

RESSALVA

Alertamos para ausência dos capítulos 4 ao 6,
não incluídos pelo(a) autor(a) no arquivo
original.

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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Xanthomonas PATOGÊNICAS A CITROS BASEADA EM GENES
avr E leucine rich protein.

Fabrício José Jaciani
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
Xanthomonas PATOGÊNICAS A CITROS BASEADA EM GENES
avr E leucine rich protein.

Fabrício José Jaciani

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboshi Ferro

Co-orientador: Dr. José Belasque Júnior

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

J12d Jaciani, Fabrício José
Diversidade genética de espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros baseada em genes *avr* e *leucine rich protein* / Fabrício José Jaciani. — — Jaboticabal, 2008
ix, 53 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientadora: Maria Inês Tiraboshi Ferro
Banca examinadora: João Martins Pizauro Júnior, Júlio Cezar Franco de Oliveira
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Interação patógeno-hospedeiro. 3. *avrPphE*.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.21:634.31

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. Filho de Wilson Jaciani e Maria Ester Vizoto. Biólogo formado em janeiro de 2006 pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA. Ingressou em março do mesmo ano no curso de Mestrado, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal.

“...Desejo que você afague um gato,
alimente um cuco e ouça o João-de-barro
erguer triunfante o seu canto matinal,
porque assim, você se sentirá bem por nada...”

Victor Hugo

À minha família:
*meus pais, **Wilson e Maria Ester**;*
*meus avós, **Luiz e Orlanda**,*
*meus irmãos **Rita, André e Chiara**,*
*meus sobrinhos **Bruno, Gabriel e Manoela**;*
*meu cunhado **Michel** e*
*minha namorada **Greice**...*

por serem, simplesmente, quem são e
por tudo que representam em minha vida.
A existência de vocês é minha festa interior.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu eterno orientador.

À Maria Inês T. Ferro agradeço profundamente por ter assumido a orientação desta dissertação, tendo-me brindado com a oportunidade da realização de um sonho.

Ao meu co-orientador, Dr. José Belasque Júnior, peça fundamental na elaboração deste trabalho, pela confiança, tempo dispensado e paciência, dosando as críticas com comentários de incentivo e amizade. Agradeço imensamente.

À Msc. Elaine Cristina Martins pelos inúmeros ensinamentos, valiosas sugestões e indispensável colaboração em muitos momentos ao longo desse trabalho.

Aos xantho-amigos Denis Rogério Marin e Gisele Lopes Braga pelas palavras amigas, de incentivo, de carinho e de irmãos.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, em nome de Antônio Juliano Ayres, pela oportunidade e estrutura oferecidas na realização do Mestrado, e por me abrir as portas, ainda na graduação, do mundo científico.

Aos colegas do Fundecitrus com quem convivi durante esses dois anos de Mestrado: Ana Paula, André, Anelise, Célia, Júlio César, Daniel, Diva, Everton, Gabriel, Guilherme, Gustavo, Helber, Jaqueline, Marcel, Marcos, Marlene, Mateus, Michele, Montesino, Nelson, Nivian, Pedro, Priscila, Renata, Renato, Ricardo, Sidinei, Silvio, Sueli, Thais, Thiago e Vitor. Colegas estes que compartilharam idéias, opiniões e principalmente, muitas gargalhadas, tornando a realização deste trabalho muito mais fácil e agradável. Para vocês “Aquele abraço”.

À FCAV/UNESP e aos colegas de pós-graduação, em especial a Breno Pupin, Gisele Rodrigues e Rachel Rattis pelo convívio e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

E aos que eventualmente me esqueci de mencionar, uma vez que a esta altura do campeonato, pouca memória disponível me resta.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cancro cítrico.....	3
2.2 Xanthomonas patogênicas a citros.....	5
2.3 Interação patógeno/hospedeiro.....	7
2.4 Diversidade genética.....	9
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Isolados bacterianos.....	11
3.2 Teste de patogenicidade dos isolados de <i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	15
3.3 Extração de DNA genômico.....	16
3.4 Construção dos iniciadores e amplificação via PCR.....	16
3.5 Clonagem dos produtos amplificados.....	17
3.6 Transformação bacteriana.....	21
3.7 Seqüenciamento dos clones.....	22
3.8 Digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição (PCR-RFLP).....	23
3.9 “Southern blot”.....	23
3.10 Análise dos dados.....	24
IV. RESULTADOS.....	24
4.1 Teste de patogenicidade.....	25
4.2 PCR-RFLP.....	25
4.3 “Southern blot”.....	26
V. DISCUSSÃO.....	40
VI. CONCLUSÕES.....	43
VII. REFERÊNCIAS.....	44

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Xanthomonas* PATOGÊNICAS A CITROS BASEADA EM GENES *avr* E *leucine rich protein*

RESUMO - A caracterização da estrutura genética de populações clonais de patógenos bacterianos tem sido feita, entre outros métodos, por “Southern blot” empregando-se como sondas seqüências de inserção ou genes *avr*. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores e sondas de DNA baseadas em genes de patogenicidade para estudo da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Observou-se a presença dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2* e *lrp* em todos isolados das subsp. *citri* e *aurantifolii* e a ausência do gene *avrXacE2* no isolado da subsp. *citrumelonis*. Os perfis de restrição gerados por PCR-RFLP não revelaram polimorfismo nos genes amplificados e o uso de genes *avr* como sondas para “Southern blot” mostrou-se efetiva na diferenciação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros e na identificação de relativo polimorfismo entre isolados da mesma espécie. A diversidade haplotípica foi maior com o gene *avrXacE1*. Com exceção à sonda correspondente ao gene *lrp*, o número de haplótipos identificados (17) variou de acordo com a endonuclease utilizada em “Southern blot”. Os isolados da subsp. *citri* apresentaram um maior número de cópias dos genes *avr* em comparação com isolados das subsp. *aurantifolii* e *citrumelonis*. O estado de São Paulo, que adota uma campanha de erradicação do cancro cítrico, apresentou a menor diversidade haplotípica, provavelmente em decorrência do curto período em que o patógeno interage com o hospedeiro.

