

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

**ANÁLISE POR SEQUÊNCIAS MULTILOCUS DE
Xanthomonas fuscans subsp. *aurantifolii***

Flávia Cristina Dall’ Acqua

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

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

**ANÁLISE POR SEQUÊNCIAS MULTILOCUS DE *Xanthomonas
fuscans* subsp. *aurantifolii***

Flávia Cristina Dall’ Acqua

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. José Belasque Junior

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 (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SP
Dezembro – 2011

D145a Dall' Acqua, Flávia Cristina
Análise por sequências multilocus de *Xanthomonas fuscans*
subsp. *aurantifolii* / Flávia Cristina Dall' Acqua. – – Jaboticabal, 2011
xiii, 29 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Banca examinadora: José Belasque Junior, Lucia Maria Carareto
Alves, Franklin Behlau
Bibliografia

1. genes *housekeeping*. 2. cancro cítrico. 3. relação filogenética. I.
Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.911:634.3

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

e-mail: flacda@yahoo.com.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FLÁVIA CRISTINA DALL' ACQUA – Filha de Flávio Roberto Dall' Acqua e Euflauzina Aparecida Dall' Acqua, nasceu em Jaboticabal, São Paulo, no dia 25 de dezembro de 1982. Em fevereiro de 2005 ingressou no Curso de Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto – SP. Foi bolsista de iniciação científica pelo programa CNPq durante os anos de 2007 e 2008. Em março de 2009, ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal – SP. No mês de dezembro de 2011, submeteu-se à banca para a defesa de Dissertação, sendo aprovado como Mestre em Agronomia.

Pegadas na areia

*“Uma noite eu tive um sonho...
Sonhei que estava andando na praia
com o Senhor
e no céu passavam cenas de minha vida.
Para cada cena que passava,
percebi que eram deixados dois pares
de pegadas na areia:
um era meu e o outro do Senhor.
Quando a última cena da minha vida
passou diante de nós, olhei para trás,
para as pegadas na areia,
e notei que muitas vezes,
no caminho da minha vida,
havia apenas um par de pegadas na areia.
Notei também que isso aconteceu
nos momentos mais difíceis
e angustiantes da minha vida.
Isso aborreceu-me deveras
e perguntei então ao meu Senhor:
- Senhor, tu não me disseste que,
tendo eu resolvido te seguir,
tu andarias sempre comigo,
em todo o caminho?
Contudo, notei que durante
as maiores tribulações do meu viver,
havia apenas um par de pegadas na areia.
Não compreendo por que nas horas
em que eu mais necessitava de ti,
tu me deixaste sozinho.
O Senhor me respondeu:
- Meu querido filho.
Jamais te deixaria nas horas
de prova e de sofrimento.
Quando viste na areia,
apenas um par de pegadas,
eram as minhas.
Foi exatamente aí,
que te carreguei nos braços.”*

Mary Stevenson

Aos meus amados pais
Flávio Roberto Dall' Acqua e
Euflauzina Aparecida Dall' Acqua

DEDICO

À meu irmão William
Roberto Dall' Acqua

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter-me “carregado no colo” durante a elaboração e execução deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, o qual admiro e muito respeito, agradeço, profundamente, pelo total apoio e pela confiança que depositou em mim e em meu trabalho. Agradeço pela amizade, pelos conselhos e dedicação.

Ao meu co-orientador Dr. José Belasque Junior pela elaboração deste trabalho, apoio e ensinamentos que jamais serão esquecidos por mim, profissionais e, principalmente, pessoais.

À Prof. Dr. Maria Inês Ferro pelo seu apoio de sempre.

À FCAV/UNESP Jaboticabal.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus pela estrutura oferecida durante o desenvolvimento de meu trabalho e à todos os funcionários que, de uma forma, contribuíram com o trabalho.

À minha irmã de coração Vanessa Duarte, por sempre estar presente nos momentos mais importantes da minha vida.

Às minhas eternas amigas Agda, Elaine e Juliana Rossi pelas palavras de apoio e incentivo, de carinho e de irmãs.

Ao Fabrício Jacianni pelo apoio de sempre e disponibilidade total do seu tempo. Fabrício você foi fundamental na execução do meu trabalho.

Aos colegas do laboratório com quem convivi por mais de seis anos, desde a minha iniciação científica e alguns por dois anos, durante o Mestrado: Lucília, Juliana Cavalinni, Juliana Vantini, Mayara, Tereza, Fabrício, Rafael, Daniele, Karina, Mariza, Gustavo, Mariane, Andréa, Júlio Bortolossi, Roseli, Gustavo e Renata.

Aos meus eternos amigos de graduação: Michelle, Fabiana, Flaviana, Camila, Kelly, Viviane, Leonardo, Lecine, Tadeu, Lucas, Juliano, Alex, Alfredo, Laurentez e Antônio.

Ao Prof. Dr. Newton La Scala Júnior e Roberta, por suas palavras amigas de apoio e incentivo.

À todos do departamento de Tecnologia da UNESP.

Aos funcionários do departamento de Ciências Exatas.

À Gisele e sua família que, gentilmente, forneceu o seu lar em Araraquara durante as semanas para realização deste trabalho.

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

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, sempre dispostos a sanar minhas dúvidas.

E finalmente ao meu noivo Alan, pelo amor, companheirismo, amizade, paciência, tolerância, fé, apoio e por sempre estar ao meu lado me dando forças de que tudo daria certo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	5
II.1. O CANCRO CÍTRICO	5
II.2. O GÊNERO XANTHOMONAS	7
II.3. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS MULTILOCUS (MLSA).....	9
III. MATERIAL E MÉTODOS	12
III.1 ISOLADOS BACTERIANOS E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	12
III.2 AMPLIFICAÇÃO VIA PCR.....	13
III.3 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS	14
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
V. CONCLUSÕES	23
VI. REFERÊNCIAS	24

Índice de Tabelas

Tabela 1. Espécie bacteriana, isolado, hospedeiro, ano de isolamento e origem geográfica dos isolados utilizados no presente estudo.	13
Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes <i>housekeeping atpD</i> , <i>dnaK</i> e <i>fusA</i> empregados na caracterização de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> , <i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> (tipos B e C) e <i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> (ALMEIDA et. al., 2010; AH-YOU et al., 2009).	14
Tabela 3. Número de nucleotídeos diferentes (n) e porcentagem de similaridade de sequências (%) dos genes <i>housekeeping atpD</i> , <i>dnaK</i> e <i>fusA</i> de isolados de <i>Xanthomonas</i> patogênicas a citros.	19

Índice de Figuras

- Figura 1. Produtos de amplificação dos genes *fusA*, *atpD* e *dnaK* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (A), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* (B e C), e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (E). Gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Tempo de corrida de 2 h a 80 V. M1: marcador de peso molecular 100 pb e M2: marcador de peso molecular 1 kb (*Fermentas Life Sciences*). Os isolados 1564 e 1565 não foram utilizados no trabalho.17
- Figura 2. Produtos de amplificação do gene *dnaK*, *fusA* e *atpD* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (A), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* (B e C). Gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Tempo de corrida de 2 h a 80 V. M1: marcador de peso molecular 100 pb e M2: marcador de peso molecular 1 kb (*Fermentas Life Sciences*).....18
- Figura 3. Análises filogenéticas com base nas sequências parciais dos genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* de bactérias do gênero *Xanthomonas*. pelo do método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*), modelo de Tamura-Nei.....21
- Figura 4. Análise filogenética conjunta com genes *housekeeping* por meio do método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*), modelo de Tamura-Nei.23

ANÁLISE POR SEQUÊNCIAS MULTILOCUS DE *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

