

Janaína Ciboto Mulati

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri* OBTIDAS DE CULTIVARES DE CITROS DA
REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO PARANÁ**

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
2004**

Janaína Ciboto Mulati

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* OBTIDAS DE CULTIVARES DE CITROS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO PARANÁ

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL**

2004

Janaína Ciboto Mulati

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
OBTIDAS DE CULTIVARES DE CITROS DA REGIÃO NOROESTE DO
ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada, 25 de outubro de 2004.

“DEUS,
DAI-ME SERENIDADE PARA ACEITAR O QUE NÃO POSSO MUDAR,
CORAGEM PARA MUDAR O QUE PODE SER MUDADO E
SABEDORIA PARA DISTINGUIR UMA COISA DA OUTRA”
(ORAÇÃO DA SERENIDADE)

PRIMEIRAMENTE, À **DEUS**.
À MINHA “**PEQUENA FAMÍLIA**”:
MEUS PAIS CELSO E CLEMÍLZA
PELO AMOR, EXEMPLO DE DETERMINAÇÃO E CORAGEM;
MINHAS IRMÃS IARA E MOARA
MEU ESPOSO ALEXANDRE, PELA PACIÊNCIA E INCENTIVO;
MINHA RAZÃO DE VIVER, **TALLIS**.

DEDICO

AGRADECIMENTO

A **Deus** pela luz que me guia;

Ao **Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes**, pela sua valiosa orientação, confiança e incentivo.

À **Prof. Dra. Maria Júlia Corazza Nunes**, pela oportunidade de iniciar na Pós-Graduação, pelas sugestões, incentivo e co-orientação.

Ao **Prof. Dr. Gerd Walter Müller**, pelo auxílio na versão do resumo.

À **Universidade Estadual de Maringá**, ao programa de **Pós-Graduação em Agronomia**, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

Ao **Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA)**, vinculado ao **Centro de Ciências Agrárias**, tendo como **Coordenador Geral**, o **Professor Dr. William Mário de Carvalho Nunes** e **Coordenadora Técnico-Científica** Professora **Dra. Maria Júlia Corazza Nunes**, onde foi desenvolvido este trabalho.

À **Coordenadoria do Projeto Instituto do Milênio (CNPq)**, pela viabilização dos recursos financeiros para a aquisição de equipamentos e material de consumo.

Ao **Centro APTA Citros Sylvio Moreira**, através do **Coordenador do Laboratório de Biotecnologia em Citros**, **Dr. Marcos Antonio Machado** e ao **Pesq. Dr. Helvécio Della Coletta Filho**, por me oferecer treinamento e o fornecimento de iniciadores empregados neste trabalho.

Ao amigo, incentivador **Engenheiro Agrônomo Carlos Alexandre Zanutto**, do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), pela paciência e ensinamento das técnicas de Biologia Molecular.

À **amiga Simone Morales** pela compreensão, incentivo, ajuda e amizade.

Aos amigos **Luciana, Waldecy, Maria Lúcia, Alessandra, Gisele, Rui e demais colegas**, pelo companheirismo e colaboração.

Aos **funcionários do Laboratório de Fitopatologia, Mauro, Júnior e Marli**, pela colaboração.

Ao **José Alcides**, pela colaboração nas viagens de coleta do material vegetal.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia**, pela oportunidade de conhecimento em diversas áreas, servindo para meu desenvolvimento.

A **TODOS** que, de alguma forma, colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADEÇO.

BIOGRAFIA

JANAÍNA CIBOTO MULATI, filha de Celso Natal Ciboto e Clemíza S. de Melo Ciboto, nasceu em Boa Esperança, no Estado do Paraná, aos 2 dias do mês de novembro de 1976. Graduiu-se em Ciências Biológicas, em junho de 2002, pela Universidade Estadual de Maringá. Iniciou o curso de Mestrado em junho de 2002, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	O GÊNERO <i>Xanthomonas</i>	3
2.2	CANCRO CÍTRICO	4
2.3	SINTOMAS	5
2.4	CICLO DA DOENÇA	6
2.5	DISSEMINAÇÃO	8
2.6	CONTROLE	9
2.7	INICIADORES ERIC E BOX	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	18
3.2	ISOLAMENTO	19
3.3	PROVAS BIOQUÍMICAS	20
3.3.1	Coloração de Gram	20
3.3.2	Catalase	21
3.3.3	Oxidação/Fermentação da Glicose	21
3.3.4	Hidrólise de Aesculina	22
3.3.5	Liquefação de Gelatina	22
3.3.6	Produção de Urease	22
3.3.7	Produção de Ácidos de Carboidratos ou Utilização de Fontes de Carboidratos	23
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	24
3.5	QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	25
3.6	AMPLIFICAÇÃO VIA PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE XAC	25
3.7	REAÇÃO BOX-PCR	26
3.8	REAÇÃO ERIC-PCR	26
3.9	ANÁLISE DOS DADOS	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS	28

4.2	PROVAS BIOQUÍMICAS	28
4.2.1	Coloração Gram	30
4.2.2	Catalase	30
4.2.3	Oxidação/ Fermentação da Glicose	30
4.2.4	Hidrólise da Aesculina	31
4.2.5	Liquefação da Gelatina.....	31
4.2.6	Produção de Urease.....	31
4.2.7	Produção de Ácidos de Carboidratos ou Utilização de Fontes de Carboidratos	31
4.3	REAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	32
4.4	REAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	33
4.5	VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE BOX-PCR	34
4.6	VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ERIC-PCR.....	37
5	CONCLUSÃO	38
6	REFERÊNCIAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo da doença Cancro Cítrico.	8
Figura 2- Folhas de laranja doce (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck) variedade “Pêra” com sintomas do cancro cítrico.	18
Figura 3- Colônias típicas de isolamento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> . 20	
Figura 4- Gel de agarose com a linha 1= λ 25ng, linha 2= λ 50ng, linha 3= λ 100ng, linhas 4 a 8 = isolados 49, 62, 70, 407 e 56.	32
Figura 5- Gel de agarose com a linha M= marcador com 100pb, linha C= controle negativo, linha 3 a 12= isolados 49, 413, 99, 56, 95, 410, 77, 418, 89 e 407, respectivamente.	33
Figura 6- Dendrograma dos isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , determinado por BOX-PCR.	35
Figura 7- Geis de agarose (A e B) com os isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , determinado por BOX-PCR	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Locais das coletas dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* Obsteck) de pomares de citros do Noroeste do Estado do Paraná..... 28

Tabela 2- Provas bioquímicas realizadas para identificação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* obtidos de pomares comerciais da região Noroeste do Estado do Paraná..... 29

MULATI, Janaína Ciboto. Universidade Estadual de Maringá. Outubro de 2004. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI* OBTIDAS DE CULTIVARES DE CITROS DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO PARANÁ.** Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes (Orientador). Professores Conselheiros: Profa. Dra. Maria Júlia Corazza Nunes e Prof. Dr. João Batista Vida.

RESUMO

O cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. citri* é um dos principais problemas fitossanitários incidentes em culturas de citros. Esta doença provoca lesões em quase todos os órgãos, causando destruição foliar, queda e má qualidade dos frutos, dificultando a comercialização. O controle da doença, numa primeira etapa, passa forçosamente pela identificação do seu agente causal. Com esse objetivo, o presente trabalho utilizou alguns testes bioquímicos para a identificação de 36 isolados da bactéria *X. axonopodis pv. citri* obtidas de três variedades de laranja doce, “Pêra”, “Folha Murcha” e “Valência”, coletadas em três diferentes propriedades comerciais do Noroeste do Estado do Paraná. Os isolados de bactérias foram submetidos a técnicas moleculares empregando iniciadores específicos, amplificados por PCR, para confirmação, identificação e estudos de sua variabilidade genética. Os resultados obtidos através de testes bioquímicos foram confirmados pelos iniciadores específicos para a identificação de *X. axonopodis pv. citri*. Subseqüentemente, foram empregados os iniciadores ERIC e BOX para o estudo da variabilidade do patógeno. Os testes utilizados mostraram variabilidade genética nas regiões e variedades analisadas.

Palavras-chave: cancro cítrico, bactéria, identificação, iniciadores, Box e ERIC-PCR.

MULATI, Janaína Ciboto. Universidade Estadual de Maringá. Outubro de 2004. **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* IN CITRUS CULTIVARS OF THE NORTHEAST REGION OF PARANÁ STATE, BRAZIL PARANÁ.** Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes (Orientador). Professores Conselheiros: Profa. Dra. Maria Júlia Corazza Nunes e Prof. Dr. João Batista Vida.

ABSTRACT

The citrus canker caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is one of the main phytosanitary problems in the citrus industry. This disease induces lesions in almost all plant organs, causing foliar destruction, drop and bad quality of the fruits, thus difficulting the internal commercialization of the crop and making impossible the export. The present work used a number of biochemical assays for the identification of 36 isolates of bacterium obtained from three sweet orange varieties; “Pêra”, “Folha Murcha” and “Valencia”, collected in three different commercial properties in the northeast of the Paraná state, Brazil. The bacteria isolates were submitted to molecular techniques employing specific primers submitted to amplifications by PCR, for confirmation, identification and study of its genetic variability. The results obtained by the biochemical tests were confirmed by the specific primers for the identification of *X. axonopodis* pv. *citri*. Subsequently, the primers ERIC and BOX were employed for the study of the variability of the pathogen. The utilized assays did show genetic variability in the regions and analysed varieties.

Key-words: citrus canker, bacterial, identification, primers, Box e ERIC-PCR.

1

INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas, com uma produção acima de 17 milhões de toneladas, ultrapassando 800 mil ha de área plantada até junho de 2004 (IBGE, 2004), constituindo-se, também, no maior exportador de suco cítrico concentrado. A cultura espalhou-se por todas as regiões do país, destacando-se as regiões Sudeste, Nordeste e Sul, cuja produção correspondente a 98,4% do total do país (Rodrigues Neto e Lopes, 2003).

Um dos problemas que interferem na produção de citros são as doenças bacterianas. Investigações referentes ao conhecimento destes organismos, bem como sua associação com plantas hospedeiras e o meio ambiente podem favorecer informações para a complementação de práticas culturais que visam à diminuição do impacto causado por estes patógenos na cultura de citros (Graham et al., 2004).

As fitobactérias são agressivas às culturas de citros devido a sua rápida disseminação e pela dificuldade de controle. O cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, com alta capacidade de sobrevivência, esse fitopatógeno provoca lesões em quase todos os órgãos, causando destruição foliar, má qualidade e queda dos frutos afetando posteriormente a comercialização (Leite Júnior e Mohan, 1990; Rodrigues Neto e Lopes, 2003; Graham et al., 2004).

O aumento na intensidade do cancro cítrico está relacionado com o aumento do número de lesões nas folhas, favorecendo o crescimento e a perpetuação do inóculo na planta e no pomar, servindo como fonte de disseminação do patógeno para outras plantas (Leite Júnior e Mohan, 1990).

