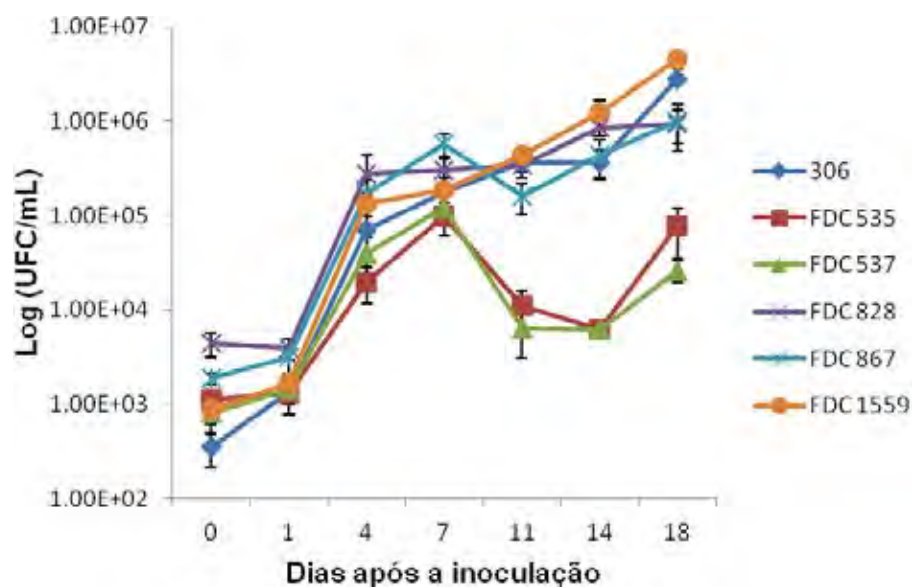


Figura 9. População bacteriana em lesões de folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* produtores (FDC 535 e 537) e não produtores (FDC 867 e 1559) de pigmento escuro em meio de cultura artificial, e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306 e FDC 828).

Caracterização genética

Análise de sequências

Foram obtidas amplificações dos genes *lrp* e *gyrB* e da região intergênica 16S-23S (ITS) para todos os isolados analisados. Análises da sequência parcial do gene *lrp* (460 pb) e da região ITS completa (513 pb) permitiram distinguir as três espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros e os isolados dos tipos B e C de Xfa, conforme observado na Figura 10. Isolados pertencentes à mesma espécie/tipo apresentaram a mesma sequência nucleotídica. A similaridade do gene *lrp* entre os tipos B e C de Xfa foi de 99,6%, com diferença de dois nucleotídeos (nt), e a similaridade destes patótipos com Xcc e Xacm, foi de 97,8% (10 nt) e 97,4% (12 nt), respectivamente. Os isolados de Xcc e Xacm diferiram em 16 nt (96,5%). A comparação da sequência da região ITS revelou 99,8% de similaridade entre os tipos B e C de Xfa, com apenas um nt diferente. A similaridade entre Xfa-B e Xfa-C com Xcc foi de 98,6% (7 nt) e 98,4% (8 nt), respectivamente, e com Xacm de 99,2% (4 nt) e 99% (5 nt), respectivamente. Sete nucleotídeos (98,6%) apresentaram-se diferentes entre Xcc e Xacm.

Resultados semelhantes foram observados nas análises da sequência parcial do gene *gyrB* (619 pb), exceto para os isolados de Xfa, que apresentaram sequências idênticas entre si. A similaridade de Xfa com Xcc e Xacm foi de 98,9% (7 nt) e 97,7% (14 nt), respectivamente (Tabela 3). A comparação de Xfa com isolados de *Xanthomonas* geneticamente relacionados (RADEMAKER et al., 2000; 2005) revelou similaridade superior a 99%, com diferença de 2 a 5 nt. Com o isolado LA100 de *X. axonopodis* pv. *anacardii* observou-se 100% de similaridade. Na Figura 11 observa-se o agrupamento de Xfa com *X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pvs. *anacardii*, *dieffenbachiae*, *rhynchosiae*, *sesbaniae* e *vignicola*, e maiores distâncias em relação à Xcc e Xacm.

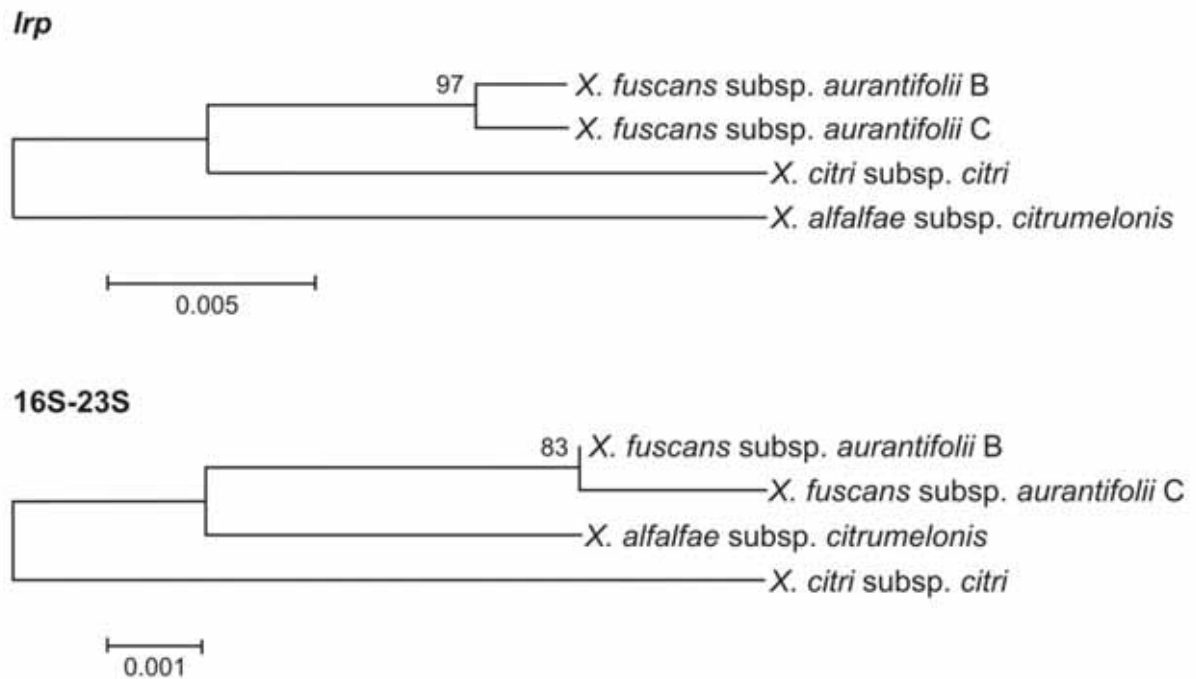


Figura 10. Dendrogramas construídos pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), com base na sequência parcial do gene *lrp* ("leucine-responsive regulatory protein") e da região intergênica 16S-23S de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros.

Tabela 3. Diferenças no número de nucleotídeos (esquerda, abaixo) e porcentagem de similaridade de sequências (direita, acima) do gene *gyrB* de bactérias do gênero *Xanthomonas*: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) e *fuscans* (Xff), *X. axonopodis* pvs. *anacardii* (Xaa), *dieffenbachiae* (Xad), *rhynchosiae* (Xar), *sesbaniae* (Xas) e *vignicola* (Xav), *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm).

Espécie	Isolado	Xfa	Xff	Xaa		Xad	Xar	Xas	Xav	Xcc	Xacm
		(24 isolados)	LMG 7511	LA 100	CFBP 2913	LMG 7399	LMG 8021	LMG 867	LMG 8139	(4 isolados)	FDC 1510
Xfa	(24 isolados) ^a	-	99,2	100	99,7	99,7	99,2	99,3	99,3	98,9	97,7
Xff	LMG 7511	5	-	99,2	99,5	98,9	99,3	99,5	99,2	98,7	98,2
Xaa	LA100	0	5	-	99,7	99,7	99,2	99,3	99,3	98,9	97,7
	CFBP 2913	2	3	2	-	99,3	99,5	99,7	99,7	99,2	98,1
Xad	LMG 7399	2	7	2	4	-	98,9	99,0	99,0	98,5	97,4
Xar	LMG 8021	5	4	5	3	7	-	99,8	99,5	98,7	98,1
Xas	LMG 867	4	3	4	2	6	1	-	99,7	98,9	98,1
Xav	LMG 8139	4	5	4	2	6	3	2	-	98,9	97,7
Xcc	(4 isolados) ^b	7	8	7	5	9	8	7	7	-	97,9
Xacm	FDC 1510	14	11	14	12	16	12	12	14	13	-

^aReferente aos 24 isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (tipos B e C) utilizados no presente estudo, os quais apresentaram sequência de nucleotídeos idêntica para o gene *gyrB*.

^bReferente aos 4 isolados de *X. citri* subsp. *citri* utilizados no presente estudo, os quais apresentaram sequência de nucleotídeos idêntica para o gene *gyrB*.

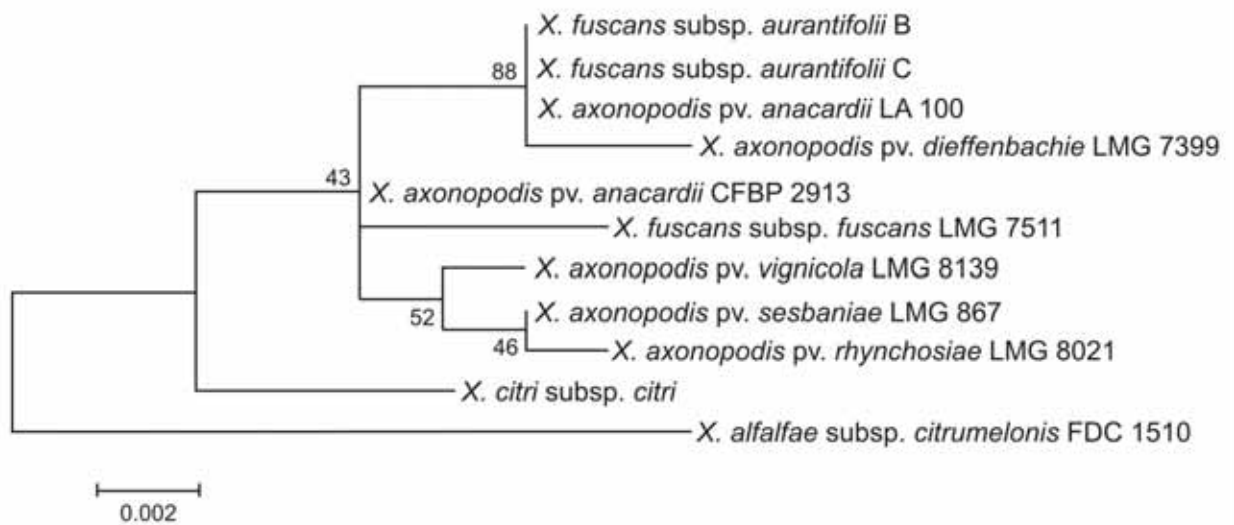


Figura 11. Dendrograma construído pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), com base na sequência parcial do gene *gyrB* de bactérias do gênero *Xanthomonas*.

AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)

Os ensaios de AFLP com os pares de iniciadores E12/M16 e E21/M16 geraram um total de 19 e 12 posições de bandas, respectivamente, com fragmentos entre 50 e 800 pb, aproximadamente. Com os dois pares de iniciadores foi possível identificar um padrão de amplificação característico para cada uma das três espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros (resultados não apresentados). A análise conjunta dos dados permitiu a identificação de dez haplótipos entre os 29 isolados analisados (Tabela 4), com 31 posições de bandas. Foram identificados dois haplótipos entre os isolados de Xfa-B (A1 e A2), três para Xfa-C PP (A3, A4 e A5) e NP (A6, A7 e A8) e um para Xcc (A9), além do haplótipo representado pelo isolado FDC 1510 de Xacm (A10). Observa-se no dendrograma (Figura 12) a formação de quatro grupos principais, representados pelos quatro patótipos de *Xanthomonas* causadores de doença nos citros, separados por altos valores de bootstrap.

Tabela 4. Haplótipos de *Xanthomonas* isoladas de citros identificados por AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism").

Espécie	Haplótipo	Isolado
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B	A1	11122 ^b e FDC 1561
	A2	FDC 1565 e 1566
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C		
Produtora de pigmento ^a	A3	FDC 535
	A4	FDC 537
	A5	FDC 536, 725, 751, 766, 791, 1560, 1609 e 1630
Não produtora de pigmento	A6	FDC 1568
	A7	FDC 578
	A8	10535 ^b , FDC 752, 763, 867, 1558, 1559, 1563 e 1564
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	A9	306 ^b , FDC 636, 828 e 1567
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> .	A10	FDC 1510

^aLinhagens produtoras de pigmento escuro em meio de cultura artificial.

^bIsolados que tiveram seus genomas sequenciados (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010).

BOX e ERIC-PCR

Diferentes perfis genéticos foram observados nas análises por BOX e ERIC-PCR. As reações de BOX-PCR geraram de 7 a 14 fragmentos, entre 250 e 1500 pb, aproximadamente. Os perfis identificados possibilitaram a separação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros e dos tipos B e C de Xfa, e foram únicos entre isolados do mesmo patótipo. Exceto para os isolados de Xfa-C que apresentaram sete perfis diferentes. As reações de ERIC-PCR resultaram na amplificação de 6 a 12 fragmentos de 150 a 2500 pb, aproximadamente. Foram identificados nove perfis de bandas entre os isolados analisados, os quais permitiram identificar os isolados por espécie e distinguir os tipos B e C de Xfa. Além disso, os resultados obtidos por ERIC-PCR possibilitaram a separação dos isolados de Xfa-C PP e NP. Foi observado um perfil único entre os isolados de Xcc e Xfa-C PP, e três entre os isolados de Xfa-B e Xfa-C NP. Quinze haplótipos foram obtidos na análise conjunta dos dados de BOX e ERIC-PCR. Os dendrogramas obtidos com os resultados de BOX (Figura 13) e ERIC-PCR (Figura 14) e pela combinação dos resultados das duas técnicas (Figura 15), permitiram observar a formação de quatro grupos distintos, representados pelos quatro tipos de *Xanthomonas* patogênicas aos citros.

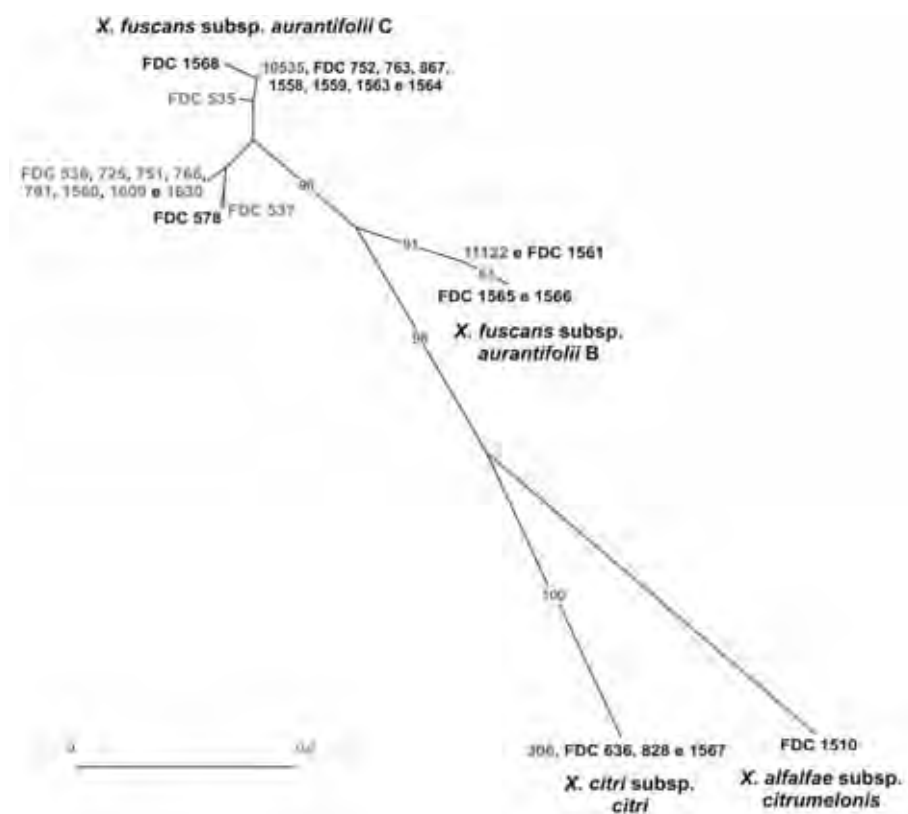


Figura 12. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por AFLP. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura.

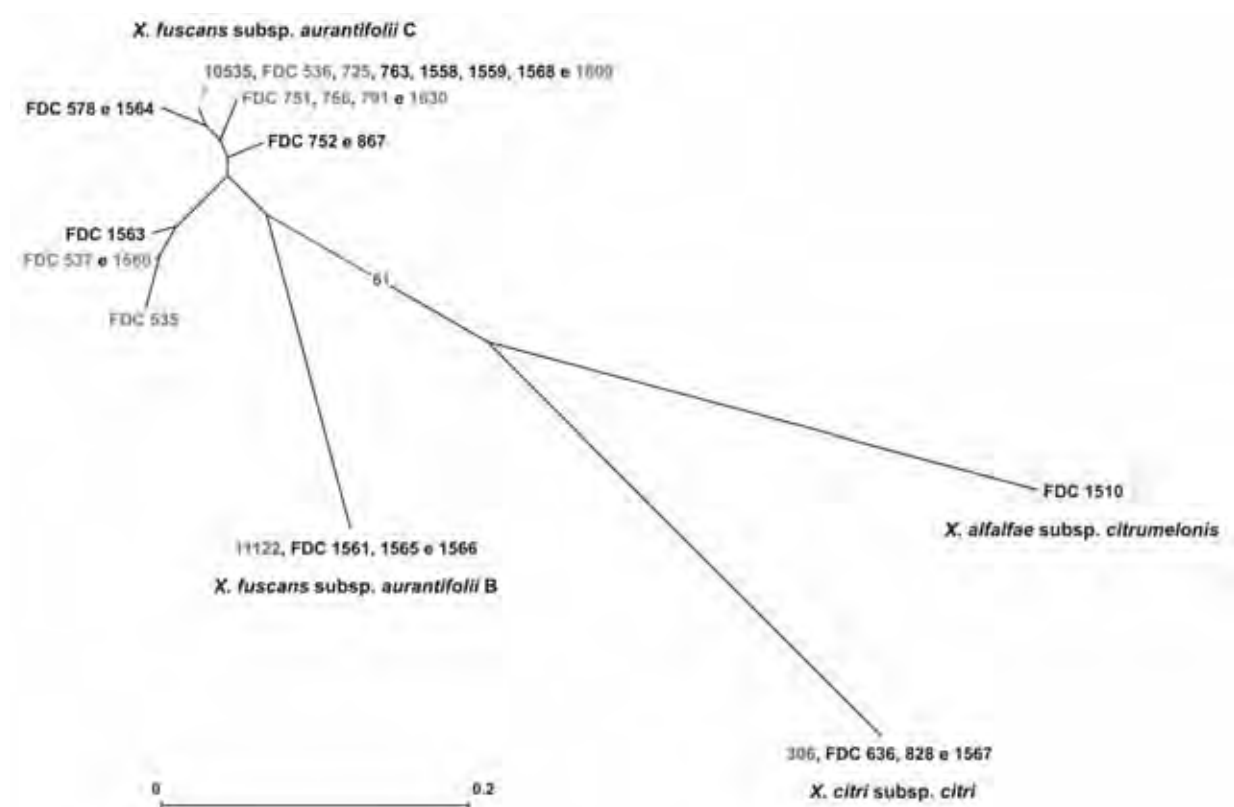


Figura 13. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por BOX-PCR. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura.

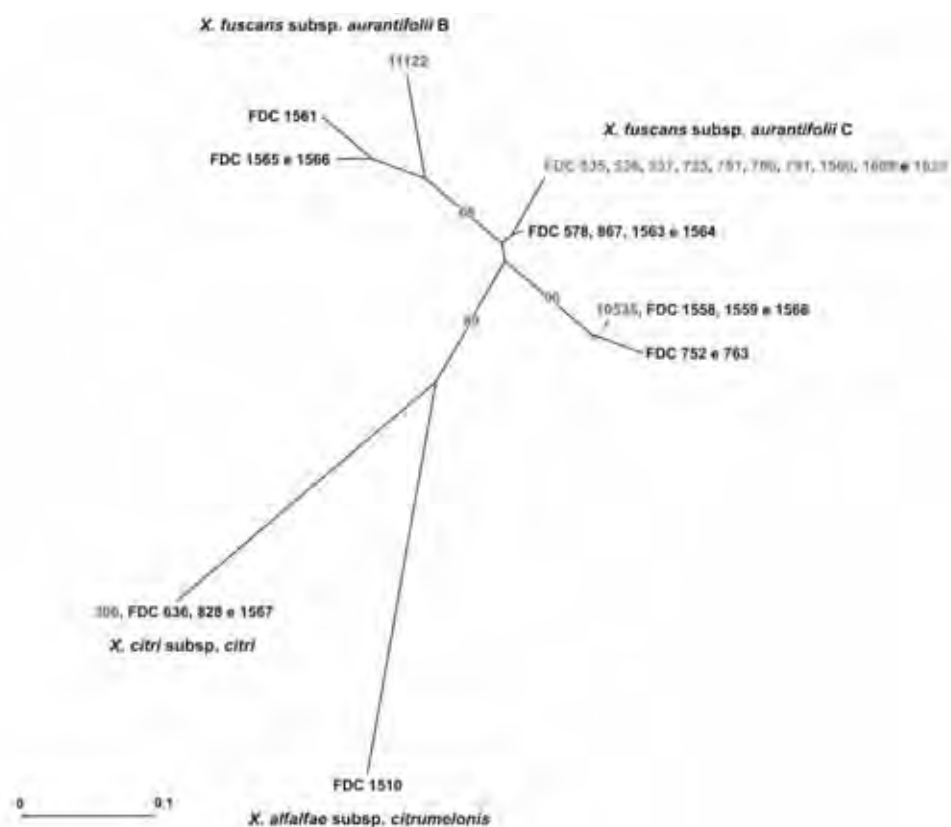


Figura 14. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por ERIC-PCR. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura.

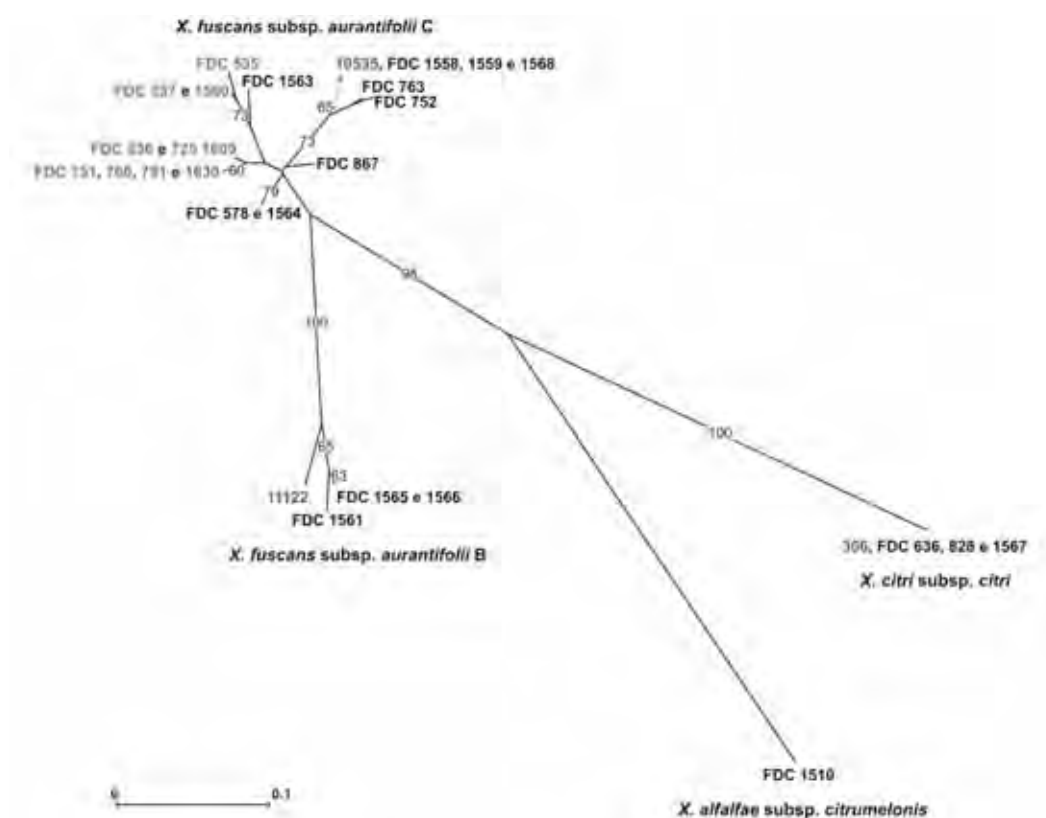


Figura 15. Dendrograma (“unweighted neighbor-joining”; DarWIN 5.0) ilustrando a diversidade genética de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros por BOX e ERIC-PCR. Os isolados com o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010) estão marcados em verde. Em azul estão representados os isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtores de pigmento escuro em meio de cultura.