Resumo - As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* constituem um dos grupos de fitopatógenos mais importantes na natureza, com capacidade de infectar aproximadamente 120 tipos diferentes de plantas monocotiledôneas e 270 dicotiledôneas. A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) é o agente causal do cancro cítrico, uma das principais doenças dos citros. Restrita à Flórida, a mancha bacteriana dos citros, causada por *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), afeta principalmente o citrumelo 'Swingle'. A bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) é o agente causal das cancroses B e C, encontradas apenas na América do Sul. As técnicas mais utilizadas na diferenciação e caracterização dos patógenos bacterianos, hibridização DNA-DNA (DDH) e sequenciamento da região do DNA que codifica o RNA ribossomal 16S (rRNA 16S), são onerosas, trabalhosas, lentas e de resultados restritos, não permitindo a comparação dos resultados obtidos entre diferentes estudos laboratoriais. Por isso, a técnica de análise de sequências multilocus (MLSA), considerada rápida, barata e confiável, tem sido recomendada para a caracterização e delimitação de espécies de patógenos bacterianos, tais como as do gênero *Xanthomonas*, permitindo o estabelecimento das relações filogenéticas por meio de genes *housekeeping*. Portanto, o objetivo do trabalho foi caracterizar os isolados de *Xanthomonas* (Xcc-A, Xfa-B, Xfa-C e Xacm) por meio da técnica MLSA. Foram utilizados 27 isolados de *Xanthomonas* patogênicas a citros, sendo quatro de *X. citri* subsp. *citri* (Xcc), três de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* B (Xfa-B), dezenove de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* C (Xfa-C) e um de *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm). Os genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* foram utilizados como genes *housekeeping* e para a reação da PCR foram utilizados iniciadores específicos para a amplificação dos mesmos. Os produtos da PCR foram purificados e utilizados no sequenciamento. Os cromatogramas foram analisados por meio do aplicativo CodenCode Aligner versão 3.7.1 e as análises filogenéticas foram realizadas pelo método da Máxima Verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei,

utilizando o aplicativo MEGA 5. Análises das sequências parciais dos genes *atpD* (833 pb), *dnaK* (963 pb) e *fusA* (743 pb) revelaram 100% de similaridade entre isolados da mesma espécie/tipo e diferenças entre isolados de espécies/tipos diferentes. As análises conjuntas das sequências dos três genes (2539 pb) revelaram similaridade de 99,4% entre Xfa-B e C, maior similaridade verificada no estudo, e de 97% (a menor similaridade), observada entre Xacm e Xfa-B. As análises filogenéticas realizadas com as sequências parciais dos genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* revelaram quatro grupos distintos, formados pelas três espécies patogênicas a citros (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelonis*), sendo que o grupo formado pelos isolados de *aurantifolii* apresentou-se sub-dividido de acordo com os isolados tipos B e C desse patógeno. Os resultados sugerem que a técnica MLSA foi eficiente na diferenciação dos isolados de *Xanthomonas* pertencentes a diferentes espécies mas, entretanto, não foi capaz de diferenciar os isolados pertencentes à mesma espécie.

Palavras-chave: genes *housekeeping*; cancro cítrico; relação filogenética.

MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS OF *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

Abstract – Bacteria belonging to the genus *Xanthomonas* are one of the main groups of phytopathogens in nature, capable to infecting about 120 different monocots and 270 dicots plants. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) is the causal agent of bacterial citrus canker, one of the major diseases of citrus. Restricted to Florida, citrus bacterial spot, caused by *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), affects mainly citrumelo 'Swingle'. *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) is the causal agent of canker B and C, found only in South America. The most widely used techniques for the differentiation and characterization of bacterial pathogens, DNA-DNA hybridization (DDH) and analysis of DNA sequences coding for small subunit ribosomal RNAs (16S rRNA), are costly, cumbersome, slow and give limited results, do not allowing the interlaboratorial comparisons of the results. Therefore, the technique of multilocus sequence analysis (MLSA), which is considered fast, cheap and reliable, has been recommended for characterization and delineation of species of bacterial pathogens, such as the genus *Xanthomonas*, allowing the establishment of phylogenetic relationships between them through housekeeping genes. Therefore, the objective of this study was to characterize strains of *Xanthomonas* (Xcc-A, Xfa-B, Xfa-C and Xacm) using the MLSA technique. We used 27 strains of *Xanthomonas* pathogenic to citrus, being four Xcc, three Xfa-B, 19 Xfa-C and one Xacm. The PCR reaction was performed using the specific primers to amplify the *atpD*, *dnaK* and *fusA* genes. PCR products were purified, sequenced and the sequences were analyzed using the software CodenCode Aligner version 3.7.1. Phylogenetic analysis was performed using Maximum Likelihood based on the model of Tamura-Nei and using the software MEGA 5. Analyses of partial sequences of the genes *atpD* (833 bp), *dnaK* (963 bp) and *fusA* (743 bp) revealed 100% similarity between isolates of the same species/type and differences between different isolates species/types. The concatenated analysis of the sequences of the three genes (2539 bp) revealed 99.4% similarity between Xfa-B and C, the greatest similarity observed in the study, and 97% (the lowest), observed between Xacm and Xfa-B. Phylogenetic analysis

performed with partial sequences of genes *atpD*, *dnaK* and *fusA* revealed four distinct groups formed by the three pathogenic species to citrus (*citris*, *aurantifolii* and *citrumelonis*), and the group formed by *aurantifolii* isolates was sub-divided according to types B and C isolates of this pathogen. The results suggest that the MLSA technique was efficient in differentiating isolates belonging to different species of *Xanthomonas*. However, it was not able to differentiate isolates belonging to the same species.

Keywords: housekeeping genes, citrus canker, phylogenetic relationship.

I. INTRODUÇÃO

A laranja, originária do sul asiático, provavelmente da China, foi introduzida no Brasil no início de sua colonização e, devido ao clima, encontrou condições favoráveis para vegetar e produzir, expandindo-se por todo o território nacional. O chamado cinturão citrícola brasileiro (São Paulo e Triângulo Mineiro) é responsável por 80% da produção total de laranjas do País, que possui 838 mil hectares destinados à produção de laranja (71% apenas no estado de São Paulo) (NEVES et al., 2010; AGRIANUAL, 2011).

Desde 1962, quando iniciaram as exportações, a citricultura tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento do Brasil. No ano de 2009, as exportações somaram 2,9 milhões de toneladas, sendo 1,129 milhão de toneladas de suco concentrado, 939 mil toneladas de suco não concentrado e 851 mil toneladas de subprodutos. O Brasil é responsável por mais da metade da produção mundial de suco de laranja e destina 98% da sua produção às exportações. Os estados de São Paulo e da Flórida (Estados Unidos) detêm em conjunto 81% da produção mundial de suco. Entretanto, somente o estado de São Paulo tem sido responsável por 53% do total da produção mundial (AGRIANUAL, 2011). Diante desse contexto, a citricultura é considerada um dos principais pilares do agronegócio brasileiro. No ano de 2009 o PIB citrícola foi de US\$ 6,5 bilhões, correspondendo aos subtotais de US\$ 4,39 bilhões no mercado interno e US\$ 2,15 bilhões no mercado externo, gerando, entre empregos diretos e indiretos um contingente de 230 mil posições, o que representou uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões (NEVES et al., 2010).

Os dados oficiais mais recentes sobre a produção de laranja (paulista e Triângulo Mineiro) apontam como uma das maiores safras da história indicando a ascensão da citricultura no País. Porém, o segmento produtivo apresenta grandes desafios que, se não superados, devem limitar a produtividade nas próximas safras. Durante a última década, o cancro cítrico, a CVC, a morte súbita e o *greening* foram responsáveis pela erradicação de 39 milhões de árvores do parque citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro. Com isso, a taxa anual média de mortalidade atingiu o valor de 7,3% no ano de 2010 (NEVES et al., 2010), um dos maiores até então registrados, comprometendo,

assim, o setor citrícola brasileiro. Estima-se que essas quatro doenças foram responsáveis por uma redução anual de aproximadamente 78 milhões de caixas, representando uma diminuição na safra de 2010 da ordem de 20%. No que se refere a isso, o estudo da diversidade genética de um patógeno pode fornecer subsídios no estabelecimento de hipóteses a respeito da história evolutiva deste, da interação com os organismos hospedeiros e, principalmente, para a definição de estratégias de controles para contenção de seu ataque.

Espécies procarióticas têm sido caracterizadas por meio de abordagens polifásicas, ou seja, incorporam dados genotípicos, fenotípicos e filogenéticos na tentativa de classificação de entidades biológicas com o máximo de acurácia. Tais técnicas vêm sendo consideradas inadequadas e incapazes de acompanhar os níveis de diversidade descobertos atualmente na natureza. Classificação de espécies de *Xanthomonas* tem sido baseada em grande parte na hibridização DNA-DNA (DDH), rep-PCR e sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) (VAUTERIN et al., 1995; SCHAAD et al., 2006).