A presença da larva minadora (*Phyllonocnistis citrella*) desencadeou uma progressão da doença, pois facilita a penetração da bactéria na planta (Bergamin Filho e Hughes, 2000; Graham et al., 2004). Outras vias de penetração desta bactéria nas plantas são por aberturas naturais via estômatos ou via ferimentos, provocados por espinhos, insetos, abrasão das folhas com o solo e areia.

A erradicação completa da doença parece ser extremamente difícil ou quase impossível (Namekata et al., 1992). O controle integrado do cancro cítrico utilizando quebra-vento e pulverizações de produtos a base de cobre, obtiveram resultados satisfatórios na redução da incidência do cancro cítrico (Leite Júnior e Mohan, 1990).

A biotecnologia promoveu maior impacto na citricultura, favorecendo novas técnicas para diagnosticar doenças (Roose, 1996). Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no estudo da diversidade de fitopatógenos. A taxonomia do gênero *Xanthomonas* apresenta bastante controvérsia, sendo freqüentemente revisada. Schaad e colaboradores (2000) realizaram propostas de reclassificação das estirpes do grupo Cancro Cítrico como uma nova espécie, *Xanthomonas citri*. No entanto, o nome científico *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, ainda é aceito na literatura mundial, sendo a doença referida como Cancro Cítrico Asiático, e no Brasil é a principal e mais severa doença do grupo Cancro Cítrico.

Neste sentido o presente trabalho objetivou:

- Analisar a variabilidade genética entre isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* através de iniciadores ERIC e BOX.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Xanthomonas*

Segundo Schaad (1988), as bactérias do gênero *Xanthomonas* são vistas no microscópio óptico como bastonetes retos, isolados, medindo 1-3.5µm, móveis por meio de flagelo polar (monotríquia). As espécies são gram-negativas, aeróbicas, não redutoras de nitratos (Graham et al., 2004). As colônias são usualmente amarelas, lisas e mucóides. Caracteristicamente produzem pigmentos amarelos, insolúveis em água, denominado xantomonadina. Essas bactérias são oxidase-negativas, catalase positivas, quimiorganotróficas e incapazes de utilizar asparagina como única fonte de carbono ou nitrogênio. Requerem fatores de crescimento, tais como metionina, ácido glutâmico, entre outros. As espécies conhecidas são fitopatogênicas (Schaad, 1988; Romeiro, 2000; Graham et al., 2004).

As bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* crescem na maioria dos meios de cultura usados em laboratório, são facilmente isoladas de tecidos cítricos infectados. As unidades formadoras de colônias das bactérias são visíveis em meio de cultura com ágar após 2-3 dias de incubação a 28°C (Rossetti et al., 1981).

A taxonomia das *Xanthomonas* apresenta bastante controvérsia, sendo freqüentemente revisada. Schaad e colaboradores (2000) realizaram propostas de reclassificação das estirpes do grupo Cancro Cítrico, resultando em novas composições de grupos ou espécies, inclusive com a proposição de novas espécies, acarretando profundas alterações na taxonomia e patovares das fitobactérias. No entanto Vauterin e colaboradores (2000) rejeitaram esta proposta porque as justificativas que embasavam esta afirmação de surgimento de uma nova espécie de *Xanthomonas axonopodis* eram insuficientes.

2.2 CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é uma doença economicamente importante em muitos países tropicais subtropicais (Hartung et al., 1996; Pruvost et al., 2000; Graham et al., 2004). O cancro cítrico teve sua origem no continente asiático coincidentemente onde se originou a cultura de citros. A disseminação da doença foi favorecida principalmente pelo transporte de mudas, atingindo outros países do mundo como o Japão, Austrália, Nova Zelândia, Ilhas do Pacífico, África, América e EUA. Em muitos países como Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil a doença ocorre endemicamente (Leite Júnior, 1990).

Cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, sinónimo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (patótipo A) (Hartung et al., 1996; Cubero e Graham, 2002), que chegou ao Brasil possivelmente pela importação de mudas cítricas proveniente da Ásia. Primeiramente foi detectada na década de cinquenta no município de Presidente Prudente, São Paulo (Bitancourt, 1957). No Estado do Paraná o cancro cítrico foi relatado inicialmente em 1957, no município de Lupionópolis, proveniente possivelmente de mudas contaminadas do Estado de São Paulo. Medidas de quarentena foram realizadas, mas não foram suficientes para deter o patógeno, que se disseminou rapidamente para a região Norte e Noroeste e posteriormente para todas as regiões do Estado (Leite Júnior, 1990).

Com o objetivo de controlar e erradicar a doença foi criada uma Campanha Nacional de Erradicação e Controle do Cancro Cítrico. O Estado de São Paulo apesar de não conseguir erradicar a doença conseguiu estabelecer seu controle. Schubert e colaboradores (2001) consideram que as bactérias *X. axonopodis* pv. *citri* são patógenos que apresentam eficiente erradicação por apresentar algumas características patogênicas como a fácil e rápida diagnose, disseminação relativamente lenta, ausência de vetores, especificidade pelo hospedeiro e a doença apresenta grande importância econômica.

A cultura de citros ainda é nova no Estado do Paraná. Atualmente a área cultivada com laranja é de aproximadamente 14.000 ha, com 6.450 produtores e produção de 332.300 toneladas de frutos (SEAB/DERAL, 2004). A economia da região Noroeste do Estado está investindo na cultura de citros. O

adensamento da cultura, por exemplo, permitiu que os produtores aumentassem a rentabilidade por área, passando de cerca de 300 plantas para até 450 plantas por hectare, dependendo do tipo de solo, porta-enxerto e da variedade empregada. A forte expansão no plantio é observada nos investimentos do setor industrial, existindo três indústrias processadoras de suco em funcionamento na região do arenito: a Paraná Citrus e a Citri, ambas em Paranavaí, e a Corol, em Rolândia. Fundada em 1994, a Paraná Citros, da Cooperativa de Cafeicultores de Maringá (Cocamar) tem capacidade para processar 6 milhões de caixas por safra e trabalha com ociosidade de 50% (Chiara, 2003).

2.3 SINTOMAS

Os sintomas manifestados pela planta são lesões em todos os órgãos, as quais são elevadas, necróticas, crateriformes, podendo ou não apresentar um halo clorótico, o que prejudica o aspecto e o valor comercial dos frutos (Graham et al., 2004, Gottwald et al., 1992a). As plantas infectadas produzem frutos menores e em menor quantidade. A doença destrói árvores de muitas espécies de citros (Gottwald et al., 1989; 2000).

As lesões nas folhas são igualmente salientes nos dois lados da superfície foliar e seu tamanho depende da susceptibilidade do hospedeiro. As lesões velhas nas folhas apresentam as partes centrais corticosa, duras e lignificadas, podendo formar rugas dispostas concentricamente (Leite Júnior, 1990). Apesar do cancro apresentar um aspecto de lesão típica de filoplano, ele origina de uma infecção sistêmica, onde a bactéria invade sistematicamente uma planta e passa a se multiplicar nos feixes vasculares, conseqüentemente a colonização se estende para o tecido parênquimatoso circunvizinho, ocorrendo profundas alterações histológicas que empurram o parênquima para fora, rachando o caule e expondo o cancro (Romeiro, 2000).

Os sintomas nos frutos assemelham-se aos observados nas folhas, porém, mais acentuados com lesões maiores, dilacerando a casca podendo

atingir a parte interna da mesma, apresenta aspecto esponjoso (Leite Júnior, 1990).

As perdas causadas dependem da severidade da doença, mas envolve basicamente desfolha com conseqüente depauperamento das plantas e queda prematura dos frutos, além da depreciação de seu valor comercial pela presença de lesões (Leite Júnior, 1990).

2.4 CICLO DA DOENÇA

Cancros presentes em ramos, folhas e frutos de árvores cítricas são as estruturas que abrigam a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, quando na ausência de tecido jovem suscetível. O agente causal pode estar no tecido do hospedeiro e também sobreviver na forma de inóculo, após a queda dos órgãos infectados, embora no solo a bactéria não consiga sobreviver por muito tempo. Em períodos chuvosos e quentes, uma massa bacteriana exsuda e é dispersa pela água das chuvas (Graham et al., 2000; 2004). O cancro cítrico é mais severo no início do verão, quando a temperatura e as chuvas propiciam o desenvolvimento da doença (Leite Júnior, 1990; Malavolta Júnior et al., 1983). Chuvas acompanhadas de ventos fortes constituem o principal agente de disseminação da bactéria em curtas distâncias (Gottwald et al., 1992b). Disseminação a longas distâncias engloba muitos agentes capazes de transportar uma bactéria, sendo o principal agente disseminador material vegetal infectado (frutos, sementes e mudas), ferramentas utilizadas em plantas contaminadas como caixas, escada para colheita, veículos e o próprio homem, que trafegam em localidades infectadas também são agentes disseminadores (Graham et al., 2000; Leite Júnior, 1990).

Após estabelecer contato com tecidos jovens, sobre condições favoráveis, os propágulos do patógeno iniciam uma série de alterações morfológicas, tornando-o capaz de interagir com hospedeiro. A entrada do patógeno na planta se dá por aberturas naturais (estômatos, hidatódios), ferimentos causados por espinhos, injúrias, abrasão provocada por partículas

de areia carregadas pelo vento (Bergamin Filho et al., 2000; Graham et al., 2000).

O aumento da epidemia do cancro cítrico esta diretamente relacionada com o aparecimento da lagarta minadora de citros (LMC), *Phyllocnistis citrella*, descrita primeiramente no Brasil em 1996 (Graham et al., 2004). A LMC provoca ferimentos nos tecidos jovens da planta em que se alimenta, promovendo aberturas facilitando a penetração dos inóculos da bactéria na planta (Canteros et al., 2000). Bergamin Filho e colaboradores (2000), analisando as vias de penetração das bactérias nas plantas constatou que a LMC não é vetora do patógeno, porem facilita sua entrada das unidades formadoras de colônia na planta, pois as bactérias encontram-se dispersas pelo “spray” das chuvas e se acomoda na superfície das folhas esperando uma oportunidade para penetrar e iniciar a colonização.