Palavras chave: *avrXacE1*, *avrXacE2*, cancro cítrico, PCR-RFLP, “Southern blot”

GENETIC DIVERSITY OF *Xanthomonas* SPECIES PATHOGENIC TO CITRUS BASED ON *avr* AND *leucine rich protein* GENES

SUMMARY - The genetic structure of clonal populations of bacterial pathogens has been characterized, among other methods, by Southern blot using insertion sequences or *avr* genes as probes. The present work aimed the development of DNA primers and probes based on pathogenicity genes to study the genetic diversity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* strains. The presence of *avrXacE1*, *avrXacE2* and *leucine rich protein (lrp)* genes was observed in all *citri* and *aurantifolii* strains, as well as the absence of the *avrXacE2* gene in *citrumelonis* isolate. The restriction profiles generated by PCR-RFLP did not show polymorphism in the amplified genes and the use of *avr* genes as Southern blot probes showed to be effective to differentiate *Xanthomonas* species pathogenic to citrus and to identify a relative polymorphism between strains belonging to the same species. The haplotype diversity was higher with the *avrXacE1* gene. Excepting the probe corresponding to *lrp* gene, the number of haplotypes identified (17) varied according to the endonuclease used on Southern blot. The strains of the *citri* species presented a higher number of copies of the *avr* genes compared to *aurantifolii* and *citrumelonis*. The state of São Paulo, that adopts a campaign of eradication of the citrus canker, presented the smaller haplotype diversity, probably as result of the short period where the pathogen interacts with the host.

Keywords: *avrXacE1*, *avrXacE2*, citrus canker, PCR-RFLP, Southern blot

I. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico é uma das principais ameaças à cultura dos citros em todo o mundo. Provocadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*, diferentes formas de cancro cítrico são descritas com base na especificidade do patógeno e origem geográfica. Causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o cancro cítrico asiático, ou cancrose A, possui ampla faixa de hospedeiros, sendo considerado o mais agressivo tipo de cancro. Recentemente, dois novos isolados da subsp. *citri* foram identificados. Denominados de A* (VERNIÈRE et al., 1998) e A^w (SUN et al., 2004) ambos possuem patogenicidade restrita à *Citrus aurantifolia* e estão limitados, respectivamente, ao sudeste asiático e à Flórida. Também restrita à Flórida, a mancha bacteriana dos citros, causada por *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*, afeta principalmente citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*). Encontrada apenas na América do Sul, a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* é o agente causal das cancrozes B e C. Isolados do tipo B foram encontrados na Argentina, Paraguai e Uruguai e possuem patogenicidade restrita a limões verdadeiros e limas ácidas, enquanto que limitado ao estado de São Paulo, o tipo C deste patógeno afeta somente *Citrus aurantifolia*. DESTÉFANO & RODRIGUES NETO (2001), relataram a existência de isolados do tipo C produtores de pigmento escuro quando cultivados em meio de cultura. Testes de patogenicidade com isolados produtores e não produtores de pigmento revelaram diferenças na agressividade dos mesmos (NOCITI et al., 2006).

A interação patógeno-hospedeiro é caracterizada por uma complementaridade gene-a-gene (FLOR, 1955), na qual a resistência genética é controlada por um gene de avirulência (*avr*) no genoma bacteriano e um gene de resistência (*R*) correspondente na planta. Moléculas protéicas receptoras que são sintetizadas pelos genes *R* do hospedeiro reagem de forma específica às moléculas elicitoras produzidas pelos genes *avr* do patógeno (QUIRINO & BENT, 2003). Os produtos dos genes *avr*, também chamados de efetores, são transferidos para dentro das células hospedeiras através do sistema de secreção tipo III (CHEN et al., 2004). Quando o hospedeiro reconhece estas moléculas é desencadeada uma resposta de defesa, freqüentemente gerando rápida morte de células no local da infecção, chamada de reação de hipersensibilidade.

Quando o patógeno não é reconhecido pelo hospedeiro, este consegue se instalar e incitar a doença (GACHOMO et al., 2003).

O estudo da diversidade genética de um patógeno pode fornecer subsídios no estabelecimento de hipóteses a respeito da história evolutiva, interação com o hospedeiro e definição de estratégias de controle. A caracterização da estrutura genética de populações clonais de patógenos bacterianos tem sido feita, entre outros métodos, por “Southern blot” empregando-se como sondas seqüências de inserção (“insertion sequences”-IS) ou genes *avr* (BELASQUE JÚNIOR, 2005; HERMANS et al., 1990; LEACH et al., 1995). A diversidade de genes da família *avrBs3* entre isolados de *Xanthomonas* têm sido observada em diferentes patossistemas (GAGNEVIN & PRUVOST, 1998; VERDIER et al., 1998). Essa diversidade pode ser útil na determinação da estrutura genética de populações de isolados obtidos de diferentes hospedeiros e/ou de plantas submetidas a diferentes condições de manejo/controle da doença (VERDIER et al., 1998).

Em relação à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, técnicas moleculares baseadas em sondas *hrp*, perfil eletroforético após clivagem com endonucleases, re-associação de DNA e “pulsed-field gel electrophoresis”, mostraram-se com limitado poder discriminatório na diferenciação de isolados (EGEL et al., 1991; GABRIEL et al., 1988; HARTUNG & CIVEROLO, 1989; HARTUNG, 1992; LEITE JÚNIOR et al., 1994). Maiores dissimilaridades foram obtidas com BOX (BOX “elements”) e ERIC-PCR (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”), técnicas que permitiram a relativa caracterização de grupos genéticos e separação parcial de isolados originários de diferentes países e regiões produtoras ou com patogenicidade diferenciada (CUBERO & GRAHAM, 2002).

Recentemente, BELASQUE JÚNIOR (2005) demonstrou que o uso de IS's como sondas para “Southern blot” permitiu a identificação de polimorfismo genético e diferenciação de isolados da subsp. *citri* originários de São Paulo. Os resultados apresentados por esse autor, obtidos com AFLP, diferiram da genotipagem realizada com “Southern blot”. A distribuição de haplótipos de espécies de *Xanthomonas* baseada na técnica de “Southern blot” com sondas como IS's e genes *avr* tem fornecido uma adequada quantificação da diversidade genética da população de patógenos, tendo

revelado, pelo menos parcialmente, alguns fatores envolvidos na adaptação do patógeno ao hospedeiro/ambiente e permitido o estabelecimento de hipóteses baseadas na ecologia do patossistema (ADHIKARI et al., 1999; GAGNEVIN et al., 1997; NELSON et al., 1994; OCHIAI et al., 2000; RESTREPO et al., 2000).