A técnica do rRNA 16S, baseada no sequenciamento e comparação do gene do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S), é uma alternativa rápida na identificação de espécies procarióticas, tornando-se cada vez mais comum. Apesar de amplamente utilizada, e de confiabilidade indiscutível, de acordo com GEVERS et al. (2005), a classificação de espécies por meio do sequenciamento de um único gene do rRNA é insatisfatória, pois quando comparada à DDH, muitas vezes apresenta baixa resolução. A baixa resolução consiste no fato de isolados que apresentam menos que 97% de similaridade na sequência do gene do rRNA, frequentemente compartilham menos de 70% de similaridade na DDH e pertencem a espécies diferentes. De maneira análoga, isolados que possuem identidade igual a 97%, ou maior, podem atender, ou não, o critério de 70% do DDH para a inclusão na mesma espécie. Portanto, a limitação do sequenciamento do gene ribossomal 16S é que as sequências não são diversificadas o suficiente para distinção entre espécies bacterianas intimamente relacionadas. Casos de comparação com alta identidade entre a sequência do gene do rRNA não elimina a

necessidade da aplicação de outros métodos para melhor avaliação se os isolados são suficientemente semelhantes para serem classificados dentro de uma mesma espécie.

A técnica da DDH, considerada o padrão ouro em taxonomia, baseia-se na medida do total de similaridade genética entre isolados. Apesar de amplamente utilizada e capaz de fornecer medidas padronizadas na identificação e classificação de espécies, apresenta algumas desvantagens por ser uma técnica laboriosa e onerosa, que consome muito tempo de análise e possui dificuldade de padronização entre laboratórios. Diante do crescimento do número de novas espécies que requerem comparação e rapidez do processo de classificação, esta técnica torna-se de difícil aplicação para quase todos os laboratórios. Além disso, o método não é aplicável para bactérias que não podem ser cultivadas e apresenta limitações para aquelas espécies bacterianas de crescimento lento. Os resultados algumas vezes não são reprodutíveis, sendo assim, inapropriados para a rápida identificação de organismos procarióticos (STACKEBRANDT et al., 2002; RICHTER et al., 2006; YOUNG et al., 2008).

Assim, diante das limitações das atuais técnicas, tem sido proposta como alternativa na caracterização e classificação de espécies a análise de sequências multilocus (MLSA). Tal técnica consiste na caracterização filogenética usando sequências de DNA de genes que codificam proteínas conservadas (genes *housekeeping*) envolvidas em processos celulares essenciais, que constituem o "genoma do núcleo". A análise envolve múltiplos locais distribuídos em todo o genoma de um organismo, podendo ser aplicada na delimitação de espécies procarióticas, bem como na reassociação de espécies para fins taxonômicos (STACKEBRANDT et al., 2002; GEVERS et al., 2005; PARKINSON et al., 2007). Na MLSA, as sequências são processadas por meio de um método de distâncias de similaridade e esta ferramenta deve substituir a DDH, uma vez que ambas as técnicas têm demonstrado suficiente grau de congruência entre si (STACKEBRANDT et al., 2002). De acordo com RICHTER et al. (2006), os resultados da técnica MLSA são uma valiosa alternativa para a diferenciação de espécies, precisa e confiável, que resulta em sequências sólidas de dados, com elevado poder discriminatório e não sujeitos às variações experimentais.

Devido a tais características, os resultados da MLSA podem ser facilmente compartilhados, permitindo a comparação entre aqueles obtidos em diferentes estudos. Para YOUNG et al. (2008), a MLSA é uma ferramenta poderosa para a investigação mais aprofundada da classificação de *Xanthomonas*, sendo que o método oferece uma maneira simples de identificação de estirpes, como membros de espécies conhecidas ou pertencentes a novas espécies. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os isolados de *Xanthomonas* patogênicos aos citros (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B e C) por meio da técnica MLSA.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1. O cancro cítrico

A atual conjuntura citrícola do Brasil vem sendo ameaçada por pragas e doenças que atacam a cultura, tais como tristeza (CTV *Citrus tristeza virus*), *greening*, CVC, pinta preta, morte súbita dos citros e cancro cítrico, dentre outras, sendo esta última considerada uma das doenças mais sérias e potencialmente prejudiciais para a citricultura mundial (NEVES et al., 2010; NAMEKATA et al., 1996). O cancro cítrico ocorre endemicamente em várias regiões do Sudoeste Asiático e em vários países da América do Sul, como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil foi constatado pela primeira vez em 1957, na região de Presidente Prudente, São Paulo, de onde se disseminou para outras regiões paulistas e outros estados, como Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FEICHTENBERGER et al., 1997). O cancro cítrico atingiu o seu ápice na década de 1990, sendo a mais antiga das quatro doenças de citros presentes no Brasil.

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) é o agente causal do cancro cítrico, uma das principais doenças dos citros. Restrita à Flórida, a mancha bacteriana dos citros, causada por *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), afeta principalmente o citrumelo 'Swingle'. A bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) é o agente causal das cancroses B e C, encontradas apenas na América do Sul. De forma geral, as doenças causadas por *Xanthomonas* spp. são disseminadas por meio de sementes contaminadas, contudo, como no caso do cancro cítrico, algumas espécies de *Xanthomonas* pode ser disseminadas para plantas saudáveis por meio de práticas agrícolas como a poda ou a nebulização de canteiros, mas também pela água da chuva, pela formação de partículas de aerossóis que podem carregar a bactéria e disseminá-la em áreas não infectadas, por partículas de solos contaminadas e, possivelmente, por meio de insetos (RYAN et al., 2011), bem como pela introdução de mudas contaminadas a partir de viveiros

Inicialmente a bactéria Xcc se desenvolve sobre a superfície da folha (ou do órgão contaminado), sendo que a infecção pode acontecer por qualquer abertura disponível no tecido vegetal, aberturas naturais, tais como estômatos, e hidatódios, ou

por meio de ferimentos nas folhas e frutos (RYAN et al., 2011). Folhas maduras são resistentes à infecção por meio da invasão estomática, entretanto, continuam susceptíveis às infecções por meio de injúrias (STALL & SEYMOUR, 1983).

A infecção geralmente ocorre em tecidos imaturos e, sob condições favoráveis, as lesões podem ser observadas com o auxílio de lentes uma semana após a infecção. As lesões primordiais podem ser confundidas com glândulas de óleo na folha; todavia, podem ser distinguidas destas pelo padrão de distribuição agregado. Cerca de duas semanas após a infecção, as lesões podem ser vistas a olho nu, as quais continuam aumentando de tamanho, podendo ser maiores que 10 mm de diâmetro em cultivares susceptíveis. Geralmente, um halo amarelo característico forma-se ao redor da lesão, quando esta atinge de 1 a 2 mm de diâmetro. Este halo pode esmaecer ou mesmo desaparecer quando as lesões atingem 5 a 10 mm de diâmetro, sendo observadas centenas de lesões em um único órgão atacado (STALL & SEYMOUR, 1983).

Após a entrada da bactéria, esta se aloja nos espaços intercelulares onde, por meio de ativação de genes específicos, desencadeia o processo infeccioso. Sintomas de cancro cítrico podem ser vistos em toda a parte aérea da planta e, embora característicos, podem variar de acordo com o órgão afetado e sua idade no momento da infecção pela bactéria (BERGAMIN FILHO & AMORIN, 1999). Os sintomas em folhas constituem-se em lesões corticosas 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). No fruto, os sintomas são semelhantes aos observados nas folhas e, em estágio avançado, as lesões provocam o rompimento da casca. De acordo com STALL & SEYMOUR (1983) os frutos são susceptíveis ao ataque do fitopatógeno por um maior período de tempo, em comparação às folhas; portanto, o ataque a esse órgão é mais severo. Lesões em ramos, geralmente são encontradas apenas em variedades muito susceptíveis. A fotossíntese é prejudicada em função da destruição da área foliar e ataques mais severos podem provocar desfolha com consequente depauperamento de plantas, e queda prematura de frutos (LEITE JUNIOR, 1990; FEICHTENBERGER et al., 1997; MOREIRA et al., 2010).