Integrans

Amplificações com os iniciadores MRG18 e AJH72 ocorreram apenas com os isolados de Xcc e Xacm. Cinco perfis de amplificação foram observados com os pares de iniciadores AJH73/AJH95 (Figura 16), MRG17/AJH60 e MRG23/AJH60 (Figura 17), que apresentaram, respectivamente, de 1-3, 2-5 e 4-6 fragmentos. Com todos os iniciadores utilizados o perfil de amplificação foi idêntico entre isolados da mesma espécie/tipo, com exceção dos isolados de Xfa-C que, quando amplificados, apresentaram dois perfis diferentes. Como observado na Tabela 5, com os pares de iniciadores AJH73/AJH95 e MRG17/AJH60, essa variação ocorreu somente entre os isolados não produtores de pigmento. Com os iniciadores MRG23/AJH60 observou-se a separação dos isolados produtores dos não produtores de pigmento.

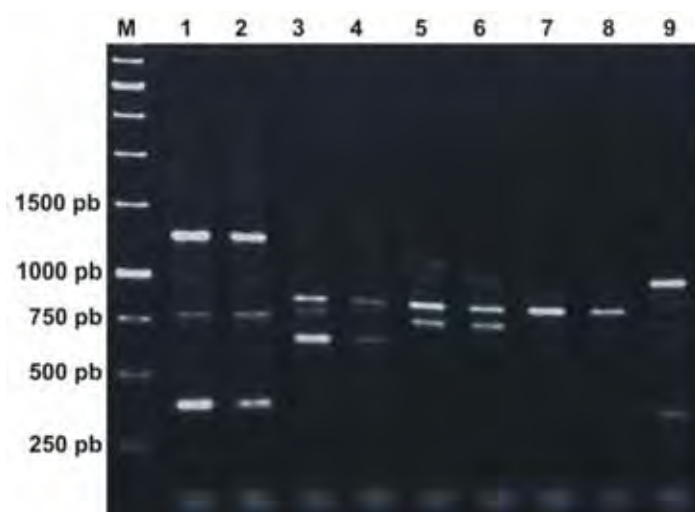


Figura 16. Produtos de PCR gerados após amplificação com os iniciadores AJH73 e AJH95 (GILLINGS et al., 2005). A utilização desses iniciadores teve como objetivo averiguar a presença de integrans nos isolados analisados. Colunas 1 e 2: *X. citri* subsp. *citri* (isolados 306 e FDC 636, respectivamente); 3 e 4: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (11122 e FDC 1566); 5, 6, 7 e 8: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (10535, FDC 763, 725 e 751); 9: *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (FDC 1510). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

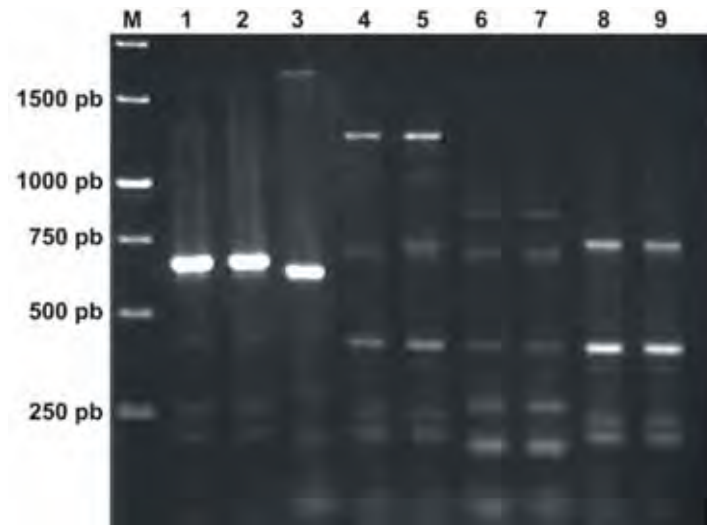


Figura 17. Padrão de amplificação de cassetes gênicos de integrons com os iniciadores MRG23 e AJH60 (GILLINGS et al., 2005) de isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros. Colunas 1 e 2: *X. citri* subsp. *citri* (isolados 306 e FDC 636, respectivamente); 3: *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (FDC 1510); 4 e 5: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (10535 e FDC 1558); 6 e 7: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (11122 e FDC 1566); 8 e 9: *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (FDC 535 e 1560). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

Tabela 5. Perfis de amplificação de integrons e cassetes gênicos de linhagens de *Xanthomonas* isoladas de citros.

Espécie	Isolados	Oligonucleotídeo iniciador ^a			
		MRG18/AJH72	AJH73/AJH95	MRG17/AJH60	MRG23/AJH60
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B	1561	- ^c	1	1	1
	1565	-	1	1	1
	1566	-	1	1	1
	11122	-	1	1	1
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C Produtora de pigmento ^b	535	-	2	2	2
	536	-	2	2	2
	537	-	2	2	2
	725	-	2	2	2
	751	-	2	2	2
	766	-	2	2	2
	791	-	2	2	2
	1560	-	2	2	2
	1609	-	2	2	2
	1630	-	2	2	2
	Não produtora de pigmento	578	3	2	3
		752	2	2	3
		763	3	2	3
		867	2	2	3
		1558	3	2	3
		1559	3	2	3
		1563	2	3	3
		1564	2	3	3
		1568	3	3	3
		10535	3	2	3
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	12	1	4	4	4
	636	1	4	4	4
	828	1	4	4	4
	1567	1	4	4	4
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	1510	1	5	5	5

^aOligonucleotídeos iniciadores descritos por GILLINGS e colaboradores (2005).^bLinhagens produtoras de pigmento escuro em meio de cultura artificial.^cIndica que não ocorreu amplificação.

Discussão

As bactérias *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) são responsáveis pelo cancro cítrico, uma das principais doenças da cultura dos citros em todo mundo, e pelas cancroses B e C, respectivamente. Além de causar danos significativos para a planta, como queda prematura dos frutos e desfolha, o cancro

cítrico gera enormes prejuízos econômicos em razão do seu caráter quarentenário ou decorrentes do seu manejo integrado (GOTTWALD et al., 2001; 2002). Os sintomas causados por esses patógenos em hospedeiros suscetíveis são muito similares, entretanto, enquanto Xcc infecta todas as variedades comerciais de citros, Xfa apresenta restrita faixa de hospedeiros. Além disso, diferenças entre Xcc e Xfa têm sido observadas por diferentes metodologias, incluindo testes fisiológicos, sorológicos e análises moleculares (NAMEKATA, 1971; RADEMAKER et al., 2000; 2005; SCHAAD et al., 2005; 2006; VAUTERIN et al., 1995). Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de Xfa ainda são desconhecidos, e estudos mais detalhados sobre este patógeno podem contribuir para um melhor entendimento da interação *Xanthomonas*/citros. Por esta razão, o presente estudo objetivou a caracterização patogênica e genética de isolados de Xfa (tipos B e C) empregando-se diferentes metodologias. A fim de comparação foram utilizados isolados de Xcc e Xacm (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*).

Os genótipos de citros utilizados no presente estudo apresentaram diferenças significativas quando inoculados com Xfa, Xcc e Xacm. Os isolados de Xfa analisados, como esperado, demonstraram limitada patogenicidade em relação aos isolados de Xcc e Xacm. No entanto, não foram observados sintomas claros de infecção para os isolados de Xfa-B em nenhum dos genótipos testados, independentemente do método de inoculação adotado, sugerindo uma provável perda de patogenicidade desses isolados. É possível que essa atenuada agressividade seja consequência do longo período de conservação desses isolados ou devido a sucessivas repicagens em meio de cultura. De qualquer forma, novos estudos são necessários para determinar, com segurança, a patogenicidade de Xfa-B.

Segundo a literatura, apenas lima ácida 'Galego' é suscetível, em condições naturais de infecção, à Xfa-C (MALAVOLTA JR. et al., 1987; NAMEKATA, 1971). Contudo, os isolados de Xfa-C analisados apresentaram grande variação na patogenicidade. Além de infectarem lima ácida 'Galego', a maioria dos isolados apresentou-se patogênica para citrumelo 'Swingle' pelos dois métodos de inoculação adotados. Ainda, considerando as inoculações por ferimento com agulha, os isolados

FDC 752 e 763 também foram patogênicos para tangerina 'Cravo', o isolado FDC 1559 para as tangerinas 'Cravo' e 'Ponkan' e o isolado FDC 1568 infectou limão 'Siciliano' e as tangerinas 'Cleópatra', 'Cravo' e 'Ponkan'. As inoculações por infiltração indicaram uma gama de hospedeiros maior para os isolados de Xfa-C, provavelmente em razão do maior volume de suspensão bacteriana em contato com o tecido vegetal. Por esta metodologia, a maioria dos isolados deste patótipo infectaram citrumelo 'Swingle', lima ácida 'Galego', limão 'Cravo' e tangerina 'Cravo', e alguns isolados também foram patogênicos em lima ácida 'Tahiti' (FDC 578, 763 e 1559), limão 'Siciliano' (FDC 578, 763, 867, 1559 e 1568) e tangerina 'Cleópatra' (10535, FDC 763, 1559 e 1568). Os sintomas duvidosos observados em determinados genótipos provavelmente é consequência da alta concentração do inóculo utilizado nos testes (10^8 UFC/mL).

Resultados semelhantes para a patogenicidade de Xfa-C foram relatados por NAMEKATA (1971), que observou que os isolados desse patótipo apresentam maior agressividade para lima ácida 'Galego' e são pouco agressivos para lima da Pérsia (*C. limettioides*) e para lima ácida 'Tahiti' e limões 'Eureka' e 'Siciliano'. Segundo GOTTWALD e colaboradores (1993), testes de patogenicidade realizados com isolados de *Xanthomonas* por inoculações artificiais, como os praticados no presente estudo, frequentemente resultam em uma maior suscetibilidade de genótipos que apresentam resistência no campo. Isto ocorre porque os ferimentos realizados mecanicamente permitem o contato direto do patógeno com o mesófilo foliar, enquanto sob condições naturais de infecção, a colonização da bactéria ocorre, principalmente, por meio de aberturas naturais (BRUNINGS & GABRIEL, 2003; GOTTWALD et al., 1993). No entanto, a observação de sintomas em citrumelo 'Swingle' provocados por Xfa-C explica o recente relato desse patógeno em plantas de citrumelo 'Swingle' naturalmente infectadas (JACIANI et al., 2009).

Todos os isolados de Xcc analisados foram patogênicos para todos os genótipos de citros testados, exceto o isolado FDC 636 quando inoculado com agulha imersa na suspensão bacteriana, tendo sido também menos agressivo que os demais isolados de Xcc testados. Outro isolado de Xcc, FDC 828, induziu sintomas atípicos, com ausência de lesões erupentes, similares aos sintomas provocados por Xacm. Essas

características podem estar associadas à ausência de alguns genes efetores do Tipo III nestes isolados, como observado no Capítulo 2 do presente trabalho. Além de não apresentar o gene *avrXacE3*, análises preliminares indicam que o isolado FDC 636 não possui cópias dos genes *pthA3* e *pthA4*, e o isolado FDC 828 não têm o homólogo do *pthA4* (resultados não apresentados). Com exceção de *Xacm*, que não causa lesões erumpentes típicas de cancro cítrico, todas variantes de *Xanthomonas* patogênicas aos citros (tipos A, A*, A^w, B e C) possuem ao menos um homólogo do gene *pthA*. Contudo, AL-SAADI e colaboradores (2007) demonstraram que provavelmente apenas os homólogos do *pthA* que apresentam 17,5 repetições ricas em leucina na região central são essenciais para a patogenicidade de *Xcc* em citros. Dos quatro homólogos do *pthA* presentes no isolado 306 de *Xcc*, *pthA4* é o único que apresenta esta característica (DA SILVA et al., 2002).

Alguns isolados de *Xfa-C* têm como característica a produção de pigmento escuro quando cultivados em meio de cultura artificial. Com exceção de *X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. campestris* pv. *vignicola*, nenhuma outra espécie de *Xanthomonas* apresenta essa característica (SCHAAD et al., 2005; 2006). Estudos moleculares baseados na região intergênica 16S-23S envolvendo isolados de *Xfa-C* produtores (PP) e não produtores de pigmento (NP) não revelaram diferenças entre esses isolados, assim como não foram observadas diferenças na patogenicidade dos mesmos quando inoculados em lima ácida 'Galego' (DESTÉFANO & RODRIGUES NETO, 2001). No entanto, em outro estudo, os isolados de *Xfa-C* foram separados em dois grupos distintos em termos de agressividade, correlacionados com a capacidade de produção de pigmento, sendo que os isolados PP mostraram-se menos agressivos que os isolados NP (NOCITI et al., 2006). No presente estudo foram analisados vinte isolados de *Xaf-C*, sendo dez PP. Nos testes realizados para avaliação da agressividade em folhas de lima ácida 'Galego', os isolados PP analisados (FDC 535 e 537) foram menos agressivos que os isolados NP (FDC 867 e 1559), e ambos apresentaram reduzida agressividade em comparação ao isolado 306 de *Xcc*. Diferenças entre os isolados PP e NP também foram observadas nas análises de população bacteriana, sendo que em

todas as avaliações as populações de PP foram inferiores a dos demais isolados analisados.

Para a caracterização genética dos isolados de *Xanthomonas* analisados no presente estudo foram utilizadas técnicas moleculares usualmente empregadas na caracterização de microrganismos (AH-YOU et al., 2009; CUBERO & GRAHAM, 2002; 2004; HAUBEN et al., 1997; PARKINSON et al., 2007; 2009; RADEMAKER et al., 2005; SCHAAD et al., 2005; VALVERDE et al., 2007). Essas análises incluíram o sequenciamento da região intergênica 16S-23S (ITS) e das sequências parciais dos genes *lrp* e *gyrB*, ensaios de AFLP, BOX e ERIC-PCR e amplificação de integrons e cassetes gênicos. Todas as técnicas utilizadas permitiram distinguir as três espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros e os tipos B e C de Xfa, com exceção das análises da sequência parcial do gene *gyrB* que revelaram sequências idênticas para todos os isolados de Xfa.

As análises da região ITS e da sequência parcial do gene *lrp* permitiram, como observado por outros autores (CUBERO & GRAHAM, 2002; 2004; SCHAAD et al., 2005), diferenciar os quatro patótipos de *Xanthomonas* causadores de doença nos citros. No entanto, não foram observadas diferenças entre isolados pertencentes ao mesmo patótipo. As sequências do *gyrB* analisadas mostraram alta similaridade entre Xfa, *X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pvs. *anacardii*, *dieffenbachiae*, *rhynchosiae*, *sesbaniae* e *vignicola*. A similaridade entre essas espécies e patovares também foi observada por análises de rep-PCR reportadas por RADEMAKER e colaboradores (2005), os quais alocaram estes patógenos no mesmo grupo genético, designado de 9.6. Análises filogenéticas do gênero *Xanthomonas* com base no gene *gyrB* permitiram distinguir a maioria das espécies desse gênero (PARKINSON et al., 2007; 2009). Segundo os autores deste estudo, os resultados obtidos indicam que o gênero *Xanthomonas* é um grupo monofilético, derivado de um ancestral comum que adquiriu a habilidade de colonizar o tecido vegetal. Corrobora com esta hipótese o fato dos isolados de Xfa analisados apresentarem maior similaridade com espécies e patovares não patogênicos aos citros do que em relação a Xcc e Xacm.

Os dois patótipos de Xfa foram diferenciados pelas três técnicas de DNA “fingerprinting” utilizadas no presente estudo (AFLP, BOX e ERIC-PCR), com relativa diversidade entre isolados do mesmo patótipo (exceto para os isolados de Xfa-B que apresentaram o mesmo perfil por BOX-PCR). O poder discriminante destas técnicas já foi observado em estudos anteriores com isolados de *Xanthomonas* (CUBERO & GRAHAM, 2002; RADEMAKER et al., 2005). Contudo, a diferenciação dos isolados de Xfa-C de acordo com a capacidade de produção de pigmento, observada nas análises por ERIC-PCR, ainda não tinha sido relatada com alguma técnica molecular.

Integrans são elementos genéticos capazes de adquirir e expressar genes exógenos (cassetes gênicos) por um mecanismo de recombinação sítio-específica, mediante a enzima DNA integrase (*intI*). Esses elementos têm sido estudados principalmente em patógenos humanos e são conhecidos por sua capacidade em adquirir genes de resistência a antibióticos. GILLINGS e colaboradores (2005) observam que, em geral, isolados de *Xanthomonas* pertencentes ao mesmo patovar possuem arranjos idênticos de cassetes gênicos, embora estudos com *X. axonopodis* pvs. *juglandis* e *pruni* (BARIONOVI & SCORTICHINI, 2008) e *X. campestris* pv. *campestris* (VALVERDE et al., 2007) mostraram relativa diversidade entre isolados do mesmo patovar. A função desses elementos genéticos em *Xanthomonas* é em grande parte desconhecida, e não há evidências experimentais que eles estejam envolvidos com patogenicidade ou sobrevivência epifítica (GILLINGS et al., 2005). No entanto, as comparações de integrans entre bactérias desse gênero sugerem que rearranjos de cassetes gênicos ao longo do tempo acompanharam a adaptação dos diferentes patovares de *Xanthomonas* a hospedeiros específicos (BARIONOVI & SCORTICHINI, 2008; GILLINGS et al., 2005). As reações de PCR com os iniciadores MRG17 ou MRG23 e AJH60 (GILLINGS et al., 2005) apresentaram dois perfis de amplificação para os isolados de Xfa-C analisados. A diversidade encontrada permitiu a separação desses isolados de acordo com a capacidade de produção de pigmento (obtida com os iniciadores MRG23/AJH60) ou foi observada apenas entre os isolados não produtores (MRG17/AJH60). Para os demais isolados analisados foi observado um perfil único para cada espécie.

O crestamento comum do feijoeiro é causado por duas espécies de bactérias geneticamente distintas: *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap). No entanto, até recentemente, considerava-se que ambas pertenciam à mesma espécie bacteriana, sendo Xff considerada uma variante de Xap devido sua capacidade de produzir pigmento escuro (melanina) em meio de cultura artificial (SCHAAD et al., 2005). Do mesmo modo, foi possível observar no presente estudo diferenças genéticas entre os isolados de Xfa-C PP e NP por AFLP, BOX e ERIC-PCR e também por amplificação de cassetes gênicos, sugerindo que este patótipo seja formado por dois grupos relativamente distintos de isolados.

A definição da gama de hospedeiros é um importante parâmetro para o entendimento e controle de doenças bacterianas de plantas. Um controle eficiente pode ser obtido, por exemplo, por transformação genética com genes de resistência que reduzam a gama de hospedeiros do patógeno ou resultem em menores danos ao hospedeiro (NGOC et al., 2009). Como alguns genes de resistência são eficazes apenas contra determinado patógeno, ou subpopulações do patógeno, é importante também compreender a estrutura populacional do agente etiológico da doença e assim determinar a melhor estratégia para a implantação de resistência (ADHIKARI et al., 1995). Do ponto de vista econômico, Xfa apresenta menor importância que Xcc em razão de sua restrita localização geográfica, baixa agressividade e limitada gama de hospedeiros. Por outro lado, a utilização de Xfa como um modelo biológico no estudo das interações *Xanthomonas*/citros, como realizado no presente trabalho, pode contribuir para a formulação de novas estratégias de controle quanto ao uso de genótipos resistentes, controle químico/cultural, restrições quarentenárias e rastreabilidade do patógeno.

A cancrose B, ou falsa cancrose, foi detectada em 1934 na província de Corrientes na Argentina, e anos mais tarde no Uruguai (1936) e no Paraguai (1940). Desde sua descoberta em 1963, a cancrose C, ou cancrose da lima ácida 'Galego', encontra-se restrita ao Estado de São Paulo. Embora seja conhecida há várias décadas, Xfa ainda foi pouco caracterizada e a literatura concernente a esse patógeno é relativamente escassa. Estudos mais detalhados foram realizados por exames

morfológicos, sensibilidade a bacteriófagos, testes serológicos e patogenicidade (MALAVOLTA JR. et al., 1987; NAMEKATA, 1971). Análises moleculares envolveram um ou poucos isolados, e geralmente, foram utilizadas em estudos taxonômicos ou como ferramenta para diferenciação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros (CUBERO & GRAHAM, 2002; 2004; PARKINSON et al., 2009; RADEMAKER et al., 2005; SCHAAD et al. 2005).

No entanto, uma caracterização de Xfa como realizada no presente estudo, envolvendo um número maior de isolados e diferentes metodologias, ainda não tinha sido descrita. Além de observar que Xfa é geneticamente relacionada com espécies e patovares de *Xanthomonas* não patogênicas aos citros, os resultados obtidos permitiram identificar que a patogenicidade de Xfa-C não é restrita à lima ácida 'Galego', como considerado até o presente momento. Além disso, observou-se uma relativa separação de Xfa-C em dois grupos de isolados geneticamente distintos, de acordo com capacidade ou não de produção de pigmento, sendo que os isolados NP são mais agressivos e infectam um maior número de hospedeiros do que os isolados PP. As técnicas moleculares adotadas para a caracterização desses isolados mostraram-se eficazes na diferenciação dos quatro patótipos de *Xanthomonas* causadores de doença nos citros, podendo ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico da doença.

Conclusões

Novos estudos são necessários para confirmar a patogenicidade de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (Xfa-B), uma vez que os isolados analisados não provocaram sintomas nítidos de infecção nos genótipos de citros testados, mesmo naqueles nos quais foram originalmente isolados.

Lima ácida 'Galego' não é o único hospedeiro cítrico suscetível à *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (Xfa-C), como considerado até o presente momento. Isolados desse patótipo também infectam citrumelo 'Swingle' e, em altas concentrações

do inóculo, podem infectar lima ácida 'Tahiti', limões 'Cravo' e 'Siciliano' e tangerinas 'Cleópatra' e 'Cravo'.

Análises da sequência nucleotídica da região intergênica 16S-23S e das sequências analisadas dos genes *lrp* e *gyrB* não permitiram identificar polimorfismo entre isolados pertencentes ao mesmo patótipo. Além disso, o sequenciamento parcial do gene *gyrB* revelou sequências idênticas entre todos os isolados de Xfa analisados e maior similaridade desse patógeno com espécies e patovares de *Xanthomonas* não patogênicas aos citros (*X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pvs. *anacardii*, *dieffenbachiae*, *rhynchosiae*, *sesbaniae* e *vignicola*) do que em relação a Xcc e Xacm.

Os isolados de Xaf-C produtores (PP) e não produtores (NP) de pigmento escuro em meio de cultura artificial apresentaram-se geneticamente distintos. Além disso, esses dois grupos de isolados apresentaram diferenças em termos de agressividade, sendo que os isolados NP são mais agressivos e infectam um maior número de hospedeiros do que os isolados PP.

As técnicas de DNA "fingerprinting" adotadas para a caracterização dos isolados analisados (AFLP, BOX e ERIC-PCR) mostraram-se eficazes na diferenciação dos quatro patótipos de *Xanthomonas* causadores de doença nos citros, podendo ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico da doença. Além disso, os resultados obtidos por ERIC-PCR possibilitaram a separação dos isolados de Xfa-C de acordo com a capacidade de produção de pigmento.

CAPÍTULO 4 – Caracterização de *Xanthomonas alfalfae* Detectada em Citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil

RESUMO – A mancha bacteriana dos citros (MBC) é uma doença causada por *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm) e de ocorrência restrita ao Estado da Flórida, EUA. O hospedeiro mais comum desta bactéria é o híbrido de trifoliata citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.). Em Novembro de 2009, no município de Embaúba, Estado de São Paulo, sintomas necróticos similares aos induzidos por Xacm foram observados em folhas de uma única planta de citrumelo ‘Swingle’ localizada em um pomar de laranja ‘Pera’ (*C. sinensis*). Análises da sequência da região ITS 16S-23S rDNA de bactérias isoladas das folhas sintomáticas permitiram identificar o agente etiológico da doença como *X. alfalfae* (Xa). Inoculações artificiais demonstraram limitada patogenicidade destes isolados, semelhante ao observado para o isolado de Xacm originário da Flórida. Análises da sequência parcial do operon ribossômico 16S-23S revelou similaridade de 99,8% entre os isolados investigados e um isolado de Xacm da Flórida. Resultados semelhantes foram observados nas análises das sequências parciais dos genes *atpD*, *dnaK* e *lrp* e da região ITS. Análises de DNA “fingerprinting” por AFLP, BOX e ERIC-PCR permitiram diferenciar claramente as espécies/patótipos de *Xanthomonas* patogênicas aos citros e agruparam os isolados investigados com o isolado de Xacm. Este é o primeiro relato de Xa no Brasil, contudo, baseado na limitada agressividade, necessidade de feridas para penetrar no hospedeiro e incompatibilidade com os genótipos de citros utilizados comercialmente, os isolados descritos aqui provavelmente não conferem risco para a produção de citros no Brasil.

Palavras-chave: cancro cítrico, interação planta-patógeno, mancha bacteriana dos citros

CHAPTER 4 – Characterization of *Xanthomonas alfalfae* Detected in Swingle Citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) in Brazil

SUMMARY – Citrus bacterial spot (CBS) is a disease induced by *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm) which occurrence was described only in Florida state. The most common host of this bacterium is the trifoliolate hybrid Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.). In November 2009, in the Embaúba municipality in São Paulo state, Brazil, necrotic symptoms similarly induced by Xacm were identified on a unique Swingle citrumelo tree presented in a Pera Sweet orange (*C. sinensis*) orchard formed by plants grafted on this rootstock. By 16S-23S rDNA sequence analysis the *Xanthomonas* bacterium isolated from the symptomatic tissues belongs to *X. alfalfae* (Xa). By artificial inoculation, two strains obtained from the field infections showed very limited pathogenicity, similar to Xacm originated from Florida. 16S-23S sequence analysis revealed a similarity of 99.8% for the comparisons of Xa Brazilian strains and Xacm. The sequence comparisons for the ITS region, *lrp*, *atpD*, and *dnaK* genes also showed similar results. DNA fingerprint analysis by AFLP, BOX, and ERIC-PCR, allowed the clearly specie/pathotype differentiation and strains investigated and Xacm strains clustered together. This is the first description of Xa in Brazil, but based on the limited aggressiveness, lack of natural spread, necessity of wounds to penetrate the host, and the incompatibility reaction with commercial scion citrus genotypes, we hypothesize that the strains described here do not impose a risk for the citrus production in Brazil.

