



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA MENEGUIM

**OCORRÊNCIA DE HLB E CARACTERIZAÇÃO DE
'*Candidatus Liberibacter spp.*' NO ESTADO DO PARANÁ**

LUCIANA MENEGUIM

**OCORRÊNCIA DE HLB E CARACTERIZAÇÃO DE
'*Candidatus Liberibacter spp.*' NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador(a): Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles

Co-Orientador(a): Dr. Rui Pereira Leite Jr.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M541o Meneguim, Luciana.
Ocorrência de HLB e caracterização de '*Candidatus Liberibacter spp.*' no estado do Paraná / Luciana Meneguim. – Londrina, 2012. 106 f. : il.

Orientador: Luzia Doretto Paccola-Meirelles.
Coorientador: Rui Pereira Leite Junior.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas – Aspectos genéticos – Teses. 2. Frutas cítricas – Doenças e pragas – Teses. 3. Cultura e meios de cultura (Biologia) – Teses. 4. Plantas – Bacteriologia – Teses. I. Paccola-Meirelles, Luzia Doretto. II. Leite Júnior, Rui Pereira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.35:634.3

LUCIANA MENEGUIM

**OCORRÊNCIA DE HLB E CARACTERIZAÇÃO DE
'*Candidatus Liberibacter spp.*' NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Giovaneti Canteri
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas
UEL – Londrina - PR

Dr. José Segundo Giampan
IAPAR – Londrina - PR

Profa. Dra. Gisele Maria Andrade da Nóbrega
UEL – Londrina - PR

Dra. Michele Regina Lopes da Silva
IAPAR – Londrina - PR

Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles
Orientadora
UEL – Londrina - PR

Dr. Rui Pereira Leite Jr.
Co-Orientador
IAPAR – Londrina - PR

Londrina, 29 de fevereiro de 2012.

Aos meus pais, Moacyr e Terezinha por todo o amor, pela dedicação e exemplos de otimismo e a minha querida irmã Ana pelo incentivo para a realização de mais essa etapa.

Ao meu marido Fred pelo apoio, força e compreensão.

A minha filha Maria Eduarda que foi a coisa mais importante que me aconteceu durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Divino Pai Eterno, pois sem Ele, nada seria possível.

Ao Dr. Rui Pereira Leite Júnior por todos os ensinamentos, oportunidades, companheirismo e amizade.

A minha orientadora Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles pela oportunidade de concluir mais essa etapa da minha formação.

Ao Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas por todo incentivo e sugestões para realização desse trabalho e principalmente, pela amizade.

Aos professores do Departamento de Agronomia pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Iapar (LBV): Eliana, Fátima, Israel e Vanessa pelo apoio técnico e pelos momentos de descontração.

A Prof. Dra. Célia Guadalupe T. J. Andrade e Osvaldo Capelo do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise pelo auxílio no processamento das amostras e obtenção das imagens.

A minha amiga Dra. Viviani Vieira Marques pela grande contribuição para a realização desse trabalho.

As colegas do Laboratório de Biotecnologia do Iapar, Gislaine e Sandra pela disponibilidade em ajudar sempre.

As minhas amigas de sempre, Eliana Fávaro, Michele Regina Lopes da Silva e Viviani Vieira Marques, pelo apoio e amizade.

Ao pessoal do LBV: Amanda, Andrey, Antonio Augusto, Camila

Carlos, Diogo, Ivã, Mayara, Monica, Nadia, Ricardo, Suelen, Thales e Thiago pela convivência saudável.

A minha sogra, Zelma "*in memorian*" pelo incentivo para a realização dessa etapa.

Ao Dr. Celso Luiz Hohmann pelo incentivo., apoio e amizade.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná pelas instalações e material cedidos para a realização do trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

MENEGUIM, Luciana. **Ocorrência de HLB e caracterização de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ no Estado do Paraná.** 2012. 106 f. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é considerada a principal doença que ocorre na cultura de citros no mundo. Três espécies da bactéria são descritas como responsáveis pela doença, ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em 2004, no estado de São Paulo. No Paraná, a primeira ocorrência da doença foi observada em 2006 no município de Altônia, na região Noroeste do Estado. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a incidência do HLB em regiões citrícolas do estado do Paraná, estudar a diversidade genética de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ presente nessas regiões, bem como obter isolados da bactéria em meio de cultura. Foram avaliadas folhas com sintomas suspeitos de HLB utilizando-se o teste da PCR com ‘*primers*’ específicos para as três espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’. Para o estudo de diversidade genética, foram utilizadas as técnicas de PCR-RFLP com as enzimas de restrição *ApoI*, *HinfI* e *TaqI* e sequenciamento dos genes *omp* e *rplAJ*. No isolamento de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ foram utilizados ramos de plantas de laranja doce cv. Valência enxertadas sobre limão Cravo e também plantas de pé-franco da mesma cultivar, infectadas artificialmente. Para extração da seiva foi utilizada bomba de pressão de Scholander, onde os ramos foram submetidos a uma pressão de 3,0 megapascal e a seiva extraída foi coletada e plaqueada sobre os meios de cultura BCYE, PD2+E e LiberA sem adição de NADP. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C até o desenvolvimento de colônias bacterianas. O levantamento da ocorrência de HLB foi realizado no período de agosto de 2007 a agosto de 2011, onde 728 amostras de citros foram examinadas. Destas amostras, 61,5% apresentaram resultado positivo para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, sendo essa a única espécie detectada associada ao HLB. Foram avaliadas amostras de citros provenientes de 192 pomares de 47 municípios das regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado. O HLB foi constatado em amostras de 37 municípios. A doença foi diagnosticada em laranja Pêra (50,0%), Valência (17,7%), laranja 73 (16,0%) e Folha Murcha (9,2%). Do total de amostras positivas para HLB, 61,30% foram detectadas em copas de laranjas doce enxertadas sobre o porta-enxerto limão Cravo. Plantas com idade entre 6 e 10 anos foram as mais avaliadas, correspondendo a 34% do total de amostras positivas. Não foi observada diversidade genética entre as amostras paranaenses da bactéria do HLB, tanto pela técnica de PCR-RFLP como por sequenciamento para os dois genes analisados. A similaridade genética observada da bactéria que ocorre no Paraná com amostras de outras regiões citrícolas foi de 99 a 100%. A presença de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ em colônias bacterianas desenvolvidas no meio de cultura PD2+E foi confirmada por PCR e sequenciamento com ‘*primers*’ específicos para esta bactéria. Porém, o sequenciamento do produto de PCR obtido com ‘*primers*’ genéricos também revelou similaridade de 99% com bactérias não culturáveis e bactérias do gênero *Paenibacillus*, indicando que ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ pode estar em associação com outras bactérias nessas colônias bacterianas.

Palavras – chave: Diversidade genética. PCR-RFLP. Isolamento. Meio de cultura. Co-cultivo.