Várias estratégias de controle têm sido utilizadas na tentativa de redução das perdas causadas pelo cancro cítrico no Brasil, como por exemplo o controle por meio de pulverizações cúpricas. Uma vez que não existem variedades de citros resistentes, essas estratégias foram inicialmente baseadas na erradicação e exclusão do patógeno. A não adoção de medidas de exclusão/erradicação, uma vez que esta bactéria tenha sido detectada, impede o comércio de frutos cítricos, suco concentrado e seus derivados para países livres deste patógeno. Entretanto, com o progresso de epidemias e o desenvolvimento de áreas endêmicas da doença nas regiões de produção de citros, mudanças nas estratégias de controle têm sido necessárias (BEHLAU et al., 2010). Anteriormente, tendo em vista que o comércio destes produtos é regulamentado por uma legislação internacional, o único meio de evitar a sua proliferação era a erradicação dos pés contaminados e demais plantas vizinhas, num raio de 30 metros ou então de todo o talhão se as plantas contaminadas fossem superior a 0,5% do total de plantas do talhão, além de toda a área permanecer sem uso para o cultivo de citros durante dois anos (BARBOSA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003), sem compensação financeira para o produtor. Atualmente, não se faz mais necessária a erradicação de todo o talhão, apenas das plantas contaminadas e as presentes num raio de 30 metros, permanecendo, contudo, a necessidade de dois anos sem cultivo de citros no local. O programa de erradicação dos pés contaminados é mandatório apenas no estado de São Paulo, que exige a exclusão e erradicação, incluindo a destruição, de árvores doentes imediatamente após a detecção e remoção de árvores assintomáticas expostas ao patógeno (BELASQUE JR et al., 2009; BEHLAU et al., 2010).

II.2. O Gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo de bactérias fitopatogênicas de grande importância econômica no mundo todo (MOREIRA et al., 2010) e atualmente é composto por 27 espécies com nomes validamente publicados que são patógenos de culturas agrônomicas importantes (PARKINSON et al., 2007). *Xanthomonas*, do grego *xanthos*, que significa amarelo e *monas*, que significa unidade, é um gênero numeroso de bactérias gram-negativas de pigmentação amarelada, obrigatoriamente aeróbicas e

que possuem um único flagelo (RYAN et al., 2011). Essas fitobactérias já foram descritas como patógenos de aproximadamente 120 monocotiledôneas e 270 dicotiledôneas. Tal capacidade de infecção torna o estudo das *Xanthomonas* de grande importância, pois a produtividade de diversas culturas de interesse agrônomo pode ser seriamente afetada por doenças causadas por bactérias deste gênero (CARVALHO, 2006). Algumas dessas culturas são: citros, arroz, banana, feijão e tomate (RYAN et al., 2011).

A classificação das espécies desse gênero patogênicas a *Citrus* spp. vem sofrendo alterações nas últimas décadas (GABRIEL et al., 1989; VAUTERIN et al., 1995; VAUTERIN et al., 2000; SCHAAD et al., 2006). A recente classificação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros é baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e hibridização DNA-DNA. Antes pertencentes a uma mesma espécie bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) e separados em patovares (*citri*, *aurantifolli* 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. *aurantifolli*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*) (SCHADD et al., 2006).

Causados por bactérias do gênero *Xanthomonas*, diferentes formas de cancro cítrico são descritas com base na especificidade do patógeno e origem geográfica. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) é a bactéria responsável pelo cancro cítrico denominado de canrose A, possuindo ampla faixa de hospedeiros e sendo considerada a espécie mais agressiva de citros. Restrita à Flórida, a mancha bacteriana dos citros, causada por *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), afeta principalmente o citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*). Encontrada apenas na América do Sul, a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) é o agente causal das cancroses B (Xfa-B) e C (Xfa-C). Isolados do tipo B foram encontrados na Argentina, Paraguai e Uruguai e possuem patogenicidade, sob condições naturais de infecção, restrita a limões verdadeiros e limas ácidas, enquanto

que o tipo C deste patógeno, limitado ao estado de São Paulo, afeta somente lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) (JACIANI, 2008; CUBERO & GRAHAM, 2002; BUI THI NGOC et al., 2008). A bactéria Xfa-C foi observada primeiramente em 1963 em São Paulo por NAMEKATA (1971), induzindo sintomas hiperplásticos, semelhantes aos de cancro cítrico, tais como lesões salientes, corticosas, pardacentas, circundadas muitas vezes por halo amarelo na superfície de ramos, folhas e frutos (CIVEROLO, 1994; STALL & CIVEROLO, 1991). Xfa-C é considerada patogênica apenas à lima ácida 'Galego', induzindo reação de hipersensibilidade quando inoculada em folhas de outras espécies cítricas (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 1987). Atualmente, no Brasil, a ocorrência de Xfa-C está restrita a alguns municípios do estado de São Paulo, não causando danos economicamente significativos (NOCITI et al., 2006; JACIANI et al., 2009). Assim, o estudo de técnicas que permitam a distinção entre esses organismos torna-se cada vez mais importante, para o monitoramento da sua disseminação, com o objetivo de impedir a propagação de patógenos para novas regiões geográficas.

II.3. Análise de sequências multilocus (MLSA)

Atualmente, a técnica MLSA tem sido aplicada em estudos filogenéticos de espécies procariontas, relacionada ao uso de grandes conjuntos de amostras, comparação com banco de dados virtuais, classificação e delimitação de espécies, dentre elas as pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (ALMEIDA et al., 2010; AH-YOU et al., 2009; GEVERS et al., 2005). É importante que esta técnica seja amplamente adotada, pois ela facilita o estudo de vários isolados bacterianos que até agora não foram classificados devido ao impedimento de métodos trabalhosos e onerosos (RICHTER et al., 2006).

A técnica MLSA baseia-se na análise das sequências de nucleotídeos de vários genes, entre eles os denominados genes *housekeeping*. Tais genes são mais conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas encontradas em qualquer organismo (ALMEIDA et al., 2010; MARCELLETTI et al., 2010). Por essa razão, os genes *housekeeping* são expressos em níveis relativamente constantes nos organismos. Os genes *atpD* (subunidade β da F1-Fo ATP sintase),

dnaK (proteína de choque térmico, Hsp70), *fusA* (proteína fator de alongamento de cadeias) e *gyrB* (subunidade β da girase do DNA), atualmente têm sido aqueles mais utilizados para o sequenciamento e análise pela técnica da MLSA visando a caracterização e classificação de espécies do gênero *Xanthomonas* (PARKINSON et al., 2007; YOUNG et al., 2008; PARKINSON et al., 2009; AH-YOU et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010). A MLSA incide sobre as comparações das sequências reais de DNA (GEVERS et al., 2005). Na MLSA as sequências são comparadas por similaridade e, em adição, as análises filogenéticas são realizadas com bases em matrizes de similaridade ou diretamente da sequência. Assim, a técnica de MLSA é mais adequada para separação de espécies (CHRISTENSEN et al., 2007).

Com o objetivo de validar a técnica MLSA para fins filogenéticos e taxonômicos na delimitação das espécies, RICHTER et al. (2006) sequenciaram sete genes *housekeeping* de inúmeras estirpes de *Borrelia burgdorferi*, bactérias gram-negativas, anaeróbicas e responsáveis pela doença de Lyme, e compararam os resultados da técnica com uma extensa coleção de dados de DDH. Os autores observaram que as sequências de similaridade produzidas pela MLSA foram estritamente correlacionadas com os dados inferidos por meio da DDH, e concluíram que a MLSA constitui uma alternativa valiosa para a laboriosa técnica da DDH.

MARTENS et al. (2007) utilizaram a MLSA para o estudo das relações entre bactérias fixadoras de nitrogênio, associadas às raízes de leguminosas, por meio da filogenia de cinco genes *housekeeping* (*recA*, *glnA*, *gltA*, *dnaK* e *thrC*) e comparação com as relações filogenéticas oriundas da técnica do rRNA 16S. Ao final, observaram que, por ser mais informativa, a MLSA apresentou um potencial de discriminação superior à do rRNA 16S.

Na análise filogenética de 27 espécies de *Xanthomonas* por comparação de sequências parciais do gene *gyrB*, PARKINSON et al. (2007) observaram que apesar da variação entre o comprimento de ramos entre espécies, indicando diferentes graus de distinção genética, a maioria das espécies foi bem diferenciada, indicando a utilidade do método como uma ferramenta tanto para indicação de parentesco de inter-espécies mas também como um auxílio rápido e preciso na identificação das espécies, sendo

recomendado para o diagnóstico de rotina de espécies de *Xanthomonas*. Em adição, os autores observaram significativas correlações quando os resultados provenientes do MLSA foram comparados àqueles obtidos pela técnica de DDH e rRNA 16S.