Key-words: citrus bacterial spot, citrus canker, host-pathogen interaction

Introdução

Agente causal da mancha bacteriana dos citros (MBC), a bactéria *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm) ocorre predominantemente em viveiros de citros da Flórida, EUA, e afeta principalmente citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata*). Variedades suscetíveis incluem ainda plantas jovens de laranjas doces (*C. sinensis*) e azedas (*C. aurantium*), tangerinas (*C. reticulata*), limões (*C. limon*), lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*) e pomelo 'Grapefruit' (*C. paradisi*). Os sintomas da MBC caracterizam-se por lesões achatadas com o centro necrótico, rodeadas por anasarca e, geralmente, por um halo amarelo, podendo ocorrer em folhas, ramos e raramente em frutos. Difere do cancro cítrico, causado por *X. citri* subsp. *citri* (Xcc), e das cancrozes B e C, causadas por *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa), por não causar lesões erupcentes (GRAHAM & GOTTWALD, 1988; SCHOULTIES et al., 1987; SUN et al., 2004).

A MBC foi identificada em 1984 e inicialmente associada ao cancro cítrico. Como nesta época a Flórida adotava um programa de erradicação para conter o avanço desta doença no Estado, milhares de porta-enxertos e plantas enxertadas de viveiros e pomares infectados foram eliminados, gerando prejuízos de aproximadamente US\$250 milhões (GOTTWALD et al., 1997; GRAHAM & GOTTWALD, 1988; SCHOULTIES et al., 1987). Após a caracterização desse patógeno e sua diferenciação de Xcc, não foram mais adotadas medidas de erradicação para a MBC.

No Brasil são descritas duas doenças associadas com *Xanthomonas* em citros: o cancro cítrico asiático e a cancrose da lima ácida 'Galego' ou cancrose C. Enquanto o cancro cítrico possui ampla disseminação e é patogênico para todas as variedades comerciais de citros do país, a cancrose C está restrita ao Estado de São Paulo e possui pequena gama de hospedeiros (NAMEKATA, 1971). Recentemente, isolados do tipo C foram encontrados em citrumelo 'Swingle' no município paulista de Severínia (JACIANI et al., 2009). De acordo com a legislação vigente em São Paulo, a detecção de qualquer espécie de *Xanthomonas* infectando citros em pomares ou viveiros

paulistas culmina na eliminação das plantas contaminadas e das demais circunvizinhas, suspeitas de estarem infectadas (BELASQUE JR. et al., 2009; 2010).

O gênero *Xanthomonas* foi reclassificado por diferentes autores nas últimas três décadas, incluindo as espécies causadoras de doenças nos citros (GABRIEL et al., 1989; SCHAAD et al., 2005; 2006; VAUTERIN et al., 1995; 2000). Até os anos 90, as três espécies patogênicas aos citros pertenciam à mesma espécie (inicialmente *X. campestris* e posteriormente *X. axonopodis*) e eram diferenciadas por patovares (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelo* para Xcc, Xfa e Xacm, respectivamente). Mais recentemente, SCHAAD e colaboradores (2005; 2006) reclassificaram os patógenos de citros em diferentes espécies e subespécies: *X. citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, respectivamente. As principais técnicas moleculares empregadas na caracterização molecular desses patógenos incluem homologia DNA-DNA, AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), BOX e ERIC-PCR, microssatélites e sequenciamento da região intergênica (ITS) 16S-23S e de “housekeeping genes” (AH-YOU et al., 2009; CUBERO & GRAHAM, 2002; 2004; HAMZA et al., 2010; PARKINSON et al., 2007; 2009; SCHAAD et al., 2005).

Em Novembro de 2009, no município de Embaúba, São Paulo, durante inspeções de rotina para detecção do cancro cítrico, equipes do Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura, observaram sintomas necróticos similares aos provocados por Xacm em folhas de um pé-franco de citrumelo ‘Swingle’ localizado em um pomar de laranja “Pera” (*Citrus sinensis*). As lesões, somente associadas com galerias provocadas pelo minador dos citros [*Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) Stainton] (Figura 1), não foram localizadas em outras plantas desta área. Análises da sequência da região ITS 16S-23S rDNA de bactérias isoladas das folhas sintomáticas permitiram identificar o agente etiológico da doença como *X. alfalfae* (Xa). Por esta razão, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os isolados de Xa detectados no Brasil por técnicas moleculares, como análises de sequências e DNA “fingerprinting”, e também determinar a patogenicidade destes isolados em genótipos de citros. Este é o primeiro relato de *X. alfalfae* no Brasil.



Figura 1. Folhas de citrumelo 'Swingle' com sintomas característicos da mancha bacteriana dos citros (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*), coletados no município de Embaúba, São Paulo. Observa-se o enrolamento das folhas decorrentes da presença do minador dos citros [*Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) Stainton].

Material e Métodos

Isolamento bacteriano e extração de DNA

Aproximadamente dez folhas de citrumelo 'Swingle' com sintomas da doença foram coletadas para isolamento do patógeno. Bactérias do gênero *Xanthomonas* foram isoladas após maceração do tecido vegetal infectado em água deionizada estéril, plaqueamento em meio de cultura NA (contendo por litro, 3g de extrato de carne, 5g de peptona, 5g de NaCl e 15g de ágar, pH 7,0) e incubação a 28°C por 40–44 horas.

Culturas puras foram conservadas em ultrafreezer a -80°C e depositadas na Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Fundecitrus (FDC, Araraquara/São Paulo). Dois isolados foram utilizados para as análises, denominados de FDC 1637 e FDC 1638, os quais foram comparados com o isolado-tipo de Xacm (FDC 1510 = LMG 9325) e com os isolados de Xcc (306) e Xfa tipos B (11122) e C (10535) que tiveram seus genomas sequenciados (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010). O DNA genômico dos seis isolados foram extraídos pelo método de CTAB (AUSUBEL et al., 1995), com modificações.

Testes de patogenicidade

Testes de patogenicidade foram realizados por inoculação de suspensões bacterianas (aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia por mL⁻¹) em folhas de citrumelo 'Swingle', limões 'Cravo' (*C. limonia*) e 'Siciliano' (*C. limon*), limas ácidas 'Tahiti' (*C. latifolia*) e 'Galego' (*C. aurantifolia*), tangerinas 'Ponkan', 'Cravo' (*C. reticulata*) e 'Cleópatra' (*C. reshni*), laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*) e pomelo 'Grapefruit' (*C. paradisi*). Os testes foram realizados em plantas com folhas jovens em expansão (imaturas) e também folhas maduras mediante dois métodos de inoculação: infiltrações das suspensões bacterianas no tecido vegetal com auxílio de seringas hipodérmicas, e também por perfurações do limbo foliar com agulhas imersas nas suspensões bacterianas. Como controles foram inoculados os isolados 306 de Xcc, FDC 1510 de Xacm e água estéril. As folhas que apresentaram sintomas foram coletadas para reisolamento do patógeno e complementação do postulado de Koch.

PCR, clonagem e análises de sequências

Reações de PCR ("Polymerase Chain Reaction") para amplificação do operon ribossomal 16S-23S e dos genes *lrp* ("leucine-responsive regulatory protein"), *atpD*

(subunidade F_1 - F_0 da síntese do ATP), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp70) e *gyrB* (subunidade β da girase do DNA) dos isolados FDC 1637 e 1638 foram realizadas como descrito abaixo. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo (0,1 μ g/mL), e visualizados em luz ultravioleta. Os fragmentos de tamanho esperado foram purificados (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) e posteriormente clonados em plasmídeo vetor (PGEM-T Easy Vector Systems, Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os sequenciamentos foram conduzidos em equipamento capilar automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) e os cromatogramas analisados através do aplicativo CodonCode Aligner versão 3.7.1. As sequências obtidas foram comparadas com sequências previamente depositadas no *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do algoritmo ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/ clustalw>). Análises filogenéticas foram realizadas por *locus* sequenciado ou pela combinação de múltiplos *loci* (MLSA), pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) baseado no modelo de Tamura-Nei (1993) do aplicativo MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). A confiança dos agrupamentos formados foi estimada pelo mesmo programa por análise de bootstrap com 2000 repetições.

DNA ribossomal (rDNA)

Os oligonucleotídeos iniciadores fD1 (WEISBURG et al., 1991) e 23r (LI & DE BOER, 1995) foram utilizados para amplificar a sequência do DNA ribossomal incluindo o gene 16S rDNA, a região intergênica (ITS) e um pequeno fragmento do gene 23S rDNA. Reações de PCR foram elaboradas em reações de 50 μ L (volume final) com 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion, Finnzymes), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada iniciador e 50 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação

inicial a 98°C/30 s; seguido de 30 ciclos a 98°C/10 s, 55°C/10 s e 72°C/50 s; e um ciclo de extensão final a 72°C/10 min. As sequências obtidas foram comparadas com sequências correspondentes do banco de dados do NCBI do isolado 306 de Xcc (número de acesso: AE008923.1), X84 de Xfa-B (AF442739.1), X341 de Xfa-C (AF442740.1) e F1 de Xacm (AF442741.1).

“Housekeeping genes”

A amplificação parcial do gene *lrp* foi realizada com os iniciadores *J-lrp6b* e *J-lrp5* (CUBERO & GRAHAM, 2004). Reações de PCR (50 µL) foram preparadas com 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,5 mM de dNTPs, 2,0 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. Os parâmetros utilizados para as amplificações foram: 94°C/5 min; 40 ciclos a 94°C/1 min, 64°C/1 min e 72°C/1 min; e 72°C/10 min. Sequências deste gene dos isolados 306 de Xcc (número de acesso: AE008923.1), X64 de Xfa-B (AY227396.1), 2905 de Xfa-C (AY227398.1) e F11, CBS1 e X0039 de Xacm (AY227412.1, AY227413.1 e AY227414.1, respectivamente), obtidas do NCBI, foram comparadas com as sequências obtidas dos isolados FDC 1637 e 1638.

Amplificações parciais dos genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB* foram conduzidas com os iniciadores descritos por AH-YOU e colaboradores (2009). As reações foram realizadas em 50 µL (volume final), com 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion, Finnzymes), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador e 50 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as amplificações foi o mesmo para todos os pares de iniciadores, seguindo o seguinte protocolo: 98°C/30 s; 35 ciclos a 98°C/10 s, 68°C/15 s e 72°C/15 s; e 72°C/10 min. As sequências obtidas dos três genes (*atpD*, *dnaK* e *gyrB*) foram comparadas com sequências correspondentes de *Xanthomonas* patogênicas aos citros: Xacm [isolados CFBP 2910 (números de acesso no NCBI: EU015139.1, EU015231.1 e EU015323.1, respectivamente), CFBP 3138 (EU015140.1, EU015232.1 e EU015324.1) e JJ238-28 (EU015141.1, EU015233.1

e EU015325.1)], Xcc [306 (EU015177.1, EU015269.1 e EU015361.1)], Xfa-B [CFBP 2866 (FJ376131.1, FJ376181.1 e FJ376231.1)] e Xfa-C [CFBP 2868 (FJ376132.1, FJ376181.1 e FJ376231.1)]; e com espécies de *Xanthomonas* geneticamente relacionadas com Xacm (RADEMAKER et al., 2000; 2005): *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* [LMG 495 (EU333905.1, EU333908.1 e EU333911.1), LMG 497 (EU015124.1, EU015216.1 e EU015308.1) e LMG 8019 (EU015125.1, EU015217.1 e EU015309.1)] e *X. axonopodis* pvs. *allii* [JW202 (EU015129.1, EU015221.1 e EU015313.1)], *cassiae* [LMG 675 (EU015138.1, EU015230.1 e EU015322.1)], *desmodii* [LMG 692 (EU015144.1, EU015236.1 e EU015328.1)], *patelii* [LMG 811 (EU015154.1, EU015246.1 e EU015338.1)] e *ricini* [LMG 861 (EU015159.1, EU015251.1 e EU015343.1)].

AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)

Análises de AFLP foram realizadas de acordo com VOS e colaboradores (1995), com algumas modificações. O DNA genômico (250 ng) foi clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI* (Invitrogen) e ligado a adaptadores específicos com a enzima T4 DNA ligase, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen). Pré-amplificações não seletivas foram elaboradas em reações de 25 µL (volume final) com 0,2 µM de cada iniciador (E00 e M00), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,06 mM de dNTPs, 1,6 mM MgCl₂ e 5 µL da reação digestão/ligação diluída 10X. Os parâmetros utilizados para as pré-amplificações foram os seguintes: 94°C/2 min; 35 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/30 s e 72°C/1 min; e 72°C/10 min.

Os produtos gerados foram diluídos 20X e utilizados em novas reações de PCR com iniciadores seletivos. As amplificações foram realizadas em um volume final de 30 µL com 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM do iniciador E12, E20 ou E21 e 1,2 µM do iniciador M16. As condições de amplificação foram: um ciclo inicial a 94°C/2 min; seguido de duas

etapas de termociclagem (15 ciclos a 94°C/30 s, 65°C/30 s e 72°C/30 s; e 25 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/30 s e 72°C/1 min); e um ciclo final a 72°C/10 min. As sequências dos adaptadores e iniciadores utilizados nas análises de AFLP estão listadas na Tabela 1. A separação e visualização dos fragmentos amplificados correram em eletroforese de cuba vertical (Sequi-Gen GT System, Bio-Rad) com gel desnaturante de poliacrilamida (6%) e coloração à base de nitrato de prata (CRESTE et al., 2001).

Tabela 1. Adaptadores e oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism").

Adaptadores/Iniciadores	Sequência (5' → 3')
Adaptadores	
ECORI-1	CTCGTAGACTGCGTACC
ECORI-2	AATTGGTACGCAGTCTAC
MSEI-1	GACGATGAGTCCTGAG
MSEI-2	TACTCAGGACTCAT
Iniciadores	
E00	GACTGCGTACCAATTC
E12	E00 + AC
E20	E00 + GC
E21	E00 + GG
M00	GATGAGTCCTGAGTAA
M16	M00 + CC

BOX e ERIC-PCR

As reações de BOX e ERIC-PCR foram realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores BOX1R, ERIC1R e ERIC2 (CUBERO & GRAHAM, 2002; LOUWS et al., 1994). Todas as reações foram elaboradas em um volume final de 25 µL, contendo 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 1 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 min; 40 ciclos a 94°C/30 s, 48°C/30 s e 72°C/1 min; e um ciclo final de 72°C/10 min. Os

produtos gerados foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

Os perfis genéticos identificados por AFLP, BOX e ERIC-PCR foram comparados quanto à ausência (0) e presença (1) de bandas. As matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os dendrogramas construídos pelo método “unweighted neighbor-joining” (GASCUEL, 1997) no aplicativo DarWIN 5.0. O nível de confiança dos agrupamentos formados foi calculado por análise de bootstrap utilizando o mesmo programa (2000 repetições).

Perfil de amplificação de cassetes gênicos associados à integrons

Cassetes gênicos presentes em integrons foram analisados de acordo com o perfil de amplificação gerado por PCR com os iniciadores MRG17 e AJH60 (GILLINGS et al., 2005). Com esta PCR é esperada a amplificação de várias bandas de diferentes tamanhos. As amplificações foram realizadas em reações de 50 µL (volume final) com 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão da enzima 1X, 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. Os parâmetros utilizados para as amplificações foram: 94°C/3 min; 35 ciclos a 94°C/45 s, 62°C/45 s e 72°C/2 min; e 72°C/10 min.

Resultados

Isolamento bacteriano, postulado de Koch e patogenicidade

Colônias típicas de *Xanthomonas*, isoladas de folhas sintomáticas de citrumelo 'Swingle' naturalmente infectadas, induziram sintomas semelhantes aos observados no campo após inoculação em folhas de citrumelo 'Swingle' mantidas em casa de vegetação. Os sintomas constituíram-se em manchas achatadas com o centro necrótico rodeado por um halo amarelo, como induzido por alguns isolados de Xacm (GRAHAM et al, 1990a; 1990b). Os postulados de Koch foram concluídos após reisolamento de colônias típicas de *Xanthomonas*.

As inoculações em folhas imaturas de diferentes genótipos de citros, realizadas com agulhas submersas nas suspensões bacterianas, demonstraram agressividade limitada dos isolados FDC 1637/1638 (Figura 2). Os sintomas provocados por esses isolados constituíram-se em manchas achatadas com necrose e foram observados em limão 'Cravo', tangerinas 'Cravo' e 'Cleópatra', citrumelo 'Swingle' e lima ácida 'Galego'. Tangerina 'Ponkan', limão 'Siciliano', lima ácida 'Tahiti', laranja doce 'Hamlin' e pomelo 'Grapefruit' não apresentaram sintomas evidentes de infecção do patógeno. Xacm FDC 1510 induziu o mesmo tipo de sintomas em limão e tangerina 'Cravo', limas ácidas 'Galego' e 'Tahiti' e citrumelo 'Swingle', mas não em tangerinas 'Ponkan' e Cleópatra, limão Siciliano, laranja 'Hamlin' e pomelo 'Grapefruit' (Figura 2). Claramente, Xacm FDC 1510 foi mais agressivo em citrumelo 'Swingle' do que os isolados FDC 1637/1638. O isolado 306 de Xcc, como esperado, induziu lesões erumpentes, típicas do cancro cítrico, em todos os genótipos de citros testados.

Nas inoculações realizadas por infiltração da suspensão bacteriana em folhas imaturas, os isolados investigados (FDC 1637 e 1638) infectaram citrumelo 'Swingle', limões 'Cravo' e 'Siciliano', lima ácida 'Galego', tangerina 'Cravo' e pomelo 'Grapefruit' (Figura 3). Nenhuma infecção ocorreu após a inoculação em laranja 'Hamlin', lima ácida 'Tahiti' e tangerina 'Ponkan'. Tangerina 'Cleópatra' não apresentou sintoma típico de infecção e o reisolamento do patógeno foi possível a partir deste genótipo três semanas após a inoculação. Em comparação com os demais isolados analisados, o isolado 306 foi mais agressivo em todos os genótipos de citros, com reações hiperplásticas características (Figura 3). O isolado de Xacm da Flórida (FDC 1510) apresentou algumas reações diferentes em comparação com os isolados FDC 1637/1638.

Nenhuma infecção ocorreu após a inoculação de ambos os isolados em tangerina 'Ponkan', contudo os isolados FDC 1637/1638 aparentemente induziram reação de hipersensibilidade (HR), não observada para o isolado da Flórida. Além disso, o isolado FDC 1510 não infectou tangerina 'Cravo', mas uma infecção extensa dos tecidos ocorreu após inoculação desse genótipo.

Do mesmo modo, os testes de patogenicidade realizados em folhas maduras de citros, por infiltração no limbo foliar, também demonstraram limitada patogenicidade dos isolados FDC 1637/1638 e FDC 1510. Os isolados investigados (FDC 1637/1638) infectaram apenas citrumelo 'Swingle', enquanto o isolado de Xacm (FDC 1510) foi patogênico para citrumelo 'Swingle', pomelo 'Grapefruit' e lima ácida 'Galego'. Contudo, ambos provocaram sintomas típicos de MBC em citrumelo 'Swingle' (Figura 4). O isolado 306 de Xcc causou lesões com hiperplasia e amarelecimento em todas as variedades cítricas testadas (resultados não apresentados).

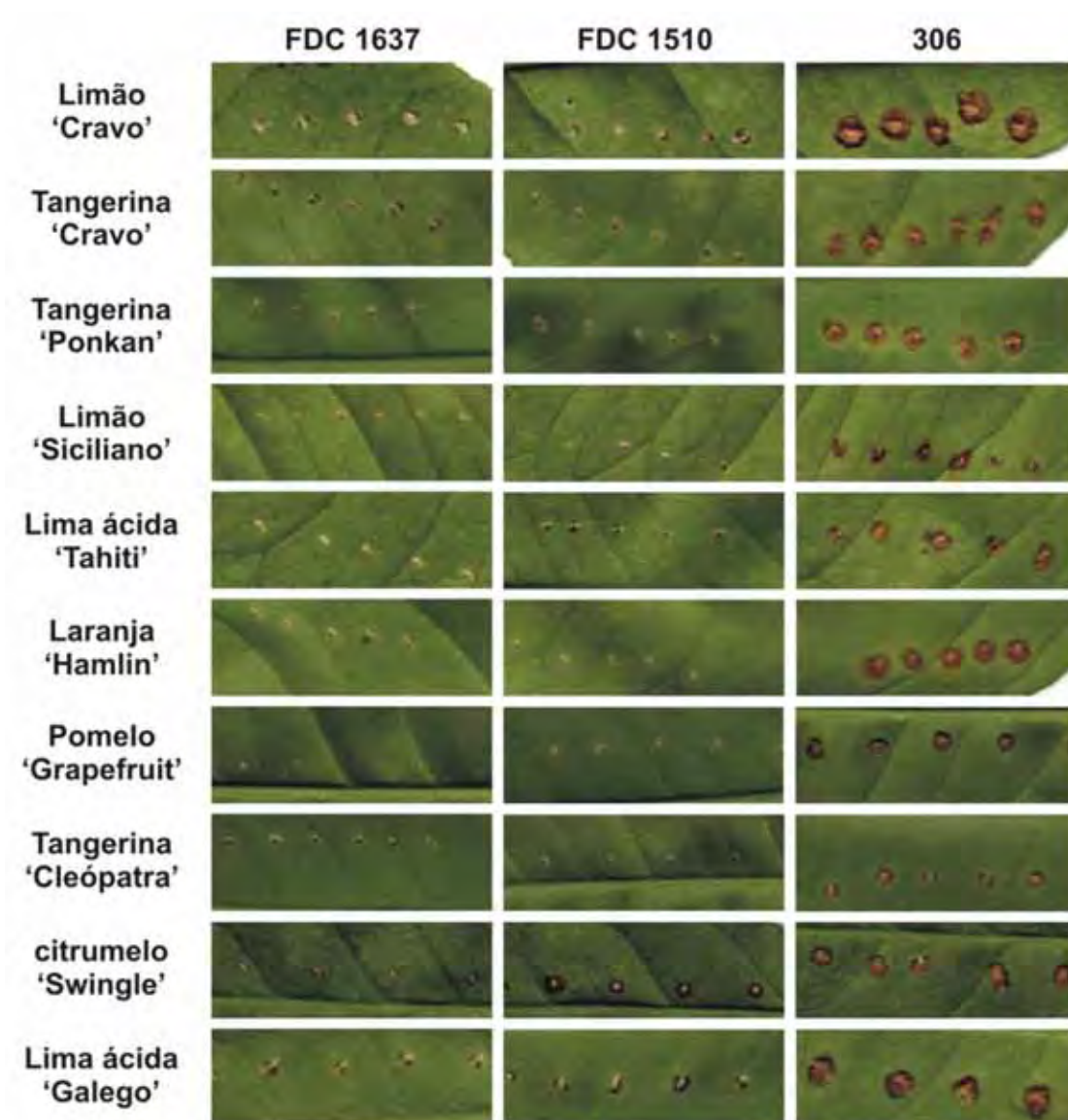


Figura 2. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (60 dias após a inoculação) provocados pelos isolados FDC 1637 (*Xanthomonas alfalfae*), FDC 1510 (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*) e 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) após perfuração do limbo foliar com agulhas imersas nas suspensões bacterianas.