MENEGUIM, Luciana. **Occurrence of HLB and characterization of 'Candidatus Liberibacter spp. in the State of Paraná.** 2012. 106 p. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is considered the most important disease for citrus production around the world. Three bacteria species are associated with HLB, 'Ca. Liberibacter africanus', 'Ca. Liberibacter asiaticus' and 'Ca. Liberibacter americanus'. In Brazil, the disease was first reported in 2004, in the State of São Paulo. In Parana, HLB was reported for the first time in 2006, in the municipality of Altonia, in the Northeast region of the State. The objectives of this work were to verify the occurrence of the disease in different citrus growing areas of Parana, to study the genetic diversity of the bacterium present in the State, as well as to establish isolates of the bacterium in pure culture. Leaf samples from plants suspected to have HLB were examined by PCR with specific primers for the three species of 'Ca. Liberibacter'. The study of the genetic diversity of the HLB bacterium present in Parana was carried out by PCR-RFLP using the restriction enzymes *ApoI*, *HinfI* e *TaqI*, and sequence analysis of the *omp* e *rpIAJ* genes. For the isolation of 'Ca. Liberibacter asiaticus', branches of sweet Orange trees of cv. Valencia grafted onto Rangpur lime, as well non-grafted trees of the same cultivar were used. Sap was extracted by using the Scholander pressure pump. Fresh cut branches were subject to 3,0 mpascal of pressure and the sap was collected and plated onto the media BCYE, PD2+E e LiberA without addition of NADP. The Petri plates were kept in growth chamber at 28 °C. The HLB survey was carried out during the period of August 2007 through August 2011. A total of 728 samples were examined, and 61.5% showed positive results for 'Ca. Liberibacter asiaticus'. "Ca. Liberibacter asiaticus" was the only species associated with HLB in Parana. Samples were collected from 192 orchards, comprising 47 municipalities of the North, Northeast and West regions of the State. HLB was detected in samples from 37 municipalities. In regard to citrus cultivars, HLB was detected in the sweet oranges Pera (50,0%), Valencia (17,7%), Iapar 73 (16,0%) and Folha Murcha (9,2%). Among the samples with positive results for HLB, 61.30% was of sweet Orange trees grafted onto Rangpur lime. The age of the citrus trees ranged from 0 to 20 years old, thus 34% of the samples were from trees 6 to 10 years old. HLB bacteria present in Parana did not show any genetic variability based on PCR-RFLP and sequencing analysis. The genetic similarity of the bacteria present in Parana was 99 to 100% similar to 'Ca. Liberibacter asiaticus' from other citrus growing areas. The presence of 'Ca. Liberibacter asiaticus' in bacterial colonies developed on PD2+E media was confirmed by PCR and sequence analysis. However, the presence of other bacteria 99% similar *Paenibacillus* spp. was determined by the sequence analysis of the 16S rDNA. These results indicated the possible association of 'Ca. Liberibacter asiaticus' with other bacteria in culture.

Key – words: Genetic diversity. PCR-RFLP. Isolation. Culture media. Co-cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Artigo A

- Figura 3.1** – Ocorrência de HLB em municípios amostrados do Estado do Paraná. Os municípios são indicados pelos números: 1, Altônia; 2, São Jorge do Patrocínio; 3 Paranaíba; 4, Guairaçá; 5, Alto Paraná; 6, Cambé; 7, Jataizinho; 8, Londrina; 9, Paraíso do Norte; 10, Pitangueiras; 11, Rolândia; 12, Sabáudia; 13, Sertanópolis; 14, Alvorada do Sul; 15, Arapongas; 16, Astorga; 17, Bandeirantes; 18, Bela Vista do Paraíso; 19, Cornélio Procopio; 20, Ibiporã; 21, Jaguapitã; 22, Mirassol; 23, Prado Ferreira; 24, Santo Antonio do Paraíso; 25, Uraí; 26, Assaí; 27, Nova Fátima; 28, Primeiro de Maio; 29, Rancho Alegre; 30, Santa Fé; 31, Santa Mariana; 32, Sertaneja; 33, Bom Sucesso; 34, Cambará; 35, Cidade Gaúcha; 36, Congoinhas; 37, Santa Cecília do Pavão37
- Figura 3.2** – Número de amostras de citros por cultivar submetidas à análise de PCR para diagnóstico de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ durante o período de agosto de 2007 a agosto de 201138
- Figura 3.3** – Relação entre cultivares de porta-enxerto de citros e amostras de copa submetidas à análise de PCR para diagnóstico de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ durante o período de 2007 a agosto de 201138
- Figura 3.4** – Idade das plantas de citros submetidas à análise de PCR para diagnóstico de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ durante o período de agosto de 2007 a agosto de 201139
- Figura 3.5** – Número de amostras positivas para ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ em função da idade das plantas de citros submetidas à análise de PCR durante o período de agosto de 2007 a agosto de 201140

Artigo B

- Figura 4.1**– Gel de agarose dos produtos da amplificação da PCR com os primers HP1/Lp1c, mostrando o fragmento de 2,4 Kb de

algumas das amostras, as quais foram utilizadas nas análises de PCR-RFLP. Linhas: M, marcador molecular 1kb plus, 1 a 9, DNA de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de diferentes amostras; 10, controle positivo da reação para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’; e 11, controle negativo da reação50

Figura 4.2 – Perfil de restrição dos produtos de PCR digeridos com a enzima *ApoI*. A amplificação foi obtida com os primers HP1/Lp1c, que codificam o gene da proteína de membrana *omp* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de amostras provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná. M, marcador de peso molecular 1kb Plus; 1, Altônia; 3, Paranavaí; 16, Alto Paraná; 18, Rolândia; 109, Sabáudia; 175, Pitangueiras; 232, Bandeirantes; 251, Santo Antonio do Paraíso; 262, Astorga; 293, Prado Ferreira; 302, Cornélio Procópio; 330, Bela Vista do Paraíso; e nd, produto não digerido51

Figura 4.3 – Perfil de restrição dos produtos de PCR digeridos com a enzima *HinI*. A amplificação foi obtida com os primers HP1/Lp1c, que codificam o gene da proteína de membrana *omp* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de amostras provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná. M, marcador de peso molecular 1kb Plus; 1, Altônia; 3, Paranavaí; 16, Alto Paraná; 18, Rolândia; 109, Sabáudia; 175, Pitangueiras; 232, Bandeirantes; 251, Santo Antonio do Paraíso; 262, Astorga; 293, Prado Ferreira; 302, Cornélio Procópio; 330, Bela Vista do Paraíso; e nd, produto não digerido52

Figura 4.4 – Perfil de restrição dos produtos de PCR digeridos com a enzima *TaqI*. A amplificação foi obtida com os primers HP1/Lp1c, que codificam o gene da proteína de membrana *omp* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de amostras provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná. M, marcador de peso molecular 1kb Plus; 1, Altônia; 3, Paranavaí; 16, Alto Paraná; 18, Rolândia; 109, Sabáudia; 175, Pitangueiras; 232, Bandeirantes; 251, Santo Antonio do Paraíso; 262, Astorga; 293, Prado Ferreira; 302, Cornélio Procópio; 330, Bela Vista

| | | |
|---------------------|---|----|
| | do Paraíso; e nd, produto não digerido..... | 53 |
| Figura 4.5 – | Árvore filogenética construída utilizando o método UPGMA para as sequências parciais do gene <i>omp</i> de ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’, obtidas nesse trabalho com amostras dos estados do Paraná e São Paulo e também aquelas depositadas no banco de dados Genbank..... | 55 |
| Figura 4.6 – | Árvore filogenética construída utilizando o método UPGMA para as sequências parciais do gene <i>rplAJ</i> de ‘ <i>Ca. Liberibacter spp.</i> ’, obtidas nesse trabalho com amostras dos estados do Paraná e São Paulo e também aquelas depositadas no banco de dados Genbank..... | 57 |