YOUNG et al. (2008), na análise de sequência multilocus do gênero *Xanthomonas* de todas as espécies publicadas de *Xanthomonas* spp. (119 estirpes), utilizando-se os genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*, observaram a divisão da *Xanthomonas* spp. em dois grupos semelhantes, resultado similar aos obtidos na análise comparativa realizada por meio da técnica do rRNA 16S. A análise foi eficiente na diferenciação da maioria das espécies que foram estabelecidas pela DDH. A matriz de similaridade dos dados indicou significativas diferenças numéricas que podem formar a base para a diferenciação de espécies no futuro, como alternativa à DDH. Geralmente, a MLSA imita agrupamentos gerados pela DDH dentro de *Xanthomonas* e pode, portanto, oferecer um método refinado para diferenciação das espécies. Uma das contribuições mais importantes do MLSA, aplicado a *Xanthomonas*, é que permitirá, com maior facilidade, que estirpes sejam alocadas em espécies conhecidas ou mesmo indicadas como membros de novas espécies.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Isolados bacterianos e extração de DNA genômico

No presente estudo foram utilizados 27 isolados de *Xanthomonas* patogênicos a citros, sendo quatro de Xcc, três de Xfa-B, 19 de Xfa-C e um de Xacm (Tabela 1). Os isolados foram cultivados em 4 mL de meio de cultura LP (7 g L⁻¹ de levedura e 7 g L⁻¹ de peptona, pH 7,0) e incubados a 28 °C sob agitação a 200 rpm por aproximadamente 16 h. A extração de DNA foi feita pelo método de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) (AUSUBEL et al., 1995), com modificações. Alíquotas de quatro mL foram centrifugadas (5.400 g, 5 min, 20 °C) e o precipitado ressuspendido em tampão de lise contendo 500 µL de TE pH 8,0, 30 µL de SDS 10% e 40 mg mL⁻¹ de proteinase K (10 mg mL⁻¹). Após 1 h a 37 °C, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 160 µL de CTAB 5%. Depois de mantidas a 65 °C por 30 min, as amostras foram acrescidas de 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas (25 min, 15.700 g, 20 °C). O sobrenadante foi recuperado e 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 min (*Speed Vacuum*), ressuspendido em 80 µL de tampão TE (10:1, pH 8,0) e acrescido de 1 µL de RNase A (2,5 mg mL⁻¹). Após incubação a 37 °C por 40 min, os DNAs extraídos foram conservados a -20 °C.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NANODROP ND-100 e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM e EDTA 1 mM) para a verificação de sua qualidade e pureza. O gel foi corado com brometo de etídio (0,1 µg.mL⁻¹) e a intensidade das bandas foi analisada por meio de um sistema de fotodocumentação (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 Kodak digital science™*).

Tabela 1. Espécie bacteriana, isolado, hospedeiro, ano de isolamento e origem geográfica dos isolados utilizados no presente estudo.

Isolado ^a	Hospedeiro	Ano de isolamento	Origem
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>			
12 (306)*	<i>Citrus</i> ssp.	1997	Brasil
636 (IAPAR 12853)	<i>Citrus</i> ssp.	1996	Brasil
828 (IBSBF 1350)	<i>Citrus</i> ssp.	1997	Brasil
1567 (IBSBF 1801)	<i>Citrus</i> ssp.	1986	Oman
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> B			
1561 (IBSBF 409)	<i>Citrus limon</i>	-	Argentina
1566 (IBSBF 1610)	<i>Citrus limon</i>	-	Argentina
1631 (11122)**	<i>Citrus limon</i>	1994	Argentina
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> C			
535 (IBSBF 1479)	<i>Citrus aurantifolia</i>	2000	Brasil
536 (IBSBF 1473)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1999	Brasil
537 (IBSBF 1481)	<i>Citrus aurantifolia</i>	2000	Brasil
578 (IBSBF 1683)	<i>Citrus aurantifolia</i>	2001	Brasil
725 (IBSBF 1472)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1999	Brasil
751 (IBSBF 1496)	<i>Citrus aurantifolia</i>	2000	Brasil
752 (IBSBF 434)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1982	Brasil
763 (IBSBF 382)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1981	Brasil
766 (IBSBF 1497)	<i>Citrus aurantifolia</i>	2000	Brasil
791 (IBSBF 1495)	<i>Citrus aurantifolia</i>	2000	Brasil
867 (IBSBF 417)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1982	Brasil
1558 (IBSBF 380)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1981	Brasil
1559 (IBSBF 381)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1981	Brasil
1560 (IBSBF 392)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1981	Brasil
1563 (IBSBF 1353)	<i>Citrus aurantifolia</i>	1997	Brasil
1568 (IBSBF 2515)	<i>Citrus aurantifolia</i>	-	Brasil
1609	<i>Citrus aurantifolia</i>	2009	Brasil
1630	<i>Citrus aurantifolia</i>	2009	Brasil
1632 (10535)**	<i>Citrus aurantifolia</i>	1981	Brasil
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>			
1510 (IBSBF 1925)	<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	1989	EUA

^aNúmeros FDC (Fundecitrus, Araraquara, SP); números entre parênteses correspondem à numeração original do isolado. * Isolado padrão sequenciado por SILVA et al. (2002). ** Isolados padrões sequenciados por MOREIRA et al. (2010).

III.2 Amplificação via PCR

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 50 µL em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Foram utilizados 50 ng de DNA genômico; 0,5 µL da Phusion High – Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES); tampão da enzima Phusion 518-5X; 5 mM de uma mistura de dNTPs (2`-desoxinucleotídeos 5`-trifosfatos) e 10 µM de cada iniciador (Invitrogen) (Tabela 2). O programa utilizado para as amplificações foi o mesmo para todos os pares de iniciadores, exceção quanto à temperatura de anelamento, a qual consistiu em um ciclo de desnaturação inicial a 98

°C por 30 s; seguido de 35 ciclos a 98 °C por 10 s, anelamento por 20 s na temperatura de anelamento de cada primer (Tabela 2), extensão a 72 °C por 20 s e um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (0,1 µg mL⁻¹), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 Kodak digital science*TM)

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes *housekeeping atpD*, *dnaK* e *fusA* empregados na caracterização de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (tipos B e C) e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (ALMEIDA et. al., 2010; AH-YOU et al., 2009).

Iniciador	Tamanho (pb)	Sequência (5'- 3')	Temperatura de Anelamento
<i>atpD</i>	868	F: GGGCAAGATCGTTCAGAT R: GCTCTTGGTCGAGGTGAT	66 °C
<i>dnaK</i>	1048	F: TGGGCAAGATCATTGGTATT R: ACCTTCGGCATAACGGGCTTG	66 °C
<i>fusA</i>	774	F: TCTGGCSCARGARGAYCC R: GCCTCTTGCTARTGGTCRAA	63 °C

III.3 Sequenciamento dos produtos de amplificação e análise dos dados

Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* seguindo as recomendações do fabricante (Promega). Para a reação de sequenciamento foram utilizados os mesmos iniciadores utilizados na obtenção dos produtos da PCR (Tabela 2). A reação de sequenciamento constituiu de 50 ng de DNA, 3 µL de tampão Save Money 2,5X (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 50 mM de MgCl₂), 1 µL de cada iniciador (10 µM) e 1 µL de Big Dye V.3.1 (*Applied Biosystems*), em um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas utilizando o mesmo ciclo para os três pares de iniciadores (exceção para a temperatura de anelamento, conforme apresentado na Tabela 2), os quais consistiram em desnaturação inicial de 96 °C por 1 min; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 s; anelamento por 15 s, e extensão a 60 °C por 4 min.

Os produtos de amplificação pela PCR foram precipitados conforme o seguinte protocolo: adição de 80 µL de isopropanol 75%, seguido de incubação das amostras a

20 °C por 15 min e centrifugação a 3.040 g a 20 °C por 30 min. Após descarte do sobrenadante, ao precipitado de DNA foram adicionados 200 µL de etanol 70%, seguido por centrifugação a 3.040 g por 10 min a 20 °C. Essa última etapa foi repetida uma vez. Após eliminação do etanol residual, as amostras foram secas em estufa bacteriológica a 37 °C por 15 min. Para o sequenciamento dos genes *fusaA*, *dnaK* e *atpD* em sequenciador automático de DNA *Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer* (PE-*Applied Biosystems, Inc.*, CA, USA), adicionaram-se 10 µL de formamida (Hi-Di™ Formamide *Applied Biosystems*) às amostras, seguido de desnaturação a 95 °C por 5 min.