No entanto, informações correlacionando a diversidade genética e a patogenicidade e/ou a dinâmica da interação de *Xanthomonas*-citros, como as fornecidas por estudos baseados em genes *avr/pth*, ainda são limitadas na literatura. As recentes informações geradas pelo Projeto Genoma/FAPESP em muito facilitam esse tipo de estudo, e novas hipóteses acerca da dinâmica da interação *Xanthomonas*-citros poderão ser estabelecidas, com reflexos futuros no controle do cancro cítrico, uma das mais importantes doenças da cultura dos citros (DA SILVA et al., 2002; GOTTWALD et al., 2001). Dessa forma, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e sondas de DNA baseadas em genes de patogenicidade para uso em análise por “Southern blot” e PCR-RFLP. A diversidade dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2* e *leucine rich protein (lrp)* foi estudada entre isolados de *Xanthomonas* patogênicos a citros originários do Brasil.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cancro cítrico

O cancro cítrico foi introduzido no século passado nas Américas do Norte e Sul e Oceania, provavelmente por material infectado, regiões estas que abrigam dois dos mais importantes produtores mundiais de citros – Brasil e Estados Unidos (STALL & SEYMOUR, 1983; CIVEROLO, 1985; SCHOULTIES et al., 1987). A primeira ocorrência de cancro cítrico no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (BITANCOURT, 1957). Medidas de exclusão e erradicação foram adotadas neste mesmo ano e foi iniciada uma campanha de erradicação que permanece ativa até os dias atuais (GIMENES-FERNANDES et al., 2000; MASSARI & BELASQUE JÚNIOR,

2006). Apesar dos esforços iniciais, já em 1957 o cancro cítrico foi encontrado nos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná (AMARAL, 1957). Atualmente a doença está presente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima e a campanha de erradicação da doença é válida em todo território nacional, com exceção dos estados do Sul do Brasil (MASSARI & BELASQUE JÚNIOR, 2006; NASCIMENTO et al., 2003; PORTO et al., 1981)

Desde 1977 a campanha de erradicação conta com o apoio do Fundecitrus - Fundo de Defesa da Citricultura, uma associação mantida por citricultores e indústrias processadoras de frutas cítricas, voltada para a sanidade dos pomares. O Fundecitrus realiza levantamentos amostrais que apontam a incidência da doença, bem como as regiões onde se encontram os focos. Realizado anualmente, o levantamento é de fundamental importância para nortear ações estratégicas de inspeção (FUNDECITRUS, 2007). Constatada a presença de cancro cítrico, a legislação federal determina a eliminação das plantas doentes, assim como de todas as outras presentes em um raio mínimo de trinta metros (BARBOSA et al., 2001).

Sintomas de cancro cítrico 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 (Figura 1). Os sintomas em folhas constituem-se em lesões levemente salientes nas duas faces e, geralmente, circundadas por um halo amarelo. A formação deste halo está associada ao decréscimo da produção de clorofilas a e b, caroteno e xantofila nessas regiões (PADMANABHAM et al., 1973). Nos frutos os sintomas são semelhantes aos observados nas folhas. Em estágio avançado, as lesões provocam o rompimento da casca. Lesões em ramos, geralmente, são encontradas apenas em variedades muito suscetíveis. A fotossíntese é prejudicada em função da destruição da área foliar e ataques mais severos podem levar à desfolha e queda de frutos (FUNDECITRUS, 2007; LEITE JÚNIOR, 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 (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD

et al., 1992). Com a introdução no Brasil, em 1996, do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 – Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae), houve importante aumento na incidência do cancro cítrico (BERGAMIN FILHO et al., 2000; GIMENES-FERNANDES et al., 2000). Durante a alimentação, as larvas rompem a cutícula e a epiderme e expõem o mesófilo foliar, tornando-o mais suscetível à infecção (CHAGAS et al., 2001; GOTTWALD et al., 1997; JESUS JÚNIOR et al., 2006).



Figura 1. Sintomas de cancro cítrico em folhas e fruto de laranja. Observa-se a formação de lesões circundadas por halo amarelo. Fonte: Fundecitrus

2.2 *Xanthomonas* patogênicas a citros

O gênero *Xanthomonas* (do grego, “xanthos” = amarelo; “monas” = unidade) compreende um grupo de bactérias fitopatogênicas de grande importância econômica em todo o mundo. Possui ampla gama de hospedeiros que incluem, pelo menos, 68 famílias de plantas e mais de 240 gêneros (HAYWARD, 1993).

A classificação de espécies desse gênero tem sido alvo de discussões durante vários anos (GABRIEL et al., 1989; VAUTERIN et al., 1995; VAUTERIN et al., 2000; SCHAAD, et al., 2005; SCHAAD, et al., 2006). A recente reclassificação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros é baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP (“amplified fragment length polymorphism”) e re-associação DNA-DNA (SCHAAD et al., 2006). Antes pertencentes a uma mesma espécie bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) e separados em patovares (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelo*) (VAUTERIN et al., 1995), a classificação atual 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).

Esses fitopatógenos penetram nos tecidos vegetais do hospedeiro através de aberturas naturais como estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos (GOTTWALD & GRAHAM, 1992; GRAHAM et al., 1992). Uma vez no espaço mesofílico, multiplicam-se nos espaços intercelulares produzindo polissacarídeos extracelulares, principalmente 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., 1973). Essas bactérias não conseguem sobreviver por longo período em restos de cultura ou plantas daninhas incorporadas ao solo, porém podem sobreviver por anos em tecidos infectados mantidos secos, livres de solo e protegidos da luz solar (GOTO, 1992).