Artigo C

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 5.1 – | Amplificação de fragmento de 703 pb em PCR com os primers A2/J5, específicos para ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2, a 4, DNA obtido de culturas bacterianas obtidas no meio BCYE; 5 a 10, DNA obtido de culturas bacterianas obtidas no meio LiberA; 11 a 18, DNA obtido de culturas bacterianas obtidas no meio PD2+E; 19, controle negativo da reação; e 20, controle positivo da reação para ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’ | 70 |
| Figura 5.2 – | Isolado bacteriano número 14, positiva em reação de PCR com os primers A2/J5 específicos para ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’, cultivada em meio de cultura BCYE, observada três a quatro dias após plaqueamento e mantida a 28 °C | 71 |
| Figura 5.3 – | Culturas bacterianas apresentando diferentes morfologias obtidas a partir de uma única colônia da cultura 14, desenvolvidas em meio BCYE após sucessivas repicagens | 72 |
| Figura 5.4 – | Amplificação de fragmento de 703 pb em PCR com os ‘primers’ A2/J5, específicos para ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’, das subculturas do isolado 14 com diferentes morfologias. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2 a 10, DNA obtido de subculturas bacterianas crescidas no meio | |

| | | |
|--------------------|--|----|
| | BCYE; 11, controle negativo da reação; e 12, controle positivo da reação para ' <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ' | 73 |
| Figura 5.5 | – Amplificação de fragmento de 600 pb em PCR com os ' <i>primers</i> ' OMP1F/OMP1R, específicos para ' <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ' de subculturas do isolado 14 obtidas após plaqueamento em meio BCYE. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2 a 8, DNA obtido de culturas bacterianas; 9, controle negativo da reação; e 10, controle positivo da reação para ' <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ' | 73 |
| Figura 5.6 | – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os primers Oi1/Oi2c (A) e Hp1/Lp1c (B) específicos para ' <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ' de subculturas do isolado 14, obtidas após plaqueamento em meio BCYE. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2 a 10, DNA obtido de culturas bacterianas crescidas no meio BCYE; 11, controle negativo da reação; e 12, controle positivo da reação para ' <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ' | 74 |
| Figura 5.7 | – Tabela de similaridade, gerada pelo programa Blastn, entre a sequência obtida do gene <i>rpIAJ</i> da subcultura 14.1 do isolado 14 com as sequências depositadas no banco de dados Genbank | 76 |
| Figura 5.8 | – Árvore filogenética contruída utilizando o método UPGMA com as sequências parciais do gene <i>rpIAJ</i> provenientes de subculturas do isolado 14 obtido de plantas cítricas com HLB e com sequências depositadas no banco de dados Genbank | 77 |
| Figura 5.9 | – Tabela de similaridade, gerada pelo programa Blastn, entre a sequência obtida da região 16S rDNA da subcultura 14.1 do isolado 14 com as sequências depositadas no banco de dados Genbank | 78 |
| Figura 5.10 | – Árvore filogenética construída utilizando o método UPGMA com as sequências parciais da região 16S rRNA provenientes de subculturas do isolado bacteriano 14, obtido nesse estudo e de sequências depositadas no banco de dados Genbank | 79 |
| Figura 5.11 | – Reação de PCR utilizando os primers A2/J5, específicos para | |

'Ca. Liberibacter asiaticus', com DNA extraído de plantas inoculadas com subculturas do isolado 14, por dois métodos de inoculação: (A) infiltração nas folhas e (B) deposição no tronco em local da poda, dois meses após a inoculação. Linhas: M, marcador de peso molecular 1kb; T, testemunha inoculada com água; +, controle positivo da reação com DNA de 'Ca. Liberibacter asiaticus'; -, controle negativo da reação 81

Figura 5.12 – Reação de PCR utilizando os primers A2/J5, específicos para 'Ca. Liberibacter asiaticus', com DNA extraído de plantas inoculadas com subculturas do isolado 14, por dois métodos de inoculação: (A) infiltração nas folhas e (B) deposição no tronco em local da poda, oito meses após a inoculação. Linhas: M, marcador de peso molecular 1kb; T, testemunha inoculada com água; -, controle negativo da reação; +, controle positivo da reação com DNA de 'Ca. Liberibacter asiaticus' 81

Figura 5.13 – Microscopia eletrônica de varredura de células bacterianas da subcultura 14.2 do isolado 14, obtidas de cultivos com 72 hrs em meio BCYE..... 82

Figura 5.14 – Corte transversal do pecíolo de tecido de citros infectados com 'Ca. Liberibacter asiaticus' em A, B, C, D e E e tecido sadio em F examinados por microscopia eletrônica de varredura. A seta em B indica a presença de biofilme no interior do vaso..... 83

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 HUANGLONGBING (HLB) | 19 |
| 2.2 BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO HLB – ‘ <i>CANDIDATUS</i> LIBERIBACTER SPP. | 19 |
| 2.3 HUANGLONGBING NO BRASIL | 21 |
| 2.4 SINTOMATOLOGIA | 22 |
| 2.5 MEDIDAS DE CONTROLE | 23 |
| 2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DE ‘ <i>Ca.</i> LIBERIBACTER SPP.’ | 24 |
| 2.7 ISOLAMENTO DE ‘ <i>Ca.</i> LIBERIBACTER SPP.’ | 25 |
| 3 ARTIGO A – OCORRÊNCIA DE HLB EM REGIÕES CITRÍCOLAS DO ESTADO DO PARANÁ | 27 |
| 3.1 RESUMO E ABSTRACT | 28 |
| 3.2 INTRODUÇÃO | 29 |
| 3.3 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 3.3.1 Amostragem | 31 |
| 3.3.2 Extração de DNA | 32 |
| 3.3.3 Reação da Polimerase em Cadeia | 32 |
| 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 3.5 CONCLUSÕES | 40 |
| 4 ARTIGO B – DIVERSIDADE GENÉTICA DE ‘<i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus’ PRESENTE NO ESTADO DO PARANÁ | 41 |
| 4.1 RESUMO E ABSTRACT | 42 |
| 4.2 INTRODUÇÃO | 43 |
| 4.3 MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 4.3.1 Amostras de Plantas Cítricas Utilizadas Neste Estudo | 45 |
| 4.3.2 Extração de DNA de Amostras de Plantas Cítricas | 45 |
| 4.3.3 Protocolo de PCR para Detecção de ‘ <i>Ca.</i> Liberibacter spp.’ | 46 |
| 4.3.4 Análise por PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) | 46 |
| 4.3.5 Sequenciamento e Análises das Sequências de DNA | 49 |

| | |
|---|----|
| 4.4 RESULTADOS..... | 49 |
| 4.4.1 Análises por PCR-RFLP de amostras de ‘ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ’ baseadas no gene <i>omp</i> | 49 |
| 4.4.2 Análise Genética por Sequenciamento do Gene <i>omp</i> de ‘ <i>Ca.</i> <i>Liberibacter Asiaticus</i> ’ | 53 |
| 4.4.3 Análise Genética por Sequenciamento do Gene <i>rplAJ</i> de ‘ <i>Ca.</i> <i>Liberibacter Asiaticus</i> ’ | 56 |
| 4.5 DISCUSSÃO | 58 |
| 4.6 CONCLUSÕES | 60 |
| | |
| 5 ARTIGO C – ISOLAMENTO DE ‘<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>’ ASSOCIADA COM HUANGLONGBING | 61 |
| 5.1 RESUMO E ABSTRACT | 62 |
| 5.2 INTRODUÇÃO | 63 |
| 5.3 MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 5.3.1 Material Vegetal | 64 |
| 5.3.2 Meio de Cultura e Condições de Crescimento..... | 65 |
| 5.3.3 Extração de DNA e PCR..... | 65 |
| 5.3.4 Sequenciamento dos Genes <i>rplAJ</i> e 16S rDNA | 67 |
| 5.3.5 Inoculação de Isolados Bacterianos | 67 |
| 5.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 68 |
| 5.4 RESULTADOS..... | 69 |
| 5.4.1 Isolamento e Meio de Cultura | 69 |
| 5.4.2 Sequenciamento do Gene <i>rplAJ</i> Amplificado do Isolado 14 | 74 |
| 5.4.3 Sequenciamento do Gene 16S rDNA Amplificado do Isolado 14 | 75 |
| 5.4.4 Teste de Patogenicidade | 79 |
| 5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Culturas Bacterianas e de Tecido Vegetal | 80 |
| 5.5 DISCUSSÃO | 84 |
| 5.6 CONCLUSÕES | 86 |
| | |
| 6 CONCLUSÕES GERAIS | 88 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 89 |

| | |
|---|-----|
| ANEXOS | 96 |
| ANEXO 4.1 – Alinhamento entre as sequências obtidas neste estudo com gene <i>omp</i> , utilizando o programa CLUSTAL W | 97 |
| ANEXO 4.2 – Alinhamento entre as sequências obtidas neste estudo com gene <i>rplAJ</i> , utilizando o programa CLUSTAL W | 101 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, cuja produção foi de mais de 19 milhões de toneladas em 2011 (IBGE, 2012). No entanto, a citricultura brasileira está seriamente ameaçada pela ocorrência da doença Huanglongbing (HLB), também conhecida como “greening”. A doença é causada por bactérias Gram-negativas, fastidiosas e restritas aos vasos do floema da planta infectada (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). Estas bactérias pertencem ao gênero ‘*Candidatus Liberibacter*’ do grupo das alfa-proteobactérias (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

Plantas infectadas pelas bactérias do HLB tornam-se amareladas com folhas cloróticas de aspecto mosqueado, e produzem frutos pequenos, irregulares, de gosto amargo e com sementes abortadas (BOVÉ, 2006). Conforme a doença progride, o crescimento das plantas e a produção de frutos são significativamente afetados, fazendo com que o pomar torne-se economicamente inviável (BOVÉ, 2006; DA GRAÇA; KORSTEN, 2004).