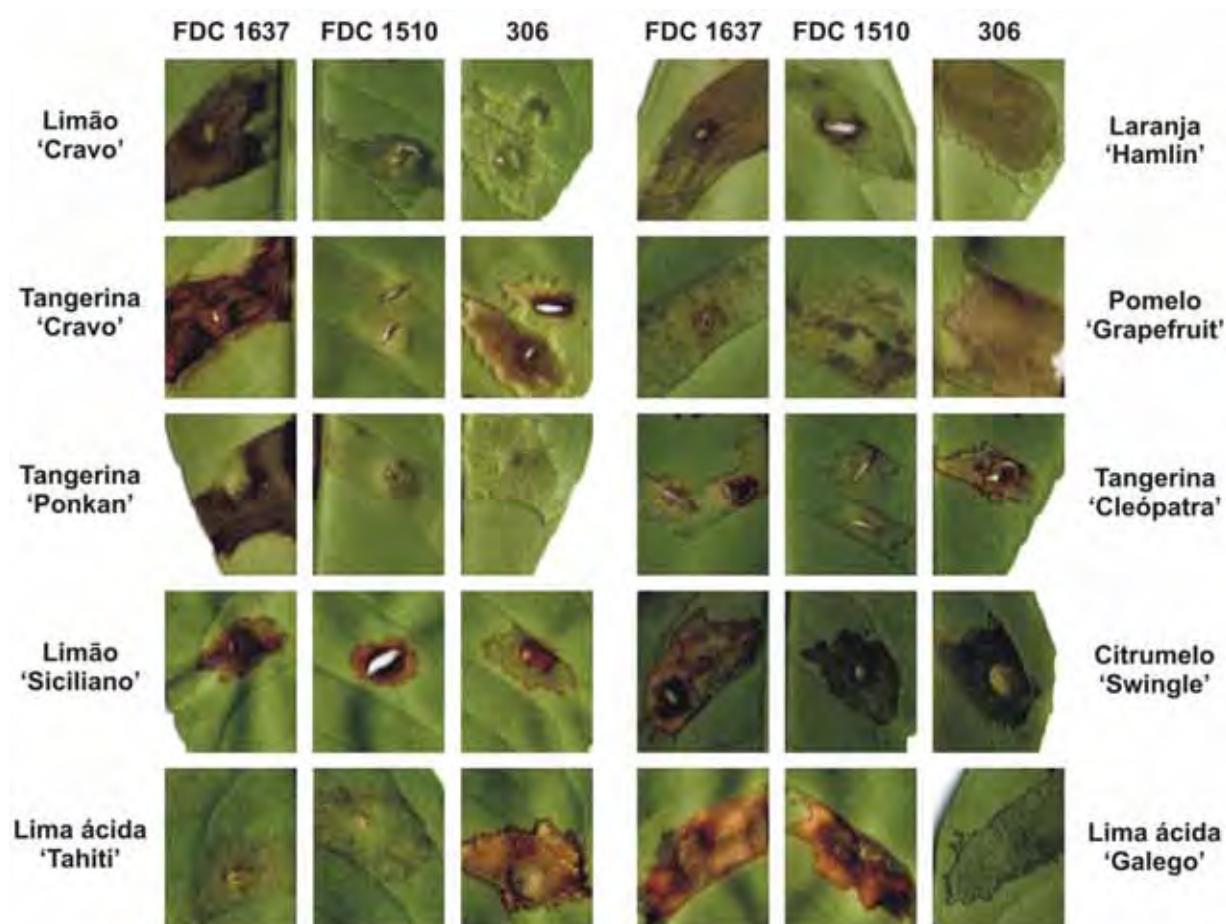


Figura 3. Sintomas decorrentes dos testes de patogenicidade em genótipos de citros (entre 4 e 12 dias após a inoculação) provocados pelos isolados FDC 1637 (*Xanthomonas alfalfae*), FDC 1510 (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*) e 306 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) após infiltração da suspensão bacteriana no limbo foliar com auxílio de seringas hipodérmicas sem agulha.

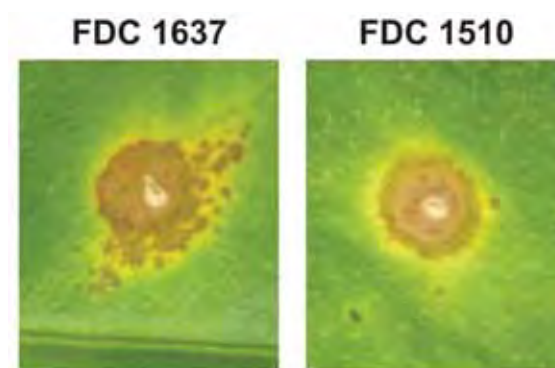


Figura 4. Sintomas provocados pelos isolados FDC 1637 (*Xanthomonas alfalfae*) e FDC 1510 (*Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*) em folhas maduras de citrumelo 'Swingle' 30 dias após a inoculação.

Análise de sequências

Um total de 2035 nucleotídeos (nt) do operon ribossômico dos isolados FDC 1637 e 1638 foram sequenciados, incluindo o gene 16S rDNA (1498 pb), a região intergênica (513 pb) e um pequeno fragmento do gene 23S rDNA (24 pb). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de *Xanthomonas* spp. patogênicas aos citros previamente depositadas no GenBank. Os isolados FDC 1637 e 1638 apresentaram 100% de similaridade entre si e diferiram por oito nt (99,6%) do isolado 306 de Xcc. Comparados com isolados dos tipos B (X84) e C (X341) de Xfa, o nível de similaridade foi de 99,6% (7 nt diferentes) e 99,5% (10 nt), respectivamente. A similaridade dos isolados investigados com Xacm (F1) foi de 99,8% (3 nt). Comparando-se apenas a região intergênica 16S-23S (ITS), os isolados FDC 1637 e 1638 diferiram em apenas um único nucleotídeo do isolado F1 de Xacm (Tabela 2). A comparação das sequências dessa região dos isolados FDC 1637 e 1638 com o isolado patótipo de Xacm (FDC 1510) foi de 100% (resultado não apresentado). A comparação da sequência parcial do gene *lrp* (460 pb) com sequências do NCBI indicou 99,3% de similaridade (3 nt diferentes) entre os isolados investigados (FDC 1637 e 1638) e os isolados F11, CBS1 e X0039 de Xacm originários da Flórida. Quando comparados com

Xcc (isolado 306) e Xfa (X64 e 2905), os isolados estudados apresentaram similaridade de 96,7% (15 nt) e 97,2% (13 nt), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Diferenças no número de nucleotídeos (esquerda, abaixo) e porcentagem de similaridade de sequências (direita, acima) do operon ribossômico, incluindo a sequência parcial do gene 16S rDNA, a região intergênica (ITS) e uma porção do gene 23S rDNA, e do gene *lrp* de isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros.

Organismo	16S-23S rDNAs (2035 pb) ^a					
	FDC 1637	FDC 1638	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
				Tipo B	Tipo C	
FDC 1637		100,0	99,6	99,6	99,5	99,8
FDC 1638	0		99,6	99,6	99,5	99,8
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	8	8		99,4	99,3	99,4
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B	7	7	11		99,5	99,5
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C	10	10	14	9		99,4
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	3	3	11	10	13	
Organismo	ITS (513 pb)					
	FDC 1637	FDC 1638	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
				Tipo B	Tipo C	
FDC 1637		100,0	98,6	99,2	98,6	99,8
FDC 1638	0		98,6	99,2	98,6	99,8
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	7	7		98,6	98,0	98,4
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B	4	4	7		99,4	99,0
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C	7	7	10	3		98,4
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	1	1	8	5	8	
Organismo	<i>lrp</i> (460 pb)					
	FDC 1637	FDC 1638	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
				Tipo B	Tipo C	
FDC 1637		100,0	96,7	97,2	97,2	99,3
FDC 1638	0		96,7	97,2	97,2	99,3
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	15	15		97,8	99,8	96,5
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B	13	13	10		99,6	97,4
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C	13	13	10	2		97,4
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> ^b	3	3	16	12	12	

^aIncluindo a região ITS.

^bReferente a sequência do gene *lrp* dos isolados F11, CBS1 e X0039, que apresentaram 100% de similaridade.

Análises das sequências parciais dos genes *atpD* (747 pb) e *dnaK* (762 pb) mostraram mais de 99% de similaridade entre as sequências dos isolados FDC 1637 e 1638 com isolados de Xacm previamente caracterizados (CFBP 2910, CFBP 3138 e JJ238-28). Maiores diferenças foram observadas nas análises da sequência parcial do

gene *gyrB* (773 pb). Para este gene as similaridades foram de 99,2% (6 nt), 98,6% (11 nt) e 98,3% (13 nt) em comparação com os isolados CFBP 2910, CFBP 3138 e JJ238-28, respectivamente, com similaridade média de 98,7%. Nas comparações com o isolado 306 de Xcc a similaridade observada foi de 97,7% (18 nt) e com os isolados tipos B (CFBP 2866) e C (CFBP 2868) de Xfa, que apresentaram sequências idênticas, foi de 96,8% (25 nt). Observa-se nas Figuras 5, 6 e 7 o agrupamento das bactérias isoladas no Brasil (FDC 1637/1638) com Xa, Xacm e patovares de *X. axonopodis* e maiores distâncias destes isolados em relação a Xcc e Xfa (tipos B e C).

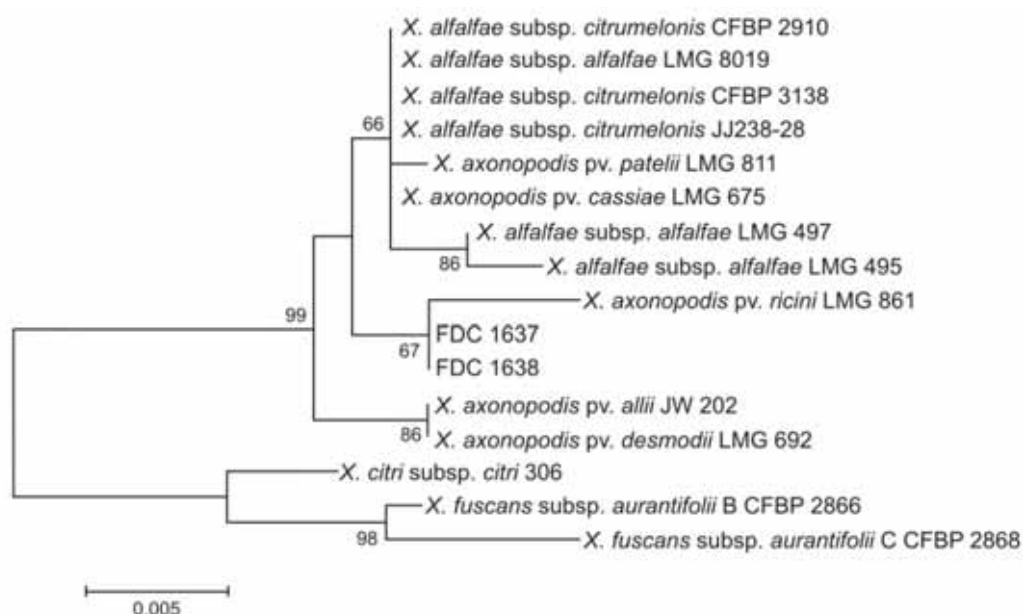


Figura 5. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas* com base na sequência parcial do gene *atpD*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações).

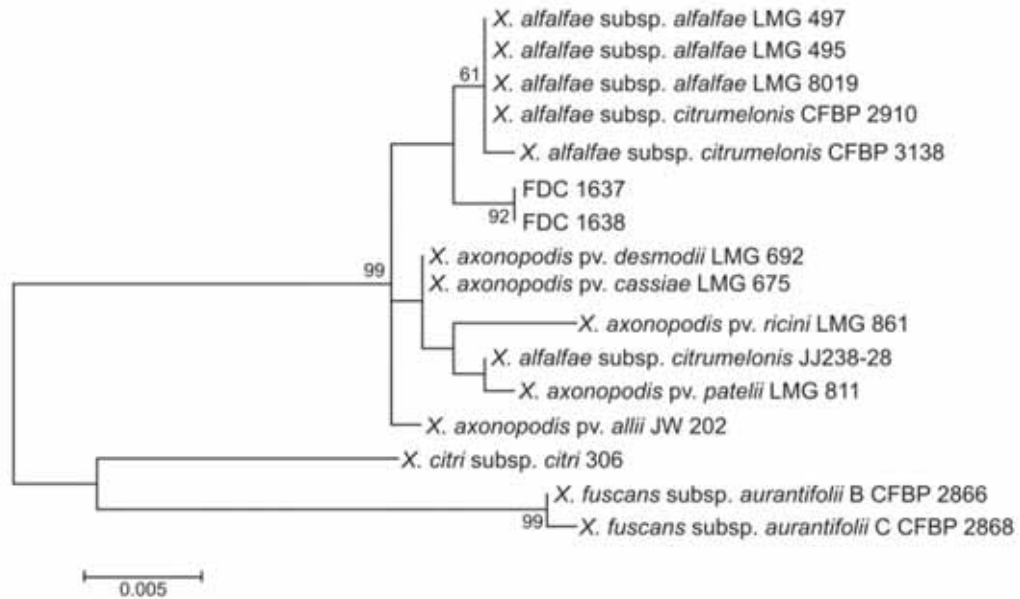


Figura 6. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas* com base na sequência parcial do gene *dnaK*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações).

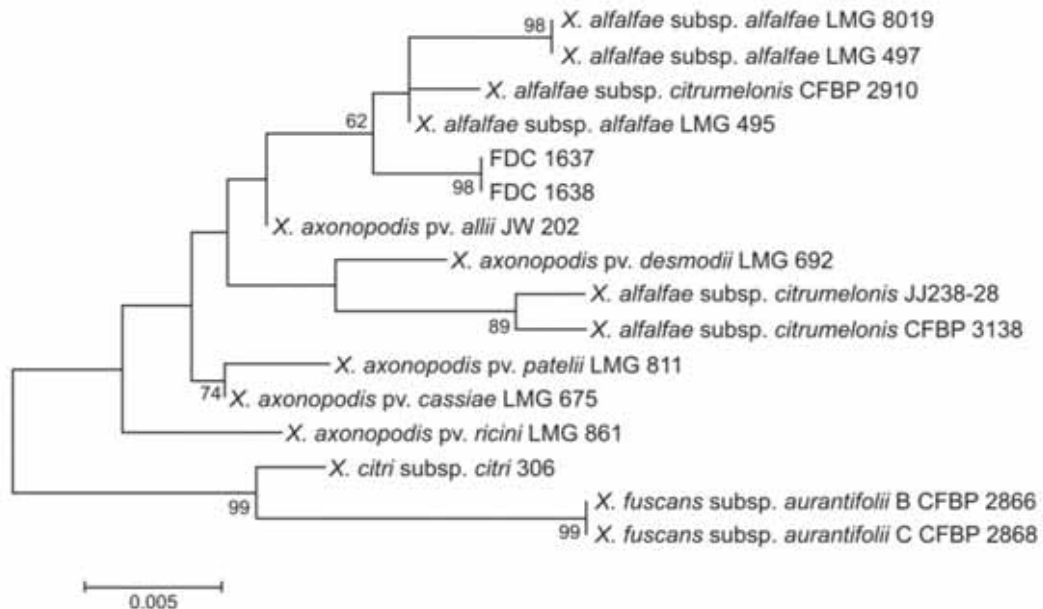


Figura 7. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas* com base na sequência parcial do gene *gyrB*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações).

As análises por MLSA utilizando as sequências parciais combinadas dos genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB* dos isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros e de isolados de *Xanthomonas* geneticamente relacionados (*X. alfafe* e *X. axonopodis*) estão apresentadas na Tabela 3. A similaridade observada entre os isolados FDC 1637/1638 com os isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros, com base nas sequências combinadas destes genes (2282 pb), foi de 97,1% (diferindo em 65 nt), 96,6% (77 nt) e 96,4% (81 nt) com Xcc, Xfa-B e Xfa-C, respectivamente, 99,3% (valor médio) com os isolados CFBP 2910, CFBP 3138 e JJ238-28 de Xacm (12, 18 e 19 nt diferentes, respectivamente) e de 99,4% (valor médio) com os isolados LMG 495, 497 e 8019 de Xaa (14, 15 e 13 nt diferentes, respectivamente). Na Figura 8 observa-se o agrupamento dos isolados FDC 1637/1638 com isolados de Xaa e Xacm e maiores distâncias em relação à Xcc e aos tipos B e C de Xfa. Os resultados obtidos com as análises das sequências parciais dos três “housekeeping genes”, por locus sequenciado ou pela técnica de MLSA, permitiram observar uma relativa diversidade entre os isolados de Xaa, Xacm e *X. axonopodis*, incluindo os isolados investigados (FDC 1637 e 1638).

Tabela 3. Diferenças no número de nucleotídeos (esquerda, abaixo) e porcentagem de similaridade de sequências (direita, acima) dos genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB* de bactérias do gênero *Xanthomonas*: *X. alfalfae* (Xa), *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (Xaa), *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), *X. axonopodis* pvs. *alii* (Xaal), *cassiae* (Xac), *desmodii* (Xad), *patelii* (Xap) e *ricini* (Xar), *X. citri* subsp. *citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B (Xfa-B) e C (Xfa-C).

		Xa	Xaa			Xacm			Xaal	Xac	Xad	Xap	Xar	Xcc	Xfa-B	Xfa-C
Espécie	Isolado	FDC 1637	LMG 495	LMG 497	LMG 8019	CFBP 2910	CFBP 3138	JJ238-38	JW 202	LMG 675	LMG 692	LMG 811	LMG 861	306	CFBP 2866	CFBP 2868
Xa	FDC 1637	-	99,4	99,3	99,4	99,5	99,2	99,2	99,2	99,2	99,1	99,1	98,9	97,1	96,6	96,4
Xaa	LMG 495	14	-	99,7	99,6	99,7	99,2	99,2	99,2	99,3	99,0	99,1	98,7	97,3	96,7	96,6
	LMG 497	15	6	-	99,9	99,6	99,4	99,3	99,2	99,2	99,0	99,0	98,7	97,3	96,8	96,7
	LMG 8019	13	8	2	-	99,7	99,5	99,4	99,2	99,3	99,1	99,1	98,7	97,3	96,8	96,7
Xacm	CFBP 2910	12	6	8	6	-	99,3	99,2	99,3	99,4	99,2	99,3	98,7	97,3	96,7	96,6
	CFBP 3138	18	18	14	12	16	-	99,6	99,2	99,3	99,1	99,1	98,7	97,4	96,9	96,7
	JJ238-38	19	19	15	13	17	9	-	99,1	99,6	99,2	99,4	98,9	97,3	96,9	96,7
Xaal	JW 202	17	17	19	17	15	19	20	-	99,6	99,6	99,2	99,0	97,5	96,9	96,7
Xac	LMG 675	17	15	17	15	13	15	10	10	-	99,4	99,7	99,2	97,5	97,0	96,8
Xad	LMG 692	21	23	23	21	19	20	17	8	13	-	99,2	98,9	97,3	96,8	96,6
Xap	LMG 811	20	20	22	20	16	20	13	17	7	18	-	99,0	97,2	96,7	96,5
Xar	LMG 861	26	30	30	28	28	30	25	23	18	26	23	-	97,2	96,8	96,7
Xcc	306	65	62	62	62	62	59	61	56	56	61	63	63	-	98,1	97,9
Xfa-B	CFBP 2866	77	74	72	72	74	71	71	70	68	73	75	72	42	-	99,7
Xfa-C	CFBP 2868	81	78	75	76	78	75	75	74	72	77	79	76	47	7	-

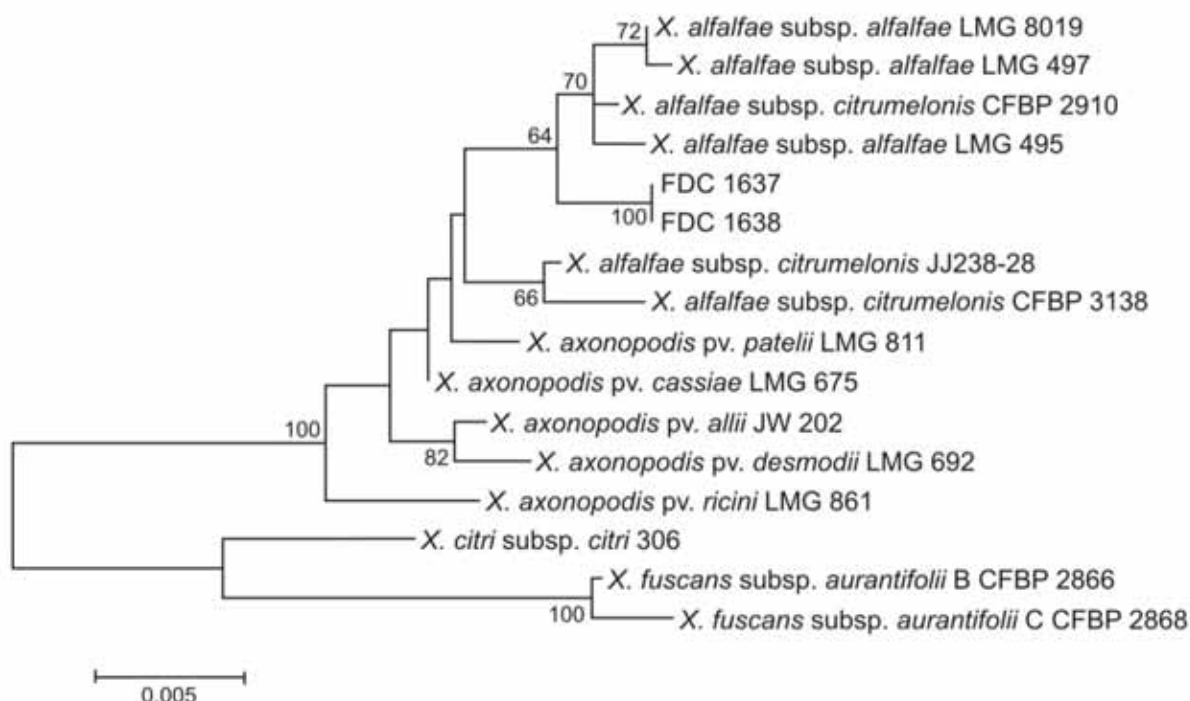


Figura 8. Análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, modelo de Tamura-Nei (MEGA 5), ilustrando as relações entre espécies de *Xanthomonas*, com base nas sequências parciais conectadas dos genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB*. Números acima dos ramos representam os valores de bootstrap (2000 replicações).

“DNA fingerprinting”

O tamanho dos fragmentos gerados por AFLP com cada um dos três pares de iniciadores utilizados variaram aproximadamente de 50 a 800 pb. De 12 a 22 fragmentos foram identificados na análise conjunta dos dados. As análises por BOX-PCR geraram de 7 a 11 fragmentos, de 250 a 1500 pb, aproximadamente. Por ERIC-PCR foram observados de 9 a 12 fragmentos de aproximadamente 150 a 2500 pb (Figura 9). As três metodologias testadas permitiram a identificação de cinco padrões de bandas, correspondentes a cada uma das espécies de *Xanthomonas* analisadas e aos isolados FDC 1637 e 1638, que apresentaram o mesmo perfil genético. Os dendrogramas gerados com os dados de AFLP e dos resultados combinados de BOX e

ERIC-PCR, permitiram a separação das diferentes espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros e o agrupamento dos isolados investigados (FDC 1637 e 1638) com Xacm (Figura 10).

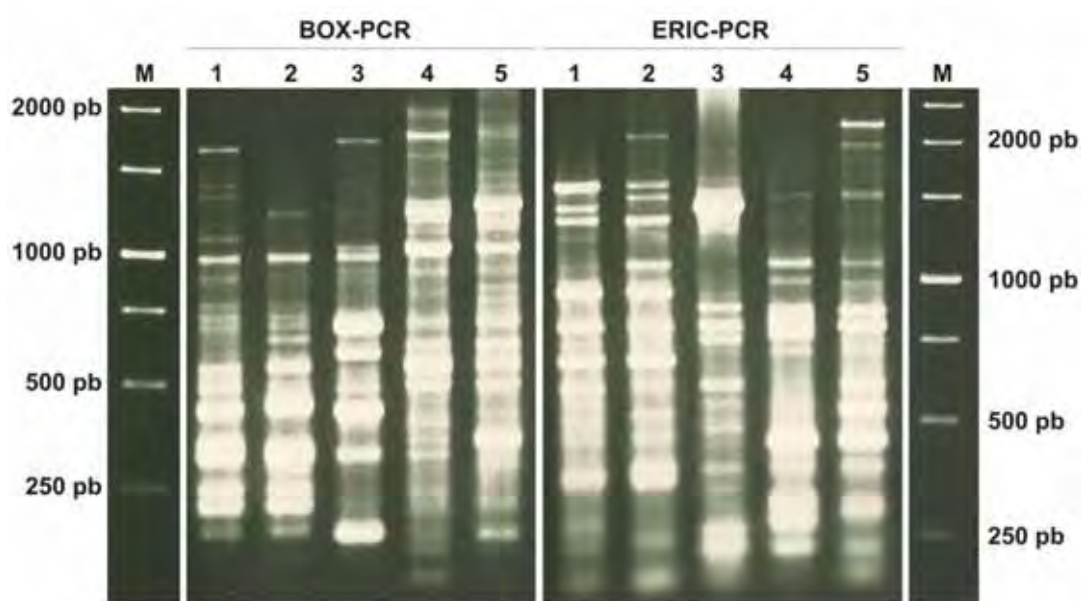


Figura 9. Padrão de amplificação de isolados de *Xanthomonas* ssp por BOX e ERIC-PCR. Coluna (1) isolado FDC 1637 (*X. alfalfae*), (2) FDC 1510 (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*), (3) 306 (*X. citri* subsp. *citri*), (4) 11122 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B) e (5) 10535 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

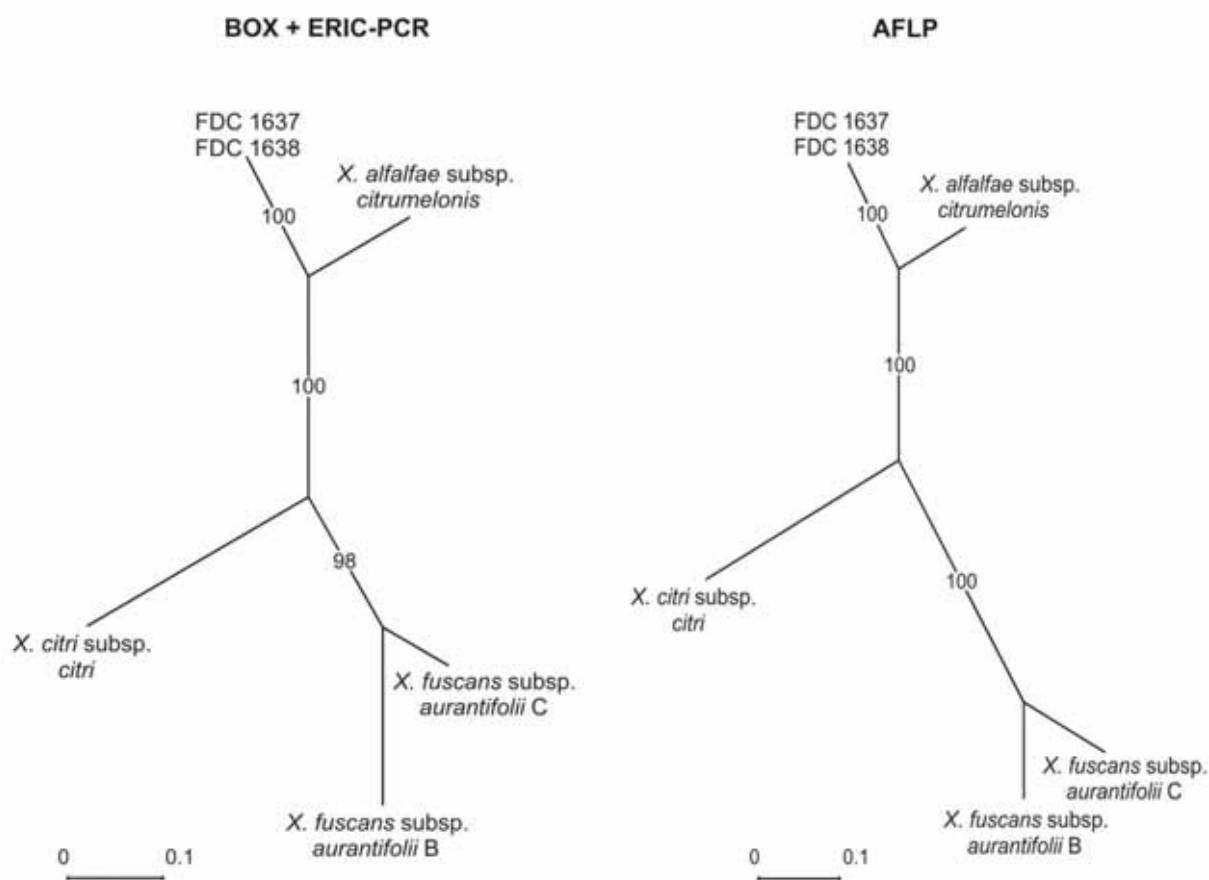


Figura 10. Dendrogramas (“unweighted neighbor-joining”) ilustrando a diversidade genética entre as espécies de *Xanthomonas* patogênicas aos citros com base nos marcadores BOX e ERIC-PCR e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”). Além dos isolados FDC 1637 e 1638, as análises incluíram os isolados 306 de *X. citri* subsp. *citri*, 11122 de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* B, 10535 de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* C e FDC 1510 de *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*.