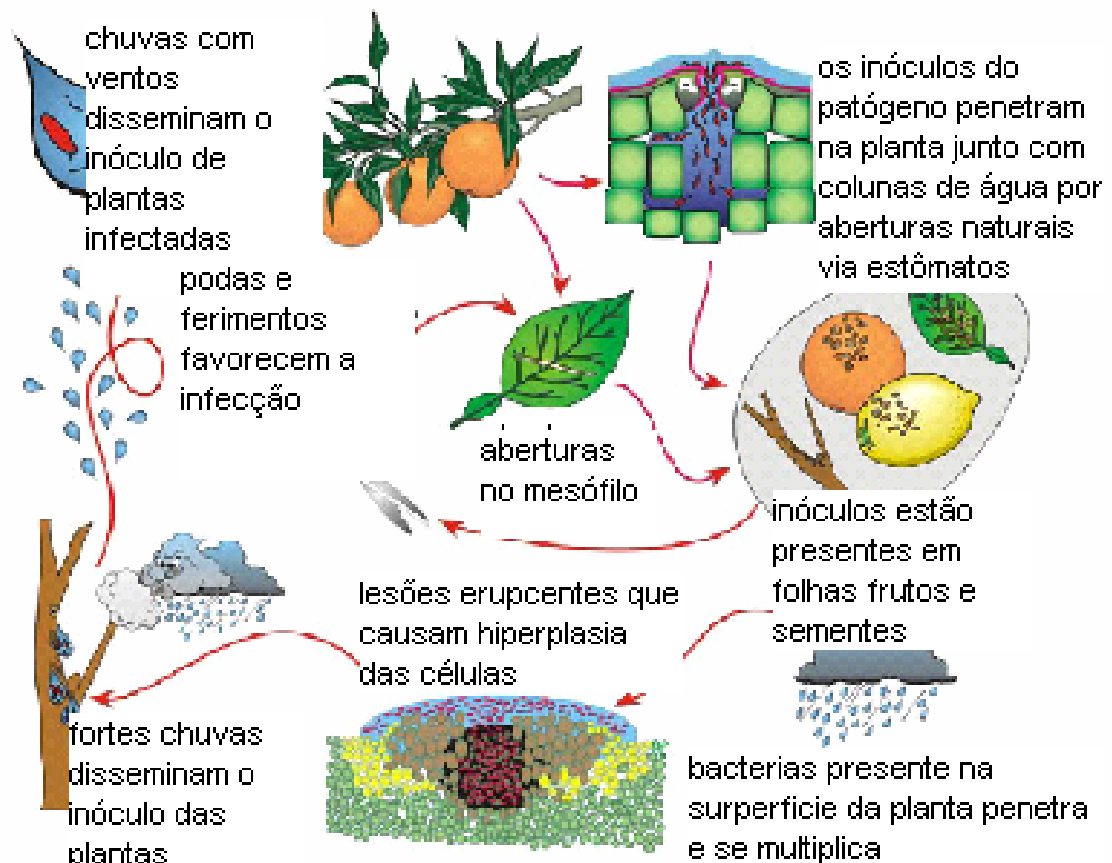


Figura 1- Ciclo da doença Cancro Cítrico
Fonte: Schubert (2001).

2.5 DISSEMINAÇÃO

O conhecimento da forma como *X. axonopodis* pv. *citri* se dissemina é importante para proceder às recomendações de controle, tratamento e prevenção de epidemias. O inóculo corresponde a células viáveis e infectivas do patógeno em quantidades suficientes para causar infecção (Romeiro, 2000), dissemina-se graças a agentes bióticos e abióticos. Os agentes bióticos correspondem ao homem, insetos, nematóides, animais. Os agentes abióticos destacam-se os fatores climáticos e meteorológicos, como chuva, vento e enxurradas (Romeiro, 2000; Leite Júnior, 1990).

Há ocorrência de situações em que as bactérias se disseminam a curtas distâncias, isto é, disseminando seu inóculo para plantas vizinhas e, desse modo, propiciando condições para que a distribuição do inóculo se faça

a longas distâncias, podendo ser de uma propriedade para outra, de uma região para outra ou de um país para outro. Gottwald e colaboradores (1992b; 1989; 2000), em seus trabalhos com epidemiologia do cancro cítrico, verificaram que novas infecções ocorriam devido à disseminação do patógeno a longas distâncias, dentro de um raio de 580m, após chuvas seguidas de ventos fortes.

Malavolta Júnior e colaboradores (1983), em seus estudos relacionados à sobrevivência da bactéria no solo, obtiveram como resultados que a bactéria permanece viável nas camadas superficiais do solo por pelo menos 10 dias. Em condições chuvosas sua recuperação é maior quando comparada com períodos secos. Outra forma de sobrevivência das bactérias *X. axonopodis* pv. *citri* é na superfície de folhas de ervas daninhas, dispersas pelas chuvas, tornando-se fontes de inóculos para outras plantas sadias (Carvalho et al., 1983; 1984).

2.6 CONTROLE

O controle de cancro cítrico, como medida curativa na eliminação da doença inexistente. Para a eliminação da doença é necessário usar métodos de erradicação do cancro, eliminando-se completamente as plantas infectadas por meio de incineração (Leite Júnior e Mohan, 1990). A eliminação da rebrota, pulverização de bactericidas nos implementos e nos materiais usados diretamente no cultivo de áreas infectadas. As áreas afetadas devem ficar sem plantio por pelo menos dois anos. Devido ao progresso da doença em diversas regiões produtoras de citros e sua reintrodução em regiões livres da doença, tem levantado dúvidas quanto à eficiência da adoção exclusiva de medidas para impedir a introdução em novas áreas e de erradicação completa da doença em regiões onde ela foi introduzida (Leite Júnior e Mohan, 1990; Namekata et al., 1992).

Para iniciar o controle de fitopatógenos algumas medidas são essenciais, entre elas: métodos de detecção de fitopatógenos, diagnóstico em

laboratório, desinfecção e práticas sanitárias, determinação da região onde se encontra a fonte de inóculo, técnicas de remoção de árvores contaminadas, cuidados no transporte e locomoção, risco nos procedimentos de avaliação (Schubert et al., 2000). Uma alternativa eficiente para o controle é a prevenção quando a doença já está estabelecida, para evitar sua posterior disseminação (Carvalho, 1986). As procedências das mudas e em quais condições estavam submetidas antes do plantio, deve ser a primeira medida preventiva. As mudas devem ser sadias e ter sido produzida em viveiros livres do cancro cítrico. As normas e padrões para produção de mudas fiscalizadas de citros determinam que somente as mudas produzidas nestas condições podem ser comercializadas (Leite Júnior, 1990; Paraná, 1989).

A detecção da presença da larva minadora, que é um importante agente agravante de doenças fitopatogênicas, está diretamente relacionada com o aumento da incidência do cancro cítrico. Este inseto ataca o hospedeiro causando lesões em suas folhas frutos e caule. Proporcionando uma das principais vias de penetração da bactéria e conseqüentemente de infecção de plantas sadias (Leite Júnior e Mohan, 1990; Graham et al., 2004).

A desinfecção de equipamentos, roupas, e carros que transitam em áreas onde existem fontes de inóculo correspondem à outra importante medida de controle do cancro cítrico. O material da colheita deve ser tratado com soluções bactericidas para evitar a disseminação da doença (Leite Júnior e Mohan, 1990).

Bergamin Filho e colaboradores (2000) mencionaram que a principal tática para controlar a doença em citros está relacionada ao ciclo da doença. Observaram que as folhas apresentam um aumento na susceptibilidade de 50% a 80% em períodos chuvosos e com ventos fortes, correspondendo a principal forma de disseminação da bactéria. As condições em que os ventos ultrapassam 8m/s favorecem a disseminação dos inóculos da bactéria (Gottwald et al., 1989, 1992). A presença da larva minadora de citros facilita a penetração da bactéria nos tecidos, principalmente das folhas, ocorrendo um escoamento de unidades formadoras de colônia de bactéria para o interior da planta. Os sintomas aparecem de 7 a 14 dias após a penetração do patógeno. Nas condições de práticas culturais como as podas, os tecidos ficam

desprotegidos e a bactéria penetra com facilidade, acarretando a colonização e os seus sintomas, que começam a se manifestar a partir de 24 horas (Bergamin Filho et al., 2000; Gottwald et al., 1989; 1992).

O método para o controle de fitopatógenos são quarentenas que correspondem a estratégias que visam impedir que os patógenos sejam introduzidos numa região ou país por meio de plantas ou órgãos vegetais infectados (Leite Júnior e Mohan, 1990).

Gottwald et al. (2000) constataram que a erradicação foi o método de controle do cancro cítrico mais eficaz utilizado nos Estados Unidos, onde há mais de trinta anos a bactéria causadora do cancro cítrico foi eliminada (Bergamin Filho et al., 2000; Schubert et al., 2000). Diversos países adotaram o método de controle a erradicação de plantas afetadas. Na Argentina e Uruguai além desta opção, foram realizadas campanhas de conscientização dos agricultores (Malavolta Júnior, 1983).

Leite Júnior (2000) desenvolveu programas de estudo do controle de cancro cítrico e constatou que o controle químico com o uso de cúpricos é uma das maneiras eficientes. Outras medidas preventivas muito eficientes no controle da doença é o uso de quebra ventos, que são árvores de grande porte que funcionam como barreira física à passagem de vento e diminuem a possibilidade de contaminação de regiões vizinhas às áreas infectadas. A combinação de práticas culturais seguras, métodos de prevenção que englobam campanhas de conscientização de produtores e o uso de variedades menos susceptível a infecção do patógeno, são estratégias que eficazmente previnem o cancro cítrico e controlam a doença no sul do Brasil (Leite Júnior e Mohan, 1990).

Schubert e colaboradores (2000) desenvolveram estudos de erradicação e controle de cancro cítrico e observaram que o processo de controle deveria ser integrado com interesses legais, logísticos, econômicos e públicos.

Canteros (2000) em pesquisas desenvolvida na Argentina e Paraguai verificou que chuvas com ventos, alta umidade, temperaturas altas, são fatores que favorecem o desenvolvimento do cancro cítrico. Por isso, foram empregadas algumas medidas de controle destes fitopatógenos, como por

exemplo, o uso de produtos químicos principalmente cúpricos, que deveriam ser aplicados em pulverizações por períodos espaçados, foram tentativas empregadas para tentar impedir o avanço da doença. Para potencializar este efeito do controle foi empregado associadamente o uso de cúpricos com mancozeb, que indicaram resultados mais eficazes e prolongados.

O controle biológico aplicado com o uso de quebra ventos, bem como o controle da larva minadora, são medidas de controle que correspondem a baixos custos quando comparados às perdas econômicas decorrentes dos períodos de quarentena, o que impossibilita novos plantios nestas áreas contaminadas (Bergamin Filho et al., 2000; Namekata et al., 1992).

No Estado do Paraná, onde a doença é endêmica, as medidas preventivas incluem pulverizações com bactericidas cúpricos para a proteção das folhagens e dos frutos novos, e o controle da lagarta minadora de citros com inseticidas ou parasitóides (Leite Júnior, 1990).

2.7 INICIADORES ERIC E BOX

Para desenvolver métodos de controle viáveis faz-se necessário o estudo de novas características do patógeno relacionadas com cultivares ou populações em diferentes etapas de desenvolvimento, através informações obtidas pela comparação de fitopatógenos (Ferreira e Gattapaglia, 1995).

Partindo do princípio do qual uma região do DNA pode ser clonada e seqüenciada, a seqüência pode ser usada para recuperar partes da região equivalente em indivíduos de uma população, para estender as análises para o estudo de diversos aspectos de variação entre indivíduos específicos de interesse e desenvolver espécies mais resistentes a doenças fitopatogênicas (Ferreira e Gattapaglia, 1995).