Até o momento não existem medidas efetivas para o controle do HLB. Algumas práticas adotadas tem por objetivo básico conter a expansão da doença, como a utilização de mudas sadias, controle do inseto vetor, inspeções regulares nos pomares e eliminação de plantas doentes (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2007).

Três espécies da bactéria são descritas como responsáveis pela doença. No continente Africano, o HLB é causado por ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’, na Ásia e nas Américas é causada por ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (COLLETA-FILHO et al., 2005; GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; LLAUGER et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005a). Na América do Sul também ocorre ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (TEIXEIRA et al., 2005b). Duas espécies de psílideo, *Trioza erytreae* Del Guercio e *Diaphorina citri* Kuwayama, são vetores naturais de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ e responsáveis pela transmissão da bactéria de uma planta para outra (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; YAMAMOTO et al., 2006).

No Brasil, a doença foi detectada inicialmente no município de Araraquara, no estado de São Paulo, em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a). Atualmente, o HLB encontra-se também presente nos

estados de Minas Gerais e Paraná (NUNES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2005a). No Paraná, a presença da doença foi constatada no município de Altônia na região Noroeste do Estado em 2006, porém, atualmente encontra-se também presente na região Norte, uma das principais regiões citrícolas do Estado (NUNES et al., 2010).

O estudo da diversidade genética de '*Ca. Liberibacter spp.*' pode fornecer informações importantes sobre a taxonomia da bactéria, bem como sua dinâmica populacional, podendo desta forma contribuir para o manejo da doença. A diversidade genética da bactéria tem sido determinada por meio de estudos moleculares envolvendo algumas regiões do genoma bacteriano como o gene que codifica a proteína ribossomal 16S, e os DNAs espaçadores da região compreendida entre os genes ribossomais 16S e 23S (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1996; SUBANDIYAH et al., 2000; COLETTA-FILHO et al., 2005; OKUDA et al., 2005). Além da região do DNA ribossomal, têm sido utilizados o gene *omp*, que codifica a proteína de membrana Omp (Outer membrane protein) (BASTIANEL et al., 2005), o cluster gênico *nusG-rpKJL-rpoB* (VILLECHANOUX et al., 1993; OKUDA et al., 2005; LIN et al., 2008; TOMIMURA et al., 2009), e uma região do gene que codifica a DNA polimerase de bacteriófago (TOMIMURA et al., 2009).

Os primeiros relatos sobre o cultivo de organismos associados ao HLB são da década de 1970 (GHOSH et al., 1971) e 1980 (GARNETT, 1985), quando ficou estabelecida a associação de bactérias com a doença. No entanto, esses trabalhos não se confirmaram e as recentes tentativas de isolamento de '*Ca. Liberibacter spp.*', resultaram em um sucesso parcial em relação ao estabelecimento de culturas puras da bactéria (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). Assim, a total caracterização de '*Ca. Liberibacter spp.*' tem sido dificultada.

Devido à recente detecção da doença no Brasil e nos pomares paranaenses, uma série de estudos nas condições locais é necessária para uma melhor compreensão do patossistema. Desta forma, os objetivos desse trabalho foram verificar a ocorrência do HLB em regiões citrícolas do estado do Paraná, estudar a diversidade genética de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' presentes nessas regiões, bem como obter isolados da bactéria em meio de cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HUANGLONGBING (HLB)

Huanglongbing (HLB) é o nome adotado pela 'International Organization of Citrus Virologists' (DA GRAÇA; KORSTEN, 2004) e pela 'American Phytopathological Society' (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000) para a doença em citros causada por bactérias do gênero '*Candidatus Liberibacter*'. A doença foi descrita pela primeira vez em 1956 como a "doença do ramo amarelo" (LIN, 1956). O HLB é também conhecido como "doença do dragão amarelo" ou ainda "greening" (DA GRAÇA; KORSTEN, 2004; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000).

A origem do HLB é provavelmente a China, onde foi relatada pela primeira vez no final dos anos de 1800 (BOVÉ, 2006; DA GRAÇA; KORSTEN, 2004; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). A doença tem sido considerada a mais destrutiva para a citricultura no mundo (BOVÉ, 2006; DA GRAÇA; KORSTEN, 2004), afetando seriamente todas as variedades comerciais, independentemente do cultivar de porta-enxerto ou de copa (BOVÉ, 2006; DA GRAÇA, 1991; LOPES; MARTINS; FRARE, 2005).

Até o momento, três espécies de bactérias do gênero '*Candidatus Liberibacter*' são descritas como causadoras do HLB: '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994), e '*Candidatus Liberibacter americanus*' (TEIXEIRA et al., 2005b). Duas espécies de fitoplasmas também têm sido associadas com sintomas do HLB na China (CHEN et al., 2009) e no Brasil (TEIXEIRA et al., 2008), muito embora não esteja clara a relação direta destes fitoplasmas com o HLB.

2.2 BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO HLB – '*CANDIDATUS LIBERIBACTER SPP*'

As três espécies bacterianas responsáveis pelo HLB, a '*Ca. Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*' (BOVÉ, 2006; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007; TEIXEIRA et al., 2005b) pertencem à subdivisão das alfa-proteobactérias, ordem Rhizobiales e família *Rhizobiaceae* (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). São bactérias Gram-negativas de difícil cultivo em culturas puras e na planta ficam restritas aos vasos do

floema. Até o momento, há relatos do cultivo das bactérias em meios de cultura axênicos, porém os resultados são inconclusivos (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009).

Essas bactérias por não serem isoladas e cultivadas em meios de cultura, têm sua caracterização dificultada. No entanto, a utilização de microscopia eletrônica, anticorpos monoclonais e técnicas moleculares têm possibilitado a identificação e diferenciação de estirpes bacterianas causadores do HLB (GARNIER; MARTIN-GROS; BOVÉ, 1987; GARNIER et al., 1991). Características comportamentais das bactérias, como a sensibilidade à temperatura, também têm auxiliado na diferenciação dessa bactéria (BOVÉ, 2006).

'*Ca. Liberibacter* spp.' associadas ao HLB são transmitidas por meio de material vegetal contaminado ou por meio de insetos vetores, como os psíldeos *Diaphorina citri* Kuwayama e *Trioza erythrae* Del Guercio para '*Ca. Liberibacter africanus*' (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; McCLEAN; OBERHOLZER, 1965; YAMAMOTO et al., 2006;).

'*Ca. Liberibacter africanus*' é encontrada na maioria dos países da África. Esta bactéria ocorre em locais de elevada altitude, com temperaturas moderadas, entre 20 e 23 °C. A espécie africana é transmitida pelo psíldeo *Trioza erythrae* Del Guercio, que também é, igualmente, sensível a altas temperaturas. (BOVÉ et al., 1974). Uma subespécie do gênero '*Ca. Liberibacter africanus*' foi identificada por PCR em uma planta ornamental pertencente à família das Rutáceas, denominada *Calodendrum capense*, na região do Cabo na África do Sul. Essa bactéria foi caracterizada com base em análises filogenéticas dos genes da proteína ribossomal β operon e apresentou homologias de 79,9% com '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e 82,1% com '*Ca. Liberibacter africanus*', sendo denominada então, '*Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis*' (GARNIER et al., 2000).

