



ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COM USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zuliani¹; Larissa Siqueira Soares²; Paula Thais Requena Nocchi²; Heraldo Takao Hashiguti¹; Carlos Alexandre Zanutto³; William Mário de Carvalho Nunes⁴

RESUMO: A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, é um importante patógeno na citricultura mundial, visto sua ampla gama de hospedeiro e variabilidade. A fim de estudar a diversidade genética de *X. citri* em pomares do Estado do Paraná, foram coletados, a partir de lesões em citros infectados por *X. citri*, 48 isolados, em pomares comerciais de Congonhinhas, Cornélio Procópio, Paranavaí e pomar experimental da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI). As culturas foram cultivadas em meio NA e posteriormente extraído o DNA genômico de cada amostra. Em seguida realizou-se a amplificação do DNA por PCR, utilizando 14 marcadores microssatélites e o resultado foi observado em gel de agarose a 2%. Com os dados obtidos foi gerada uma matriz de semelhança e um dendograma foi construído pelo método UNJ (*Unweighted neighbor joining*). A árvore foi gerada por análise *Bootstrap*. Os iniciadores microssatélites amplificaram regiões do genoma de todos os isolados, mostrando a formação de três grupos distintos. No entanto a diferenciação entre os isolados foi baixa, mostrando que a origem e o hospedeiro não foi um fator condicionante na diversidade genética dos mesmos. Essa baixa diversidade sugere que as populações de *X. citri* subsp. *citri* encontradas no Paraná podem ser clonais, possuindo forte ligação epidemiológica.

PALAVRAS-CHAVE: Cancro cítrico; isolados; PCR; primers.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é um modelo interessante de co-evolução e especialização patógeno x hospedeiro, devido as suas variantes patogênicas. Todas as estirpes de *X. citri* causam cancro em citros, no entanto, a gama de hospedeiro varia entre os grupos de estirpes (BRUNINGS & GABRIEL 2003; Gabriel 2001).

O estudo da diversidade de *X. citri* foi analisado ao longo dos anos principalmente por Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) ou pela Reação da polimerase em cadeia (PCR) (GRAHAM et al. 2004). Bui Thi Ngoc et al. (2009) em seus estudos desenvolveram uma técnica de análise multilocos para *X. citri*, utilizando 14 marcadores microssatélites desenhados com base no genoma deste patógeno.

¹ Doutoranda do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. alineorb@hotmail.com

² Mestrandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES, CNPq. paizinhos_larissa@hotmail.com

³ Eng. Agrônomo, Dr. da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. cazanutto@uem.br.

⁴ Orientador, Professor Doutor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM. william.nunes@pq.cnpq.br

O conhecimento da diversidade genética de um agente patogênico pode ajudar no estabelecimento de hipóteses sobre sua evolução, compreensão da relação entre patógeno x hospedeiro, além de auxiliar na definição de métodos e estratégias de controle (ADHIKARI et al. 1999; RESTREPO et al. 2000; OCHIAI et al. 2000). Diante disso o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de *X. citri* subsp. *citri* em pomares comerciais e experimental no Estado do Paraná, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 46 isolados (n) de *X. citri* de três pomares comerciais e um experimental, localizados no Estado do Paraná foram utilizados no estudo [Congonhinhas (n=4), Cornélio Procópio (n=3), Paranavaí (n=10) e FEI-Iguatemi (n=29)]. Além disso, duas amostras de isolados de Xcc 306 foram incluídas no estudo.

Culturas desses isolados coletados foram desenvolvidas em meio NA e mantidas por aproximadamente 48 horas a 28°C em estufa bacteriológica para crescimento. Após crescimento e repicagem, as culturas puras (isolados) foram mantidas em tampão fosfato salino [PBS].

O DNA total de *X. citri* foi extraído a partir de culturas cultivadas em meio NA, segundo Nunes et al. 2008. A quantificação do DNA e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose corado com brometo de etídeo a 1%.