Cubero e colaboradores (2001) pesquisando métodos de diagnóstico de cancro cítrico por PCR, relataram que a qualidade da extração do DNA é um dos principais requisitos para o emprego da reação de PCR. A qualidade da extração é uma característica importante para o desenvolvimento de técnicas

moleculares interferindo em resultados, através da indicação de falsos-verdadeiros. A quantificação dos produtos obtidos da reação de PCR proveniente de tecidos de citros infectados com a bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* deve ser padronizada.

Usando PCR, famílias de seqüências repetitivas de DNA presente no genoma de bactérias têm sido utilizadas na caracterização e subdivisão de espécies bacterianas ao nível intraespecífico. Três famílias de seqüências têm sido estudadas mais detalhadamente: as seqüências REP relacionadas ao potencial regularório da expressão gênica, as seqüências ERIC que estão localizadas na região intergênica conservada e as seqüências BOX que estão na terminação transcrita da DNA girase.

As seqüências REP denominadas “palindrômicas repetitivas extragênicas” são seqüências de 35-40pb, possuem um número de cópias variando entre 500 a 1000pb em *Escherichia coli* (Gilson et al., 1984). Sabe-se que estas seqüências REP estão distribuídas no genoma de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* que foram primeiramente estudadas e presume-se que a presença destas seqüências repetitivas seja comum em muitos procariotos (Versalovic et al., 1991). Quando estas seqüências REP estão presentes no genoma de organismos podem influenciar na regulação do gene operon (Lupski e Weinstock, 1992). Muito dessa regulação é feita em nível da transcrição de genes por proteínas, aproveitando-se do fato de que algumas proteínas importantes podem ser controladas por alterações alostéricas e ligações covalentes reversíveis. As seqüências REP foram descritas inicialmente como seqüências com potencial regulatório dentro de regiões de operons não codificadores em virtude da sua natureza palindrômica e devido a sua habilidade de formar estruturas estáveis de “stem-loop” no RNA transcrito (Versalovic et al., 1991). Estas seqüências REP estão relacionadas com o rearranjo dos cromossomos (Gilson et al., 1984), possivelmente relacionadas à conservação primária da seqüência, conservação da estrutura palindrômica, localização e não codificação de regiões dos genes, inclusão de seqüências transcritas, distribuição no cromossomo bacteriano, presença em diferentes espécies (Lupski e Weinstock, 1992).

Outra seqüência repetitiva de DNA tem sido identificada no genoma de procariotos como *E. coli*, *S. typhimurium* e *Enterobacteriaceae* (Lupski e Weinstock, 1992). Famílias de 124-127pb denominadas “consensuais intergênicas repetitivas enterobactérias” (ERIC), (Versalovic et al., 1991; Lupski e Weinstock, 1992). Apresentam um número de cópias variando entre 30-50pb em *E. coli*. Os elementos ERIC maiores que 126pb contêm seqüência central repetitiva, invertida e altamente conservada, localizada na região intergênica (Hulton et al., 1991). Dois mecanismos podem contribuir para o alto grau de conservação evolucionária destes elementos repetitivos: a seleção natural a qual pode restringir a variação destas seqüências por representarem locais de interação entre proteínas essenciais e o DNA; autopropagação de seqüência por conservação gênica com um DNA “egoísta” (Gilson et al; 1990). A localização no cromossomo das seqüências ERIC pode apresentar variações em diferentes espécies (Lupski e Weinstock, 1992). A aplicação destas seqüências repetitivas tem sido utilizada na identificação e classificação de organismos gram-negativos pertencentes aos procariotos (Versalovic et al., 1991; Lupski e Weinstock, 1992).

Estudos baseados na distribuição de seqüências ERIC, BOX e REP voltados para a caracterização, identificação e diversidade genética de bactérias, têm se mostrado como uma ferramenta útil para muitas bactérias. El Tassa e colaboradores (1999) identificaram *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* através de ERIC e BOX-PCR.

A biotecnologia proporcionou um avanço na citricultura com o desenvolvimento de novas técnicas para diagnosticar doenças (Roose, 1996) e com o desenvolvimento da PCR, que se apresenta como uma rápida e eficaz técnica para a identificação de bactérias (Cubero et al., 2001). Os primeiros primers desenvolvidos para identificação das bactérias causadoras do cancro cítrico foram baseados na seqüência do clone do plasmídeo de DNA de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hartung et al., 1993). Lee e colaboradores (1996) desenvolveram estudos para o isolamento do gene rec-A de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. O gene rec-A presente no genoma das bactérias representa uma proteína multifuncional envolvida em muitos processos celulares, em importantes processos metabólicos e de reprodução.

A comparação das diferenças entre os aminoácidos das proteínas representantes do gene *rec-A* foi utilizada para a identificação de *X. campestris* pv. *campestris*.

Shiotani e colaboradores (2000) desenvolveram pesquisas envolvendo diferenças de agressividade em raças de *X. axonopodis* pv. *citri*, utilizando o conhecimento a respeito da seqüência REP e de iniciadores ERIC que mostrou a presença de dois grupos relacionados com a agressividade de *X. axonopodis* pv. *citri*.

Famílias de 154pb denominadas “BOX” e que possuem números de cópias semelhantes às seqüências ERIC. Estes elementos parecem estar envolvidos na ligação da DNA girase e terminação da transcrição durante a replicação (Versalovic et al., 1991).

Essas seqüências repetitivas podem ser um indicativo da estrutura e evolução do genoma bacteriano e sua amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite uma rápida avaliação da diversidade do genoma de procariontes e estudos da variabilidade genética de uma população representativa do patógeno (Versalovic et al., 1991). Esta informação, no entanto pode ser associada à distribuição geográfica do patógeno no campo e auxiliar na formação de hipóteses a respeito da distribuição geográfica do patógeno (Graham et al., 2004).

Cintas e colaboradores (2002) objetivando correlacionar o aparecimento de três novas doenças foliares em brócolis, causadas por bactérias, procurou diferenciar o patógeno através da sintomatologia induzida por caracterização fenotípica, através dos sintomas da doença na planta, testes bioquímicos e através utilização de testes moleculares empregando o iniciador BOX (BOX-PCR). Alguns trabalhos preliminares conseguiram caracterizar estas bactérias como *Pseudomonas syringae*, embora caracterizações mais específicas ficassem incompletas. Neste trabalho foram feitas comparações dentro do patógeno *P. syringae* (*P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *maniculicola*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *syringae*), pela utilização de BOX-PCR. Foi observado pouco polimorfismo dentro do patógeno *P. syringae*. Houve a confirmação do aparecimento de um novo patógeno que infecta crucífera inclusive brócolis, sendo diferente dos patógenos testados, posteriormente este

novo patógeno foi designado *P. syringae* pv. *alisalensis*. Para embasar esta afirmativa foram realizados testes fenotípicos e genéticos (BOX-PCR). Análises feitas através das técnicas de rep-PCR e principalmente BOX-PCR tem sido uma ferramenta usada para distinguir e caracterizar a nível específico facilitando a identificação de bactérias fitopatogênicas.

Gent e colaboradores (2004) estudaram uma nova doença que causou lesões necróticas em folhas de feijão em Orion (USA), através da avaliação dos sintomas da doença, de estudos do progresso da doença após inoculação em plantas sadias, e por comparações entre outros isolados da mesma raça de diferentes regiões geográficas. Com o uso de análises fenotípica (utilização de carbono como substrato, produção de ácidos graxos), e genéticas (RAPD, rep-PCR e ERIC-PCR) concluindo que se tratava de *Xanthomonas*, caracterizaram o gênero, a espécie e o patovar como *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. O estudo do DNA desses isolados revelou a existência de cinco grandes grupos genotípicos de *Xanthomonas* em Orion e um alto grau de diversidade genética comparados com os isolados de outras regiões geográficas.

Trabalhos envolvendo rep-PCR, com os iniciadores ERIC e BOX foram empregados para separar e diferenciar raças do patótipo de *Xanthomonas*, e estudo da evolução da diversidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Os subgrupos do patótipo foram identificados. Os subgrupos foram associados com a distribuição geográfica, baseado na introdução de cancro cítrico tipo A presente na Flórida (Cubero e Graham, 2002).

O uso de marcadores facilmente detectados por várias técnicas moleculares tem sido aplicado na determinação da variabilidade genética e de fatores estruturais de populações de patógenos (Jaunet e Wang, 1999). O emprego de marcadores genéticos foram empregados no estudo de populações de *Ralstonia solanacearum* raça 1, causadora de severas injúrias em culturas de tomate. Através da realização de RAPD e rep-PCR os autores constataram que estas técnicas são eficientes para revelar o polimorfismo genético em populações de *R. solanacearum*. Para tentar explicar a larga variação genotípica e agressividade relatada nestas populações, possivelmente seja em função da influência do estresse ambiental. Com base nos resultados e na associação entre variação genotípica do patógeno e a presença de uma

interação cultivar-específico, foi constatado que esses estudos de populações baseadas somente nesses marcadores empregados não é suficiente para um entendimento da diversidade genética de populações de *R. solanacearum* (Jaunet e Wang, 1999).

Rep-PCR corresponde a uma técnica que combina a simplicidade do PCR com RFLP. Empregada no monitoramento da disseminação deste patógeno, na diferenciação de isolados patogênicos e isolados não patogênicos. Esta técnica também foi amplamente utilizada para estudo de genética de população de *Magnaporthe grisea*, responsável por causar danos em culturas de arroz. As observações foram desenvolvidas pelas análises de polimorfismo, detectados por (*Pot2*) um par de iniciadores específicos (George et al., 1998).

3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As amostras foram coletadas em pomares comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis* Obsteck), das variedades Pêra, Folha Murcha e Valência, localizados em propriedades nos municípios de Nova Esperança, Santa Isabel do Ivaí e Floraí. Em cada pomar, folhas com sintomas de cancro cítrico foram coletadas de quatro árvores de cada variedade em nessas propriedades, totalizando trinta e seis amostras. Posteriormente, foram armazenadas individualmente em saco plásticos, devidamente identificados e levados ao laboratório para posterior isolamento da bactéria.



Figura 2- Folhas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) variedade "Pêra" com sintomas do cancro cítrico.

3.2 ISOLAMENTO

As folhas, com lesões típicas de cancro cítrico (Figura 2) foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 1% e lavadas em água destilada, em seguida as áreas lesionadas foram recortadas entre as regiões intermediárias do tecido sadio e do tecido infectado da folha. As amostras de tecido infectado foram transferidas para um grau no qual se acrescentou 1ml de solução salina (137mM de NaCl, 76mM de Na₂HPO₄, 25mM de NaH₂PO₄.H₂O). Com um pistilo foi feita a maceração do material. Em seguida foi realizada a diluição em série, 10⁻¹ a 10⁻⁵ unidades formadoras de colônias. Embora, foram utilizadas as diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ unidades formadoras de colônias para a repicagem. O meio de cultura utilizado foi o Nutriente Agar (NA), (5g peptona, 3g extrato de carne, 1g NaCl, 15g agar, 1.000ml H₂O), autoclavado a 120°C, por 30 minutos, e transferido assepticamente para placas de Petri devidamente esterilizadas. Após a solidificação do meio de cultura foi feita a transferência com o auxílio de uma alça bacteriológica a suspensão bacteriana das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵, com 2 repetições cada. As placas foram invertidas e incubadas à 28°C. As colônias bacterianas começaram a crescer após 24-48 horas da semeadura. Após o isolamento as colônias selecionadas foram repicadas para outras placas objetivando a purificação das colônias, este processo foi repetido por mais uma vez (Figura 3). As amostras foram transferidas para tubos de ensaio, servindo de estoque e foram armazenadas em refrigeração.