Na Ásia e em países das Américas do Norte, Central e do Sul, o agente causal do HLB é '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Tanto a bactéria como o inseto vetor, o psíldeo *D. citri*, podem ser encontrados em regiões de baixa altitude e apresentam-se tolerantes a temperaturas de 30 a 35 °C (BOVÉ 2006; COLETTA-FILHO et al., 2004). Entre as três espécies bacterianas associadas ao HLB, a '*Ca. Liberibacter asiaticus*' é a mais amplamente distribuída no mundo e também a mais agressiva (BOVÉ, 2006; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007; TYLER et al., 2009), estando presente nas duas principais regiões produtoras de laranja do

mundo, Flórida, nos Estados Unidos, e São Paulo, no Brasil (COLETTA-FILHO et al., 2004; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ apresenta uma maior eficiência de transmissão, tanto pelo psíldeo como por enxertia de tecidos, quando comparada à ‘*Ca. Liberibacter americanus*’, provavelmente, porque atinge maiores concentrações dentro das plantas infectadas (LOPES et al., 2009a).

‘*Ca. Liberibacter americanus*’ foi a terceira espécie identificada como causadora do HLB. Sua primeira constatação foi em 2004, no município de Araraquara no estado de São Paulo, Brasil (TEIXEIRA et al., 2005a,b). Esta espécie também é transmitida pelo inseto vetor *D. citri* (YAMAMOTO et al., 2006). Diferentemente do comportamento de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ ela é sensível a altas temperaturas, sendo tolerantes a temperaturas entre 27 e 32 °C (LOPES et al., 2009b).

2.3 HUANGLONGBING NO BRASIL

No Brasil, o HLB foi reportado pela primeira vez em 2004 na região de Araraquara no estado de São Paulo. Este também foi o primeiro relato de HLB no continente Americano (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a). No ano seguinte, foi constatado o primeiro foco de HLB na região Sul do estado de Minas Gerais (BOVÉ, 2006).

Inicialmente, o HLB presente no Brasil estava associado a ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (COLLETTA-FILHO et al., 2004). Entretanto, no mesmo ano de sua detecção no país, plantas com sintomas semelhantes ao HLB foram submetidas ao diagnóstico realizado por meio da técnica de PCR, utilizando primers específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Ca. Liberibacter africanus*’, porém, os resultados foram negativos para as duas espécies (TEIXEIRA et al., 2005b). Por esta razão, suspeitou-se da presença de um novo patógeno bacteriano. Estudos baseados no sequenciamento de genes da região do 16S do rRNA de procarioto revelaram a presença de uma nova espécie de ‘*Ca. Liberibacter*’ (TEIXEIRA et al., 2005b). Por se tratar de uma nova espécie detectada pela primeira vez no continente americano e por ter sido a principal espécie a ser diagnosticada na maioria das amostras analisadas, foi sugerida a denominação ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ (TEIXEIRA et al., 2005b).

Inicialmente, '*Ca. Liberibacter americanus*' atingia mais de 90% das plantas infectadas no estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2005b). Porém, esse quadro se reverteu, tornando '*Ca. Liberibacter asiaticus*' a espécie predominante. Ambas espécies são transmitidas pelo mesmo inseto vetor, *D. citri* (YAMAMOTO et al., 2006).

No estado do Paraná, a doença HLB foi observada pela primeira vez no final de 2006, no município de Altônia, região Noroeste do Estado (NUNES et al., 2007). Em 2008, a doença encontrava-se em 29 municípios e a partir de então, atingiu cerca de 54 municípios nas regiões Norte e Noroeste do Estado (NUNES et al., 2010). Até o momento, apenas '*Ca. Liberibacter asiaticus*' foi constatada nos pomares paranaenses (NUNES et al., 2010).

2.4 SINTOMATOLOGIA

Nos estágios iniciais da infecção, as plantas cítricas afetadas pelo HLB têm sido identificadas pela presença de um ramo com folhas amareladas. Com o tempo, essa coloração amarelada atinge outros ramos e em estágio avançado a doença afeta toda a planta. Os ramos afetados podem apresentar, além de folhas de coloração amarelada, outros sintomas característicos como desfolha, seca de ramos e queda de frutos, podendo levar à morte da planta (BOVÉ, 2006; McCLEAN; OBERHOLZER, 1965). O sintoma mais característico de HLB é o aspecto mosqueado das folhas, que pode ocorrer em qualquer espécie de citros. As folhas tornam-se parcialmente amareladas e parcialmente esverdeadas, com regiões que variam de verde claro a verde intenso, e a nervura central se torna mais saliente e amarelada. Esse padrão mosqueado das folhas ocorre de forma assimétrica, ou seja, dividida pela nervura central, um lado da folha não é igual ao outro (BOVÉ, 2006). Esta característica é que distingue o HLB de sintomas de deficiência de nutrientes como zinco, ferro, cálcio, manganês, etc. (BOVÉ, 2006).

Os frutos de ramos afetados pela doença apresentam-se deformados, pequenos, de sabor amargo e com a coloração invertida. Ao cortar pela metade um fruto sintomático, observa-se escurecimento do feixe vascular que sai do pedúnculo, além da presença de sementes abortadas (BOVÉ, 2006; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007; TYLER et al., 2009).

2.5 MEDIDAS DE CONTROLE

Até o momento não há métodos de controle curativo efetivo para o HLB. Desta forma, a prevenção torna-se a medida mais eficaz no controle da doença. Várias tentativas foram realizadas para o controle do HLB com produtos químicos, porém os resultados foram insatisfatórios (BOVÉ, 2006). A utilização de antibióticos e a poda de ramos sintomáticos e assintomáticos mostraram-se também ineficientes para o controle da doença (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2007).

Atualmente, algumas medidas de controle preventivo têm sido preconizadas, como, plantio de mudas saudias, inspeções regulares dos pomares, eliminação de plantas doentes e controle do inseto vetor (AYRES et al., 2005; BOVÉ, 2006). A eliminação da falsa murta (*Murraya paniculata*), uma planta ornamental que é hospedeira tanto do inseto vetor como da bactéria do HLB, é uma medida utilizada com o objetivo de diminuir a fonte de inóculo (BOVÉ, 2006).

O plantio de mudas cítricas saudias, provenientes de viveiros certificados e que passam por um rigoroso processo de produção, é um fator importante no estabelecimento de pomares livres do HLB (BOVÉ, 2006). O transporte de mudas cítricas que tanto podem estar infectadas, como conter ovos e ninfas do psilídeo, é um dos principais fatores que contribui para a disseminação do patógeno (BOVÉ, 2006).

Atualmente, a eliminação de plantas cítricas doentes certamente é a forma mais adequada para o controle do HLB (AYRES et al., 2005; BOVÉ, 2006). No entanto, o período relativamente longo entre a infecção e o surgimento dos sintomas não possibilita a imediata remoção de todas as plantas infectadas (BOVÉ, 2006). Desta forma, plantas doentes remanescentes no pomar servem como importantes fontes de inóculo para permanência do HLB em uma dada área ou região (AYRES et al., 2005; BOVÉ, 2006).