Crescem facilmente na maioria dos meios de cultura utilizados em laboratório. Colônias são visíveis após 2-3 dias de incubação a 28°C. Em plantas inoculadas e mantidas nessa temperatura, os sintomas começam a ser visíveis depois de 10-14 dias e são facilmente isoladas de tecido cítrico infectado. Aeróbias restritas, bastonetiformes e móveis por um único flagelo polar (monotríquia), essas proteobactérias tem como característica a produção de pigmento amarelo, quando em colônia, denominado xanthomonadina, importante na proteção contra raios ultravioleta (STALL & CIVEROLO, 1991; TSUYUMU et al., 1996).

2.3 Interação patógeno/hospedeiro

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 através de 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 elicitoras (Avr) codificadas por genes de avirulência presentes no patógeno. Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas de defesa, freqüentemente gerando rápida morte de células no local da infecção, chamada de reação de hipersensibilidade (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).

Yang et al. (1994) demonstraram a função do gene *avrb6* na capacidade de *X. malvacearum* em provocar anasarca e aumentar a expressão dos sintomas da doença e a exsudação de células bacterianas das lesões para a superfície do hospedeiro. Alterações nas seqüências repetitivas de genes *avr* 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).

Genes *avr* pertencentes a diferentes famílias de genes foram clonados em diversas espécies do gênero *Xanthomonas*. O maior grupo de genes *avr* já clonados pertence à família *avrBs3/pth*. Muitos membros dessa família são requeridos, ou contribuem, na patogenicidade nos hospedeiros dos quais foram originalmente clonados (GABRIEL, 1999). O seqüenciamento do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (DA SILVA et al., 2002) identificou a presença de quatro genes da família *avrBs3/pth* neste fitopatógeno. Todos estão em plasmídeos e foram denominados de *pthA1*, *pthA2*, *pthA3* e *pthA4*. O agente causal do cancro cítrico contém ainda o gene *avrBs2* (situado no cromossomo) e três genes com similaridade para *avrPphE* (*avrXacE1* e *avrXacE2* localizados no cromossomo e *avrXacE3* localizado em plasmídeo), originalmente identificado em *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Além de genes *avr*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* contém genes *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity") e *lrp*, importantes na colonização do patógeno.

Os efetores do gene *pthA* são necessário para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* induzir sintomas da doença. Inserções deste gene em outras espécies de *Xanthomonas* não patogênicas em citros conferiram a habilidade dessas em romper a epiderme foliar e induzir sintomas em citros (SWARUP et al., 1991). O gene *pthA*, além de promover a divisão (hipertrofia) e o alargamento (hiperplasia) celulares, também está envolvido na morte celular programa ("programmed cell death"), sendo um determinante primário da gama de hospedeiros do patógeno (DUAN et al., 1999). YANG & GABRIEL (1995) observaram que tanto patogenicidade quanto avirulência são determinados pela região de seqüências repetitivas de 102 pares de base (pb) desse gene. Outro fato importante é que a virulência e as respostas fenotípicas do hospedeiro aparentemente são determinadas por regiões repetitivas diferentes. Essas regiões repetitivas são ricas em leucina, sendo possível que codifiquem proteínas que funcionam como sítios de ligação com os genes de resistência do hospedeiro.

Os tipos bacterianos A, B e C de *Xanthomonas* patogênicos em citros possuem distribuição geográfica e patogenicidade distintas, mas induzem sintomas praticamente idênticos. O seqüenciamento dos genes *pthB* e *pthC*, dos tipos B e C, respectivamente, revelou que tratam-se de genes da família *avrBs3*. Ambos hibridam com *pthA*, são

funcionalmente intercambiáveis e absolutamente necessários para elicitar os sintomas da doença em seus hospedeiros, assim como *pthA* (GABRIEL, 1999).

2.4 Diversidade genética

A genotipagem de isolados de *Xanthomonas* patogênicos a citros tem sido feita objetivando, preferencialmente, a diferenciação das espécies existentes. Padrões obtidos pela clivagem do DNA por endonucleases e re-associação de DNA demonstraram perfis similares entre os tipos A e B, e maiores diferenças destes dois grupos com a subsp. *citrumelonis*. A similaridade média entre estes três grupos foi de 60% por re-associação de DNA. Os cinco isolados testados pertencentes ao tipo A foram similares entre si no mínimo em 90% (EGEL et al., 1991). Resultados similares foram obtidos pela comparação dos perfis genéticos gerados por clivagem do DNA por endonucleases e “Southern blot” usando-se como sonda um “cluster” do gene *hrp* (LEITE JÚNIOR et al., 1994). Relativo polimorfismo foi observado entre os grupos patogênicos de *Xanthomonas*, mas não dentro de cada subespécie. Em outro estudo, a caracterização metabólica baseada na utilização do sistema Biolog não se correlacionou com a origem geográfica, hospedeiro e ano de isolamento (VERNIÈRE et al., 1993).

A diversidade genética de coleções mundiais de isolados da subsp. *citri* foi estudada por perfis de DNA baseados em RFLP (HARTUNG & CIVEROLO, 1987; HARTUNG & CIVEROLO, 1989). Essa técnica permitiu distinguir o tipo A dos demais tipos de cancro cítrico, mas não revelou polimorfismo entre isolados da mesma espécie. No Brasil, perfis de restrição de DNA plasmidial obtidos para 21 isolados do Rio Grande do Sul revelaram a existência de três “clusters” na população do patógeno naquele estado (MACIEL et al., 1998). GAGNEVIN et al. (1997), também com RFLP, estudou a diversidade genética de isolados de uma população mundial de *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*. Os grupos genéticos identificados 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, a genotipagem de uma coleção mundial de isolados da subsp. *citri* por BOX e ERIC-PCR permitiu a relativa caracterização de grupos genéticos e separou parcialmente isolados distantes geograficamente, como os originários da Ásia e América, e também os com patogenicidade diferenciada (tipos A* e A^w). As similaridades médias encontradas entre isolados da subsp. *citri* estudados foram superiores a 85 e 87% para BOX e ERIC, respectivamente (CUBERO & GRAHAM, 2002). Como sugerem os autores, a existência de genótipos comuns entre a Flórida e a América do Sul e Ásia, identificados por BOX e ERIC-PCR, pode ser em razão da introdução do patógeno na região metropolitana de Miami por material vegetal infectado (GRAHAM et al., 2004).