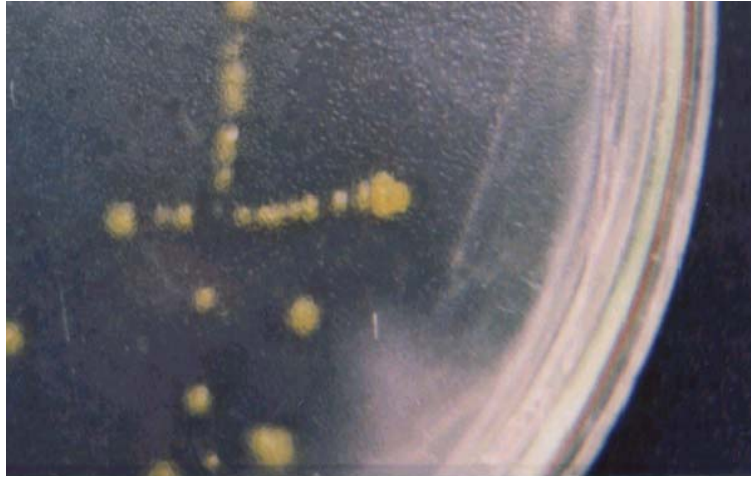


Figura 3- Colônias típicas de isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

3.3 PROVAS BIOQUÍMICAS

3.3.1 Coloração de Gram

A coloração diferencial de Gram objetivou a diferenciação das bactérias Gram negativas das Gram positivas. Baseados na diferença da espessura da parede que envolve a bactéria podemos diferenciá-las. A coloração de Gram foi feita com todos os isolados através da colocação de uma gota de suspensão bacteriana sobre uma lâmina de vidro e realizado um esfregaço sobre a superfície e fixado com ar quente. Realizando três repetições para cada isolado. Colocou-se a solução de cristal de violeta por um minuto. Lavou-se a lâmina cuidadosamente com água; adicionou-se a solução de lugol por um minuto e lavou-se a lâmina com água. A safranina foi adicionada e mantida por 30 segundos e lavou-se com água. Finalmente foram observadas em microscópio óptico, onde a coloração vermelha indica bactérias gram negativas e coloração violeta indica gram positiva (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.3.2 Catalase

O meio de cultura foi preparado acrescentando 3g de extrato de carne, 5g de peptona, 15g de agar, 1000ml de água destilada. Após a homogeneização do meio de cultura, transferiu-se 5ml do meio de cultura para tubos de ensaio, que foram autoclavados, e solidificados de forma inclinada. A suspensão bacteriana de cada isolado foram semeados em 10 tubos de ensaio, incubados a 28°C, por dois dias. Adicionaram-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada), sobre a cultura bacteriana desenvolvida em meio de cultura nos tubos de ensaio. A formação de bolhas de gás indica que a reação foi positiva (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.3.3 Oxidação/Fermentação da Glicose

O método de oxidação foi empregado para diferenciar os organismos com metabolismo oxidativo da fermentação de carboidratos. Utilizou-se o meio de cultura constituído de 2g de peptona, 5g de NaCl, 0,3g de K₂HPO₄, 0,03g de azul de bromotimol, 3g de ágar, 1000ml de água destilada. Acrescentou-se 5ml do meio de cultura nos tubos de ensaio e foi realizado a autoclavagem, após esta etapa, com uma temperatura de 45°C, adicionou-se assepticamente em cada tubo de ensaio, 0,5ml de solução de glicose a 10%, os tubos foram deixados na posição horizontal para a solidificação. Com uma alça bacteriológica foi realizada a semeadura da suspensão bacteriana de cada isolado, através do método da picada, em dez tubos. Em seguida, adicionou-se 3ml de óleo mineral nos tubos de ensaio e incubou-se a 28°C, por um período de dois dias. A mudança de coloração do meio de cultura para a coloração amarelada indica a produção de ácido. Os organismos fermentativos produzem ácidos nos tubos com e sem óleo mineral (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.3.4 Hidrólise de Aesculina

Este teste serve para diferenciar os organismos que produzem fluorescência dos que não produzem fluorescência. Foi preparado um meio de cultura composto de: 10g de peptona, 1g de aesculina, 0,5g de citrato férrico, 15g de agar, e 1000ml de água destilada. Transferiu-se 5ml do meio de cultura para tubos de ensaio, que foram autoclavados, e colocamos na posição inclinada para a solidificação. Em seguida, a suspensão bacteriana de cada isolado foram semeadas em dez tubos de ensaio e incubada a 28°C, pelo período de 3 dias. O desaparecimento da fluorescência do meio de cultura, quando observado sob luz ultravioleta, indica reação positiva (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.3.5 Liquefação de Gelatina

O meio de cultura liquefeito indica reação positiva, caracterizado pela produção de enzimas gelatinase, pelas bactérias. O meio de cultura foi preparado adicionando 3g de extrato de levedura, 5g de peptona, 120g de gelatina em 1.000ml de água destilada e ajustou-se a solução para o pH 7. Transferiu-se 5ml do meio de cultura para dez tubos de ensaio, que foram autoclavados, e foram colocados em geladeira para solidificação. Com uma alça realizou-se a repicagem da bactéria através de picada, na superfície do meio de cultura. Os tubos dez tubos contendo os isolados foram incubados a 28°C, durante 7 dias (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.3.6 Produção de Urease

Foi preparado o meio de cultura YS com 0,5g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5g de K_2HPO_4 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,016g de vermelho de cresol, 5g de NaCl, 1g

de extrato de levedura e 900ml de água destilada. Foi colocado em tubos de ensaio e foi autoclavado. A seguir foi preparada uma solução com 10% de uréia e esterilizada por filtração. Após a esterilização do meio de cultura, foi adicionada, assepticamente, 1ml da solução de uréia esterilizada. Cada isolado da bactéria foi repicado em dez tubos de ensaio contendo o meio de cultura, e a seguir incubados a 28°C durante 5 dias. O aumento de pH faz com que o meio de cultura contendo uréia fique de vermelho intenso a arroxeado indicando a atividade da enzima urease (reação positiva) (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.3.7 Produção de Ácidos de Carboidratos ou Utilização de Fontes de Carboidratos

Foi utilizado o meio basal, pH 6,8-7,0 constituído de: 0,5g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5g de K_2HPO_4 , 0,2g de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g de NaCl, 1g de extrato de levedura, 12g de agar, 7ml de solução de bromocresol púrpura e 980ml de água destilada q.s.p. Uma alíquota de 4ml do meio de cultura para tubos de ensaio para realização da autoclavagem. Foram preparadas três soluções aquosas de arabinose, glicose e manose a 2,5% e foram esterilizadas por filtração. Após a autoclavagem do meio de cultura foi transferido assepticamente a uma temperatura 45-50°C 1ml da solução de arabinose para dez tubos de ensaio e agitando-os lentamente. Essa etapa foi utilizada para as diferentes soluções aquosas contendo manose e glicose. Os tubos foram inclinados para solidificação do meio de cultura, os isolados das bactérias foram repicados em dez tubos cada e incubadas a 28°C (Schaad, 1988; Maringoni, 1995).

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Com o auxílio de um palito de madeira retirou-se da placa de Petri colônias bacterianas, transferindo-as para um microtubo, onde foi acrescentado 567µl de TE. Foi adicionado 30µl de SDS 1% e 3µl de proteinase K 20mg/ml. Foi realizada a homogeneização e foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Em seguida foi adicionada 100µl de NaCl 5M e as amostras foram agitadas. Foi adicionado 80µl de CTAB 10% em seguir as amostras foram agitadas e incubadas a 65°C durante 10 minutos. Foi acrescentado 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, respectivamente), a agitação foi feita num vortex por 40 segundos, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante um período de 5 minutos. Cuidadosamente foi removida a fase superior das amostras presentes nos microtubos para outro microtubo estéril, posteriormente foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, respectivamente). Vigorosamente as amostras foram agitadas e centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos. Este processo foi repetido várias vezes até a obtenção de uma interfase clara. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e em seguida foram adicionados 2 volumes de etanol 100%. As amostras foram delicadamente homogenizadas e acondicionadas a -20°C durante um período de 2 horas. Em seguida as amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 rpm. durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pelete” de DNA precipitado foram lavados com 600µl de etanol 70%, novamente as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm durante 5 minutos. Este processo de lavagem do “pelete” de DNA foi repetido utilizando 300µl de etanol 100% e centrifugado a 12.000rpm durante 5 minutos. A secagem das amostras contendo os “peletes” de DNA foi realizada invertendo os microtubos em papel toalha por 15 minutos. Finalmente as amostras foram redissolvidas em 50µl de 1/10 de T.E. RNase.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a quantificação do DNA foi utilizado um gel de agarose a 0,8% em solução de TAE 1X (0,04 M tris-acetado, 1mM EDTA). Corado com brometo de etídio (0,5 ng/ml). A quantidade do DNA foi avaliada com base na presença ou ausência da intensidade do arrasto no gel, após a corrida eletroforética, em gel de agarose, através da comparação com DNA de Lambda nas concentrações de 25ng, 50ng e 100ng. A corrida eletroforética se deu sob tampão TAE a 90% durante 1 hora.

3.6 AMPLIFICAÇÃO VIA PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE XAC

O DNA obtido na extração foi padronizado a concentração de 10ng de DNA/ μ l. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 μ l. O mix foi composto de água, tampão T10X (200mM tris HCl pH 8,4; 500mM KCl), 1,54mM MgCl, 0,2mM de dNTPs, de 15ng dos iniciadores wap-a e rec-j, 1,5 unidades de Taq polimerase, 50ng de DNA da amostra. Os primers wap-a e rec-j foram cedidos pelo Dr. Helvécio Della Coletta Filho, pesquisador do Centro Apta Citros Sylvio Moreira.

As amplificações das amostras foram programadas para 36 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 52°C, 2 minutos a 72°C e 10 minutos de extensão a 72°C em termociclador Eppendorf. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, utilizando gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio a 5 μ g/ml. A corrida foi realizada a 90V por um período de 3 horas, em tampão TAE 1X. Foram aplicados na canaleta 5 μ l da amostra mais 2 μ l do tampão de carregamento. Como padrão foi utilizado ladder 1kb. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta e captada em aparelho de fotodocumentação GDS 8000 System, UVP Bioimagem systems.