Mesmo com a eficiência relativamente baixa de transmissão da bactéria do HLB pelo inseto vetor *D. citri*, a aplicação de inseticidas é uma medida importante no controle da doença (HALBERT; MANJUNAH, 2004). No entanto, são necessárias inúmeras pulverizações ao longo do ano para o efetivo controle populacional do inseto vetor (AUBERT, 1990; DA GRAÇA; KORSTEN, 2004). Entretanto, essas aplicações regulares de inseticidas não eliminam os insetos provenientes de pomares vizinhos, o que faz necessária uma ação conjunta e

simultânea de produtores (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009). Vários são os produtos inseticidas utilizados no controle do inseto na fase adulta, de ninfa e de ovo (YAMAMOTO et al., 2009). Esses produtos podem ser de contato e também sistêmicos, contudo, deve-se levar em conta o mecanismo de ação desses inseticidas de forma a minimizar os danos causados a insetos benéficos como também ao meio ambiente (YAMAMOTO et al., 2009).

2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DE 'Ca. LIBERIBACTER SPP'

A caracterização das espécies de 'Ca. Liberibacter', causadoras do HLB, tem sido dificultada pelo fato dessas bactérias não serem cultivadas em meio de cultura (GARNIER; BOVÉ, 1996). No entanto, a utilização de microscopia eletrônica, anticorpos monoclonais e técnicas moleculares têm possibilitado a identificação e diferenciação de estirpes bacterianas causadoras do HLB (GARNIER; BOVÉ, 1996; GARNIER; MARTIN-GROS; BOVÉ, 1987; GARNIER et al., 1991).

Características comportamentais das bactérias, como a sensibilidade a temperatura, auxiliaram na diferenciação das estirpes provenientes de plantas sintomáticas da Ásia e da África (BOVÉ, 2006).

O estudo da diversidade genética, envolvendo diferentes regiões do genoma bacteriano, tem sido utilizado para caracterizar a bactéria proveniente de diferentes plantas hospedeiras e regiões cítricas, bem como determinar a diversidade de diferentes 'Ca. Liberibacter spp.' (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; TEIXEIRA et al., 2005b). Essas regiões do genoma bacteriano, como a do gene que codifica para a proteína ribossomal 16S, as regiões intergênicas 16S e 23S (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1996; SUBANDIYAH et al., 2000; COLETTA-FILHO et al., 2005; OKUDA et al., 2005), cluster gênico *nusG-rp1KAJL-rpoB* (LIN et al., 2008; OKUDA et al., 2005; PLANET et al., 1995; VILLECHANOUX et al., 1993) têm sido muito investigadas. No entanto, novas regiões do genoma foram identificadas para melhor caracterizar a bactéria.

A princípio, dentro de cada espécie de liberibacter há ampla homogeneidade genética. No entanto, Bastianel et al. (2005) identificaram o gene *omp*, que codifica uma proteína da membrana externa (Outer Membrane Protein) para diferenciar isolados/linhagens de 'Ca. Liberibacter asiaticus' a partir de diferentes origens geográficas. As diferenças encontradas foram suficientes para

sugerir esse gene para estudos de diversidade. Nesse estudo foram formados agrupamentos menores entre estirpes asiáticas mostrando haver variações entre e dentro dessa espécie embora cada uma das regiões foi representada por apenas 1 a 3 isolados.

Tomimura et al. (2009) analisaram a presença de SNPs ('Single-Nucleotide Polymorfisms') ou polimorfismos pontuais na sequência do gene de bacteriófago tipo-DNA polimerase e revelaram três grupos de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' do Sudeste Asiático. Todos os isolados da Indonésia foram separados em um grupo e os outros dois grupos não foram correlacionados com origens geográficas, incluindo Vietnã, Tailândia, Taiwan e Japão.

Estudos realizados com o gene 16S e as regiões intergênicas 16S e 23S de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' provenientes do sul da Índia revelaram a presença de uma nova linhagem ou pelo a presença de SNPs que foram capazes de identificar diversidade genética entre esses isolados com os isolados provenientes de outros continentes (ADKAR-PURUSHOTHAMA et al., 2009). Os resultados obtidos nesses estudos permitem uma melhor compreensão da distribuição geográfica e características biológicas, tais como a virulência de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' que podem ser exploradas na luta contra a disseminação da doença (ADKAR-PURUSHOTHAMA et al., 2009).

2.7 ISOLAMENTO DE '*CA. LIBERIBACTER SPP*'

'*Candidatus Liberibacter spp.*' são consideradas bactérias fastidiosas e esse grupo de bactérias apresenta como característica comum exigências especiais de condições de cultivo, em relação aos demais grupos (DAVIS, 2001). Estas condições variam para cada microrganismo, podendo ser a necessidade de CO₂, crescimento lento, adição de fatores especiais de crescimento, etc.

Os primeiros relatos sobre o isolamento de organismos associados ao HLB datam das décadas de 1970 e 1980 (GOSH et al., 1971; GARNETT, 1984), porém esses trabalhos não foram confirmados. A dificuldade encontrada em isolar '*Candidatus Liberibacter spp.*' em meio de cultura tem impossibilitado sua total caracterização e dificultado o entendimento de sua biologia e seu mecanismo de patogênese (SAGARAN et al., 2009). No entanto, o conhecimento sobre essas bactérias são baseados em estudos realizados por meio de infecção artificial, seja

com tecido infectado, inseto vetor ou plantas parasitas.

Recentemente dois grupos de pesquisas relataram a obtenção de ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ em meio de cultura. Em 2008, Davis e colaboradores obtiveram o cultivo de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ em meio de cultura complexo, desenvolvido para o crescimento de outra bactéria geneticamente próxima às liberibacters. O seu cultivo foi confirmado por meio de PCR com primers específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’. No entanto, exames de microscopia eletrônica, PCR com “*primers*” genéricos e sequenciamento de produto de PCR, revelaram a presença de outra bactéria na cultura. Essa bactéria foi identificada como uma actinobactéria próxima a *Propionibacterium acnes*. Mesmo após sucessivas repicagens, as duas bactérias permaneceram juntas, sugerindo uma associação benéfica para a sobrevivência em meio de cultura.

Sechler et al. (2009) desenvolveram um meio de cultura denominado Liber A, com a adição de fosfatos, NADP, ciclohexamida e extrato de pecíolo e nervura central de citros, e obtiveram o isolamento das três espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’. As culturas obtidas foram inoculadas em folhas de *Citrus spp.* as quais reproduziram sintomas característicos de HLB. Já em frutos, os sintomas não foram observados em função da pouca idade das plantas testadas. Apesar do sucesso parcial obtido pelos autores, outros grupos ainda não obtiveram os mesmos resultados, tornando assim um dos fatores limitantes para o seu completo estabelecimento.

3 ARTIGO A

OCORRÊNCIA DE HLB EM REGIÕES CITRÍCOLAS DO ESTADO DO PARANÁ

OCORRÊNCIA DE HLB EM REGIÕES CITRÍCOLAS DO ESTADO DO PARANÁ

3.1 RESUMO

Resumo

Huanglongbing (HLB) é uma das mais importantes doenças dos citros no mundo na atualidade. O HLB é causado pelas bactérias '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*', que colonizam os vasos do floema das plantas cítricas (*Citrus* spp.). Essas bactérias têm como vetores os psilídeos *Trioza erytreae* Del Guercio e *Diaphorina citri* Kuwayana. '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*' foram detectadas no Brasil em 2004, no Estado de São Paulo. No Paraná, plantas com sintomas de HLB foram observadas inicialmente no município de Altônia, na região Noroeste do Estado, em dezembro de 2006. A partir de então, a doença também foi constatada na região Norte, uma das principais regiões citrícolas do Estado. Até o momento, não existem medidas para o controle efetivo do HLB. O manejo da doença tem compreendido, basicamente, a identificação e eliminação de plantas sintomáticas, em conjunto com o controle do inseto vetor. Desta forma, a identificação e o diagnóstico precoces de plantas doentes é de extrema importância para conter o avanço do HLB. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência do HLB em regiões citrícolas do estado do Paraná, a partir de amostras coletadas por produtores e pessoal técnico do setor privado. Folhas com sintomas suspeitos de HLB foram coletadas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Paraná e encaminhadas ao laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, PR. Todas as amostras foram identificadas com informações referentes a sua origem, como município, nome do proprietário, nome da propriedade, cultivar de citros, ano de plantio, número de plantas por talhão e localização da planta no talhão. O diagnóstico foi realizado por meio da PCR utilizando primers específicos para as três espécies de '*Ca. Liberibacter*' e também para fitoplasma. O levantamento foi realizado no período de agosto de 2007 a agosto de 2011, onde um total de 728 amostras foram examinadas para o diagnóstico de HLB. Desse total, 61,5% foram positivas para '*Ca. Liberibacter asiaticus*', a única espécie detectada até o momento no Estado. Foram avaliadas amostras de citros provenientes de 192 pomares de 47 municípios das regiões Norte, e Noroeste do estado do Paraná. Sendo que o HLB foi constatado em amostras de 37 municípios. O HLB foi diagnosticado em laranja Pêra (50,0%), Valência (17,7%), Iapar 73 (16,0%) e Folha Murcha (9,2%). Do total de amostras positivas para HLB, 61,30% foi detectado em copas de laranjas doce enxertadas sobre o porta-enxerto limão cravo. Plantas com idade entre 6 e 10 anos foram as mais avaliadas, correspondendo a 34% do total de amostras positivas.