Para a amplificação do DNA obtido, seguiu-se os procedimentos descritos por Bui Thi Ngoc et al. (2009), sendo utilizado 14 pares de iniciadores microssatélites desenhados a partir da sequência completa do genoma de *X. citri* subsp. *citri* estirpe 306. As amplificações foram realizadas utilizando as seguintes condições: 15 min a 95 °C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 25 ciclos a 94°C durante 30s, as temperaturas de anelamento variaram de 64 a 70°C durante 90s e 72°C durante 90 s para a extensão, tendo ainda para extensão final, 30 min a 72°C (BUI THI NGOC et al. 2009). Após, o produto da PCR foi observado através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

Os padrões de bandas evidenciados pela PCR utilizando marcadores microssatélites foram registrados como ausência (0) ou presença (1) de bandas para a construção da matriz binária. Apenas bandas reprodutíveis foram consideradas positivas. A matriz de semelhança foi calculada usando o coeficiente *Dice* e um dendograma foi construído pelo método UNJ (*Unweighted neighbor joining*) usando o software DarWIN 5.0 (CIRAD, Montpellier, France) (JACIANI et al 2012). A árvore foi gerada por análise de *Bootstrap* (1000 repetições).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os 14 pares de iniciadores microssatélites utilizados no presente trabalho, amplificaram regiões do genoma específico para *X. citri* em todos os isolados testados. Concordando com os resultados obtidos por Bui Thi Ngoc et al. (2009), onde testaram os mesmos marcadores microssatélites em uma coleção de 239 estirpes de *X. citri* e 83 estirpes de patovares geneticamente relacionados, originados de 25 países da Ásia.

Os resultados mostraram que os iniciadores foram bastante eficientes, apontando diferenças entre os isolados e a formação de três grupos (Figura 1). No entanto essas diferenças são muito baixas, evidenciando que estes são muito próximos geneticamente, visto que o local de origem não influenciou na variabilidade genética dos isolados. Pruvost et al. (2011) observaram que estirpes que compartilhavam o mesmo perfil genético ou pertenciam ao mesmo complexo clonal eram mais frequentemente originadas a partir do

mesmo local no mesmo ano de avaliação ou dentro de um intervalo de dois anos, sugerindo forte ligação epidemiológica entre os isolados.

Em condições brasileiras, Jaciani et al. (2012) analisando 157 estirpes de *X. citri* coletadas em 62 municípios de sete estados brasileiros (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Roraima, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) verificaram uma elevada diversidade genética em amostras de todos os Estados analisados, independente das estratégias de controle utilizada em cada um deles. O Estado de São Paulo que adotou a erradicação de plantas doentes por muitos anos e o Estado do Paraná que conviveu com a doença, sem erradicar as plantas, apresentaram resultados semelhantes quanto à diversidade genética de *X. citri*. Provavelmente as populações da bactéria de São Paulo e Paraná tenham se originado a partir das mesmas linhagens genotípicas. Populações de *X. citri* identificadas nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentaram diferenças em relação aos outros Estados, provavelmente podem ter sido influenciadas por diferentes introduções do patógeno. A proximidade desses Estados com países como Argentina, Paraguai e Uruguai pode ter facilitado o intercâmbio de material genético infectado.