3.7 REAÇÃO BOX-PCR

A reação foi preparada para um volume final de 25µl contendo tampão T10 X (200 mM tris HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1,54 mM MgCl, 0,2mM de dNTPs, de 90 ng do primer BOX-A1R (CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G), 1,5 unidades de Taq polimerase, 50ng de DNA da amostra. A reação de cadeia da polimerase baseou-se na repetição de três etapas: desnaturação 95°C por 7 minutos, anelamento 52°C por 1 minuto, extensão 65°C por 8 minutos. Este ciclo foi repetido 36 vezes, acrescidos de 15 minutos a 65°C para a extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, utilizando gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio, 5µgµl. A corrida foi realizada a 80V por um período de 3 horas, em tampão TAE 1X. Foram aplicados na canaleta do gel 10µl da amostra mais 2µl do tampão de carregamento, juntamente como o marcador de peso molecular Ladder 1kb (invitrogen, DNA ladder 1mg/ml). A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta. Capturado no aparelho de fotodocumentação GDS 8000 System, UVP Bioluminescence systems.

3.8 REAÇÃO ERIC-PCR

A reação foi preparada para um volume final de 25µl contendo tampão T10 X (200 mM tris HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1,54mM MgCl, 0,2mM de dNTPs, de 120ng do primer ERIC-1 (CAC TTA GGG GTC GAA TGT A), 120ng do primer ERIC-2 (AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G), 1,5 unidades de Taq polimerase, 50ng de DNA da amostra. As amostras foram colocadas em um termociclador, Eppendorf. Programada para as seguintes condições: desnaturação 94°C por 7 minutos, anelamento 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 8 minutos. Este ciclo foi repetido 36 vezes, acrescidos 15 minutos a 72°C para a extensão final. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, utilizando gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio, 5µg/ml. A corrida foi realizada a 80V por um período de 3 horas, em tampão

TAE 1X. Foram aplicados na canaleta do gel 10µl da amostra mais 2µl do tampão de carregamento, como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular Ladder 1kb. A visualização da amplificação foi realizada sob luz ultravioleta. Capturado no aparelho de fotodocumentação GDS 8000 System, UVP Bioluminescence systems.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os fragmentos de DNA de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* representados nos géis de agarose foram avaliados como presentes (1) ou ausentes (0) para produzir uma matriz de dados binários. O coeficiente de Jaccard foi calculado para avaliar a similaridade genética e UPGMA (unweighted pair – group method with arithmetic averages) que foi empregado para agrupar os isolados.

4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram provenientes do isolamento de trinta e seis amostras de áreas plantadas com três variedades comerciais de citros: Pêra, Valência e Folha Murcha, de três regiões geográficas localizadas no noroeste do Estado do Paraná. Conforme Tabela 1. Os isolados foram armazenados, sob refrigeração, em tubos de ensaio com o meio de cultura ágar-nutriente.

Tabela 1- Locais das coletas dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* Obsteck) de pomares de citros do Noroeste do Estado do Paraná.

Local	Variedade	Nº dos isolados
Nova Esperança	Folha Murcha	02, 11, 17 e 22
	Valência	48, 49, 55 e 59
	Pêra	56, 62, 65 e 68
Floraí	Folha Murcha	97, 195, 262 e 378
	Valência	43, 57, 67 e 99
	Pêra	95, 410, 413 e 418
Loanda	Folha Murcha	70, 73, 74 e 77
	Valência	80, 82, 89 e 91
	Pêra	93, 95, 96 e 407

4.2 PROVAS BIOQUÍMICAS

A utilização de métodos tradicionais para a identificação de fitopatógenos, tornou-se um método simples e muito empregado. Neste sentido, o uso de provas bioquímicas foi empregado no presente trabalho para

identificação de bactérias fitopatogênicas e posterior confirmação de representantes do grupo das *X. axonopodis* pv. *citri*. Como podemos verificar pelos resultados obtidos na consulta da Tabela 2.

Tabela 2- Provas bioquímicas realizadas para identificação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* obtidos de pomares comerciais da região Noroeste do Estado do Paraná.

Isolados	Provas Bioquímicas								
	Gram	Catalase	Oxidação	Hidrólise Aesculina	Liquefação Gelatina	Urease	Arabinose	Glicose	Manose
02	-	+	+	+	-	-	-	+	-
11	-	+	+	+	-	-	-	+	-
17	-	+	+	+	-	-	-	+	-
22	-	+	+	+	-	-	-	+	-
43	-	+	+	+	-	-	-	+	-
48	-	+	+	+	-	-	-	+	-
49	-	+	+	+	-	-	-	+	-
55	-	+	+	+	-	-	-	+	-
56	-	+	+	+	-	-	-	+	-
57	-	+	+	+	-	-	-	+	-
59	-	+	+	+	-	-	-	+	-
62	-	+	+	+	-	-	-	+	-
65	-	+	+	+	-	-	-	+	-
67	-	+	+	+	-	-	-	+	-
68	-	+	+	+	-	-	-	+	-
70	-	+	+	+	-	-	-	+	-
73	-	+	+	+	-	-	-	+	-
74	-	+	+	+	-	-	-	+	-
77	-	+	+	+	-	-	-	+	-
80	-	+	+	+	-	-	-	+	-
82	-	+	+	+	-	-	-	+	-
89	-	+	+	+	-	-	-	+	-
91	-	+	+	+	-	-	-	+	-
93	-	+	+	+	-	-	-	+	-
95	-	+	+	+	-	-	-	+	-
95	-	+	+	+	-	-	-	+	-
96	-	+	+	+	-	-	-	+	-
97	-	+	+	+	-	-	-	+	-
99	-	+	+	+	-	-	-	+	-
195	-	+	+	+	-	-	-	+	-
262	-	+	+	+	-	-	-	+	-
378	-	+	+	+	-	-	-	+	-
407	-	+	+	+	-	-	-	+	-
410	-	+	+	+	-	-	-	+	-
413	-	+	+	+	-	-	-	+	-
418	-	+	+	+	-	-	-	+	-

4.2.1 Coloração Gram

A avaliação deste teste foi feita pela observação ao microscópio óptico das células bacterianas apresentando todos isolados a coloração vermelha, tratando-se de células bacterianas gram negativas.

Os resultados das provas bioquímicas observados na Tabela 2 confirmam a ocorrência de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* nos isolados submetidos aos mesmos testes.

4.2.2 Catalase

A formação de bolhas de gás observada após a adição de peróxido de hidrogênio a 3% nos tubos de ensaio contendo as suspensões bacterianas, indicaram que as reações foram positivas (Tabela 2).

4.2.3 Oxidação/ Fermentação da Glicose

Através da visualização deste teste foi notada a mudança de coloração do meio de cultura para amarelo. Os organismos fermentativos produzem ácidos a partir da glicose. Para todos os isolados a reação foi considerada positiva, portanto havendo a mudança de coloração do meio de cultura, para amarelo, indicando a produção de ácidos pelos organismos fermentativos (Tabela 2).

4.2.4 Hidrólise da Aesculina

A avaliação das amostras contendo as suspensões bacterianas submetidas a este teste, observadas sob luz ultravioleta, foi caracterizada pelo desaparecimento da fluorescência do meio de cultura, indicando a reação como positiva (Tabela 2).

4.2.5 Liquefação da Gelatina

A reação das amostras neste teste foi considerada negativa, uma vez que as bactérias não produziram a enzima gelatinase, que torna o meio liquefeito (Tabela 2).

4.2.6 Produção de Urease

Neste teste a reação foi considerada negativa, considerando-se que não houve atividade da enzima urease, pois não se observou o aumento do pH, que muda a coloração do meio de cultura, contendo uréia, para vermelho intenso a arroxeado (Tabela 2).

4.2.7 Produção de Ácidos de Carboidratos ou Utilização de Fontes de Carboidratos

As amostras neste teste foram consideradas positivas pela presença da coloração amarela no meio de cultura, indicando a formação do ácido a partir da fonte de carboidrato adicionada. Quando foi adicionado arabinose, como fonte de carboidrato ao meio de cultura contendo a suspensão

bacteriana, não foi observado a coloração amarelada, indicando a reação negativa. Isto é devido a não formação de ácidos pelas bactérias, a partir da arabinose.

A adição de glicose como fonte de carboidrato ao meio de cultura, tornou o meio de cultura amarelo, indicando a reação positiva portanto havendo a produção de ácidos pelas bactérias.

A adição de manose como fonte de carboidrato ao meio de cultura não mudou sua coloração para amarelo, indicando a reação negativa, conseqüentemente não havendo a formação de ácidos pelas bactérias (Tabela 2).

4.3 REAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Na Figura 4, abaixo é visto o resultado da extração do DNA de alguns isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*.

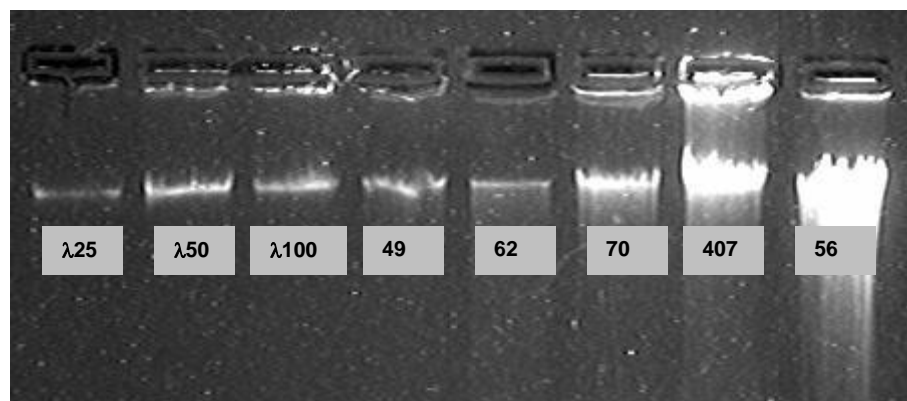


Figura 4- Gel de agarose com a linha 1= λ 25ng, linha 2= λ 50ng, linha 3= λ 100ng, linhas 4 a 8 = isolados 49, 62, 70, 407 e 56, respectivamente.

4.4 REAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

O Dr. Helvécio Della-Colleta Filho, pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, desenvolveu um par de iniciadores (“primers”) com a finalidade de identificação de *X. axonopodis* pv. *citri* (patótipo A) sendo que a seqüência dos mesmos encontra-se submetida à publicação. As identificações dos isolados obtidos foram conduzidas por PCR com a utilização desses “primers” objetivando a confirmação dos resultados obtidos na realização das provas bioquímicas. Em todos os 36 isolados visualizou-se uma banda de aproximadamente 506pb em gel de agarose, sugerindo tratar-se de *X. axonopodis* pv. *citri*.