Arranjo de cassetes gênicos

Os isolados de *Xanthomonas* analisados quanto ao padrão de amplificação de cassetes gênicos de integrons apresentaram de três a sete bandas e o perfil foi único para cada um dos patótipos de *Xanthomonas* causadores de doença nos citros (Xacm,

Xcc, Xfa-B e Xfa-C) e para os isolados investigados (FDC 1637 e 1638), que apresentaram o mesmo perfil (Figura 11).

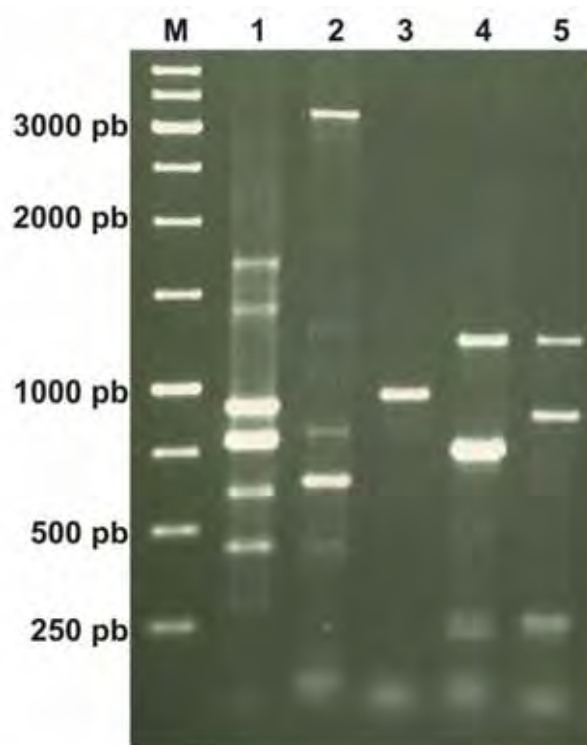


Figura 11. Padrão de amplificação de cassetes gênicos de integrons observados em isolados de *Xanthomonas* ssp. Coluna (1) isolado FDC 1637 (*X. alfalfae*), (2) FDC 1510 (*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*), (3) 306 (*X. citri* subsp. *citri*), (4) 11122 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B) e (5) 10535 (*X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C). M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas).

Discussão

No presente trabalho é relatada pela primeira vez no Brasil a presença de *Xanthomonas alfalfae* (Xa). Esse patógeno foi detectado no Estado de São Paulo em Novembro de 2009 e as lesões estavam associadas a injúrias provocadas pelo minador dos citros. Os sintomas foram observados em folhas de citrumelo 'Swingle' e caracterizavam-se por lesões achatadas, circulares, rodeadas por halo amarelo, não erumpentes. Por inoculações artificiais, dois isolados obtidos das lesões de campo

(FDC 1637 e 1638) apresentaram patogenicidade limitada, similar ao isolado FDC 1510 de *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm). No entanto, este último isolado foi mais agressivo em citrumelo 'Swingle' que os isolados FDC 1637/1638. Diferenças entre estes isolados também foram observadas após inoculações nas tangerinas 'Cravo' e 'Ponkan'. Os isolados de Xa descritos no presente estudo provavelmente pertencem à subespécie *citrumelonis*, no entanto, essa hipótese precisa ser comprovada mediante a caracterização de um número maior de isolados de *Xanthomonas* geneticamente relacionados (*X. alfalfae* subsp. *alfalfae* e *X. axonopodis* pvs. *allii*, *cassiae*, *desmodii*, *patellii* e *ricini*) e a comparação desses com os isolados FDC1637/1638.

Por inoculações com ferimentos com agulhas observou-se claramente que tanto os isolados de Xa detectados no Brasil como o isolado de Xacm (FDC 1510) possuem patogenicidade restrita à citrumelo 'Swingle', comparado aos demais genótipos de citros testados no presente estudo (laranja doce, limas ácidas, limões e tangerinas). Além disso, como observado por esse método de inoculação, os isolados FDC 1637/1638 são pouco agressivos mesmo em citrumelo 'Swingle', embora tenham sido detectados nesse porta-enxerto em condições de campo. Quando inoculados em folhas maduras, esses isolados incitaram sintomas de MBC somente em citrumelo 'Swingle', enquanto o isolado de Xacm foi patogênico a citrumelo 'Swingle', lima ácida 'Galego' e 'Grapefruit', confirmando os resultados obtidos por outros autores (GRAHAM et al., 1990a).

A gama de hospedeiros, agressividade e dinâmica populacional de lesões de Xacm e Xcc são diferentes (GRAHAM et al., 1990a; 1990b). Isolados de Xcc são homogêneos, muito mais agressivos e com uma gama mais ampla de hospedeiros do que Xacm (GOTTWALD et al., 1993). Embora a MBC tenha sido identificada em mais de vinte genótipos de citros na Flórida, o hospedeiro mais frequente é o citrumelo 'Swingle' (GRAHAM et al., 1990b). As ocorrências de MBC na Flórida foram relacionadas a três grupos de isolados de Xacm, correlacionados com a agressividade em citrumelo 'Swingle'. Os isolados mais agressivos induzem anasarca distinta e maior necrose do que os menos agressivos (EGEL et al., 1991). Os isolados investigados no presente estudo não induziram anasarca e apenas manchas muito pequenas foram observadas. Estes resultados indicam que os isolados aqui descritos são pouco

agressivos, similar aos isolados de Xacm menos agressivos caracterizados por GRAHAM e colaboradores (1990a; 1990b) e GRAHAM & GOTTWALD (1990).

Os isolados menos agressivos de Xacm são geneticamente muito diversos em comparação com Xcc e com o tipo mais agressivo de Xacm (GABRIEL et al., 1988; GABRIEL et al., 1989; GRAHAM et al., 1990a; 1990b; HARTUNG & CIVEROLO, 1989). Métodos moleculares usualmente adotados para caracterização de microrganismos foram utilizados no presente estudo (AH-YOU et al., 2009; CUBERO & GRAHAM, 2002; 2004; HAUBEN et al., 1997; PARKINSON et al., 2007; 2009; RADEMAKER et al., 2005; SCHAAD et al., 2005; VALVERDE et al., 2007). Comparações da sequência de nucleotídeos dos genes 16S-23S rDNA, *atpD*, *dnaK*, *gyrB* e *lrp* revelaram alta similaridade (>99%) entre os isolados investigados (FDC 1637 e 1638) e isolados de Xacm. As sequências do gene 16S rDNA apresentaram maior similaridade do que a região ITS, como esperado e observado por outros autores em *Xanthomonas* (HAUBEN et al., 1997; SCHAAD et al., 2005). Como previamente observado, as análises da sequência do gene *lrp* permitiram distinguir as três espécies de *Xanthomonas* causadoras de doença nos citros, além de diferenciar os tipos B e C de Xfa (CUBERO & GRAHAM, 2004).

Os isolados FDC 1637 e 1638 investigados no presente estudo agruparam-se por MLSA com isolados de Xa, Xacm e com *X. axonopodis* pvs. *allii*, *cassiae*, *desmodii*, *patelii* e *ricini*. GRAHAM e colaboradores (1990b) sugerem que somente o tipo mais agressivo de Xacm é capaz de causar MBC, e que os isolados menos agressivos são patógenos oportunistas identificados em citros. Segundo estes autores, a causa de vários focos de MBC pode ser atribuída a isolados pertencentes a outros patovares de *Xanthomonas*. Como discutido por GOTTWALD e colaboradores (1991), a diversidade de isolados de Xacm pode ser resultado de uma população de organismos oportunistas. EGEL e colaboradores (1991) observaram a presença contínua de isolados de Xacm pouco agressivos na superfície de folhas de citrumelo 'Swingle' e pomelo 'Grapefruit' e a ausência de populações internas deste patógeno, indicando uma possível sobrevivência epifítica que poderia atuar como fonte de inóculo não dependente de lesões da doença. Além disso, de acordo com GABRIEL e colaboradores (1988), o

polimorfismo genético observado nos isolados de Xacm é um indicativo de uma gama de hospedeiros maior do que apenas a genótipos de citros. A existência de isolados de Xacm pouco agressivos a citros sugere que eles foram apenas incidentalmente isolados desses hospedeiros (GABRIEL et al., 1989).

SCHAAD e colaboradores (2005; 2006) apenas recentemente reclassificaram as *Xanthomonas* patogênicas aos citros, separando os diferentes patótipos em três espécies: *X. citri* subsp. *citri*, agente etiológico do cancro cítrico, formado por um grupo homogêneo em termos genéticos e patogênicos; *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, causador da MBC; e *X. fuscans* subsp. *fuscans*, agente causal das cancroses B e C, descritas apenas na América do Sul. As subespécies de *X. alfalfae* e *X. fuscans* patogênicas aos citros são representadas por grupos heterogêneos de patógenos, com limitada agressividade e gama de hospedeiros cítricos e restritos geograficamente.

Entretanto, anos antes desta classificação atual, GABRIEL e colaboradores (1988; 1989) observaram que os isolados associados com a MBC eram genética e patogenicamente diferentes de Xcc e, portanto, deveriam ser considerados como um grupo diferente. Além disso, esses autores relataram que pelo menos alguns isolados de Xacm eram intimamente relacionados com patovares de *X. campestris*, como por exemplo, Xa. Segundo esses autores, em razão da variabilidade das estirpes menos agressivas de MBC, estes isolados podem representar diferentes patovares de *X. campestris*, os quais atacam citros como hospedeiro secundário apenas sob certas condições ambientais. Inoculações em genótipos de citros realizados com isolados de *Xanthomonas* não patogênicos aos citros (*X. campestris* pvs. *alfalfae*, *fici*, *pelargonii* e *dieffenbachiae*) resultaram em reações semelhantes às provocadas pelos isolados de Xacm menos agressivos (GRAHAM et al., 1990b). Em razão disso, e com base nos resultados relatados no presente estudo, supõe-se que os isolados FDC 1637/1638 detectados no Brasil provavelmente não tinham os citros como hospedeiros originais, mas foram apenas incidentalmente detectados nesse hospedeiro.

As amplificações de cassetes gênicos associados à integrons revelaram um padrão único para cada patótipo de *Xanthomonas* causador de doença em citros, com exceção dos isolados FDC 1637/1638 que apresentaram perfil diferente de Xacm. Os

integrans são elementos genéticos capazes de adquirir e expressar genes exógenos (cassetes gênicos) por um mecanismo de recombinação sítio-específica. Os iniciadores MRG17 e AJH60 (GILLINGS et al., 2005), utilizados no presente estudo, são complementares, respectivamente, ao gene *intl*, presente no integron, e ao sítio de recombinação *attC* do cassete gênico. Variações no número de fragmentos amplificados podem ocorrer devido à quantidade de cassetes gênicos presentes em cada integron. Diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas* têm sido analisadas por esta metodologia, e o perfil de amplificação observado é basicamente único para cada patovar analisado e idêntico em isolados do mesmo patovar (BARIONOVI & SCORTICHINI, 2008; GILLINGS et al., 2005; VALVERDE et al., 2007).

Da mesma forma, a caracterização de cassetes gênicos dos isolados patogênicos aos citros utilizados como referência no presente estudo permitiu identificar um perfil característico para cada espécie/patótipo. Os isolados FDC 1637 e 1638 apresentaram perfis de amplificação iguais entre si, porém diferentes do isolado FDC 1510 de Xacm, impossibilitando assim, pelo menos aparentemente, o uso dessa técnica como “fingerprint” no agrupamento de isolados pertencentes à mesma espécie/patótipo. Por outro lado, por AFLP, BOX e ERIC-PCR, cada espécie/patótipo de *Xanthomonas* apresentou um padrão único de “fingerprinting”, e os isolados FDC 1637/1638 agruparam-se com Xacm de modo semelhante ao observado para os tipos B e C de Xfa. Assim como os dois patótipos de Xfa, os isolados FDC1637/1638 e de Xacm estão restritos geograficamente e apresentam algum grau de variação na patogenicidade. Xacm e Xfa são grupos heterogêneos com limitada gama de hospedeiros e agressividade em citros.

Trifoliatas e seus híbridos (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) são os principais hospedeiros dos isolados de Xacm mais agressivos, como descrito previamente (GRAHAM et al., 1990a). Foi postulado ainda que os isolados menos agressivos são transmitidos apenas mecanicamente e o principal modo de entrada dessa bactéria no hospedeiro é por meio de ferimentos (GOTTWALD & GRAHAM, 1990; GRAHAM & GOTTWALD, 1990). Os maiores surtos de MBC na Flórida estavam associados com ‘Grapefruit’ e porta-enxertos de citrumelo ‘Swingle’, e com lesões que apresentavam

centros necróticos e extensa e persistente anasarca. Da mesma forma, surtos menos severos foram caracterizados por lesões mais limitadas em tamanho e com ausência de anasarca (GABRIEL et al, 1988;. GOTWALD & GRAHAM, 1990;. GOTTWALD et al, 1989).

Como demonstrado por GRAHAM & GOTTWALD (1990), os isolados de Xacm menos agressivos associados à MBC na Flórida induzem manchas que nem sempre estão estendidas por todo o sítio de inoculação, como observado no presente estudo com o isolado FDC 1510, e principalmente com os isolados FDC 1637/1638. Além disso, os surtos de MBC ocorreram em mais de 30 viveiros e pomares de citros da Flórida até 1990, sendo que a maioria dos isolados procedentes de diferentes viveiros pertencia ao grupo de isolados menos agressivos (GRAHAM & GOTTWALD, 1990). De acordo com GOTTWALD e colaboradores (1992), as populações de isolados de Xacm moderadamente e pouco agressivos eram irregulares nas lesões de MBC de hospedeiros cítricos testados em casa de vegetação e no campo. Como postulado por GOTTWALD e colaboradores (1992), com base na agressividade limitada, pequena ou ausente disseminação natural, necessidade de feridas para penetrar no hospedeiro e incompatibilidade com os genótipos de citros utilizados comercialmente, os isolados FDC 1637 e 1638 descritos no presente estudo provavelmente não conferem risco para a produção de citros no Brasil.

Conclusões

Os isolados de *Xanthomonas* (FDC 1637 e 1638), detectados em uma planta de citrumelo ‘Swingle’ em Novembro de 2009 no município de Embaúba, Estado de São Paulo, pertencem à espécie *Xanthomonas alfalfae* (Xa), considerando as maiores similaridades observadas nas análises das sequências parciais do operon ribossômico 16S-23S rDNA e dos genes *atpD*, *dnaK*, *gyrB* e *lrp* desses patógenos em comparação às demais *Xanthomonas* patogênicas aos citros. Os isolados de Xa descritos no

presente estudo provavelmente pertencem à subespécie *citrumelonis*, contudo novos estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

Os isolados FDC 1637/1638 apresentaram patogenicidade limitada, similar ao isolado FDC 1510 de Xacm originário da Flórida. No entanto, este último isolado foi mais agressivo em citrumelo ‘Swingle’ que os isolados detectados no Brasil.

Com exceção das análises de cassetes gênicos associados à integrons, que apresentaram perfis de amplificação diferentes para os isolados 1637/1638 e de Xacm, todas as outras técnicas moleculares utilizadas (AFLP, BOX e ERIC-PCR) apresentaram um padrão único de “fingerprinting” para cada patótipo de *Xanthomonas* causador de doença nos citros.

O agrupamento dos isolados FDC 1637/1638 com espécies e patovares de *Xanthomonas* patogênicos a outros hospedeiros (*X. alfalfae* subsp. *alfalfae* e *X. axonopodis* pvs. *allii*, *cassiae*, *desmodii*, *patelii* e *ricini*) observado nas análises de MLSA (“Multi Locus Sequence Analysis”), sugerem que esses isolados provavelmente não tinham os citros como hospedeiros originais, mas foram apenas incidentalmente detectados nesse hospedeiro.

Com base na agressividade limitada, pequena ou ausente disseminação natural, necessidade de feridas para penetrar no hospedeiro e incompatibilidade com os genótipos de citros utilizados comercialmente, os isolados de Xa investigados provavelmente não conferem risco para a produção de citros no Brasil.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, T. B.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Phytopathology**, St Paul, v. 89, n. 7, p. 687–694, 1999.

ADHIKARI, T. B.; VERA CRUZ, C. M.; ZHANG, Q.; NELSON, R. J.; SKINNER, D. Z.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 966–971, 1995.

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 306–318, 2009.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 385–414, 2004.

AL-SAAD, A.; REDDY, J. D.; DUAN, Y. P.; BRUNINGS, A. M.; YUAN, Q.; GABRIEL, D. W. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 20, n. 8, p. 934–943, 2007.

ARBER, W. Biological evolution: lessons to be learned from microbial population biology and genetics. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 5, p. 297–300, 2004.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Wiley, 1995.

BARIONOVI, D.; SCORTICHINI, M. Integron variability in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 288, n. 1, p. 19–24, 2008.

BAULCOMBE, D. C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viroses in transgenic plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1833–1844, 1996.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A.; GRAHAM, J. H.; LEITE JR., R. P.; GOTTWALD, T. R. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, p. 807–813, 2008.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A.; LEITE JR., R. P. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 311–317, 2007.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR., J.; GRAHAM, J. H.; LEITE JR., R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 300–305, 2010.

BELASQUE JR., J. **Dinâmica espacial do cancro cítrico, interação com a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) e diversidade genética do seu agente causal (*Xanthomoans axonopodis* pv. *citri*)**. 2005. 171 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BELASQUE JR., J., BARBOSA, J. C., BERGAMIN FILHO, A., MASSARI, C. A. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 314–317, 2010.

BELASQUE JR., J.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 2, p. 91–92, 2009.

BENALI, S.; MOHAMED, B.; EDDINE, H. J.; NEEMA, C. Advances of molecular markers application in plant pathology research. **European Journal of Scientific Research**, v. 50, n. 1, p. 110–123, 2011.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R. B.; GOTTWALD, T. R. Epidemiologia e erradicação do cancro cítrico no Brasil: passado, presente e futuro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, p. S136–S140, 2006.

BERGEY, D. H.; HARRISON, F. C.; BREED, R. S.; HAMMER, B. W.; HUNTOON, F. M. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 1 ed. Baltimore, Estados Unidos: Williams & Wilkins Company, 1923. 442p.

BOSCARIOL, R. L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E. K.; CHABREGAS, S. M.; VIEIRA, M. L.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; CARDOSO, S. C.; CHRISTIANO, R. S. C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J. M.; AZEVEDO, F. A.; MENDES, B. M. J. *Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530–536, 2006.

BOUCHER, Y.; LABBATE, M.; KOENIG, J. E.; STOKES, H. W. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 15, n. 7, p. 301–309, 2007.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 3, p. 141–157, 2003.

BUI THI NGOC, L.; VERNIÈRE, C.; BELASQUE JR., J.; VITAL, K.; SEBASTIEN, B.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Ligation-mediated PCR, a fast and reliable technique for insertion sequence-based typing of *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 288, n. 1, p. 33–39, 2008.

BUI THI NGOC, L.; VERNIÈRE, C.; JARNE, P.; BRISSE, S.; GUÉRIN, F.; BOUTRY, S.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. From local surveys to global surveillance: Three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1173–1184, 2009.

BUI THI NGOC, L.; VERNIÈRE, C.; JOUEN, E.; AH-YOU, N.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 3, p. 515–525, 2010.

CAMPBELL, V.; LEGENDRE, P.; LAPOINTE, F. J. Assessing congruence among ultrametric distance matrices. **Journal of Classification**, New York, v. 26, p. 103–117, 2009.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO, P. T. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n.1, p. 55–59, 2001.

CIVEROLO, E. L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: **Citrus canker**: an international perspective. Lake Alfred: Citrus Research and Education Center, 1985. p. 11–17.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 4, p. 299–306, 2001.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1257–1264, 2002.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. The leucine responsive regulatory protein (*lrp*) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* spp.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 2, p. 429–437, 2004.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE JR., R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E.

C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA JR., H. A.; ROSSI A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETÚBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, n. 6887, p. 459–463, 2002.

DANÓS, E.; BERGER, R. D.; STALL, R. E. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. **Phytopathology**, St Paul, v. 74, n. 8, p. 904–908, 1984.

DERSO, E.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. First Report of *Xanthomonas citri* pv. *citri*-A* Causing Citrus Canker on Lime in Ethiopia. **Plant Disease**, St Paul, v. 93, n. 2, p. 203, 2009.

DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES NETO, J. Caracterização de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Tipo C) produtora de pigmento escuro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 3, p. 287–291, 2001.

DOIDGE, E. M. Citrus canker in South Africa. **South African Fruit Grower**, v. 3, p. 265–268, 1916.

DOWSON, W. J. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Stuttgart, v. 100, p. 177–193, 1939.

DUAN, Y. P.; CASTAÑEDA, A.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D. W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division,

enlargement, and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 12, n. 6, p. 556–560, 1999.

DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; GOTO, M.; HAYWARD, A. C.; LELLIOT, R. A.; SCHROTH, M. N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, n. 59, p. 153–168, 1980.

EGEL, D. S.; GRAHAM, J. H.; STALL, R. E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2724–2730, 1991.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FAWCETT, H. S.; BITANCOURT, A. A. Observações sobre as doenças dos citrus no Paraguay. **O Biológico**, v. 6, p. 289–296, 1940.

FUNDECITRUS. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 22 mai. 2011.

GABRIEL, D. W.; HUNTER, J. E.; KINGSLEY, M. T.; MILLER, J. W.; LAZO, G. R. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 1, n. 2, p. 59–65, 1988.

GABRIEL, D. W.; KINGSLEY, M. T.; HUNTER, J. E.; GOTTWALD, T. R. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X.*

campestris pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 1, p. 14–22, 1989.

GACHOMO, E. W.; SHONUKAN, O. O.; KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 26–32, 2003.

GAGNEVIN, L.; LEACH, J. E.; PRUVOST, O. Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae*, agent of mango bacterial black spot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 246–253, 1997.

GASCUEL, O. Concerning the NJ algorithm and its unweighted version UNJ. In: MIRKIN, B.; MCMORRIS, F. R.; ROBERTS, F.; RZHETSKY, A. (Ed.). **Mathematical hierarchies and biology**. Providence, RI: American Mathematical Society, 1997. cap. 37, p. 149–171.

GILLINGS, M. R.; HOLLEY, M. P.; STOKES, H. W.; HOLMES, A. J. Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 102, n. 12, p. 4419–4424, 2005.

GIMENES-FERNANDES, N.; BARBOSA, J. C.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 26, p. 320–325, 2000.

GOTTWALD, T. R.; ALVAREZ, A. M.; HARTUNG, J. S.; BENEDICT, A. A. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* strains associated with epidemics of citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries: Correlations of detached leaf, monoclonal antibody, and restriction fragment length polymorphism assays. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, n. 7, p. 749–753, 1991.

GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H. Spatial pattern analysis of epidemics of citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, n. 2, p. 181–190, 1990.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; CIVEROLO, E. L.; BARRETT, H. C.; HEARN, C. J. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. **Plant Disease**, St Paul, v. 77, n. 10, p. 1004–1009, 1993.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; RICHIE, S. M. Relationship of leaf surface populations of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* to development of citrus bacterial spot and persistence of disease symptoms. **Phytopathology**, St Paul, v. 82, n. 6, p. 625–632, 1992.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. The influence of spray adjuvants on exacerbation of citrus bacterial spot. **Plant Disease**, St Paul, v. 81, n. 11, p. 1305–1310, 1997.