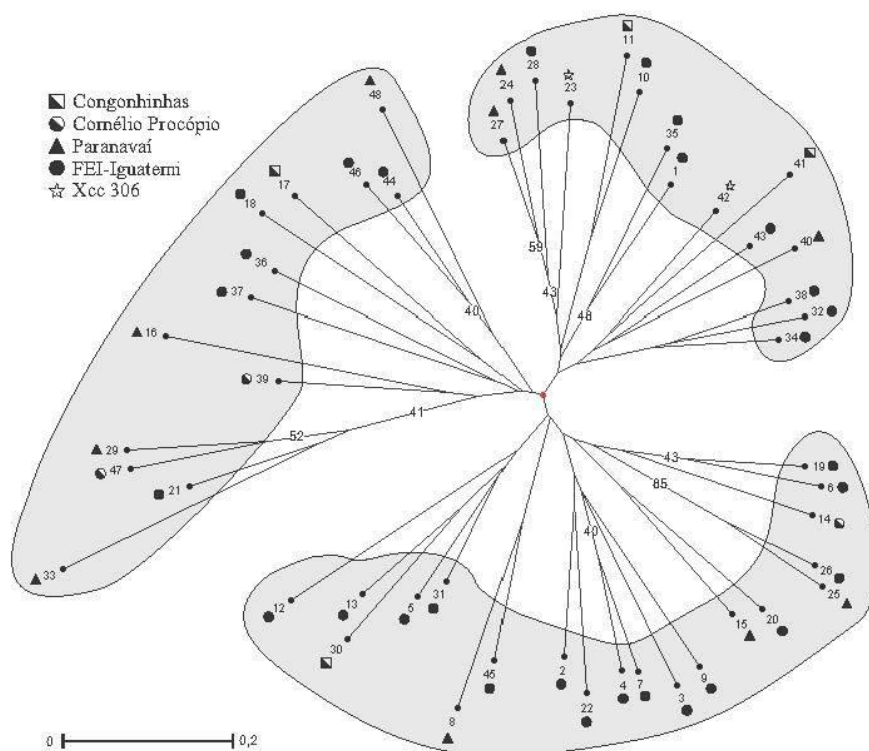


Figura 1. Árvore obtida por Unweighted neighbor joining (coeficiente Dice), mostrando a diversidade genética de 48 isolados de *X. citri* subsp. *citri*, identificados por marcadores microssatélites, de diferentes regiões do Estado do Paraná, Brasil.

O baixo grau de diversidade genética global encontrado na população de *X. citri* pode ser atribuído principalmente as cultivares de citros comerciais (por exemplo *C. sinensis*, *C. paradisi* e *C. limon*), ou seja, grandes áreas cultivadas com mesma espécie cítrica (GRAHAM et al. 2004). Isso poderia se enquadrar as condições paranaenses, onde o patógeno não enfrenta uma pressão de seleção significativa, devido à homogeneidade genética do hospedeiro nos pomares comerciais.

4 CONCLUSÃO

A baixa diversidade genética observada pode ser um indicativo de que as populações de *X. citri* subsp. *citri* encontradas no Estado do Paraná são clonais e possuem forte ligação epidemiológica.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, T. B.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Phytopathology** 89, p. 687-694, 1999.
- BRUNINGS, A. M. & GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Mol. Plant Pathol.** 4, p.141-157, 2003.
- BUI THI NGOC, L.; VERNIÈRE, C.; JOUEN, E.; AH-YOU, N.; LEFEUVRE, P.; CHIROLEU, F.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. **Intern. Journ. of Systemat. and Evolut. Microbiol.** 60, p. 515-525, 2010.
- GABRIEL, D. W. Citrus canker. In: **Encyclopedia of Plant Pathology**. O. C. Maloy and T. D. Murray, eds. John Wiley and Sons, p. 215-217, 2001.
- GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol. Plant Pathol.** 1, p. 1-15, 2004.
- JACIANI, F.J.; FERRO, J.A.; FERRO, M.I.T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; BELASQUE JR J. Genetic Diversity of a Brazilian Strain Collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Based on the Type III Effector Protein Genes. **Plant Disease**, 96, p 193-203, 2012.
- NUNES, W.M.C.; CORAZZA, M.J.; SOUZA, S.A.C.D.; TSAI, S.M.; KURAMAE, E.E. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates. **Summa Phytopathol.** 34, p. 228-231, 2008.
- OCHIAI, H., HORINO, O., MIYAJIMA, K., KAKU, H. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. **Phytopathology**, 90, p. 415-421, 2000.
- PRUVOST, O.; VERNIÈRE, C.; VITAL, K.; GUÉRIN F.; JOUEN, E.; CHIROLEU, F.; AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L. Insertion Sequence and Tandem Repeat-Based Genotyping Techniques for *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*. **Phytopathology**, 101, p. 887-893, 2011.
- RESTREPO, S.; VÉLEZ, C.M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, 90, p. 683-690, 2000.