Métodos baseados em polimorfismo de fragmentos (RFLP e AFLP) têm sido utilizados para diferenciar estirpes de *citri* associadas com diferentes epidemias do cancro cítrico e da mancha bacteriana dos citros (BELASQUE JÚNIOR, 2005; GILLINGS et al., 1995; GRAHAM & GOTTWALD, 1991; SCHUBERT et al., 1996). Nesses estudos foram incluídas análise com endonucleases de DNA total (GILLINGS et al., 1995), fragmentos de DNA clonados ao acaso de uma linhagem japonesa de *citri* utilizada como sonda em análise de “Southern blot” (GOTTWALD et al., 1991; HARTUNG & CIVEROLO, 1989; HARTUNG & CIVEROLO, 1991) e eletroforese de campo pulsado (PFGE) (EGEL et al., 1991; GOTTWALD et al., 1992). O sistema desenvolvido por HARTUNG & CIVEROLO (1989) envolveu a utilização de sete diferentes sondas polimórficas e forneceu polimorfismo limitado com isolados da subsp. *citri*.

Como observado em outros patossistemas envolvendo *Xanthomonas*, o uso de IS's como sondas para “Southern blot” permitiu a identificação de polimorfismo genético e a diferenciação de isolados da subsp. *citri* originários de São Paulo (BELASQUE JÚNIOR, 2005). Nesse estudo os índices de diversidade genética (Nei) obtidos variaram de 0,09 a 0,94 e mostraram-se dependentes das populações e sondas estudadas. A utilização de sondas correspondentes aos genes *ISxac1*, *ISxac2* e *ISxac3* é a técnica de maior poder discriminante dentre as já testadas com *Xanthomonas citri*,

sendo, potencialmente, a melhor técnica na definição da estrutura genética de populações desse patógeno e na identificação de origem de focos da doença. Os resultados obtidos com AFLP diferiram da genotipagem realizada com “Southern blot”. As sondas permitiram uma relativa separação dos isolados, baseada nas populações estudadas e na origem geográfica destes, mas com baixos valores de bootstrap. Outro ponto é que não foi possível o estudo da dinâmica da interação do patógeno com hospedeiro, em razão das sondas utilizadas (IS's) e dos hospedeiros de origem dos isolados (na maioria *Citrus sinensis*).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Nesse estudo foram utilizados 172 isolados de *Xanthomonas*, dos quais 159 pertencem a subsp. *citri* (incluindo os tipos A* e A^w), doze são da subsp. *aurantifolii* e um representa a subsp. *citrumelonis* (Tabela 1). Os isolados das subespécies *citri* e *aurantifolii* estão distribuídos em três coleções de culturas (IBSBF, IAPAR e Fundecitrus) e têm como origem sete estados brasileiros (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Roraima, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo). Foram incluídos dois isolados referência: 306, seqüenciado no Projeto Genoma/Fapesp, e IBSBF 1412 (= CFBP 2525), antigo patótipo da subsp. *citri*. A população de isolados selecionada possui algumas características importantes para o presente trabalho. Foram incluídos isolados da região de origem da doença no Brasil (Presidente Prudente/SP); de regiões consideradas, até recentemente, como livre do patógeno (Roraima); de áreas sob controle rígido do cancro cítrico por meio de erradicação do patógeno (São Paulo) e outras que fazem o manejo dessa doença (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Além de vários isolados obtidos de apenas dois pomares, ambos com longo histórico de ocorrência do cancro cítrico (Presidente Prudente/SP e Ourizona/PR) (BELASQUE JÚNIOR, 2005), e de isolados provenientes,

nos mesmos anos, tanto de regiões contíguas em diferentes estados, quanto de regiões distantes entre si.

Tabela 1. Isolados bacterianos, ano de isolamento, espécies e origem geográfica dos 172 isolados utilizados nesse estudo.

(continua)

Isolado	Ano de isolamento	Espécie	Município	Estado	País
IBSBF ¹ 382	1981	<i>aurantifolii</i>	Américo de Campos	São Paulo	Brasil
IBSBF 434	2002	<i>aurantifolii</i>	Ibirá	São Paulo	Brasil
IBSBF 1479	2000	<i>aurantifolii</i>	José Bonifácio	São Paulo	Brasil
IBSBF 1481	2000	<i>aurantifolii</i>	José Bonifácio	São Paulo	Brasil
IBSBF 1496	2000	<i>aurantifolii</i>	Mesópolis	São Paulo	Brasil
IBSBF 1497	2000	<i>aurantifolii</i>	Mesópolis	São Paulo	Brasil
IBSBF 1495	2000	<i>aurantifolii</i>	Mesópolis	São Paulo	Brasil
IBSBF 1683	2001	<i>aurantifolii</i>	Promissão	São Paulo	Brasil
IBSBF 1473	1999	<i>aurantifolii</i>	Santa Rita D'Oeste	São Paulo	Brasil
IBSBF 1472	1999	<i>aurantifolii</i>	Santa Rita D'Oeste	São Paulo	Brasil
IBSBF 1350	1997	<i>aurantifolii</i>	Ubarana	São Paulo	Brasil
IBSBF 417	2002	<i>aurantifolii</i>	Votuporanga	São Paulo	Brasil
IBSBF 1925	1989	<i>citrumelonis</i>	-	Flórida	Estados Unidos
IBSBF 2515	2003	<i>citri</i> A ^w	-	Flórida	Estados Unidos
IBSBF 1801	1986	<i>citri</i> A*	-	-	Omam
IBSBF 1843	2003	<i>citri</i>	Campo Verde	Mato Grosso	Brasil
IBSBF 1860	2003	<i>citri</i>	Campo Verde	Mato Grosso	Brasil
IBSBF 1861	2003	<i>citri</i>	Campo Verde	Mato Grosso	Brasil
IBSBF 1467	1999	<i>citri</i>	Cuiabá	Mato Grosso	Brasil
IBSBF1775	2002	<i>citri</i>	Cuiabá	Mato Grosso	Brasil
IBSBF 223	1980	<i>citri</i>	Bataguassu	Mato Grosso do Sul	Brasil
IBSBF 1050	1994	<i>citri</i>	Itaquiraí	Mato Grosso do Sul	Brasil
IBSBF 1767	2002	<i>citri</i>	Paranaíba	Mato Grosso do Sul	Brasil
IBSBF 1768	2002	<i>citri</i>	Paranaíba	Mato Grosso do Sul	Brasil
IAPAR ² 12870	1996	<i>citri</i>	Alto Paraná	Paraná	Brasil
IBSBF 987	1979	<i>citri</i>	Corbélia	Paraná	Brasil
IAPAR 12845	1996	<i>citri</i>	Cruzeiro do Sul	Paraná	Brasil
FDC ³ 121	-	<i>citri</i>	Goio Erê	Paraná	Brasil
IAPAR 12856	1997	<i>citri</i>	Guairacá	Paraná	Brasil
IAPAR 12875	1996	<i>citri</i>	Marilena	Paraná	Brasil
IAPAR 12858	1996	<i>citri</i>	Mirador	Paraná	Brasil
IAPAR 12863	1996	<i>citri</i>	Nova Aliança do Ivaí	Paraná	Brasil
FDC 1182	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1183	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1184	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1186	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1187	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1188	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1189	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1190	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1192	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1194	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1195	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1257	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1258	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1259	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1260	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1261	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1262	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1265	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1266	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1267	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1268	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1269	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1270	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1272	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1273	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil

Tabela 1. Isolados bacterianos, ano de isolamento, espécies e origem geográfica dos 172 isolados utilizados nesse estudo.

(continuação)

Isolado	Ano de isolamento	Espécie	Município	Estado	País
FDC 1274	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
FDC 1275	2005	<i>citri</i>	Ourizona	Paraná	Brasil
IAPAR 12859	1996	<i>citri</i>	Paraíso do Norte	Paraná	Brasil
IAPAR 12851	1996	<i>citri</i>	Paranavaí	Paraná	Brasil
IAPAR 12853	1996	<i>citri</i>	Paranavaí	Paraná	Brasil
IAPAR 12864	1996	<i>citri</i>	Paranavaí	Paraná	Brasil
306 ⁴	1997	<i>citri</i>	Paranavaí	Paraná	Brasil
IAPAR 12967	1997	<i>citri</i>	Santa Mônica	Paraná	Brasil
IAPAR 12861	1996	<i>citri</i>	São Carlos do Ivaí	Paraná	Brasil
IAPAR 12873	1996	<i>citri</i>	São João do Caiuá	Paraná	Brasil
IAPAR 8905	-	<i>citri</i>	Umuarama	Paraná	Brasil
IBSBF 1991	2001	<i>citri</i>	Aratiba	Rio Grande do Sul	Brasil
FDC 625	2001	<i>citri</i>	Aratiba	Rio Grande do Sul	Brasil
IBSBF 1989	2001	<i>citri</i>	Bom Princípio	Rio Grande do Sul	Brasil
FDC 605	2001	<i>citri</i>	Bom Princípio	Rio Grande do Sul	Brasil
IAPAR 12973	1999	<i>citri</i>	Crissiumal	Rio Grande do Sul	Brasil
IBSBF 1669	2001	<i>citri</i>	Maratá	Rio Grande do Sul	Brasil
IBSBF 1990	2001	<i>citri</i>	Mariano Moro	Rio Grande do Sul	Brasil
FDC 608	2001	<i>citri</i>	Mariano Moro	Rio Grande do Sul	Brasil
FDC 629	2001	<i>citri</i>	Mariano Moro	Rio Grande do Sul	Brasil
IAPAR 14002	2001	<i>citri</i>	Montenegro	Rio Grande do Sul	Brasil
IAPAR 14004	2001	<i>citri</i>	Montenegro	Rio Grande do Sul	Brasil
IAPAR 14006	2001	<i>citri</i>	Montenegro	Rio Grande do Sul	Brasil
IAPAR 12976	1993	<i>citri</i>	Palmeira das Missões	Rio Grande do Sul	Brasil
IBSBF 1778	2002	<i>citri</i>	Boa Vista	Roraima	Brasil
IBSBF 1780	2002	<i>citri</i>	Boa Vista	Roraima	Brasil
IBSBF 1803	2002	<i>citri</i>	Boa Vista	Roraima	Brasil
FDC 616	2001	<i>citri</i>	Águas de Chapecó	Santa Catarina	Brasil
IBSBF 1636	2001	<i>citri</i>	Chapecó	Santa Catarina	Brasil
IBSBF 1637	2001	<i>citri</i>	Chapecó	Santa Catarina	Brasil
FDC 617	2001	<i>citri</i>	Chapecó	Santa Catarina	Brasil
IBSBF 1992	2001	<i>citri</i>	Chapecó	Santa Catarina	Brasil
FDC 626	2001	<i>citri</i>	Chapecó	Santa Catarina	Brasil
FDC 628	2001	<i>citri</i>	Chapecó	Santa Catarina	Brasil
IAPAR 714	1985	<i>citri</i>	São Miguel do Oeste	Santa Catarina	Brasil
FDC 1227	2005	<i>citri</i>	Adolfo	São Paulo	Brasil
IBSBF 1580	2001	<i>citri</i>	Andradina	São Paulo	Brasil
IBSBF 283	1980	<i>citri</i>	Araçatuba	São Paulo	Brasil
IAPAR 13013	2001	<i>citri</i>	Araras	São Paulo	Brasil
IAPAR 12710	1999	<i>citri</i>	Bebedouro	São Paulo	Brasil
IAPAR 12708	1999	<i>citri</i>	Cafelândia	São Paulo	Brasil
IBSBF 338	1981	<i>citri</i>	Cândido Mota	São Paulo	Brasil
IBSBF 1421	1998	<i>citri</i>	Casa Branca	São Paulo	Brasil
IAPAR 1233	1988	<i>citri</i>	Cosmorama	São Paulo	Brasil
IAPAR 12701	1999	<i>citri</i>	Descalvado	São Paulo	Brasil
IAPAR 12984	2001	<i>citri</i>	Echaporã	São Paulo	Brasil
FDC 1279	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1280	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1281	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1282	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1283	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1284	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1285	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1287	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1288	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
FDC 1289	2005	<i>citri</i>	Engenheiro Coelho	São Paulo	Brasil
IBSBF 349	1981	<i>citri</i>	Fernando Prestes	São Paulo	Brasil
IAPAR 12826	2000	<i>citri</i>	Guaimbé	São Paulo	Brasil
IBSBF 222	1980	<i>citri</i>	Guararapes	São Paulo	Brasil
IBSBF 1474	1999	<i>citri</i>	Guzolândia	São Paulo	Brasil
IAPAR 12714	1999	<i>citri</i>	Iacanga	São Paulo	Brasil
IAPAR 12969	2001	<i>citri</i>	Ibitinga	São Paulo	Brasil

Tabela 1. Isolados bacterianos, ano de isolamento, espécies e origem geográfica dos 172 isolados utilizados nesse estudo.