Os cromatogramas foram analisados por meio do programa CodonCode Aligner versão 3.7.1. As sequências obtidas por este programa foram comparadas pelo algoritmo ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/clustalw>) pelo método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) baseado no modelo de TAMURA & NEI (1993) por meio do aplicativo MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Sequências do gene *atpD* e *dnaK*, 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”). Como não foram encontradas sequências depositadas nos bancos de dados disponíveis do gene *fusaA*, tais comparações não foram realizadas para este gene. A confiança dos agrupamentos formados foi estimada pelo mesmo programa por meio de análise de *bootstrap* com 2.000 repetições. Foram feitas análises *multilocus* (MLSA) para cada gene *housekeeping* e também uma análise conjunta com as sequências dos três genes.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados fragmentos amplificados dos genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* para todos os isolados estudados. Para o isolado 306 de Xcc, utilizado como referência, os fragmentos amplificados apresentaram 868 pb para o *atpD*, 1.048 pb para o *dnaK* e 774 pb para o *fusA*. Foram observadas diferenças no tamanho dos fragmentos gerados com os demais isolados para os três genes (Figuras 1 e 2).

A filogenia obtida por meio do estudo de um único gene *housekeeping* deve ser interpretada como tal e não pode ser considerada para representar a filogenia do organismo em questão, devido à possibilidade de transferência de genes horizontal ou recombinação, taxas de mutações variáveis e simples variações estocásticas (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007). STACKEBRANT et al. (2002) recomendam a investigação de 5 ou mais sequências para o estabelecimento de uma MLSA confiável, entretanto, os autores não fornecem qual o nível de congruência necessário para a formação de uma base de aceitação. FARGIER & MANCEAU (2006) e YOUNG et al. (2008) observaram representação altamente congruente da *Xanthomonas* a partir da análise de quatro genes: *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*. Especificamente, YOUNG et al. (2008), trabalhando com 119 estirpes de *Xanthomonas* spp. e um total de 440 sequências (a partir dos genes anteriormente citados), observaram a formação de dois grupos similares, possibilitando a representação de gêneros distintos, semelhante ao resultado obtido por meio da análise comparativa do rRNA16S, concluindo que a técnica MLSA é uma ferramenta poderosa e robusta para trabalhos de classificação de *Xanthomonas*, tanto para a identificação de estirpes como membros de espécies conhecidas ou mesmo para a indicação destas como membros de novas espécies.

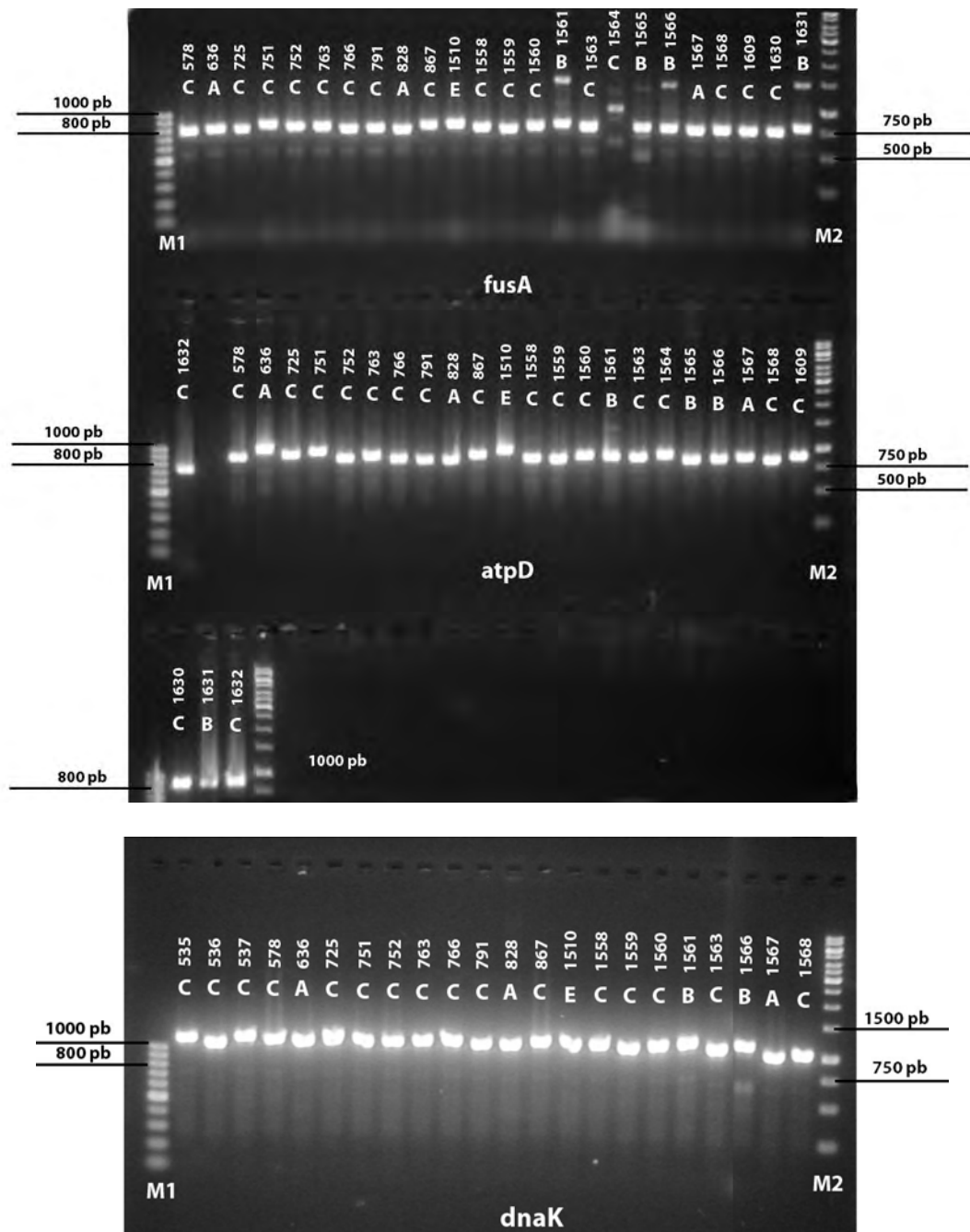


Figura 1. Produtos de amplificação dos genes *fusA*, *atpD* e *dnaK* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (A), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* (B e C), e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (E). Gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Tempo de corrida de 2 h a 80 V. M1: marcador de peso molecular 100 pb e M2: marcador de peso molecular 1 kb (*Fermentas Life Sciences*). Os isolados 1564 e 1565 não foram utilizados no trabalho.

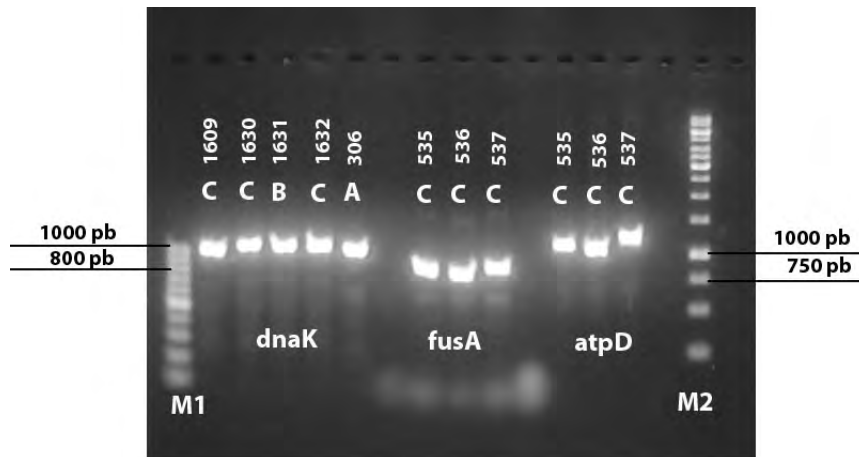


Figura 2. Produtos de amplificação do gene *dnaK*, *fusA* e *atpD* de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (A), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* (B e C). Gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Tempo de corrida de 2 h a 80 V. M1: marcador de peso molecular 100 pb e M2: marcador de peso molecular 1 kb (*Fermentas Life Sciences*).

A análise das sequências parciais dos genes *atpD* (833 pb), *dnaK* (963 pb) e *fusA* (743 pb) revelaram 100% de similaridade entre isolados da mesma espécie/tipo e diferenças entre isolados de espécies/tipos diferentes (Tabela 3). As similaridades observadas com as sequências parciais dos genes *atpD* e *fusA* foram de aproximadamente 97-98% nas comparações envolvendo Xfa-C e Xacm, de 98% nas comparações de Xfa-B e Xcc e de 99% nas comparações entre os tipos B e C de Xfa e de Xfa-C e Xcc (Tabela 3). De modo semelhante, as similaridades observadas com a sequência parcial do gene *dnaK* foram maiores entre Xfa-B e C, seguidas das comparações entre Xfa-C e Xcc e finalmente entre as comparações envolvendo a espécie *citrumelonis*.