GOTTWALD, T. R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J. H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, St Paul, v. 91, n. 1, p. 30–34, 2001.

GOTTWALD, T. R.; MILLER, C.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W.; CIVEROLO, E. L. Analysis of the spatial distribution of citrus bacterial spot in a Florida citrus nursery. **Plant Disease**, St Paul, v. 73, n. 4, p. 297–303, 1989.

GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, St Paul, v. 92, n. 4, p. 361–377, 2002.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Citrus canker and citrus bacterial spot in Florida: research findings and future considerations. **The Citrus Industry**, v. 69, p. 42–45 e 48–51, 1988.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, n. 2, p. 190–196, 1990.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; FARDELMANN, D. Cultivar-specific interactions for strains of *Xanthomonas campestris* from Florida that cause citrus canker and citrus bacterial spot. **Plant Disease**, St Paul, v. 74, n. 10, p. 753–756, 1990a.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, St Paul, v. 82, n. 11, p. 1319–1325, 1992.

GRAHAM, J. H.; HARTUNG, J. S.; STALL, R. E.; CHASE, A. R. Pathological, restriction-fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, n. 9, p. 829–836, 1990b.

GRANT, S. R.; FISHER, E. J.; CHANG, J. H.; MOLE, B. M.; DANGL, J. L. Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 425–449, 2006.

HAMZA, A. A.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; JOUEN, E.; GAGNEVIN, L.; LEFEUVRE, P. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. **Plant Disease**, St Paul, v. 94, n. 8, p. 993–999, 2010.

HARTUNG, J. S.; CIVEROLO, E. L. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c. pv. citri*. **Phytopathology**, St Paul, v. 79, n. 7, p. 793–799, 1989.

HASSE, C. H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, p. 97–100, 1915.

HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; MOORE, E. R. B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 328–335, 1997.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). ***Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, p. 1–17, 1993.

HERBERS, K.; CONRADS-STRAUCH, J.; BONAS, U. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. **Nature**, London, v. 356, n. 6365, p. 172–174, 1992.

HOLLAND, D. F. Generic index of the commoner forms of bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 5, p. 191–229, 1920.

JACIANI, F. J. **Diversidade genética de espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros baseada em genes *avr* e *leucine rich protein***. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

JACIANI, F. J.; DESTEFANO, S. A.; RODRIGUES NETO, J.; BELASQUE JR., J. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting Swingle citrumelo in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v. 93, n. 10, p. 1074, 2009.

JALAN, N.; ARITUA, V.; KUMAR, D.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 22, p. 6342–6357, 2011.

JESUS JR., W. C.; BELASQUE JR., J.; AMORIM, L.; CHRISTIANO, R. S. C.; PARRA, J. R. P.; BERGAMIN FILHO, A. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 277–283, 2006.

KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 4, p. 539–543, 2004.

KALINOWSKI, S. T. HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 187–189, 2005.

KAREN-BETH, G. S.; HERMAN, B. S.; ANDREW, O. J. Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 102, n. 1, p. 7–12, 1993.

KENDALL, M. G.; BABINGTON-SMITH, B. The problem of m rankings. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v. 10, n. 3, p. 275–287, 1939.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumonia* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 5, p. 408–418, 1995.

LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Bacterial avirulence genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 153–179, 1996.

LEE, Y. H.; LEE, S.; LEE, D. H.; JI, S. H.; CHANG, H. Y.; HEU, S.; HYUN, J. W.; RA, D. S.; PARK, E. W. Differentiation of citrus bacterial canker strains in Korea by host range, rep-PCR fingerprinting and 16S rDNA analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, n. 1, p. 97–102, 2008.

LEITE JR., R. P. **Cancro cítrico**: prevenção e controle no Paraná. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 1990. 51 p. (Circular, 61).

LI, X.; DE BOER, S. H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Phytopathology**, St Paul, v. 85, n. 8, p. 837–842, 1995.

LI, W.; SONG, Q.; BRLANSKY, R. H.; HARTUNG, J. S. Genetic diversity of citrus bacterial canker pathogens preserved in herbarium specimens. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 104, n. 47, p. 18427–18432, 2007.

LIN, H. C.; CHU, M. K.; LIN, Y. C.; DENG, W. L.; CHANG, H.; HSU, S. T.; TZENG, K. C. A single amino acid substitution in PthA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* altering canker formation on grapefruit leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, n. 2, p. 143–154, 2011.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286–2295, 1994.

MAROIS, E.; VAN DE ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. The *Xanthomonas* Type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression. And induces cell hypertrophy in the susceptible host. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 15, n. 7, p. 637–646, 2002.

MALAVOLTA JR., V. A.; CARVALHO, M. L. V.; RODRIGUES NETO, J.; ROSSETI, V.; NOGUEIRA, E. M. C.; PALAZZO, D. A. Reaction of different *Citrus* and relatives to bacterial canker C [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]. **Proceedings Congress of the International Society of Citriculture**, v. 1, p. 363–364, 1987.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 163–180, 2002.

MEYER, D. F.; BOGDANOVE, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: JACKSON, R. W. (Ed.) **Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009, p. 147–1161.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA JR., N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DE MORAES, F. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; DE SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE JR., R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JR., H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis

of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, London, v. 11, artigo 238, 2010.

NAMEKATA, T. **Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* [Hasse] Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* [Hasse] Dow., N. F. SP. *aurantifolia*, agente causal da cancriose do limoeiro Galego**. 1971. 65 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1971.

NELSON, R. J.; BARAIODAN, M. R.; VERA CRUZ, C. M.; YAP, I. V.; LEACH, J. E.; MEW, T. W.; LEUNG, H. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 9, p. 3275–3283, 1994.

NEVES, M. F. (Org.). **O retrato da Citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf>Acesso em: 21 fev. 2011.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F. (Org.). **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2005. 225 p.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; TROMBIN, V. G.; AMARO, A. A.; NEVES, E. M.; JANK, M. S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Atlas, 2007. 110 p.

NGOC, L. B. T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; JARNE, P.; BRISSE, S.; GUÉRIN, F.; BOUTRY, S.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. From local surveys to global surveillance: three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1173–1184, 2009.

NGOC, L. B. T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; SO, T.; JOHNSON, G. I. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri*-A* causing citrus canker on lime in Cambodia. **Plant Disease**, St Paul, v. 92, n. 11, p. 1588, 2008.

NGOC, L. B. T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; KOSITCHAMENKUL, N.; PHAWICHIT, S. First report in Thailand of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*-A* causing citrus canker on lime. **Plant Disease**, St Paul, v. 91, n. 6, p. 771, 2007.

NIMCHUK, Z. L.; FISHER, E. J.; DESVEAUX, D.; CHANG, J. H.; DANGL, J. L. The Hop X (AvrPphE) family of *Pseudomonas syringae* Type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 20, n. 4, p. 346–357, 2007.

NOCITI, L. A. S.; MARGARETE, C.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J. B.; BELASQUE JR., J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* tipo C em lima ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 140–146, 2006.

OCHIAI, H.; HORINO, O.; MIYAJIMA, K.; KAKU, H. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. **Phytopathology**, St Paul, v. 90, n. 4, p. 415–421, 2000.

PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 26, n. 2, p. 215–217, 1974.

PALM, M. E.; CIVEROLO, E. L. Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of *mancha foliar de los citricos* in México. **Plant Disease**, St Paul, v. 78, n. 9, p. 879–883, 1994.

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 12, p. 2881–2887, 2007.

PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 264–274, 2009.

PAVAN, A.; CALIXTO, M. C.; CARDOSO, S. C.; MENDES, B. M. J.; BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, J. R. S.; CARVALHO, C. R.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 278–285, 2007.

PETES, T. D.; HILL, C. W. Recombination between repeated genes in microorganisms. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 147–168, 1988.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 665–677, 2000.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE BRUIJN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St Paul, v. 95, n. 9, p. 1098–1111, 2005.

RECCHIA, G. D.; HALL, R. M. Gene cassettes: a new class of mobile element. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 3015–3027, 1995.

RESTREPO, S.; VÉLEZ, C. M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, St Paul, v. 90, n. 1, p. 683–690, 2000.

RODRIGUEZ, G. S.; GARZA-LOPES, J. G.; STAPLETON, J. J.; CIVEROLO, E. L. Citrus bacteriosis in Mexico. **Plant Disease**, St Paul, v. 69, p. 808–810, 1985.

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.) **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 193–264.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 8, p. 690–695, 2006.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 6, p. 494–518, 2005.

SCHORNACK, S.; MEYER, A.; RÖMER, P.; JORDAN, T.; LAHAYE, T. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 3, p. 256–272, 2006.

SCHOULTIES, C. L.; CIVEROLO, E. L.; MILLER, J. W.; STALL, R. E.; KRASS, C. J.; POE, S. R.; DUCHARME, E. P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease**, St Paul, v. 71, n. 5, p. 388–395, 1987.

SCHOULTIES, C. L.; MILLER, J. W.; STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L.; SASSER, M. A new outbreak of citrus canker in Florida. **Plant Disease**, St Paul, v. 69, p. 361, 1985.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida-Again. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, n. 4, p. 340–356, 2001.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 1043–1047, 2002.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 846–849, 1994.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 399–420, 1991.

STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, n. 5, p. 581–585, 1983.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, J. D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 268, n. 5211, p. 661–667, 1995.

SUN, X.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM J. H.; DIXON, W. D.; SCHUBERT, T. S.; CHALOUX, P. H.; STROMBERG, V. K.; LACY, G. H.; SUTTON, B. D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/Mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n. 11, p. 1179–1188, 2004.

SWARUP, S.; FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, n. 7, p. 802–809, 1991.

SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 5, n. 3, p. 204–213, 1992.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, 2011.

VALVERDE, A.; HUBERT, T.; STOLOV, A.; DAGAR, A.; KOPELOWITZ, J.; BURDMAN, S. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 17–25, 2007.

VANDAMME, P.; POT, B. GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472–489, 1995.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

VILORIA, Z.; DROUILLARD, D. L.; GRAHAM, J. H.; GROSSER, J. W. Screening triploid hybrids of 'Lakeland' limequat for resistance to citrus canker. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n. 10, p. 1056–1060, 2004.

VINATZER, B. A.; BULL, C. T. The impact of genomic approaches on our understanding of diversity and taxonomy of plant pathogenic bacteria. In: JACKSON, R. W. (Ed). **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009, p. 37–61.

VERDIER, V.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; DUQUE, M. C.; GERSTL, A.; LABERRY, R. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 601–608, 1998.

VERNIÈRE, C. J.; HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E. L.; ALVAREZ, A. M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 5, p. 477–487, 1998.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407–4414, 1995.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÜPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 37, n. 4, p. 463–464, 1987.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WHITE, F. F.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; KOEBNIK, R. The type III effectors of *Xanthomonas*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 6, p. 749–766, 2009.

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 291–298, 2000.

WULFF, N. A. Bactérias causadoras de doenças em vegetais. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 51–114, 2008.

YANG, Y.; FEYTER, R.; GABRIEL, D. W. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 7, n. 3, p. 345–355, 1994.

YANG, Y.; GABRIEL, D. W. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 17, p. 4963–4968, 1995.

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 1–2, p. 11–23, 2011.

YOUNG, J. M.; BRADBURY, J. F.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y.; VIDAVER A. K. Comment on the reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse 1915) Gabriel et al. 1989 and *X. phaseoli* (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989. Indication of the need for minimal standards for the genus *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 1, p. 172–177, 1991.

APÊNDICE

Genetic Diversity of a Brazilian Strain Collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Based on the Type III Effector Protein Genes

F. J. Jaciani, J. A. Ferro, and M. I. T. Ferro, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Jaboticabal, SP, Brazil; C. Vernière, and O. Pruvost, CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, Réunion, France; and J. Belasque Jr., Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP, Brazil

Abstract

Jaciani, F. J., Ferro, J. A., Ferro, M. I. T., Vernière, C., Pruvost, O., and Belasque, J., Jr. 2012. Genetic diversity of a Brazilian strain collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* based on the type III effector protein genes. *Plant Dis.* 96:193-203.

Exclusion and eradication or management based on an integrated approach with less susceptible varieties, copper-based bactericides, and windbreaks are the two main strategies used to prevent or control citrus canker. Field tolerance or resistance to citrus canker is not found in the most important commercial sweet orange cultivars, and pathogen-derived resistance has been developed and applied in different crops to obtain resistant genotypes to plant pathogens. We describe the development of DNA primers and probes based on the type III effector genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *pthA4*, *hpaF*, and XAC3090 (leucine rich protein), and their application in the evaluation of the genetic diversity of the pathogen. A total of 49 haplotypes were identified in 157 strains by Southern blot analysis. No genetic polymorphism was detected by BOX elements - and enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) analysis, nor

with the genes *avrBs2*, XAC3090, and *hpaF*. Nei's genetic diversity indexes varied from 0.65 to 0.96 for subcollections of the pathogen. One or few haplotypes were most frequent in the strain collection, but several haplotypes were represented by solely one or few strains. The *pthA4* probe resulted in the higher number of haplotypes identified in the Brazilian subcollections. Greater variation in the frequency of haplotypes occurred within subcollections (93.7%) than among subcollections. Only some haplotypes were genetically distant from all others, especially those originated from Rio Grande do Sul and Santa Catarina states. These bacterial effectors are widely spread in the collections and are useful for a better understanding of the host-pathogen interaction and the search for resistance genes in host and nonhost plants.

The genus *Xanthomonas* includes a group of phytopathogenic bacteria that have great economic importance around the world. The classification of species of *Xanthomonas* pathogenic to citrus has been modified in the last decades (21,41,42,45,46). The most recent reclassification is based on analysis of the 16S-23S intergenic spacer region, amplified fragment length polymorphism (AFLP), phenotypic characteristics, and DNA-DNA reassociation assays (42). Based on that, the citrus canker-causing xanthomonads have been classified in two species: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. However, Ah-You et al. (3) suggested that *X. fuscans* is a later heterotypic synonym of *X. citri* (ex Hasse 1915) (21). *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* is the causal agent of South American canker, which is regarded as a mild pathogen of citrus and represents the pathotypes B and C. Recently, a new strain of the *aurantifolii* C type was detected in São Paulo State in Brazil infecting 'Swingle' citrumelo (*C. paradisi* × *Poncirus trifoliata*) (28). *X. citri* subsp. *citri* is the causal agent of Asiatic canker, a major citrus pathogen worldwide. This pathogen has been separated into three pathotypes differing in host range, aggressiveness, and geographic origin. Strains with a wide host range within the genus *Citrus* and relatives have been described as pathotype A and are present in citrus producing areas in Asia and North and South America (24). Two other pathotypes with a pathogenicity restricted to acid lime (*C. aurantifolia*) under field conditions have been described in Asia and Florida and are designated as A* (48) and A^w (43), respectively. A different citrus disease affect-

ing exclusively 'Swingle' citrumelo only reported in Florida until now, known as citrus bacterial spot, is caused by *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (23,42).

Citrus canker is one of the most important diseases of citrus worldwide and is present in the main citrus-producing areas – São Paulo and Florida (24,25). Currently, São Paulo, which represents 53% of the total world production of orange juice, is the only region where citrus canker eradication is still practiced in Brazil (11,12). Exclusion and eradication are the main strategies used to prevent and control citrus canker in nonendemic areas (24). Management of citrus canker on sweet oranges based on an integrated approach with less susceptible varieties, spray of copper-based bactericides, and windbreaks, is a sustainable alternative to eradication in areas where the causal agent has widely established or has become endemic, and is being practiced in Southern Brazil (8–10).

Theoretically, the best control strategy for bacterial diseases affecting plants, such as citrus canker, is based on the use of resistant or tolerant host genotypes. Field tolerance or resistance is not found in the most important commercial sweet orange cultivars available in the citrus-producing areas worldwide (38). It is known that the most resistant Rutaceae genotypes are some mandarins (*C. reticulata* – Ponkan, Tankan, and Sun Chu Sha, or *C. unshiu* – Satsuma), Calamondin (*C. mitis*), and Kumquats (*Fortunella* spp.), but the resistance mechanism against *X. citri* subsp. *citri* remains to be determined. The development of more resistant citrus genotypes against *X. citri* subsp. *citri* is based mainly on genetic transformation (49). Previous studies indicate that exogenous genes from insects or *Arabidopsis* introduced into citrus plants have increased to some extent the resistance to citrus canker (13,49). Furthermore, pathogen-derived resistance has been developed and applied in different crops to obtain resistant genotypes to plant pathogens (7,31). Recently, Yang et al. (49) demonstrated that the introduction of a disrupted *pthA* at the nuclear localization signals (NLS) motif was able to trigger host resistance against citrus canker.

Corresponding author: J. Belasque Jr.,
E-mail: belasque@fundecitrus.com.br

Accepted for publication 2 August 2011.

<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0357>
© 2012 The American Phytopathological Society

Many phytopathogenic bacteria harbor a range of effector proteins delivered into plant cells via a syringe-like apparatus known as the type III secretion system (TTSS) (4,27). The interactions of these effectors with the plant cell can suppress and/or induce host defenses depending on the host–bacterium interaction. The *X. citri* subsp. *citri* genome is known to harbor a repertoire of bacterial effectors from different families: AvrBs3/PthA, HopX (AvrPphE), PopC, and AvrBs2 (19). For instance, the AvrBs3/PthA family belongs to the transcription activator-like effector family (TALE) and induces plant cell enlargement and hypertrophy (4). The HopX family members are modular proteins involved in avirulence activity and induction of cell death response (36). PopC family members are leucine-rich-repeat (LRR) proteins. LRR motifs are commonly involved in protein–protein mediation and are present in the major classes of resistance genes (27). The function of PopC proteins is not well understood.

Genetic variation in bacteria can be selected by different evolutionary forces. Host–pathogen interaction is one of them and can be expressed in the bacterium as different pathogenicity abilities, i.e., host range, aggressiveness, and/or fitness. Knowing the genetic diversity of a pathogen and its population structure may help to establish hypotheses regarding its evolutionary history, understand the interaction of the pathogen with the host, and define diagnostic methods and control strategies (1,37,40,47). Information about the genetic structure of *X. citri* subsp. *citri* populations pathogenic to citrus in a small spatial scale is limited, and could provide insights into the genetic diversity, evolution, spatial movement of strains, and interactions between *Xanthomonas* and citrus hosts. Novel approaches against *X. citri* subsp. *citri* related with the host resistance engineering can be developed based on this information.

The objectives of the present study were: (i) the development of DNA primers and probes based on type III effector genes *avrXacE1*, *avrXacE2*, and *avrXacE3*, all members of the HopX family, *avrBs2*, *pthA4*, *hpaF*, and XAC3090 (leucine rich protein) coding for a PopC-like-LRR protein; and (ii) their application in evaluation of the genetic diversity of a Brazilian collection of *X. citri* subsp. *citri* strains. For comparison, the diversity was also evaluated with BOX elements - and enterobacterial repetitive intergenic consensus–polymerase chain reaction (ERIC-PCR), a common and useful technique used in studies of genetic diversity of pathogens.

Materials and Methods

Bacterial strains, and DNA extraction. In total, 157 strains of *X. citri* subsp. *citri* from 62 municipalities and 7 Brazilian states were used in this study (Mato Grosso [*n* = 5], Mato Grosso do Sul [*n* = 4], Paraná [*n* = 44], Roraima [*n* = 3], Rio Grande do Sul [*n* =

13], Santa Catarina [*n* = 8], and São Paulo [*n* = 80]) (Table 1 and Fig. 1). The strain collection included the *X. citri* subsp. *citri* strain 306 (Xcc 306), sequenced by the Genoma Project/FAPESP (19). Thirty-seven and 27 strains, originating from two citrus groves located in São Paulo and Paraná (named Presidente Prudente and Ourizona, respectively), were also included. Most of the strains used in the present study were isolated from sweet orange plants (*Citrus sinensis*). DNA was extracted using the CTAB method (6). To test the reproducibility of the performed techniques, two independent DNA extractions were used for each strain.

Primer design, PCR, and PCR–restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Primers were designed with the Primer3 software using the complete sequence of Xcc 306 (GenBank accession number NC_003919.1). Specific primers were synthesized for the *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, *pthA4*, *hpaF*, and XAC3090 genes (Table 2). Primers were designed to hybridize in the flanking regions of the targeted genes to amplify complete copies of the target sequences. All these genes have a chromosomal location in Xcc 306, except *avrXacE3* and *pthA4*, which are plasmid-borne.

Amplification reactions with primers AvrXacE1-F/R, AvrXacE2-F/R, AvrXacE3-F/R, and Xac3090-F/R were performed in a total volume of 50 µl in an Eppendorf Mastercycler. Each reaction contained 2 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1× *Taq* buffer, 0.2 mM of mixed dNTPs, 2 mM MgCl₂ (1.5 mM MgCl₂ for AvrXacE3), and 0.5 µM of each primer (Invitrogen). The protocol used for the amplifications was the same for all primer pairs and consisted of an initial denaturing cycle at 94°C/3 min followed by 35 cycles at 94°C/1 min, 65°C/1 min, and 72°C/3 min; and a final extension cycle at 72°C/10 min.

PCR analysis using primers AvrBs2-F/R, HpaF-F/R, and PthA4-F/R were performed in 50 µl (total volume) mixtures containing 1 U of Phusion DNA polymerase (Finnzymes), 1× Phusion buffer, 5% DMSO (except for AvrBs2), 0.2 mM of mixed dNTPs, and 0.5 µM of each primer. The amplification conditions with primers AvrBs2-F/R consisted of 98°C/35 s, 62°C/35 s, and 72°C/45 s for 30 cycles plus an initial step of 98°C/30 s and a final step of 72°C/10 min; and with primers HpaF-F/R and PthA4-F/R consisted of 98°C/10 s, 66°C/10 s, and 72°C/50 s for 30 cycles plus an initial step of 98°C/30 s and a final step of 72°C/10 min. The following endonucleases were used for PCR-RFLP analysis: *EcoRI*, *EcoRII*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HincII*, *PstI*, *PvuII*, and *SphI* (Invitrogen); *AluI*, *BbvI*, *PvuI*, and *NspI* (New England BioLabs); *BglI* (Promega); and *CfrI*, *Clal*, and *TaqI* (Fermentas), according to the manufacturer's instructions.

Southern blot. Primer sets and PCR conditions used for amplifying complete sequences of the seven selected genes of Xcc

Table 1. Brazilian states, year of isolation, and strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* used in this study

Brazilian state	Year ^a	Strain ^b
Mato Grosso	1999, 2002, and 2003	IBSBF 1467, 1775, 1843, 1860, and 1861
Mato Grosso do Sul	1980, 1994, and 2002	IBSBF 223, 1050, 1767, and 1768
Paraná	1979, 1986, 1996, 1997, and 2005	306 (genome sequenced); FDC 121, 1182, 1183, 1184, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1192, 1194, 1195, 1257, 1258, 1259, 1260, 1261, 1262, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1270, 1272, 1273, 1274, 1275; IAPAR 12845, 12851, 12853, 12856, 12858, 12859, 12861, 12863, 12864, 12870, 12873, 12875, 12967, 8905; and IBSBF 987
Rio Grande do Sul	1993, 1999, and 2001	FDC 605, 608, 625, 629; IAPAR 12973, 12976, 14002, 14004, 14006; IBSBF 1669, 1989, 1990, and 1991
Roraima	2002	IBSBF 1778, 1780, and 1803
Santa Catarina	1985 and 2001	FDC 616, 617, 626, 628; IAPAR 714; IBSBF 1636, 1637, and 1992
São Paulo	1980, 1981, 1988, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, and 2005	FDC 200, 201, 202, 210, 213, 214, 217, 274, 276, 277, 278, 279, 281, 282, 284, 285, 287, 288, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 299, 300, 302, 304, 306, 307, 308, 309, 310, 312, 359, 363, 1227, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1287, 1288, 1289; IAPAR 1233, 12353, 12405, 12418, 12701, 12708, 12710, 12714, 12826, 12833, 12969, 12984, 12988, 12992, 13000, 13013, 13016; IBSBF 222, 245, 283, 338, 339, 349, 1350, 1404, 1421, 1422, 1474, 1509, 1515, 1568, and 1580

^a There are indicated only the different years when strains were isolated from field affected plants.

^b Strains originated from three culture collections: IBSBF – Instituto Biológico de São Paulo; IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná; and FDC – Fundecitrus.

306 to be used as probes in Southern blot analysis were used as aforementioned. The bands corresponding to the expected fragments were purified and inserted into the plasmid vector pGEM-T Easy Vector System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Samples of total DNA (10 µg) of *Xanthomonas* strains were cleaved with *AccI* (Invitrogen), *AflIII* (New England BioLabs), *AvaI* (New England BioLabs), or *BstXI* (New England BioLabs) endonucleases, as presented in Table 2, according to the manufacturers' instructions and separated by electrophoresis in 1% agarose gels (50 V for 22 h). The restriction patterns for each enzyme were predicted using the complete sequence of Xcc 306 allowing complete fragments containing each Type III effector gene. DNA fragments were transferred to nylon membranes (Hybond N+, GE Healthcare). Probes were labeled and hybridization was performed for about 16 h at 42°C, and detection was accomplished using the ECL kit (Direct Nucleic Acid Labeling) according to the manufacturer's recommendations (GE Healthcare).