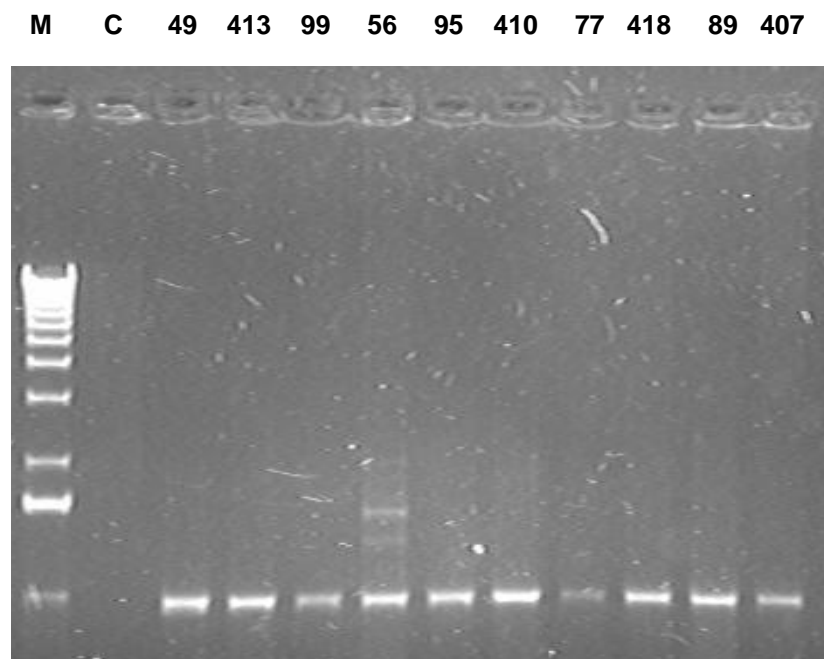


Figura 5- Gel de agarose com a linha M= marcador com 1kb, linha 2= controle negativo, linha 3 a 12= isolados 49, 413, 99, 56, 95, 410, 77, 418, 89 e 407, respectivamente.

4.5 VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE BOX-PCR

A variabilidade genética de *X. axonopodis* pv. *citri*, utilizando-se os iniciadores BOX-PCR, foi baseada nos resultados das análises obtidas pela visualização de bandas em gel de agarose.

O dendrograma construído com base nos iniciadores BOX aplicados aos isolados deste estudo, demonstrou um coeficiente de similaridade superior a 69%.

No subgrupo 1, os isolados 49 e 62, provenientes de Nova Esperança, o isolado 70 provenientes de Loanda e o isolado 407, proveniente de Florái.

Os isolados 43, 195 e 378, originados de amostras provenientes da localidade de Florái, com os isolados 56 e 65, oriundos de Nova Esperança e o isolado 95, proveniente de Loanda formaram o subgrupo 2.

O subgrupo 3, foi constituído pelos isolados 2, 11 e 48, originados de amostras de Nova Esperança, os isolados 74 e 93, provenientes de Loanda e o isolado 97, oriundo de Florái.

Os isolados 17, 22, 55 e 59, oriundos de Nova Esperança, com os isolados 73, 80, 82 e 91, provenientes de Loanda, mais os isolados 57 e 67, oriundos de Florái formaram o subgrupo 4.

O subgrupo 5, foi constituído pelos isolados 95, 410 e 418, provenientes de Florái e o isolado 89 proveniente de Loanda.

Os isolados 99, 262 e 413, provenientes de Florái com o isolado 77 de Loanda formaram o subgrupo 6.

Foi observado um predomínio na composição dos subgrupos 1 e 5 de isolados obtidos de amostras da variedade Pêra, independentemente do local de coleta das mesmas.

Nos subgrupos 3 e 6 foi observado um predomínio dos isolados obtidos da variedade Folha Murcha.

O subgrupo 4 apresentou maior número de isolados provenientes de amostras da variedade Valência.

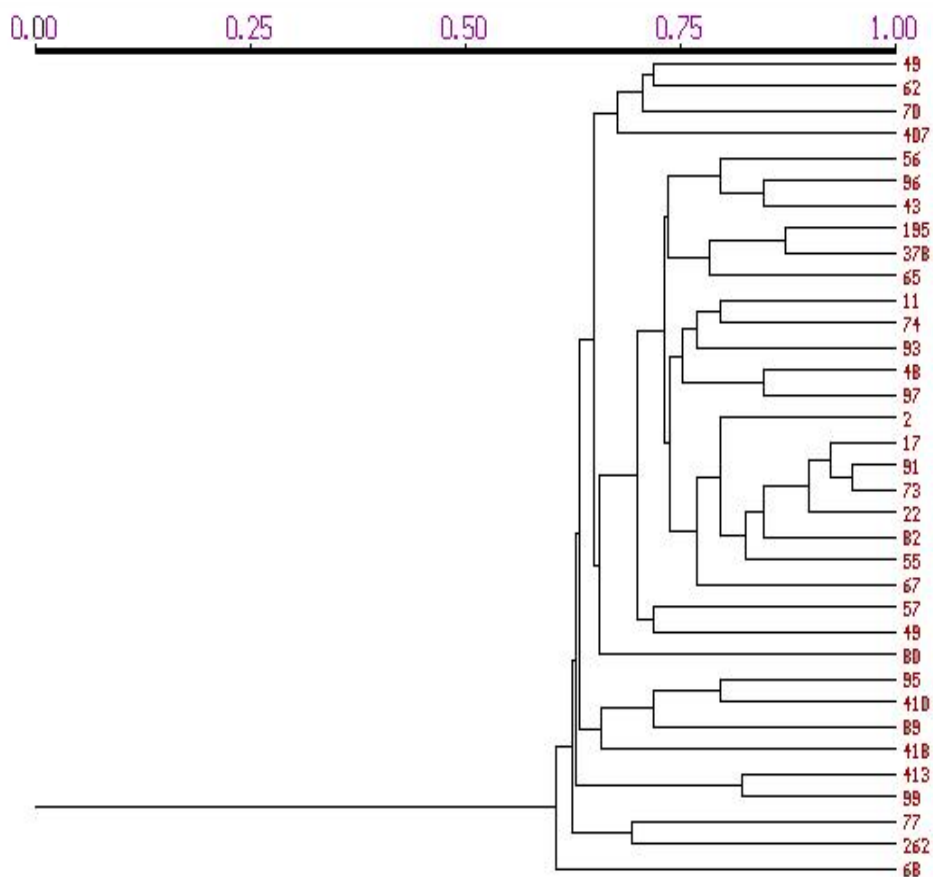


Figura 6- Dendrograma dos isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*, determinado por BOX-PCR.

Foi possível observar que os isolados 91 e 73 ambos provenientes do município de Loanda, com variedades diferentes de laranja doce, apresentaram um índice de similaridade de 94,9%. Comparados com os isolados 195 e 378 que pertencem à região de Floráí, oriundos da mesma variedade Folha Murcha, apresentaram um índice de similaridade 87,2%. O isolado 68 ficou separado dos demais isolados, portanto podemos concluir que este difere dos demais isolados.

Segundo Roose (1996) a identificação correta de patógenos e a possível utilização na formação de coleções que poderão servir como bancos de germoplasmas para o estudo da diversidade genética, bem como para o entendimento da origem e evolução destes patógenos.

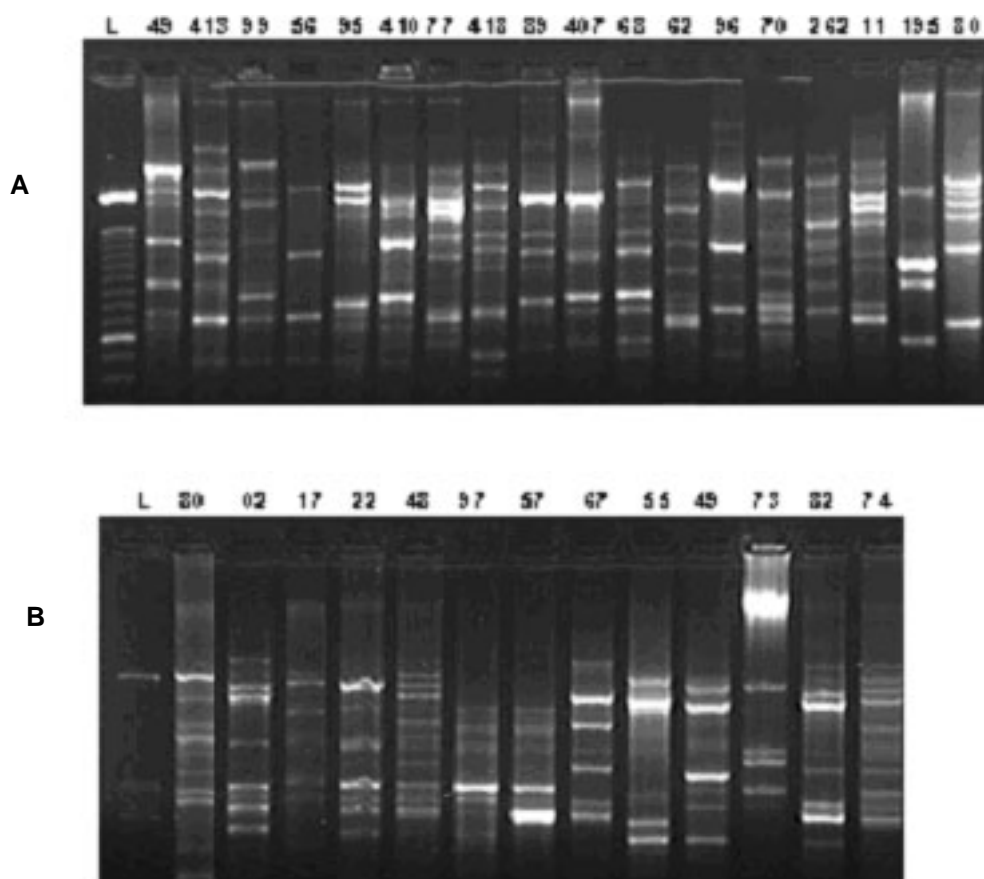


Figura 7- Geis de agarose (A e B) com os isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*, determinado por BOX-PCR

Os resultados obtidos neste experimento indicam a existência de variabilidade genética entre os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Kim e colaboradores (2001), encontraram variabilidade genética em isolados de *Bacillus anthracis* usando iniciadores BOX e ERIC. Da mesma forma, Cubero e Graham (2002), conseguiram identificar a formação de subgrupos relacionados com a distribuição geográfica de *X. axonopodis* pv. *citri*, no Estado da Florida, EUA. George e colaboradores (1997) agruparam em três grupos, baseados na distribuição de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* no sudoeste da Ásia.

Zavaglia e colaboradores (2000) trabalhando com a caracterização de raças de *Bifidobacteria* através do uso de iniciadores BOX obtiveram como resultado a formação de dois grupos e vários subgrupos. Sugeriram a partir destes resultados alterações na taxonomia de *Bifidobacterium*. Estes

pesquisadores destacam as vantagens de se trabalhar com metodologias empregando análises de genoma baseados na reação de PCR, e somente um iniciador (primer) é necessário para se obter resultados específicos e satisfatórios das espécies submetidas a estas análises.

Alvarez (2004) afirmou em seus estudos de detecção e diagnóstico de doenças bacteriológicas que, embora os métodos baseados no estudo do DNA não se deve substituí-los por testes tradicionais. Coincidindo com o trabalho desenvolvido nesta dissertação, onde se iniciou com o uso dos testes bioquímicos para identificação de *X. axonopodis* pv. *citri*, confirmado-se pelo uso de iniciadores específicos desenvolvidos com base no DNA do genoma bacteriano dessa espécie.