Tabela 3. Número de nucleotídeos diferentes (n) e porcentagem de similaridade de sequências (%) dos genes *housekeeping atpD*, *dnaK* e *fusA* de isolados de *Xanthomonas* patogênicas a citros.

Espécies	<i>atpD</i>			
	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
		Tipo B	Tipo C	
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>		98,1%	98,9%	97,2%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> B	15 n		98,7%	97,1%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> C	9 n	10 n		97,2%
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	23 n	24 n	23 n	

Espécies	<i>dnaK</i>			
	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
		Tipo B	Tipo C	
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>		97,1%	97,4%	97,1%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> B	27 n		99,8%	96,4%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> C	25 n	2 n		96,7%
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	27 n	34 n	32 n	

Espécies	<i>fusA</i>			
	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
		Tipo B	Tipo C	
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>		98,5%	98,6%	97,3%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> B	11 n		99,8%	97,5%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> C	10 n	1 n		97,7%
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	20 n	18 n	17 n	

Espécies	<i>atpD + dnaK + fusA</i>			
	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i>		<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
		Tipo B	Tipo C	
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>		97,9%	98,2%	97,2%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> B	53 n		99,4%	97,0%
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolli</i> C	44 n	13 n		97,1%
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	70 n	76 n	72 n	

As análises conjuntas das sequências dos três genes (2.539 pb) revelaram similaridade de 99,4% entre Xfa-B e C, a maior similaridade verificada no estudo, e de 97% (a menor), observada entre Xacm e Xfa-B (Tabela 3). Apesar da diferença de 0,3%, Xcc mostrou-se mais similar a Xfa-C (98,2% de similaridade) do que a Xfa-B (97,9%). YOUNG et al. (2008), na análise de MLSA dos genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*, observaram 98,3% de similaridade entre as espécies Xcc e Xfa. ALMEIDA et al. (2010), trabalhando com o primeiro banco de dados virtual de MLST/MLSA para bactérias fitopatogênicas (PAMDB), observaram que a técnica de análise da árvore filogenética

construída a partir da concatenação dos dados de MLSA, para o gênero *Xanthomonas*, possibilitou fácil distinção entre Xcc e Xfa.

No presente trabalho, as análises filogenéticas realizadas com as sequências parciais dos genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* revelaram quatro grupos distintos, formados pelas três espécies patogênicas a citros (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelonis*), sendo que o grupo formado pelos isolados de *aurantifolii* apresentou-se subdividido de acordo com os isolados tipos B e C desse patógeno (Figuras 3 e 4). Segundo ALMEIDA et al. (2010), a MLSA, apesar de possuir um menor poder na distinção entre tipos dentro da Xcc, permitiu uma subtipagem inicial destes organismos, uma vez que, em seus estudos, a técnica foi capaz de diferenciar os dois tipos da subsp. *citri*, A* e A^w, do mais comum de Xcc, presente na Flórida. Entretanto, no presente trabalho, a técnica MLSA foi eficiente na diferenciação de isolados entre as espécies de *Xanthomonas*, mas mostrou-se ineficiente na diferenciação dos isolados pertencentes à mesma espécie. Os valores de *bootstrap* obtidos nas análises individuais dos genes *housekeeping* foram de 74% para o *atpD*, 100% para o *dnaK* e 99% para o *fusA*. Para a análise conjunta dos genes *housekeeping* o valor de *bootstrap* foi de 100%. O valor de *bootstrap* acima de 70% frequentemente é utilizado como referência, indicando um alto nível de confiança das análises filogenéticas (PARKINSON et al., 2007).

A análise filogenética individual para os genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* apresenta uma variação entre as árvores filogenéticas oriundas de cada um desses genes *housekeeping* pelo método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) (Figura 3). A filogenia obtida a partir das sequências dos genes *atpD* e *fusA* apresentam maior similaridade entre as espécies patogênicas *citri* e *aurantifolii*; por outro lado, a filogenia obtida para o gene *dnaK* apresentou maior similaridade entre as espécies *citri* e *citrumelonis*. A comparação entre filogenia de genes individuais, de forma geral, mostram variações. Segundo YOUNG et al. (2008) as variações nas estruturas filogenéticas podem ser atribuídas, principalmente, à escolha do gene, ao invés do algoritmo de análise utilizado. MARTENS et al. (2007), na análise da filogenia individual para os genes *glnA*, *thrC* e *dnaK*, dos gêneros *Ensifer* e *Sinorhizobium*, relataram estruturas semelhantes na

comparação entre os métodos *Neighbour-joining*, *Maximum Parsimony* e Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*).

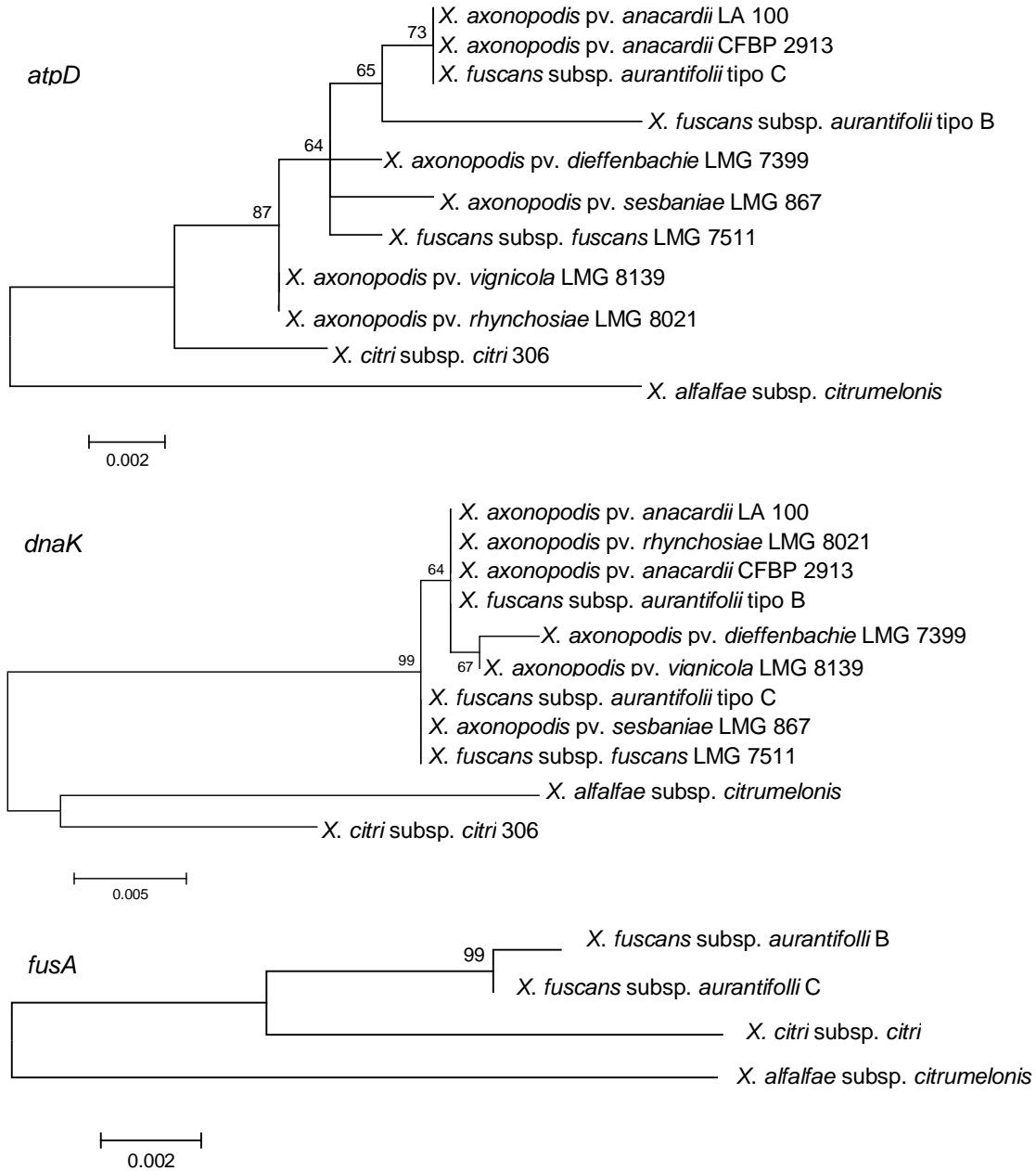


Figura 3. Análises filogenéticas com base nas sequências parciais dos genes *atpD*, *dnaK* e *fusA* de bactérias do gênero *Xanthomonas*. pelo do método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*), modelo de Tamura-Nei.