BOX and ERIC-PCR. BOX and ERIC PCR analysis (18) were carried out with primers BOX1R, ERIC1R, and ERIC2 (35). Each PCR analysis was performed in 25-µl (total volume) mixtures containing 1× *Taq* buffer, 0.2 mM of mixed dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1 µM of each primer, and 2 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Amplifications were carried out in a Eppendorf Mastercycler thermal cycler programmed for a denaturation initial step of 94°C/5 min, followed by 40 cycles at 94°C/30 s, 48°C/30 s, and 72°C/1 min; and a final extension cycle at 72°C/10 min. The products were visualized under UV light in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

Data analysis. The genetic profiles identified by Southern blot were recorded as the absence (0) or presence (1) of bands. Only reproducible bands were considered positive. Each unique profile

of bands was considered as a haplotype. A similarity matrix was calculated using the Dice coefficient, and a dendrogram was built by the UNJ (unweighted neighbor joining) method (22) using the software DarWIN 5.0 (CIRAD, Montpellier, France). The robustness of the tree was assessed by bootstrap analysis using the same program with 2,000 resamplings.

The correlations between distance matrices were tested globally by computing the Kendall's coefficient of concordance (W) among the distance matrices through a permutation test (9,999 permutations) with the 'CADM.global' function of the 'ape' package in R software (17). Kendall's W is a nonparametric statistic (no assumptions are made on the probability distribution of the values) that evaluates congruence among multiple rating systems, with W ranging from 0 (no agreement) to 1 (complete agreement) (32). The concordant and discordant distance matrices in the group were identified by Mantel tests that were carried out by using the 'CADM.post' function in 'ape' (17). The Holm's correction method for multiple testing was applied to the list of *P* values produced in the *a posteriori* Mantel tests.

Allelic richness among strain collections was computed by a rarefaction method producing unbiased estimates due to uneven sample sizes (29). Analyses were performed with HP-RARE version 1.0 (30) using RFLP data for the two Brazilian states (São Paulo and Paraná) for which large strain numbers were available ($n_{\min} = 44$). Data derived from the AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, and PthA4 probes (Southern analyses) were used.

The Brazilian strain collection was divided into 7 subcollections considering the region of origin and also the different strategies applied for control of citrus canker in Brazil. Only states with more than 7 strains were considered for the analysis. Seven subcollections were used for genetic analysis and were named after the mu-

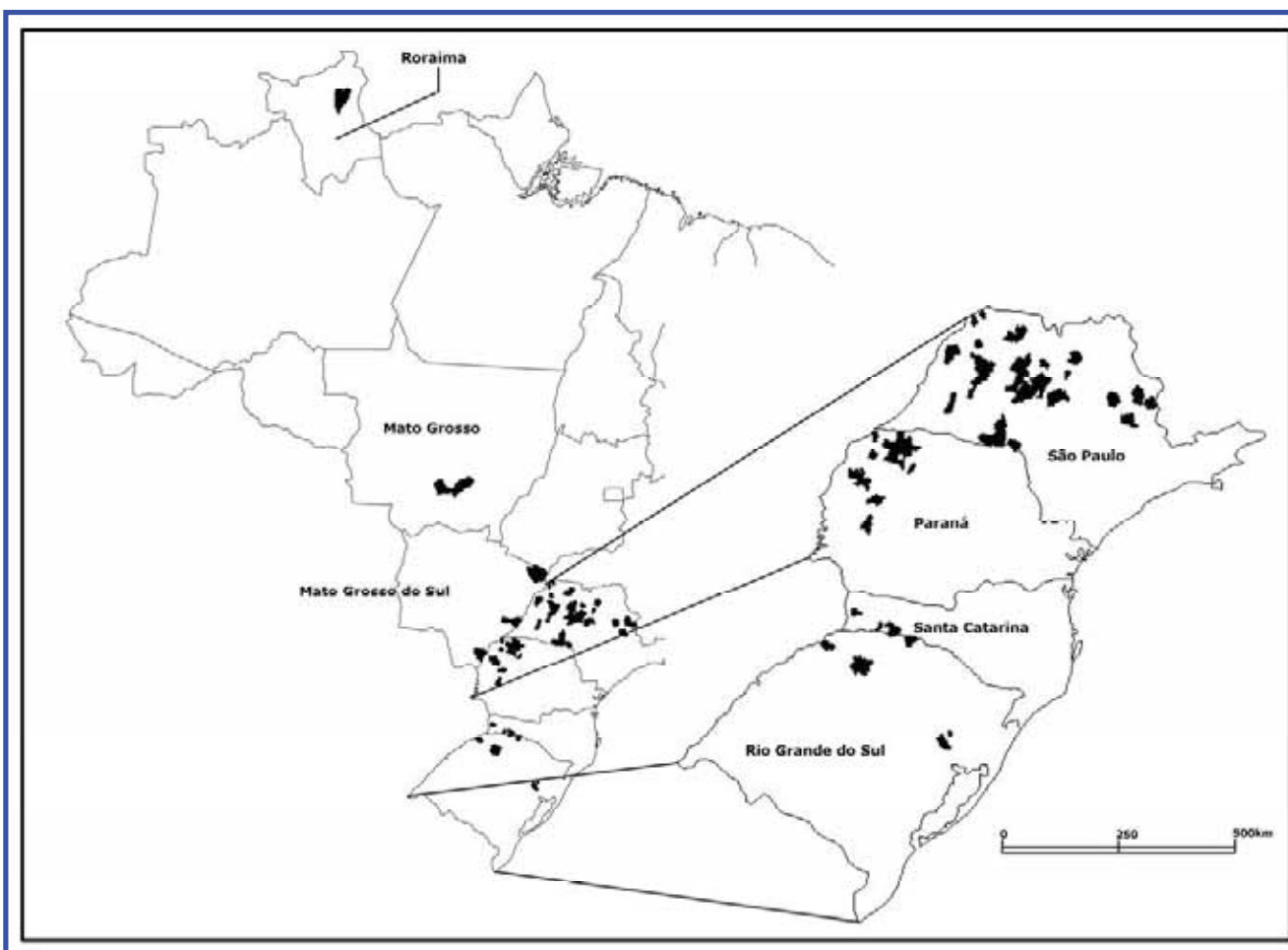


Fig. 1. Origin of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains collected from Brazilian states. Municipalities where the strains originated are in black.

nicipality, state, or region of origin. Santa Catarina and Rio Grande do Sul subcollections were composed of 8 and 13 strains, respectively. The São Paulo subcollection was composed of 42 strains from 30 municipalities. Also from São Paulo State, but not included in the São Paulo subcollection, the 38 strains from Presidente Prudente municipality formed an orchard population named after the municipality, as all the strains from this municipality (except one) were isolated in 2001 from 37 different citrus trees from the same citrus orchard. The same reasoning was used for the strains from Ourizona, Paraná State, forming an orchard population of 27 strains from the same citrus orchard. The Paraná subcollection was composed of 17 strains, not including the strains from Ourizona. The subcollections Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul were further merged into another subcollection named Sul, representing the southern Brazilian states. The genetic differentiation (F_{ST} values) between the subcollections was estimated considering the frequency of haplotypes and calculated by an analysis of molecular variance (AMOVA) using the software Arlequin version 3.11 (20).

Results

DNA fragments of the expected size containing the *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrBs2*, *hpaF*, and XAC3090 genes occurred in all the strains tested in this study. Only one strain (IAPAR 12853) did not present the *avrXacE3* fragment by PCR amplification or Southern blot analysis. No amplification or unspecific bands occurred for *pthA4* after PCR in 13 strains (IAPAR 14004 and 14006; IBSBF 1636, 1669, 1989, 1991, and 1992; and FDC 605, 616, 617, 625, 626, and 1182), and bands of different sizes from strain Xcc 306 occurred in 8 strains (IAPAR 12826, 12833, and 12967; IBSBF 1350, 1778, 1780, and 1803; and FDC 1227). The PCR-RFLP

results for the amplified fragments corresponding to *avrXacE1* (digested with the endonucleases *Bgl*II, *Hinc*II, *Pst*I, *Cfr*I, and *Nsp*I), *avrXacE2* (*Bgl*II, *Hinc*II, *Pst*I, *Eco*RI, and *Eco*RV), *avrXacE3* (*Bbv*I, *Bgl*II, *Hae*III, *Hinc*II, and *Eco*RV), *avrBs2* (*Bgl*II, *Cl*aI, *Eco*RV, *Hinc*II, and *Pst*I), *hpaF* (*Hinc*II, *Nsp*I, *Pst*I, *Pvu*II, and *Sph*I), and XAC3090 (*Hinc*II, *Pst*I, *Hae*III, *Bbv*I, and *Pvu*I) genes did not reveal polymorphism in their nucleotide sequences. All amplified and cleaved fragments for these 6 genes with the respective endonucleases presented restriction profiles identical to those expected by in-silico analysis for Xcc 306. The restriction pattern identified for Xcc 306 by PCR-RFLP for *pthA4* was as expected by in-silico analysis and did not differ from almost all other tested strains, except for 9 strains that presented different restriction patterns with *Alu*I, *Nsp*I, *Taq*I, and *Pvu*I endonucleases (IAPAR 12826, 12833, 12967; IBSBF 1350, 1778, 1780, 1803; FDC 1227 and 1273), and also 13 strains with *Bgl*II (IAPAR 12826, 12833, 12967; IBSBF 1350, 1778, 1780, 1803; FDC 306, 308, 310, 312, 1227, and 1273).

All 157 strains presented the same genetic pattern for both BOX and ERIC-PCR. Five fragments were amplified for each strain by BOX-PCR and 10 fragments by ERIC-PCR. A total of 49 haplotypes were identified by Southern blot analysis combining the results of all 7 probes. The probes corresponding to the genes *avrBs2*, XAC3090, and *hpaF* did not reveal polymorphisms in the collections (Table 3). Probes *AvrXacE1*, *AvrXacE2*, and *AvrXacE3* allowed the identification of 7, 3, and 8 haplotypes, respectively. The *PthA4* probe showed the greatest diversity with 43 band positions, allowing the identification of 30 haplotypes. Band positions related to the *pthA* homologs that have been defined in the sequenced strain 306 were recorded in most but not all strains of *X. citri* subsp. *citri* from Brazil, suggesting sequence variation in

Table 2. Primers used to amplify and clone the *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, XAC3090 (leucine rich protein), *hpaF*, and *pthA4* genes, and restriction enzymes used in Southern blot analysis

Type III effector gene	Locus tag ^a	Primer	Sequence (5' → 3')	Restriction enzymes used in Southern blot ^b
<i>avrXacE1</i>	XAC0286	AvrXacE1-F AvrXacE1-R	TGAACGATAGGCAGCTGTTC GGAGAGCGACATGGGACTAT	<i>Acc</i> I, <i>Bst</i> XI
<i>avrXacE2</i>	XAC3224	AvrXacE2-F AvrXacE2-R	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA CAGGACGGTTACGCCAGTA	<i>Ava</i> I, <i>Bst</i> XI
<i>avrXacE3</i>	XACb0011	AvrXacE3-F AvrXacE3-R	AAATGATCAGCCGCTTGG TCCATCGTCACCAACTCAAG	<i>Acc</i> I, <i>Bst</i> XI
<i>avrBs2</i>	XAC0076	AvrBs2-F AvrBs2-R	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA CAGGACGGTTACGCCAGTA	<i>Acc</i> I, <i>Bst</i> XI
<i>leucine rich</i>	XAC3090	Xac3090-F Xac3090-R	CAGCTCAGCGACATAGAACG TCGTGTTTGCCCTTTACTGA	<i>Acc</i> I, <i>Bst</i> XI
<i>hpaF</i>	XAC0393	HpaF-F HpaF-R	CATGCCTGCCGTTTAAAGT ACATCGACGATTGGCTTG	<i>Acc</i> I, <i>Afl</i> III
<i>pthA4</i>	XACb0065	PthA4-F PthA4-R	GCGGGAGTTTATGGATGGT AGATTGCCAAGGATCTACGC	<i>Afl</i> III, <i>Ava</i> I

^a Locus tag in GenBank.

^b Indicated restriction enzymes were used to fragment total DNA of all 157 strains described in Table 1 in Southern blot analysis with the related Type III effector genes as DNA probes.

Table 3. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* haplotypes identified by Southern blot analysis with *AvrXacE1*, *AvrXacE2*, *AvrXacE3*, *AvrBs2*, Xac3090 (leucine rich protein), *HpaF*, and *PthA4* DNA probes

DNA probe	Haplotypes ^a	Total number of haplotypes
<i>AvrXacE1</i>	1 (2), 2 (8), 3 (1), 4 (1), 6 (5), 7 (52), and 8 (88)	7
<i>AvrXacE2</i>	1 (1), 2 (90), and 3 (66)	3
<i>AvrXacE3</i>	1 (10), 3 (3), 4 (2), 5 (60), 6 (79), 7 (1), 8 (1), and 10 (1)	8
<i>AvrBs2</i>	1 (157)	1
Xac3090	1 (157)	1
<i>HpaF</i>	1 (157)	1
<i>PthA4</i>	p1 (90), p2 (1), p3 (1), p4 (2), p5 (1), p6 (1), p7 (12), p8 (2), p9 (1), p10 (1), p11 (3), p12 (1), p13 (1), p14 (1), p15 (1), p16 (1), p17 (1), p18 (11), p19 (1), p20 (1), p21 (1), p22 (2), p23 (11), p24 (1), p25 (1), p26 (2), p27 (1), p28 (2), p29 (1), and p30 (1)	30

^a Number in parentheses corresponds to the total number of strains belonging to the related haplotype.

flanking regions and/or the absence in these strains of some homologs described in strain 306. Most haplotypes identified with AvrXacE/PthA probes were represented by only one or a few strains for each DNA probe. Also, for most of these tested probes, one or two haplotypes occurred with highest frequencies in the collection, as haplotypes 7 and 8 (AvrXacE1), 2 and 3 (AvrXacE2), 5 and 6 (AvrXacE3), and p1 (PthA4) (Table 3). The number of copies of each studied gene identified by Southern blot varied within the strains, except for *avrBs2*, XAC3090, and *hpaF*, identified as one copy each. One to three copies occurred for *avrXacE1*, one to two for *avrXacE2*, zero to three for *avrXacE3*, and two to five for *pthA* (Fig. 2).

The Kendall's W statistics ($W = 0.5171$; $p = 0.0001$) indicated a global congruence among the RFLP data derived from the four probes for which polymorphism was shown. *A posteriori* comparisons based on Mantel tests indicated a lack of positive correlation between data derived from the AvrXacE2 probe and other probes. This could be explained by the low number of haplotypes revealed with the AvrXacE2 probe. All other pairwise comparisons between probes based on Mantel tests yielded significant correlation between distances among haplotypes ($p \leq 0.0004$). When all data were considered, overall allelic richness was 4.29 and 4.86 for São Paulo and Paraná, respectively. Most of the overall allelic richness was related to data derived from the PthA4 probe (data not shown).

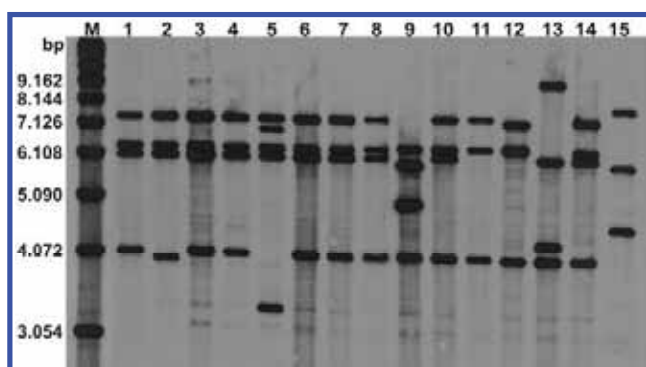


Fig. 2. Southern blot hybridization patterns with PthA4 DNA probe of *AvrI*-digested genomic DNA from Brazilian strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Columns 1 (strain 306), 3 (IBSBF 339), 4 (IBSBF 1050), 6 (IAPAR 714), 7 (IAPAR 13016), 8 (IAPAR 12969), 10 (IAPAR 12708), and 14 (IAPAR 12701): haplotype p1; columns 2 (IBSBF 222), 5 (IAPAR 12992), 9 (IAPAR 12710), 13 (IAPAR 12833), and 15 (IBSBF 1992): haplotypes p3, p19, p7, p18, and p16, respectively; and columns 11 (IAPAR 13000) and 12 (IAPAR 12714): haplotype p12. M: 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

Six to 17 haplotypes were identified in the defined subcollections or orchard populations (Table 4). The greatest locus polymorphism was observed for strains from the subcollections, and the lowest polymorphism was observed in the orchard populations of Ourizona and Presidente Prudente. The Nei genetic diversity indexes were relatively high and varied from 0.65 (Ourizona) to 0.96 (Paraná). The mean number of differences between all pairs of haplotypes (pairwise differences) varied from 1.52 (Ourizona) to 12.62 (Rio Grande do Sul). Considering all 7 probes used, São Paulo presented 17 haplotypes, the highest number between all strain's collections (Tables 4 and 5). All subcollections presented one or few haplotypes as the most frequent, noted the haplotypes 13, 32, and 38 (Table 5). Strains from Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Roraima corresponded to haplotypes 35 and 38, respectively. The PthA4 probe resulted in the higher number of haplotypes identified in the strain's collections, especially in São Paulo and Paraná (Table 6). For each subcollection, 2 to 5 haplotypes were identified with the Avr probes and 2 to 12 for PthA4. Only for Ourizona, the AvrXacE3 revealed more polymorphism than PthA4, considering the number of haplotypes identified. Higher variation in the frequency of haplotypes occurred within the subcollections (93.72%) than among subcollections (6.28%). Pairwise comparison analysis did not reveal any differences among the southern Brazilian subcollections, except for Santa Catarina and Rio Grande do Sul compared to Paraná (Table 7). The subcollections formed by strains isolated from the same groves (Presidente Prudente and Ourizona) and São Paulo differed from each other and from all other subcollections.

Although a relatively high number of haplotypes were identified in the Brazilian collection, only some haplotypes were genetically distant from all others, especially those originating from Rio Grande do Sul and Santa Catarina, as showed in Figure 3 with results of all 7 probes. Bootstrap values higher than 70 occurred only for branches formed by 9 haplotypes (numbers 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, and 22), each of them represented by one to three strains only and originated from São Paulo (number 7), Rio Grande do Sul (numbers 1, 2, 4, 5, 8, and 22) and Santa Catarina (numbers 2, 3, 5, 8, and 9). A similar branching pattern for these aforementioned Brazilian states was observed for PthA4 (Fig. 4).

Discussion

São Paulo and southern states represent the most important citrus producing areas where citrus canker develops in Brazil. First detected in São Paulo in 1957, *X. citri* subsp. *citri* has induced citrus canker in the mentioned regions for decades, and two main control strategies are applied for this disease (8–12). The eradication of symptomatic and neighboring citrus plants is applied in

Table 4. Number of strains, haplotypes, polymorphic loci, Nei genetic index, and pairwise differences of Brazilian subcollections and orchard populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains identified by Southern blot analysis with AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090 (leucine rich protein), HpaF, and PthA4 DNA probes

Brazilian collections ^a	Number of strains ^b	Number of haplotypes ^c	Number of polymorphic loci (%) ^d	Genetic diversity (Nei) ^e	Mean number of pairwise differences ^f
Subcollections					
São Paulo	42	17	38 (54%)	0.91	5.90
Paraná	17	14	34 (49%)	0.96	7.25
Santa Catarina	8	6	26 (37%)	0.93	9.29
Rio Grande do Sul	13	9	28 (40%)	0.94	12.62
Orchard populations					
Presidente Prudente	38	13	16 (23%)	0.87	2.78
Ourizona	27	6	6 (9%)	0.65	1.52

^a Indicate the analyzed strain collections formed by strains from different Brazilian states (subcollections), and also the orchard populations formed by strains originated from the same citrus groves in Presidente Prudente and Ourizona municipalities.

^b Total number of strains from each subcollection or orchard population.

^c Total number of haplotypes identified by Southern blot analysis with DNA probes corresponding to the complete sequences of *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXacE3*, *avrBs2*, Xac3090 (leucine rich protein), *hpaF*, and *pthA4* genes.

^d Number of polymorphic fragments identified by Southern blot analysis in each strain collection or population, and percentage of polymorphic fragments from the total number of fragments considered.

^e Nei's genetic diversity index calculated using the software Arlequin version 3.11 (20).

^f Represents the number of different alleles between two Southern blot haplotypes, calculated using the software Arlequin version 3.11 (20).

São Paulo only, where an official eradication program has been followed since the 1950s. Citrus canker was detected during the same time in Paraná State, and in the 1980s in Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The eradication program was initially practiced in the southern citrus areas as well for a few years. It was later replaced by an integrated management approach to citrus canker, which is the current control strategy for nearly the last three decades in those states (8–10).

Theoretically, eradication procedures should markedly reduce the time of interaction between the pathogen and host, whereas integrated management of the disease allows a more extended pe-

riod of interaction. Very interestingly, a relatively high genetic diversity was found in strains from all Brazilian provinces irrespective of the strategy used for citrus canker control. Due to the eradication program, surveys conducted between 1999 and 2010 revealed incidences of blocks with citrus canker lower than 0.45% and that >99.9% of the sweet orange trees are not infected with *X. citri* subsp. *citri* (11,12). No official surveys are conducted in the southern areas in Brazil, but citrus canker is endemic in most of Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states, where since the 1990s no plant and orchard eradications are officially applied. Despite these very low levels of disease in São Paulo State, allelic

Table 5. Number and percentage of haplotypes identified by Type III effector genes in subcollections and orchard populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by Southern blot analysis

Haplotype ^c	Subcollections ^a				Orchard populations ^b		All Brazilian strains ^d
	São Paulo	Paraná	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Presidente Prudente	Ourizona	
1				2 (15.38)			2 (1.27)
2			1 (12.50)	2 (15.38)			3 (1.91)
3			1 (12.50)				1 (0.64)
4				1 (7.69)			1 (0.64)
5			2 (25.00)	1 (7.69)			3 (1.91)
6		1 (5.88)					1 (0.64)
7	1 (2.38) ^e						1 (0.64)
8			2 (25.00)	1 (7.69)			3 (1.91)
9			1 (12.50)				1 (0.64)
10				1 (7.69)			1 (0.64)
11						1 (3.70)	1 (0.64)
12		1 (5.88)					1 (0.64)
13	5 (11.90)	4 (23.53)		3 (23.08)	1 (2.63)	15 (55.56)	28 (17.83)
14		1 (5.88)					1 (0.64)
15					1 (2.63)		1 (0.64)
16					1 (2.63)		1 (0.64)
17		1 (5.88)			3 (7.89)		4 (2.55)
18	1 (2.38)	1 (5.88)					2 (1.27)
19		1 (5.88)					1 (0.64)
20	1 (2.38)						1 (0.64)
21	1 (2.38)						1 (0.64)
22				1 (7.69)			1 (0.64)
23	1 (2.38)						1 (0.64)
24	5 (11.90)						5 (3.18)
25		1 (5.88)					1 (0.64)
26		1 (5.88)					1 (0.64)
27	1 (2.38)						1 (0.64)
28		1 (5.88)					1 (0.64)
29					3 (7.89)	3 (11.11)	6 (3.82)
30		1 (5.88)					1 (0.64)
31					1 (2.63)		1 (0.64)
32	4 (9.52)		1 (12.50)		9 (23.68)	1 (3.70)	15 (9.55)
33					1 (2.63)		1 (0.64)
34					2 (5.26)		2 (1.27)
35							1 (0.64)
36	1 (2.38)						1 (0.64)
37						1 (3.70)	1 (0.64)
38	10 (23.81)			1 (7.69)	9 (23.68)	6 (22.22)	37 (23.57)
39	1 (2.38)						1 (0.64)
40		1 (5.88)			5 (13.16)		6 (3.82)
41		1 (5.88)					1 (0.64)
42	1 (2.38)						1 (0.64)
43					1 (2.63)		1 (0.64)
44	2 (4.76)						2 (1.27)
45	5 (11.90)						5 (3.18)
46	1 (2.38)						1 (0.64)
47	1 (2.38)						1 (0.64)
48					1 (2.63)		1 (0.64)
49		1 (5.88)					1 (0.64)
Number of strains ^f	42	17	8	13	38	27	157

^a Brazilian strain collections originated from São Paulo, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states.

^b Populations formed by strains from two citrus groves located in Presidente Prudente (São Paulo State) and Ourizona (Paraná State) municipalities.

^c Haplotypes identified by Southern blot analysis with AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090 (leucine rich protein), HpaF, and PthA4 DNA probes.

^d Refers to all studied Brazilian strains (157 strains of *X. citri* subsp. *citri*), including São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Roraima states.

^e Number of strains identified as the related haplotype and, between parentheses, percentage of the haplotype in the subcollection or orchard population.

^f Total number of strains from each subcollection or orchard population.