Palavras – chave: Huanglongbing. '*Candidatus liberibacter asiaticus*'. *Citrus* spp.

OCCURRENCE OF HLB IN CITRUS GROWING AREAS OF THE STATE OF PARANA

Abstract

Huanglongbing (HLB) is the most important disease of citrus around the world. The disease is caused by the bacteria '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' and '*Ca. Liberibacter americanus*', which colonize the phloem vessels of the citrus trees (*Citrus* spp.). The bacteria are transmitted by the psyllids *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayana. '*Ca. Liberibacter asiaticus*' and '*Ca. Liberibacter americanus*' were detected for the first time in Brazil in 2004, in the State of São Paulo. In Parana, citrus trees with HLB symptoms were first observed in the the municipality of Altonia, in the Northwest region of the State, in December 2006. Since then, the disease was also detected in the North region of Parana, one of the most important citrus growing areas of the State. There is no efective measures for the control of the disease. Therefore, HLB management involves the identification and elimination of diseased trees, as well as control of the insect vector. The early identification of diseased citrus trees is of utmost importance for prevention of disease spread. The objective of this work was to survey the incidence of the disease in different citrus growing areas of Parana. Leaf samples from plants suspected to have HLB were examined by PCR with specific primers for the three species of '*Ca. Liberibacter*'. The HLB survey was carried out during the period of August 2007 through August 2011. A total of 728 samples were examined, and 61.5% showed positive results for '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. '*Ca. Liberibacter asiaticus*' was the only species associated with HLB in Parana. Samples were collected from 192 orchards, comprising 47 municipalities of the North, Northeast and West regions of the State. HLB was detected in samples from 37 municipalities. In regard to citrus cultivars, HLB was detected in the sweet oranges Pera (50,0%), Valencia (17,7%), Iapar 73 (16,0%) and Folha Murcha (9,2%). The disease was not detected in samples of *Murraya paniculata*. Among the samples with positive results for HLB, 61.30% was of sweet Orange trees grafted onto Rangpur lime. The age of the citrus trees ranged from 0 to 20 years old, thus 34% of the samples were from trees 6 to 10 years old.

Key – words: Huanglongbing. '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Citrus* spp.

3.2 INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é uma das mais importantes doenças dos citros no mundo. O HLB é causado pela bactéria '*Candidatus Liberibacter spp.*', que coloniza os vasos do floema das plantas cítricas (*Citrus* spp.), onde se multiplica e se distribui por toda a planta (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). Três espécies da bactéria estão associadas ao HLB, '*Ca. Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*' (COLLETA-FILHO et al., 2004; GARNIER;

DANEL; BOVÉ, 1984; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; TEIXEIRA et al, 2005b). A transmissão da bactéria ocorre por meio de material propagativo contaminado (McCLEAN; OBERHOLZER, 1965) e também por insetos vetores como, *Trioza erytreae* Del Guercio para a espécie 'Ca. Liberibacter africanus' e *Diaphorina citri* Kuwayana para 'Ca. Liberibacter asiaticus' e 'Ca. Liberibacter americanus' (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; YAMAMOTO et al., 2006).

Os sintomas de HLB são caracterizados pela presença de folhas com aspecto mosqueado, frutos pequenos e deformados com sementes abortadas e seca de ramos (BOVÉ, 2006). Ainda não são conhecidas fontes de resistência ao HLB e todas as espécies e variedades cítricas cultivadas são suscetíveis ao 'Ca. Liberibacter spp.' (DA GRAÇA; KORSTEN, 2004). As perdas causadas pela doença variam de 30 a 100% na produção de frutos, tornando normalmente inviável a exploração comercial de pomares cítricos (DA GRAÇA 1991). Além das plantas cítricas, 'Ca. Liberibacter spp.' têm também como hospedeiros outras espécies da família Rutaceae, incluindo a planta ornamental falsa murta (*Murraya paniculata*), amplamente utilizada em arborização de ruas, praças e jardins do Brasil e de outros países (LOPES; MARTINS; FRARE, 2005).

No Brasil, o HLB foi detectado pela primeira vez no estado de São Paulo, em 2004 e duas espécies da bactéria foram associadas à doença, 'Ca. Liberibacter asiaticus' e 'Ca. Liberibacter americanus', ambas transmitidas por *D. citri* (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a,b). Ainda no estado de São Paulo, um fitoplasma foi encontrado em citros associado a sintomas semelhantes ao do HLB (TEIXEIRA et al., 2008). No Paraná, plantas com sintomas de HLB foram observadas inicialmente no município de Altônia, na região Noroeste do Estado, em dezembro de 2006 e sua confirmação foi realizada em maio de 2007 (NUNES et al., 2007). A partir de então, a doença também foi constatada na região Norte, uma das principais regiões citrícolas do Estado (NUNES et al., 2010).

Até o momento não existem medidas para o controle efetivo do HLB. O manejo da doença tem compreendido, basicamente, a identificação e eliminação de plantas sintomáticas, em conjunto com o controle do inseto vetor (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2007). O diagnóstico baseado em observações visuais contribui na tentativa de identificar plantas doentes com o objetivo de conter o avanço do HLB nos pomares. No entanto, as dificuldades em identificar as plantas doentes com base em observações visuais é um fator limitante, uma vez que em estágios iniciais,

os sintomas não são evidentes ou ainda podem ser confundidos com outros problemas, como por exemplo sintomas de deficiências nutricionais (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). Outra forma utilizada para diagnosticar plantas doentes é baseada em procedimentos laboratoriais, principalmente na PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), que é uma técnica altamente sensível e específica para detecção dos agentes causais do HLB (HOCQUELLET; BOVÉ; GARNIER, 1999; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1996).

O estado do Paraná conta com três laboratórios devidamente credenciados pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SEAB) para realização de diagnóstico do HLB, sendo um deles o Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), localizado em Londrina, PR (NUNES et al., 2010). Desta forma, o Laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) atua oficialmente no diagnóstico de HLB, e também no desenvolvimento de pesquisas sobre a doença, e tem contribuído com os produtores e diversos setores da iniciativa privada, dando suporte na tomada de decisão para aplicação de medidas de prevenção e controle da doença e, com o objetivo maior de proteger a citricultura paranaense do desenvolvimento epidêmico da HLB (NUNES et al., 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência do HLB em regiões citrícolas do estado do Paraná a partir de amostras coletadas por produtores e pessoal técnico do setor privado.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostragem

Folhas com sintomas suspeitos de HLB foram coletadas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Paraná, por produtores e agentes técnicos do setor privado. Essas amostras foram encaminhadas ao laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, para o diagnóstico da doença HLB. Para realização do diagnóstico de HLB, todas as amostras foram identificadas com informações referentes a sua origem, como município, nome do proprietário, nome da propriedade, cultivar de citros, ano de plantio, número de plantas por talhão e localização da planta no talhão. Durante todo

o período antes do processamento, as amostras foram mantidas em geladeira a temperatura de 5 a 8 °C, para preservação das suas características antes da realização dos testes laboratoriais.