Resultados semelhantes foram observados por AH-YOU et al. (2009) que, utilizando MLSA e os genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB* na análise de filogenia de isolados de *Xanthomonas*, obtiveram resultados congruentes na comparação das árvores obtidas pelos métodos *Neighbour-joining*, Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) e Inferência Bayesiana. Assim, os resultados sugerem que as variações nas árvores filogenéticas observadas no presente estudo podem ser atribuídas à escolha dos genes *housekeeping* e não ao método de análise escolhido.

A análise filogenética conjunta (*atpD+dnaK+fusA*), por sua vez, apresentou maior similaridade entre os grupos formados pelos isolados de *aurantifolii* (B e C) e o grupo formado pelos isolados de *citri* (Figura 4). Os resultados corroboram aqueles obtidos por YOUNG et al. (2008) que, trabalhando com 119 estirpes de *Xanthomonas* e utilizando a análise de quatro genes *housekeeping*, observaram uma maior similaridade na filogenia dessas espécies (*citri* e *aurantifolii*) e menor similaridade entre estas e isolados da espécie *citromelonis*. PARKINSON et al. (2007), na comparação de sequências parciais do gene *gyrB*, observaram maior similaridade entre *citri* e *aurantifolii* e menor similaridade entre estas e os isolados de *citromelonis*. Os mesmos autores afirmam que as sequências parciais do gene *gyrB* foram suficientemente distintas para a discriminação da maioria das espécies de *Xanthomonas*. Em trabalho posterior, PARKINSON et al. (2009) observaram o mesmo comportamento anteriormente descrito para as espécies *citri*, *aurantifolii* e *alfalfae*, afirmando que foi encontrada apenas uma mínima diferença na diversidade das sequências de um grande número de *Xanthomonas* que constituíram as árvores filogenéticas de *X. citri* e *X. aurantifolii*.

As atuais técnicas de definição e diferenciação de espécies são a DDH (conhecida como método padrão ouro) e a rRNA 16S. Entretanto, a DDH é onerosa, laboriosa e de difícil padronização entre laboratórios e a rRNA 16S, por sua vez, apresenta pouca diferença na sequência de nucleotídeos do gene do rRNA 16S, dificultando a comparação entre as sequências dos isolados. De acordo com ALMEIDA et al. (2010), estudos baseados nas sequências do gene do rRNA 16S mostraram que vários genótipos de diferentes espécies, assim como determinados pela DDH,

compartilharam mais de 99% de identidade das sequências, tornando esta técnica inadequada para a diferenciação de espécie no gênero *Xanthomonas*. Com isso, a técnica MLSA vem desempenhando um importante papel na diferenciação de espécies dentro do gênero *Xanthomonas* por ser rápida, barata e de alta confiabilidade dos resultados.

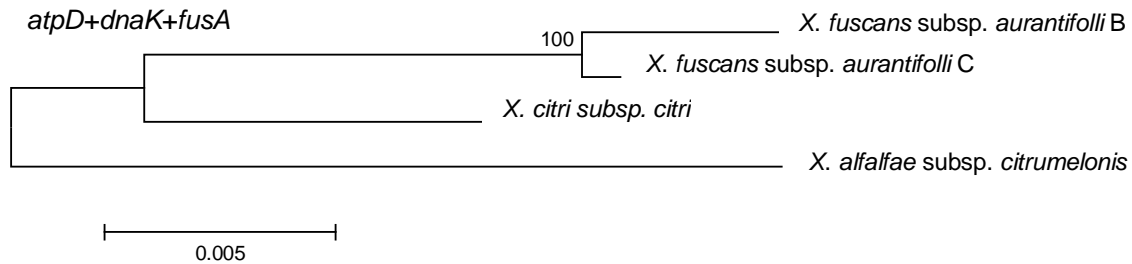


Figura 4. Análise filogenética conjunta com genes *housekeeping* por meio do método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*), modelo de Tamura-Nei.

V. CONCLUSÕES

A técnica MLSA foi eficiente na caracterização de isolados pertencentes a diferentes espécies de *Xanthomonas*. Para o conjunto de genes *housekeeping* utilizados (*atpD*, *dnaK* e *fusA*) foram observadas maiores similaridades entre os isolados de Xcc e Xfa B e C. Entretanto a técnica MLSA não foi capaz de diferenciar os isolados pertencentes às mesmas espécies de bactérias patogênicas à citros. Esse resultado pode ser devido ao alto grau de conservação dos genes *housekeeping* dentro das espécies. Foi possível a diferenciação de Xfa-B de Xfa-C, indicando que os isolados são de tipos diferentes.

VI. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. F.; YAN, S. C.; CAI, R. M.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X. A.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. PAMDB, A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated Microbes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 3, p. 208-215, 2010.

AGRIFANUAL 2011 anuário da agricultura brasileira. São Paulo: AgraFNP, 2011. 482 p.

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; NGOC, L. B. T.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIERE, 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**, Berks, v. 59, p. 306-318, 2009.

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. 4410 p.

BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A.; AYRES, A. J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 30-35, 2001.

BEHLAU, F.; AMORIM, L.; BELASQUE, J.; BERGAMIN, A.; LEITE, R. P.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. **Plant Pathology**, Malden, v. 59, n. 6, p. 1031-1036, 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 Phytophthologica**, Botucatu, v. 35, n.2, p. 91-92, 2009.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Manejo integrado de pragas (IPM): problemas conceituais para sua aplicação em fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 385-390, 1999.

BUI THI NGOC, L.; VERNIÈRE, C.; BELASQUE, J.; VITAL, K.; BOUTRY, S.; 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**, Malden, v. 288, n. 1, p. 33–39, 2008.

CARVALHO, F. M. S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 2006. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2006.

CIVEROLO, E. L. Citrus bacterial canker disease in tropical regions. In: INTERNATIONAL CONF PLANT PATH BACTERIA. 8., 1994, Paris. Proceedings...

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P., BUSSE, H-J., FREDERIKSEN, W.C., BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the Pasteurellaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 57, p. 166-178, 2007.

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.

FARGIER, E.; MANCEU, C. Pathogenic and genetic characterization of *Xanthomonas campestris* by plant inoculations and multilocus site analysis. In: 11TH INT. CONF. PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 11., 2006, p. 35.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. cap. 25, p. 261-296.

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**, Berks, v. 39, p. 14-22, 1989.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, n. 9, p.733-739, 2005.

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

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

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

MARCELLETTI, S.; FERRANTE, P.; SCORTICHINI, M. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. **Diversity**, Basel, v. 2, n. 11, p. 1205-1222, 2010.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, P.; VOS, P. D.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **Internations Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, n. 3, p. 489-503, 2007.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, 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.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE,

R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; NETO, J. R.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA, 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**, Londres, v. 11, p. 1/25-25/25, 2010.

NAMEKATA, T. **Estudo comparativo entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., N.F. SP. *aurantifolii*, agente causal da cancrose do limoeiro Galego**. 1971. 65 f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1971.

NAMEKATA, T.; ROSSI, A. C.; CERÁVOLO, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cc. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n.1, p. 67-78, 1996.

NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M.; ARAÚJO, A. E. S. Ocorrência de cancro cítrico no estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p. 81-82, 2003.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Maskestrat, 2010. 137 p.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J. B.; BELASQUE JÚNIOR, 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.

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 Journal Phytopathology**, Nova Delhi, v. 26, p. 215-217, 1973.

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C.; BEW, J.; STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 57, 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**, Berks, v. 59, n. 2, p. 264-274, 2009.

RICHTER, D.; POSTIC, D.; SERTOUR, N.; LIVEY, I.; MATUSCHKA, F.R.; BARANTON, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, n.4, p. 873-881, 2006.

RYAN, R. P.; VORHOLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M. A.; BOGDANOVA, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011.

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**, Amsterdam, v. 29, p. 690-695, 2006.

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.; CLAPINA, 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, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A.; 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.; DOS SANTOS, M. T.;

TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Londres v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P. A. D., KÄMPFER, J.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWING, J.; MAIDEN, M. C. J. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Internations Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Bekers, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

STALL, R.E.; CIVEROLO, E.L. Research related to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.339-420, 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.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v.10, n. 3, p.512-526, 1993.

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**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

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.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 7, p. 677-682, 2000.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C.; SHEARMAN, H. M.; FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p. 366-377, 2008.