Table 6. Number and percentage of haplotypes identified by AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, and PthA4 DNA probes in subcollections and orchard populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by Southern blot analysis

DNA probe/haplotype ^c	Subcollections ^a				Orchard populations ^b	
	São Paulo	Paraná	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Presidente Prudente	Ourizona
AvrXacE1						
1				2 (15.39)		
2			4 (50.00)	4 (30.77)		
3		1 (5.88)				
4	1 (2.38) ^d					
6			3 (37.50)	2 (15.39)		
7	15 (35.72)	11 (64.71)		4 (30.77)	6 (15.79)	16 (59.26)
8	26 (61.90)	5 (29.41)	1 (12.50)	1 (7.68)	32 (84.21)	11 (40.74)
AvrXacE2						
1		1 (5.88)				
2	18 (42.86)	13 (76.47)	6 (75.00)	10 (76.92)	22 (57.90)	20 (74.07)
3	24 (57.14)	3 (17.65)	2 (25.00)	3 (23.08)	16 (42.10)	7 (25.93)
AvrXacE3						
1			4 (50.00)	6 (46.16)		
3			2 (25.00)	1 (7.69)		
4		1 (5.88)				1 (3.70)
5	16 (38.10)	10 (58.82)		5 (38.46)	10 (26.32)	19 (70.37)
6	25 (59.52)	5 (29.42)	1 (12.50)	1 (7.69)	28 (73.68)	7 (25.93)
7	1 (2.38)					
8			1 (12.50)			
10		1 (5.88)				
PthA4						
1	21 (50.00)	5 (29.41)	1 (12.50)	4 (30.77)	22 (57.90)	26 (96.30)
2	1 (2.38)					
3		1 (5.88)				
4					2 (5.26)	
5						1 (3.70)
6					1 (2.63)	
7		2 (11.77)			10 (26.32)	
8		1 (5.88)				
9		1 (5.88)				
10		1 (5.88)				
11	2 (4.76)	1 (5.88)				
12		1 (5.88)				
13		1 (5.88)				
14	1 (2.38)					
15		1 (5.88)				
16				1 (7.69)		
17					1 (2.63)	
18			5 (62.50)	6 (46.15)		
19			1 (12.50)			
20	1 (2.38)					
21	1 (2.38)					
22	2 (4.76)					
23	10 (23.81)			1 (7.69)		
24	1 (2.38)					
25	1 (2.38)					
26	1 (2.38)	1 (5.88)				
27			1 (12.50)			
28					2 (5.26)	
29		1 (5.88)				
30				1 (7.69)		
Number of strains ^c	42	17	8	13	38	27

^a Brazilian strain collections originated from São Paulo, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states.

^b Populations formed by strains from two citrus groves located in Presidente Prudente (São Paulo state) and Ourizona (Paraná state) municipalities.

^c Haplotypes identified by Southern blot analysis with AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, and PthA4 DNA probes.

^d Number of strains identified as the indicated haplotype and, between parentheses, percentage of the haplotype in the subcollection or orchard population to each DNA probe.

^e Total number of strains from each subcollection or orchard population.

Table 7. F_{ST} values calculated to compare haplotype frequencies in the strain subcollections and orchard populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* identified by Southern blot analysis with AvrXacE1, AvrXacE2, AvrXacE3, AvrBs2, Xac3090 (leucine rich protein), HpaF, and PthA4 DNA probes

Brazilian strain collections	Paraná	São Paulo	Santa Catarina	Rio Grande do Sul	Presidente Prudente
São Paulo	0.0429 ^{**a}	—	—	—	—
Santa Catarina	0.0566 ^{**}	0.0741 [*]	—	—	—
Rio Grande do Sul	−0.0004	0.0367 [*]	0.0105	—	—
Presidente Prudente	0.0705 ^{**}	0.0314 [*]	0.0756 [*]	0.0756 ^{**}	—
Ourizona	0.0837 [*]	0.1099 ^{**}	0.2360 ^{**}	0.0840 [*]	0.1634 ^{**}

^a F_{ST} values were calculated by analysis of molecular variance (AMOVA) using the software Arlequin version 3.11 (20). * indicates $P = 0.05$, and ** indicates $P = 0.01$ for each comparison.

richness, computed from Southern blot analysis for strains originating from São Paulo (where eradication is still undertaken) and Paraná (where IPM is implemented), yielded similar values. The sampling periods were 1980 to 2005 and 1986 to 2005 for strains collected in São Paulo and Paraná states, respectively. Most of the

recorded polymorphism was linked to the PthA4 probe, for which 30 haplotypes differed in terms of number of homologs and size of the hybridizing fragments. All *X. citri* subsp. *citri* strains studied so far were found to carry a *pthA* homolog, and 133 strains presented the *pthA4*, identified by fragment similarity (size) with the fully

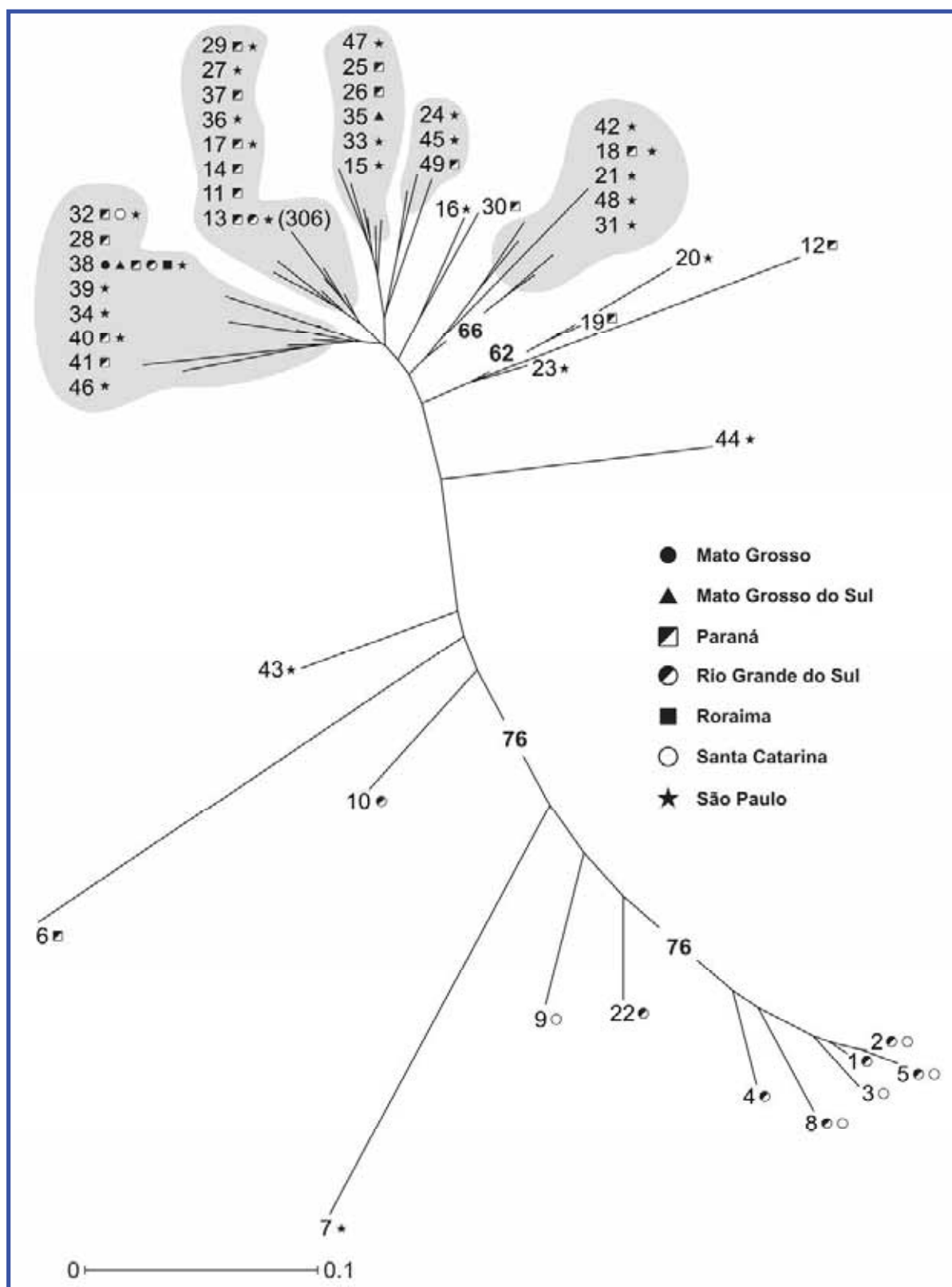


Fig. 3. Unweighted neighbor joining tree (Dice coefficient) showing the genetic diversity of 49 haplotypes identified by Type III effector genes in a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain collection from Brazil.

sequenced strain Xcc 306 by Southern analysis. The 17.5 nearly identical direct tandem repeats present in the *pthA4* homolog are essential for elicitation of citrus canker disease (5). Direct tandem repeats are leucine-rich sequences of 102 bp each, known as an active site for unequal crossing-over and homologous recombination (39). The *pthA* genes were found plasmid-borne in the fully sequenced strain Xcc 306 (19). Thus, such diversity is likely due to variation in the number and relative position of the *avr/pthA* genes in the *X. citri* subsp. *citri* genome, rearrangements of plasmids containing those genes linked to horizontal transfer, and recombination at and outside of the direct tandem repeat sequences in the *pthA* genes. Interestingly, only one or two haplotypes occurred within highest frequencies in each subcollection for AvrXacE/PthA4 probes and seem to be all genetically similar to one another and to most of the haplotypes (Figs. 3 and 4). However, the frequency of most genetically distant haplotypes was low, and they originated almost exclusively from Rio Grande do Sul and Santa Catarina, suggesting that strains with a different origin may have been introduced in these states.

Thirty-seven and 27 strains were isolated from only two citrus groves over a single year in Presidente Prudente, São Paulo in

2001, and Ourizona, Paraná in 2005, respectively. Their analysis using the panel of techniques reported herein yielded 19 different haplotypes, an unexpectedly high amount of diversity. Based on Southern/PCR-RFLP analysis with the *pthA* homolog, six and two haplotypes were identified in Presidente Prudente and Ourizona, respectively. The corresponding Nei's genetic diversity indexes for these subcollections were 0.87 and 0.65, respectively, when pooled datasets were considered. However, these two orchard populations presented the smallest values of polymorphic loci and pairwise differences between haplotypes, as compared to statewide strain collections. These two areas have been naturally infected by *X. citri* subsp. *citri* for at least two decades, and therefore share a relatively long history of local epidemics. The trees in Ourizona are located in a commercial grove, whereas in Presidente Prudente the grove belonged to an experimental station and was used for studies of the citrus canker epidemiology under simulated endemic occurrence. This experimental station was launched in the early 1980s. By that time, the first citrus trees were planted, followed by a single inoculation of *X. citri* subsp. *citri* in 1982. All other citrus trees grown thereafter in the station were "naturally" infected with *X. citri* subsp. *citri* by the inoculum previously introduced in the

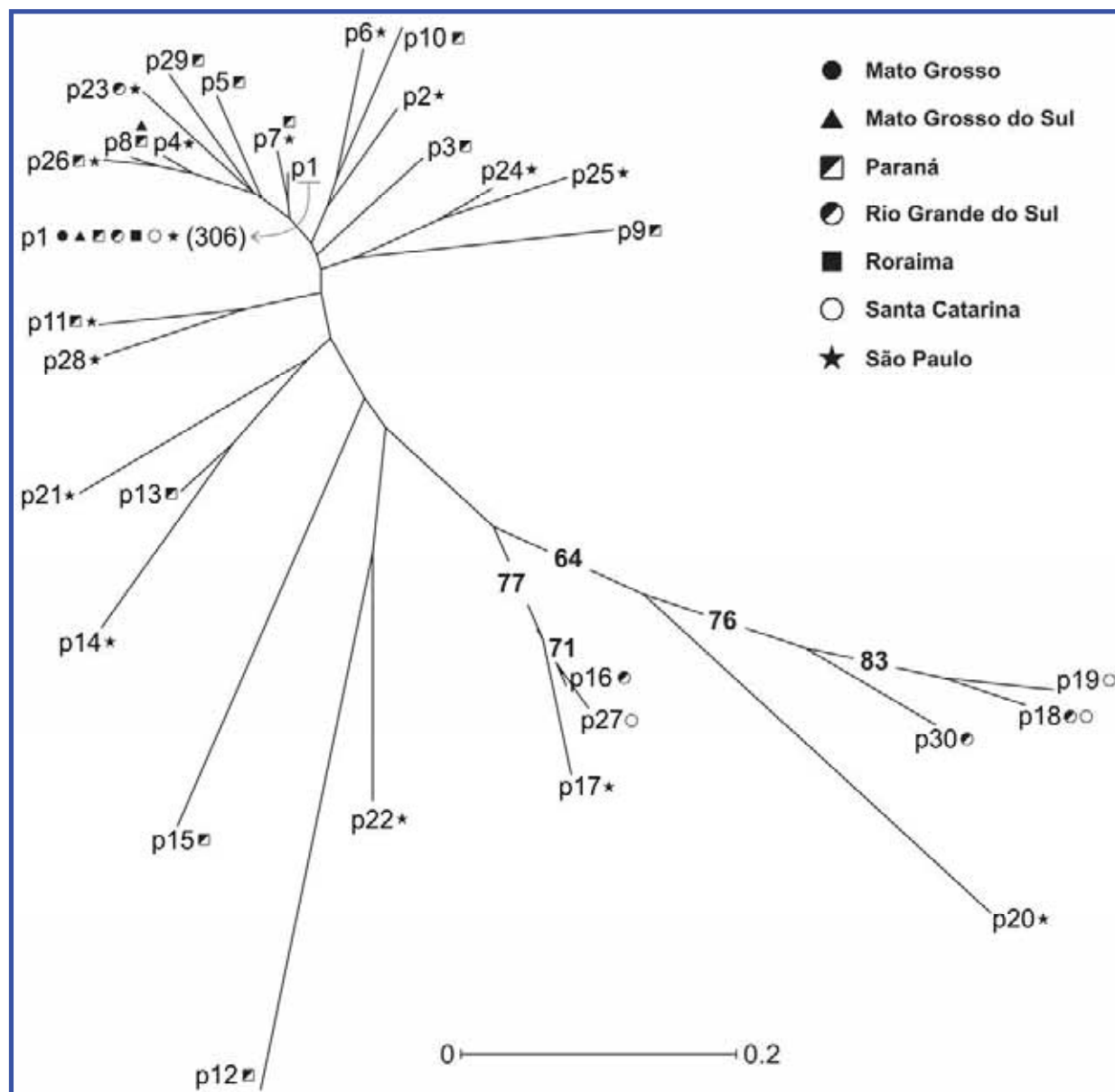


Fig. 4. Unweighted neighbor joining tree (Dice coefficient) showing the genetic diversity of 30 haplotypes (indicated by the "p") identified by PthA4 DNA probe used in Southern blot in a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strain collection from Brazil.

area. Thus, we hypothesize that the high genetic diversity observed for *X. citri* subsp. *citri* strains from both orchards reflected the relatively long history of the disease in that area.

Although 49 haplotypes were identified in 157 *X. citri* subsp. *citri* strains, the results presented here revealed short genetic distances among almost all haplotypes, especially those highly frequent in the subcollections, and not robust bootstrap values in the UNJ dendrograms. Different techniques have been used to assess the genetic diversity of *X. citri* subsp. *citri* based on putative neutral markers (14,16,18,34). Polymorphism was recently observed within world collections of *X. citri* subsp. *citri* using rep-PCR (18), insertion sequence-LM-PCR (14), AFLP, and multi locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) (15,16). The analysis of the selected effector genes used in the present work was useful for the identification of variability among *X. citri* subsp. *citri* strains originating from close geographic regions, and reveals the dynamics of *avr/pth* genes in the pathogen population.

In Brazil, *X. citri* subsp. *citri* was first detected in the late 1950s in São Paulo and Paraná states, in the 1980s in most of the southern states, and only in 2003 in Roraima. Our results indicate that haplotypes 13, 32, and 38 are relatively widespread in Brazil. The occurrence of identical haplotypes in distant Brazilian regions may be explained by transport of infected vegetal material. Moreover, multiple independent introductions of *X. citri* subsp. *citri* may have occurred over time, as supposed in Florida, USA (26). We speculate that the *X. citri* subsp. *citri* population in Brazil originated from one or a few strains introduced in São Paulo in the 1950s or earlier. Immediately after the first official detection of citrus canker in São Paulo in 1957, *X. citri* subsp. *citri* was also detected in Paraná and Mato Grosso do Sul states. Probably São Paulo and Paraná populations of *X. citri* subsp. *citri* originated from the same genotypic strains. However, the populations in Rio Grande do Sul and Santa Catarina, states where *X. citri* subsp. *citri* was detected decades later, may have been formed or influenced by additional pathogen introductions. The geography and relative proximity of the southern states, especially Santa Catarina and Rio Grande do Sul, and neighbor countries with endemic occurrence of citrus canker in South America (Argentina, Paraguay, and Uruguay) could have facilitated the exchange of infected plant material, which in turn led to the establishment of relatively different *X. citri* subsp. *citri* populations. This hypothesis can explain the large differences observed between subcollections from Rio Grande do Sul/Santa Catarina and all other Brazilian subcollections. A broad and multi-method for genetic characterization of *X. citri* subsp. *citri* strains from South American countries, as previously done in Asia (15), would be necessary to better understand the genetic structure of this pathogen in Brazil.

Identification of the components of the gene-for-gene interaction and its association with well-defined phenotypes (susceptible or resistant) allowed the establishment of strategies for the deployment of selected genes into different varieties as sources of resistance (2). The *avr* genes used in the present study are likely not directly involved in causing canker symptoms like *pthA* from the AvrBs3/PthA family (44). As demonstrated by Al-Saadi et al. (5), *pthA* is essential for elicitation of citrus canker disease, but not for host-range variation. However, Yang et al. (49) demonstrated that the interruption of the nuclear localization signals (NLS) of *pthA* genes induced host resistance against citrus canker. Type III effectors are delivered into the host cell and interfere with defense responses. Except for *pthA*, the phenotype of the interaction involving the bacterial effectors used as DNA probes in the present work with the host is not known. As demonstrated, the bacterial effectors from the families AvrBs3/PthA, HopX (AvrPphE), PopC, and AvrBs2 are widespread in the *X. citri* subsp. *citri* collection, indicating their possible participation in the pathogen–host interaction. Essential genes for pathogenicity and host interaction are target candidates in the search for the corresponding resistance genes in host/no host plants and the generation of plants with effective and durable resistance (33).

We conclude that the counter-intuitive large *pthA*-based diversity observed in São Paulo leads to at least two nonexclusive hypotheses, which would be dependent on the primary mode of *X. citri* subsp. *citri* spread in this state. A predominance of human-assisted spread would imply the occurrence of multiple migration events over the years. A predominance of natural spread through wind-driven rains from undetected or incompletely eradicated foci would imply a relative immediacy of plasmid transfer among strains and/or genetic reorganization at transcription activator-like effector family (TALE) loci or at flanking sites on the plasmids that bear them. This issue should be studied further and a more thorough surveillance system combining extensive high throughput genotyping such as MLVA and typing of TALE genes in clonal complexes would be of interest for an improved understanding of the epidemiology of *X. citri* subsp. *citri*.

Acknowledgments

We thank Franklin Behlau for critically reviewing this manuscript. This work was financed by Fapesp (Process number 2007/01431-4) and CNPq (Process number 300231/2008-3).

Literature Cited

- Adhikari, T. B., Mew, T. W., and Leach, J. E. 1999. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. *Phytopathology* 89:687-694.
- Adhikari, T. B., Vera Cruz, C. M., Zhang, Q., Nelson, R. J., Skinner, D. Z., Mew, T. W., and Leach, J. E. 1995. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:966-971.
- Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A. D., Brisse, S., Nesme, X., Chiro-leu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Vernière, C., and Pruvost, O. 2009. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:306-318.
- Alfano, J. R., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.
- Al-Saadi, A., Reddy, J. D., Duan, Y. P., Brunings, A. M., Yuan, Q., and Gabriel, D. W. 2007. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:934-943.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
- Baulcombe, D. C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8:1833-1844.
- Behlau, F., Belasque, J., Jr., Bergamin Filho, A., Graham, J. H., Leite R. P., Jr., and Gottwald, T. R. 2008. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on Young Orange trees in southern Brazil. *Crop Prot.* 27:807-813.
- Behlau, F., Belasque, J., Jr., Bergamin Filho, A., and Leite, R. P., Jr. 2007. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. *Fitopatol. Bras.* 32:311-317.
- Behlau, F., Belasque, J., Jr., Graham, J. H., and Leite R. P., Jr. 2010. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. *Crop Prot.* 29:300-305.
- Belasque, J., Jr., Barbosa, J. C., Bergamin Filho, A., and Massari, C. A. 2010. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. *Trop. Plant Pathol.* 35:314-317.
- Belasque, J., Jr., Gimenes-Fernandes, N., and Massari, C. A. 2009. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo, Brasil. *Sum. Phytopathol.* 35:91-92.
- Boscariol, R. L., Monteiro, M., Takahashi, E. K., Chabregas, S. M., Vieira, M. L., Vieira, L. G. E., Pereira, L. F. P., Mourão Filho, F. A. A., Cardoso, S. C., Christiano, R. S. C., Bergamin Filho, A., Barbosa, J. M., Azevedo, F. A., and Mendes, B. M. J. 2006. *Atacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 13:530-536.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Belasque, J., Jr., Vital, K., Sebastien, B., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2008. Ligation-mediated PCR, a fast and reliable technique for insertion sequence-based typing of *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *FEMS Microbiol. Let.* 288:33-39.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jarne, P., Brisse, S., Guérin, F., Boutry, S., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2009. From local surveys to global surveillance: Three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1173-1184.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiro-

- leu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bluvae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:515-525.
17. Campbell, V., Legendre, P., and Lapointe, F. J. 2009. Assessing congruence among ultrametric distance matrices. J. Classif. 26:103-117.
18. Cubero, J., and Graham, J. H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68:1257-1264.
19. Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M. C., Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E. A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chamberg, F., Ciapina, L. P., Ciccarelli, R. M. B., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J. S., Ferreira, R. C. C., Ferro, M. I. T., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F. M., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T. M., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A. D., Silva, C., De Souza, R. F., Spinola, L. A. F., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I. D., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C., and Kitajima, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417:459-463.
20. Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online 1:47-50.
21. Gabriel, D. W., Kingsley, M. T., Hunter, J. E., and Gottwald, T. R. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:14-22.
22. Gascuel, O. 1997. Concerning the NJ algorithm and its unweighted version UNJ. B. Mirkin, F. R. McMorris, F. S. Roberts, and A. Rzhetsky, eds. Mathematical Hierarchies and Biology. American Mathematical Society, Providence, RI. 37:149-171.
23. Gottwald, T. R., Graham, J. H., Civerolo, E. L., Barrett, H. C., and Hearn, C. J. 1993. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. Plant Dis. 77:1004-1009.
24. Gottwald, T. R., Hughes, G., Graham, J. H., Sun, X., and Riley, T. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology 91:30-34.
25. Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F., and Taylor, E. L. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. Phytopathology 92:361-377.
26. Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., and Achor, D. S. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: Factors affecting successful eradication of citrus canker. Mol. Plant Pathol. 5:1-15.
27. Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., and Dangl, J. L. 2006. Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 60:425-449.
28. Jaciani, F. J., Destéfano, S. A. L., Rodrigues Neto, J., and Belasque, Jr., J. 2009. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting Swingle citrumelo in Brazil. Plant Dis. 93:1074.
29. Kalinowski, S. T. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. Conserv. Genet. 5:539-543.
30. Kalinowski, S. T. 2005. HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. Mol. Ecol. Notes 5:187-189.
31. Karen-Beth, G. S., Herman, B. S., and Andrew, O. J. 1993. Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. Plant Physiol. 102:7-12.
32. Kendall, M. G., and Babington-Smith, B. 1939. The problem of m rankings. Ann. Math. Stat. 10:275-287.
33. Leach, J. E., and White, F. F. 1996. Bacterial avirulence genes. Annu. Rev. Phytopathol. 34:153-179.
34. Li, W., Song, Q., Brlansky, R. H., and Hartung, J. S. 2007. Genetic diversity of citrus bacterial canker pathogens preserved in herbarium specimens. Proc. Natl. Acad. Sci. 104:18427-18432.
35. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and Brujin, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60:2286-2295.
36. Nimchuk, Z. L., Fisher, E. J., Desveaux, D., Chang, J. H., and Dangl, J. L. 2007. The Hop X (AvrPphE) family of *Pseudomonas syringae* Type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. Mol. Plant-Microbe Interact. 20:346-357.
37. Ochiai, H., Horino, O., Miyajima, K., and Kaku, H. 2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. Phytopathology 90:415-421.
38. Pavan, A., Calixto, M. C., Cardoso, S. C., Mendes, B. M. J., Bergamin Filho, A., Lopes, J. R. S., Carvalho, C. R., and Mourão Filho, F. A. A. 2007. Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. Sci. Hortic. 113:278-285.
39. Petes, T. D., and Hill, C. W. 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. Annu. Rev. Genet. 22:147-168.
40. Restrepo, S., Vélez, C. M., and Verdier, V. 2000. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. Phytopathology 90:683-690.
41. Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.. Syst. Appl. Microbiol. 28:494-518.
42. Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Syst. Appl. Microbiol. 29:690-695.
43. Sun, X., Stall, R. E., Jones, J. B., Cubero, J., Gottwald, T. R., Graham, J. H., Dixon, W. D., Schubert, T. S., Chaloux, P. H., Stromberg, V. K., Lacy, G. H., and Sutton, B. D. 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/Mexican lime and alemow in South Florida. Plant Dis. 88:1179-1188.
44. Swarup, S., Feyter, R., Brlansky, R. H., and Gabriel, D. W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.
45. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:472-489.
46. Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682.
47. Verdier, V., Restrepo, S., Mosquera, G., Duque, M. C., Gerstl, A., and Laberry, R. 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. Plant Pathol. 47:601-608.
48. Vernière, C., Hartung, J. S., Pruvost, O., Civerolo, E. L., Alvarez, A. M., Maestri, P., and Luisetti, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. Eur. J. Plant Pathol. 104:477-487.
49. Yang, L., Hu, C., Li, N., Zhang, J., Yan, J., and Deng, Z. 2011. Plant Mol. Biol. 75:11-23.