(continua)
(conclusão)

Isolado	Ano de isolamento	Espécie	Município	Estado	País
IAPAR 12833	2001	<i>citri</i>	Ibitinga	São Paulo	Brasil
IAPAR 12353	1998	<i>citri</i>	Jaci	São Paulo	Brasil
IBSBF 1568	2001	<i>citri</i>	Lins	São Paulo	Brasil
IAPAR 12405	1999	<i>citri</i>	Lins	São Paulo	Brasil
IBSBF 1422	1998	<i>citri</i>	Novo Horizonte	São Paulo	Brasil
IBSBF 1509	2000	<i>citri</i>	Osvaldo Cruz	São Paulo	Brasil
IAPAR 13016	2001	<i>citri</i>	Ourinhos	São Paulo	Brasil
IBSBF 245	1980	<i>citri</i>	Palmital	São Paulo	Brasil
IBSBF 339	1981	<i>citri</i>	Palmital	São Paulo	Brasil
IAPAR 12988	2001	<i>citri</i>	Platina	São Paulo	Brasil
FDC 200	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 201	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 202	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 210	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 213	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 214	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 217	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 274	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 276	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 277	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 278	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 279	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 281	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 282	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 284	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 285	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 287	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 288	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 291	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 292	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 293	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 294	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 295	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 296	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 297	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 299	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 300	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 302	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 304	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 306	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 307	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 308	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 309	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 310	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 312	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 359	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
FDC 363	2001	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
IBSBF 1515	2000	<i>citri</i>	Presidente Prudente	São Paulo	Brasil
IAPAR 13000	2001	<i>citri</i>	Salto Grande	São Paulo	Brasil
IBSBF 1404	1998	<i>citri</i>	São João da Boa Vista	São Paulo	Brasil
IAPAR 12992	2001	<i>citri</i>	Tarumã	São Paulo	Brasil
IAPAR 12418	1999	<i>citri</i>	Uru	São Paulo	Brasil
IBSBF 1412	1956	<i>citri</i>	-	-	Nova Zelândia

¹ IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, SP. Brasil.

² IAPAR: Coleção de Culturas do Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR. Brasil.

³ FDC: Coleção de Culturas do Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP. Brasil.

⁴ Isolado seqüenciado no Projeto Genoma/FAPESP.

3.2. Teste de patogenicidade dos isolados de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*

Com o objetivo de confirmar a patogenicidade dos isolados da subsp. *aurantifolii*, estes foram semeados em meio de cultura LPGA (7 g/L levedura, 7 g/L peptona, 7 g/L glicose e 16 g/L agar, pH 7,0) e incubados a 28°C por 48 horas. Posteriormente, realizou-se diluições seriadas a partir de suspensão bacteriana em solução salina tamponada fosfatada concentrada a $3,4 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônia) por mililitro (600 nm a 0,3 de absorbância em espectrofotômetro) até a concentração final de 10^6 UFC/ml. Ajustada a concentração, os isolados foram inoculados em folhas destacadas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle), provenientes de plantas sadias cultivadas em casa de vegetação, com auxílio de agulhas de 0,55 x 20 mm. As folhas foram mantidas verticalmente em tubos plásticos (50 ml) (Figura 2) à temperatura ambiente (FRANCISCHINI, 2004).



Figura 2. Folhas destacadas de limão 'Cravo' e lima ácida 'Galego' mantidas em tubos plásticos após inoculação com *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*.

3.3 Extração de DNA genômico

Os isolados foram semeados em meio de cultura LP (7 g/L levedura e 7 g/L peptona, pH 7,0) e incubados a 28°C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 16 horas. A extração de DNA ocorreu pelo método de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), com modificações (AUSUBEL et al., 1995). Alíquotas de 4 ml foram centrifugadas (7500 rpm, 5 minutos, 20°C) e o precipitado ressuspenso em tampão lise contendo 500 µl de TE pH 8,0 [Tris-(hidroximetil)-aminometano 10 mM, ácido etilenodiamonotetracético -EDTA 1 mM], 30 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 4 µl de proteinase K (10 mg.ml⁻¹). Após 1 hora a 37°C, adicionou-se 100 µl de NaCl 5 M e 160 µl de CTAB 5%. Depois de mantidas a 65°C por 30 minutos, as amostras foram acrescidas de 800 µl de clorofórmio:isoamilálcool (24:1) e centrifugadas (25 minutos, 13000 rpm, 20°C). Recuperado o sobrenadante, o DNA foi precipitado pela adição de 700 µl de isopropanol (-20°C). Em seguida, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol (70%), seco a 35°C por 2 minutos (200 atm), resuspenso em 80 µl de tampão TE e acrescido de 1 µl de RNase A (2,5 mg/ml). Depois de incubados a 37°C por 40 minutos, os DNAs extraídos foram conservados a -20°C.

A confirmação de tal processo foi realizada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM e EDTA 1 mM), corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) e a visualização do DNA feita em transiluminador de luz ultravioleta.

3.4 Construção dos iniciadores e amplificação via PCR

Objetivando a amplificação dos genes de interesse para desenvolvimento de sondas de DNA e análise por PCR-RFLP, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *avrXacE1*, *avrXacE2* e *Irp* (Tabela 2). As seqüências nucleotídicas desses genes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (número de acesso NC_003919.1) foram obtidas no site da “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além das bases que formam os genes, foram

selecionados nucleotídeos extras para que o pareamento dos iniciadores ocorresse nas regiões flangeadoras dos mesmos e assim, ao serem amplificados, gerassem cópias completas de suas seqüências (Figuras 3, 4 e 5). Os iniciadores foram construídos com o auxílio do “software” Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem dos genes *avrXacE1*, *avrXacE2* e *lrp*.