Muitas espécies de bactérias apresentam uma complexa divisão em subpopulações e outras apresentam dificuldade na formação destas subpopulações ou, ainda, dificuldade na identificação destas variabilidades (Alvarez, 2004). Baseados nesta afirmação e levando em consideração que o uso de iniciadores específicos apresenta 95% de concordância com outros testes na identificação de bactérias, mas PCR talvez possa identificar como sendo positivas amostras negativas. Neste sentido algumas interferências devem ser consideradas como possibilidades de ocorrência no presente trabalho, o que dificultou as análises dos dados obtidos.

Cubero e Graham (2002) desenvolveram iniciadores (primer) para identificar *X. axonopodis* pv. *citri*, patótipo A. Estes iniciadores foram baseados em diferentes seqüências das regiões ITS e no gene *pthA*. O uso de rep-PCR com os iniciadores ERIC e BOX foi usado para identificar a origem geográfica de raças do patógeno incidente na Flórida.

4.6 VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE ERIC-PCR

A variabilidade genética de *X. axonopodis* pv. *citri*, pela utilização do iniciador ERIC-PCR nas condições analisadas não apresentaram resultados satisfatórios, por isso este motivo não foram descritos neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

- As provas bioquímicas utilizadas foram eficientes na identificação de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

- Houve uma alta correlação entre os resultados obtidos através das provas bioquímicas e com os resultados obtidos através dos iniciadores específicos para identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* patótipo A.

- Os iniciadores BOX-PCR mostraram a existência de variabilidade genética entre os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

- Foi possível visualizar correlação entre os grupos de isolados definidos pelos marcadores moleculares com a origem geográfica e com a variedade do hospedeiro de onde foram obtidos esses isolados.

6

REFERÊNCIAS

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.; GOTTSWORLD, T. R. Epidemiology of Citrus Canker in Brazil with and without Asian Citrus Leaf Miner. **International Citrus Canker Research Workshop**. p.6; 2000, FT. Pierce, Florida.

BERGAMIN FILHO, A.; HUGHES, G. Citrus Canker Epidemiology-Methodologies and Approaches: a Moderad Discussion Session. **International Citrus Canker Research Workshop**. p.24-25; 2000, FT. Pierce, Florida.

BITANCOURT, A. A. Cancro cítrico. **Biológico**. (São Paulo) v.23, n.6, p.101-111, 1957.

CANTEROS, N. I. Citrus canker in Argentina control, eradication, and management. **International Citrus Canker Research Workshop**. p.10; 2000, FT. Pierce, Florida.

CARVALHO, M. L. V. Medidas de prevenção contra o cancro cítrico. **Laranja**, v.7, p.125-130, 1986.

CARVALHO, M. L. V.; MALAVOLTA JÚNIOR, A. A.; PALAZZO, D. A.; ROSSETTI, V. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hase). Dye in soil and in non host plants. **Proc. Int. Soc. Citric.**, v.1, p.368-369, 1984.

CARVALHO, M. L. V.; MALAVOLTA JÚNIOR, A. A.; NOGUEIRA, E. M. C.; PALAZZO, D. A. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hase) em ervas daninhas. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.641, 1983.

CHIARA, Márcia; A laranja é o novo 'ouro verde' no noroeste do Paraná. **O Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.agr.feis.unesp.br/estadao27072003b.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2003. p.B12

CINTAS, N. A.; KOIKE, S. T.; BULL, C. T. A New Pathovar, *Pseudomonas syringae* pv *alisalensis* pv nov., Proposed for the Causal Agent of Bacterial Blight of Broccoli and Broccoli Raab. **Plant Disease**. v.86, n.9, p.992-998, 2002.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. Genetic relationship among worldwide strain of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and desing of new primers for their identification by PCR. **Appl. Environ. Microbiology**. v.68, n.3, p.1257-1264, 2002.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. **App. Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2849-2852, 2001.

EL TASSA, S. O. M.; MORAES, M. G.; DUARTE, V. Identificação de *Pseudomonas syringae* pv *coronafaciens* através de ERIC e BOX-PCR. **Fitopatologia Brasileira**. n.24, p.503-508, 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEN**, Brasília, DF, p.220, 1995.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H.F.; ISHIMARU, C. A.; LOUWS, F. J. Polyphasic characterization of *Xanthomonas* strains from Orion. **Phytopathology**. v.94, n.2, p.184-194, 2004.

GEORGE, M. L. C.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S.; LEUNG, H. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. **Phytopathology**. v.88, n.3, p.223-232, 1998.

GEORGE, M. L. C.; BUSTAMAM, M.; CRUZ, W. T.; LEACH, J. E.; NELSON, R. J. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. **Phytopathology**. v.87, n.3, p.302-309, 1997.

GILSON, E.; CLEMENTE, J. M.; BRUTLAG, d.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences en *E. coli*. **EMBO Journal**, v.3, p.1417-1421, 1984.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. D. Polimerase I and a protein complex bend specifically to *E. coli* polindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial cromossome organization. **Nucleic Acids Reserch**. v.18, p.3841-3952, 1990.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; RICHIE, S. M. Relationship of leaf surface population of strain of *Xanthomonas campestris* pv *citrumelo* to development of citrus bacterial spot and persistence of disease symptoms. **Phytopatology**. v.82, n.6, p.625-632, 1992a.

GOTTWALD, T. R.; REYNOLDS, K. M.; CAMPBELL, C. L.; TIMMER, L. W. Spatial and spatiotemporal autocorrelation analisis of canker epidemics in citrus nurseries and groves in Argentina. **Phytopatology**. v.82, n.8, p.843-851, 1992b.

GOTTWALD, T. R.; SUN. X.; RILEY, T. D.; GRAHAM, J.; HUGHES, G. Estimating spread of citrus canker in urban Miami via differential GPS. **International Citrus Canker Research Workshop**. p.4; 2000, FT. Pierce, Florida.

GOTTWALD, T. R.; TIMMER, L. W. ; McGUIRE, R. G. Analysis of disease progress of citrus in nurseries in Argentina. **Phytopatology**. v.79, n.11, p.1276-1283, 1989.

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

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RIRLEY, T. R.; CUBERO, J.; DROUILLARD, D. L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on Various Surfaces and Chemical Control of Asiatic Citrus Canker (ASC). **International Citrus Canker Research Workshop**. p.7; 2000, FT. Pierce, Florida.

HARTUNG, J. S.; DANIEL, J. F.; PRUVOST, O. P. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. **Appl. Environ. Microbiology**. n.4, v.59, p.1143-1148, 1993.

HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; VILLEMOT, I.; ALVAREZ, A. rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**. v.86, n.1, p.86-95, 1996.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacterias. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 27 ago. 2004.

JAUNET, T. X.; WANG, J. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**. v.89, n.4, p.22-24, 1999.

KIM, W.; HONG, Y.; YOO, J.; LEE, C. C.; CHUNG, S. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**. n.207, p.21-27, 2001.

LEE, T.; LIN, N.; TSENG, Y. Isolation and characterization of the *recA* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.221, p.459-465, 1996.

LEITE JÚNIOR, R. P. Cancro Cítrico; Prevenção e controle no Paraná. Londrina. **IAPAR**, Circular, 61, 1990.

LEITE JÚNIOR, R. P. Control Studies in Brazil. **International Citrus Canker Research Workshop**. p.8; 2000, FT. Pierce, Florida.

LEITE JÚNIOR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná Brazil. Review. **Crop Protection**, v.9, p.3-7, 1990.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. Minireview. **Journal of Bacteriology**. v.174, n.14, p.4525-4529, 1992.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Cancro cítrico-prevenção e erradicação. **Laranja**, v.4, p.189-195, 1983.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; CARVALHO, M. L. V.; PALAZZO, D. A.; NOGUEIRA, E. M. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye. I- em amostras de solos. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.3, p.640, 1983.

MARINGONI, A. C. Apontamento de técnicas em fitobacteriologia. Botucatu: **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 1995 (Boletim Didático, 8).

NAMEKATA, T.; CEVALO, L. C.; ROSSI, A. C.; POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O. Comportamento de uma coleção de citros submetida à contaminação ao cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*. **Laranja**, v.13, n.2, p.757-775, 1992.

PARANÁ. Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento. Divisão da Produção de Sementes e Mudas, Curitiba, PR. **Normas e padrões para produção de mudas fiscalizadas de citros**. Curitiba, 1989. 64p.

PRUVOST, O.; VERNIERE, C.; COUTEAU, A.; BPEH, B.; NICOLE, M. Citrus Bacterial Canker Disease: A Review on Research Developed on Réunion Island (France). **International Citrus Canker Research Workshop**. p.9; 2000, FT. Pierce, Florida.

RODRIGUES NETO, J.; LOPES, S. A. Manejo integrado de doenças bacterianas dos citros. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia-Palestra. Uberlândia/Mg. 2003.

ROMEIRO, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa: UFV, 365 p.2000.

ROOSE, M. L. The impact of Biotechnology on Citriculture. **Proc. Soc. Citriculture**, v.1, p.41-45, 1996.

ROSSETTI, V.; FEICHTENBERGER, E.; SILVEIRA, M. L. Cancro Cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*): bibliografia analítica. São Paulo, **Instituto Biológico**, 1981. 203p.

SCHAAD, N. W. (Ed). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2. ed. St Paul, **American Phytopathological Society**, 398p. 1988.

SCHAAD, N. W.; VIDAVER, A. K.; LANEY, G. H.; RUDOLPH, K.; JONES, J. B. Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. **Phytopatology**, v.90, n.3, p.208-213, 2000.

SEAB/DERAL, Curitiba, Pr. Fruta – Paraná. Curitiba, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/seab/deral/efpr.xls>>. Acesso em: 23 jul. 2004.

SHIOTANI, H.; OZAKI, K.; TSUYUMI, S. Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of pummelo (*Citrus grandis*). **Phytopatology**. v.90, n.12, p.1383-1389, 2000.

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

SCHUBERT, T. S.; SUN, X.; DIXON, W. N. Integration the scientific perspective into citrus canker eradication efforts in Florida. **International Citrus Canker Research Workshop**. p.13; 2000, FT. Pierce, Florida.

SCHUBERT, T. S.; RISVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. A.; DIXON, W. N. Meeten the challenge of erradication citrus cancker in Florida-Again. **Pant Disease**, v.85, n.4, p.340-356, 2001.

VAUTERIN, L.; RADEMARK, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.90, p.677-682, 2000.

VERSALOVIC, J.; KOLUTH, T.; LUPSIK, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprint of bacterial genomic. **Nucleic Acids Reserch**. v.19, n.24, p.6423-6831, 1991.

ZAVAGLIA, A. G.; URRAZA, P.; ANTONI, G.; Characterization of *Bifidobacterium* strains using BOX primers. **Anaerobe**. v.6, p.169-177, 2000.