



***Xanthomonas citri* subsp. *citri*: ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA**

*Bruna Rafaela Barbieri*¹, *Paula Thaís Requena Nocchi*², *Angélica Albuquerque Tomilhero Frias*², *Hudson Sérgio de Souza*², *Mariana Gomes Brescansin*², *William Mário de Carvalho Nunes*³

RESUMO: A citricultura mundial é vulnerável a diversas doenças, dentre elas destaca-se o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade deste patógeno em variedades mais e menos suscetíveis à doença em pomar experimental. Para isso foram coletadas amostras de folhas de três variedades mais suscetíveis e três menos suscetíveis a cancrose no pomar da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI). Foi realizado o isolamento e manutenção da bactéria em meio NA e posteriormente seu DNA foi extraído e amplificado por PCR utilizando-se 14 marcadores microssatélites e o resultado foi observado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%. Através dos resultados foi gerado um dendograma onde pôde observar uma mínima diversidade genética entre os isolados avaliados, evidenciando que as populações da bactéria podem ser clonais e possuir uma estreita ligação epidemiológica.

PALAVRAS-CHAVE: PCR; cancro cítrico; variabilidade.

1 INTRODUÇÃO

Constatado pela primeira vez em Presidente Prudente – SP, em 1957 (BITANCOURT, 1957), o cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, e este patógeno tem obtido a atenção de produtores, técnicos e pesquisadores, por possuir uma grande variedade de hospedeiros do gênero *Citrus* e também por sua agressividade e ampla distribuição (GOTWALD et al., 2002).

Os sintomas se caracterizam por lesões circulares, salientes, de coloração amarronzada e com aspecto eruptivo. Os sintomas se expressam em folhas, frutos e ramos. Nas folhas as lesões são observadas em ambos os lados, sendo comum a presença de um halo amarelo circundando a lesão. Quando a doença ocorre mais agressivamente, pode-se observar a ocorrência de desfolha, queda de frutos e seca de ramos (LARANJEIRA et al., 2005).

O estudo da diversidade genética de um patógeno ajuda na suposição de hipóteses sobre sua evolução, compreensão da relação entre patógeno e hospedeiro, além de auxiliar na definição de métodos e estratégias de controle (RESTREPO et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho foi estudar a diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em três variedades mais suscetíveis e três menos suscetíveis ao cancro cítrico presentes no pomar da FEI.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de folhas de três variedades de laranja doce mais suscetíveis e três menos suscetíveis a cancrose do pomar experimental existente na FEI, todas as amostras apresentavam sintomas característicos da doença. As folhas foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá, onde foi realizado o isolamento e manutenção da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio de cultura nutriente-ágar [NA] (3g extrato de carne; 5g de peptona; 5g de cloreto de sódio; 15g de Agar/Litro de água destilada q.s.q) por aproximadamente 48 horas a 28°C em estufa bacteriológica.

Após o crescimento e repicagem, o DNA total da bactéria foi extraído. Posteriormente foi realizado sua quantificação e verificado sua qualidade por meio de gel de agarose, corado com brometo de etídio a 1%.

A amplificação do DNA foi realizado pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), com 14 marcadores microssatélites desenhados a partir da sequencia completa do genoma de *X. citri* subsp. *citri* estirpe 306 (BUI THI NGOC et al., 2009; DA SILVA et al., 2002).

¹ Mestranda do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá - PR. Bolsista CNPq. brunarbarbieri91@hotmail.com

² Doutorandos do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá – PR. Bolsistas CNPq/CAPEs. thaisnocchi@hotmail.com

³ Orientador, Professor Doutor do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM. Bolsista Produtividade CNPq. wmcnunes@uem.br



O isolado 306 foi obtido do acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) e foi incluído no estudo para comparação ao avaliar a variabilidade genética entre os isolados testados.

O produto da PCR foi observado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, foi utilizado brometo de etídio para visualizar as bandas no gel e foi possível a construção de um dendograma construído pelo método UNJ (*Unweighted neighbor joining*) usando o software DarWIN 5.0. Foi gerado por análise de *Bootstrap* com 1000 repetições.