Gene	Lócus Tag	Iniciador	Seqüência (5'→ 3')
<i>avrXacE1</i>	XAC0286	AvrXacE1-F	TGAACGATAGGCAGCTGTTC
		AvrXacE1-R	GGAGAGCGACATGGGACTAT
<i>avrXacE2</i>	XAC3224	AvrXacE2-F	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA
		AvrXacE2-R	CAGGACGGTTACGCCAGTA
<i>lrp</i>	XAC3090	LRP-F	CAGCTCAGCGACATAGAACG
		LRP-R	TCGTGTTTGCCCTTTACTGA

Todas as reações de amplificação foram elaboradas 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 *Taq* 1X; 0,5 mM de uma mistura de dNTPs (2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos); 2 mM de MgCl₂; e 0,5 µM de cada iniciador (Invitrogen). O programa utilizado para as amplificações foi o mesmo para todos os pares de iniciadores e consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/3 minutos; seguido de 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 65°C/1 minuto e 72°C/3 minutos; e um ciclo de extensão final a 72°C/10 minutos. Os produtos gerados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

3.5 Clonagem dos produtos amplificados

Confirmada as amplificações, novas PCRs foram realizadas especificamente para clonagem, utilizando como molde o DNA do isolado 306. As condições de amplificação foram as mesmas citadas no item anterior, com exceção da enzima (e de



Figura 3. Representação esquemática do pareamento dos iniciadores AvrXacE1-F e AvrXacE1-R no gene *avrXacE1* (1206 pb) de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Para a construção dos iniciadores foram selecionados nucleotídeos extras (em preto) a fim de garantir a amplificação total desse gene. As bases em azul representam a seqüência nucleotídica completa do gene *avrXacE1*.

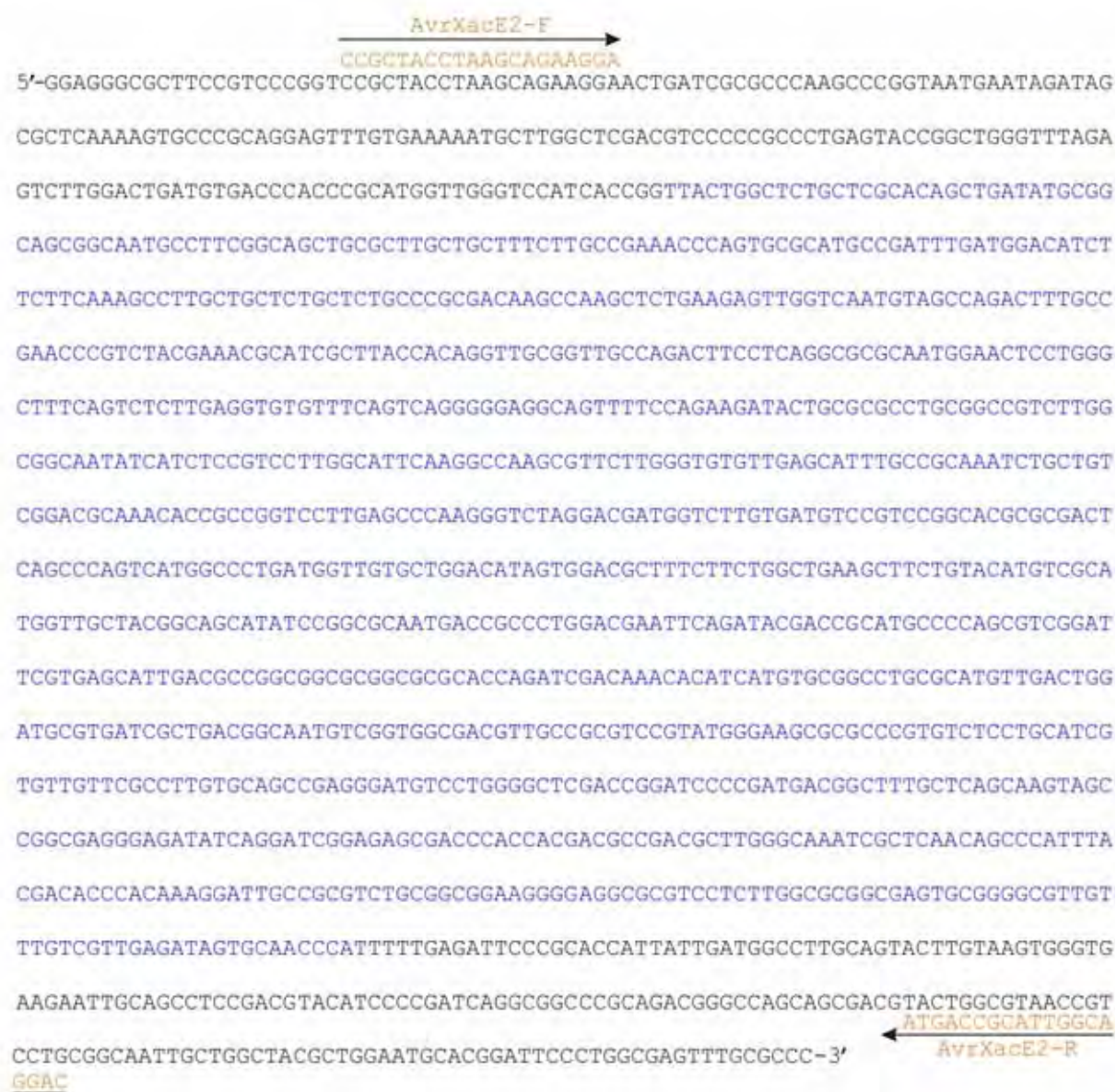


Figura 4. Representação esquemática do pareamento dos iniciadores AvrXacE2-F e AvrXacE2-R no gene *avrXacE2* (1071 pb) de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Para a construção dos iniciadores foram selecionados nucleotídeos extras (em preto) a fim de garantir a amplificação total desse gene. As bases em azul representam a sequência nucleotídica completa do gene *avrXacE2*.