Tabela 1. Isolados de *X. citri* subsp. *citri* utilizados no experimento

Código do isolado	Nome comum	Vulnerabilidade
140	Shamouti	Resistente
76	Tangerina Ponkan	Resistente
83	Satsuma Oktisu SPA 29	Resistente
84	Valência 1230	Suscetível
327	Ovale mut Proc 435/96	Suscetível
85	Valência Frost	Suscetível

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Analisando a figura 1, pode-se observar que houve um agrupamento em três grupos distintos, cada qual com dois isolados. Apesar de ter havido essa distinção entre os grupos, pode-se afirmar que há uma baixa diversidade genética entre os isolados, o que indica que as populações do patógeno encontradas no pomar experimental possuem uma forte ligação epidemiológica e são clonais. Essa similaridade também foi encontrada em trabalhos anteriores onde se pesquisou coleções de *X. citri* isoladas de diferentes áreas geográficas (BUI THI NOGOC et al., 2009; CARVALHO et al., 2005).

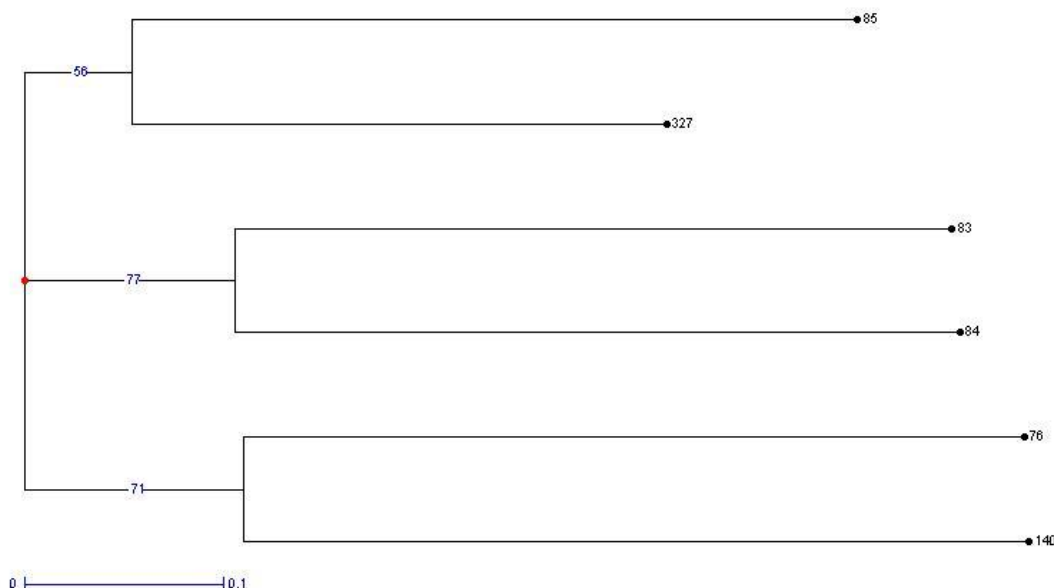


Figura 1. Dendograma evidenciando a diversidade genética dos seis isolados utilizados no estudo.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o estudo da diversidade genética de um patógeno é um fator importante para estudar a epidemiologia do mesmo, a fim de propor práticas de manejo mais adequadas e eficientes para o verdadeiro controle da doença.



REFERÊNCIAS

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**. v.23, p.101-111, 1957.

BUI THI NGOC, L.; VERNIÈRE, C.; VITAL, K.; GUERIN, F.; GAGNEVIN, L.; BRISSE, S.; AH-YOU, N.; PRUVOST, O. Development of 14 minissatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **Molecular Ecology Resources**. 9, p. 125-127, 2009.

CARVALHO, F.M.S.; CARAMORI, P.C.L.; LEITE JR., R.P. Genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* PV. *Citri* based on plasmid profile and pulsed Field gel eletrophoresis. **Genetics and Molecular Biology**. v.28, p.446-451, 2005.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**. 417, p. 459-463, 2002.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus Canker: The patogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**. doi:1094/PHP-2002-0812-01-RV. <http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/>. 2002.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLLETA-FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D., et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 509 -566, 2005.

RESTREPO, S.; VÉLEZ, C.M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within diferente fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, p. 683-690, 2000.