3.3.2 Extração de DNA

O DNA total das amostras cítricas foi extraído utilizando o protocolo desenvolvido por Murray e Thompson (1980) com modificações. Para a extração de DNA das plantas, 0,5 g de nervura central e pecíolos foram removidos das folhas, segmentados e triturados em almofariz, contendo 3,5 mL de tampão de extração [0,7 M NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA e 1% 2 β -mercaptoetanol]. O triturado foi transferido para microtubos de 2,0 mL e estes foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos, com agitação por inversão aos 15 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm (6.700 g) e o sobrenadante transferido para novos tubos, aos quais foram acrescentados 500 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguido de homogeneização em vortex. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa transferida para novos tubos. O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volume de isopropanol gelado. A solução foi mantida a -20 °C por 30 minutos e o DNA recuperado por centrifugação a 14.000 (13.140 g) rpm por 20 minutos. O *pellet* foi lavado pela adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm (13.140 g) e o processo foi repetido mais uma vez. O '*pellet*' foi ressuspenso em 100 μ L de água ultra-pura. A qualidade e quantidade do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 1% e visualização em transiluminador com luz ultravioleta depois que o DNA foi corado com brometo de etídio. O DNA foi estocado a -20 °C para posterior utilização.

3.3.3 Reação da Polimerase em Cadeia

O DNA de todas as amostras foi analisado pela reação de PCR com primers específicos para detecção de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*'. As sequências dos primers para '*Ca. Liberibacter asiaticus*' RPLA2 (5' – TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT – 3') e RPLJ5 (5' – ACA AAA GCA GAA

ATA GCA CGA ACA A – 3') amplificam fragmento de aproximadamente 703 pares de base (HOCQUELLET et al., 1999). Para '*Ca. Liberibacter americanus*', os primers GB1 (5'– AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT – 3') e GB3 (5'– CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG – 3') amplificam fragmento de 1.027 pares de bases (TEIXEIRA et al., 2005b). Para cada reação de PCR foi utilizado 1 µL de DNA em 39 µL da solução de reação. A solução para a reação de cada amostra continha 4,0 µL buffer 10X (Invitrogen, CA, EUA); 1,6 µL dNTP 5 mM (Invitrogen, CA, EUA); 1,6 µL MgCl₂ 50 mM; 0,2 µL de cada primer (100 mM); 30,7 µL H₂O Milli-Q autoclavada, e 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U/µL (Invitrogen, CA, EUA). Em todos os experimentos, foi adicionado um controle negativo onde o DNA foi substituído por H₂O Milli-Q e controles positivos para '*Ca. Liberibacter americanus*' e '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. As reações foram colocadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) com desnaturação inicial de 30 segundos a 94 °C, hibridação dos iniciadores a 62 °C durante 30 segundos, extensão a 72 °C durante 1 minutos, seguido de 35 ciclos.

Para pesquisar a presença de fitoplasma, foram utilizados os primers D7f2 (5' – ATG TGT AGC TGG ACT GAG AGG – 3') e D7r2 (5' – CTA AAG TGC TCA CCA TTA CGT GG – 3') que amplificam sequência de 857 pb (TEIXEIRA et al., 2008). A amplificação foi de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 62 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos, seguidos de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Para todas as amostras foram aplicados 20 µL da reação em gel de agarose a 1% com tampão SB 1X (borato de sódio). O gel foi corado com brometo de etídio a 5 µg/mL e foto documentado com o programa L-Pix Image (Loccus Biotecnologia).

3.4 Resultados e Discussão

Entre agosto de 2007 a agosto de 2011, 719 amostras foram examinadas para diagnóstico de HLB. Do total de 719 amostras examinadas, 62,3 % apresentaram resultado positivo para presença de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (Tabela 3.1). Entretanto, em nenhuma amostra foi constatada a presença de '*Ca. Liberibacter americanus*' ou de fitoplasma. A quantidade de amostras submetidas

para análise de HLB foi em média de 180 por ano, com exceção de 2007, quando foram analisadas apenas sete amostras. As proporções de amostras positivas para HLB nos anos de 2008 a 2011 foram de 56,1%, 58,9%, 61,4% e 73,6%, respectivamente (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Número de amostras de *Citrus* spp. submetidas à análise de PCR para diagnóstico de ‘*Ca. Liberibacter* spp.’ durante o período de agosto de 2007 a agosto de 2011.

| Ano de avaliação | Nº de amostras | % de amostras positivas |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 2007 | 7 | 100,0 |
| 2008 | 173 | 56,1 |
| 2009 | 207 | 58,9 |
| 2010 | 184 | 61,4 |
| 2011 | 148 | 73,6 |
| Total | 719 | 62,3 |

Foram examinadas amostras de citros provenientes de 47 municípios das regiões Norte, Noroeste e Oeste do estado do Paraná. A presença de HLB foi constatada em amostras de 37 municípios (Tabela 3.2). No ano de 2006, o HLB foi relatado pela primeira vez no estado do Paraná, estando presente apenas no município de Altônia, na região Noroeste do Estado (Figura 3.1) (NUNES et al., 2007). Já no ano de 2007, a presença da doença foi confirmada em pomares de mais três municípios da região Noroeste (Figura 3.1). Nos anos de 2008, 2009, 2010 e 2011, o HLB foi diagnosticado em mais 9, 12, 7 e 6 municípios, respectivamente (Figura 3.1).

Com relação ao número de propriedades, plantas de citros de 192 propriedades foram avaliadas sendo que em 133 foram encontradas plantas com resultados positivos para HLB (Tabela 3.2). O maior número de amostras avaliadas na região Norte, deve-se a maior área de citros plantada, como também por ser atendida pela Cooperativa de Rolândia (COROL), que tem uma participação efetiva no desenvolvimento da citricultura no Estado. O município de Rolândia, localizado na região Norte do Estado, foi aquele que apresentou o maior número de propriedades avaliadas, com 57 propriedades, bem como de amostras submetidas para avaliação, correspondendo a 34,5% do total das amostras examinadas e 36,4% destas positivas para HLB (Tabela 3.2).

O HLB foi diagnosticado em diferentes cultivares de laranja doce, tangerinas, limas ácidas e porta-enxertos de citros. O maior número de amostras examinadas para presença de HLB foi para as cultivares de laranja Pêra, Valência, IAPAR 73 e Folha Murcha com 50,0%, 17,7%, 16,0% e 9,2% das amostras examinadas, respectivamente (Figura 3.2). A laranja Pêra foi a cultivar com o maior número de amostras positivas para HLB, com 54,6% do total de amostras positivas (Figura 3.2). A maior incidência de plantas doentes para a cultivar Pêra deve-se ao fato de ser a cultivar mais plantada nos pomares paranaenses (STENZEL et al., 2005). Entretanto, todas as espécies e cultivares de citros são susceptíveis ao HLB (GARNIER; DANIEL; BOVE, 1984).

Tabela 3.2 – Origem das amostras de citros examinadas para diagnóstico de HLB, durante os anos de 2007 a 2011.

| Município | Número de amostras examinadas | Número de propriedade | Número de amostra positiva para HLB | Número de propriedade positiva para HLB |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|---|
| Região Norte | | | | |
| Alvorada do Sul | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Arapongas | 22 | 5 | 16 | 5 |
| Assaí | 4 | 3 | 4 | 3 |
| Astorga | 6 | 3 | 5 | 2 |
| Bandeirantes | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Barra do Jacaré | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Bela Vista do Paraíso | 27 | 2 | 15 | 1 |
| Bom Sucesso | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Cambará | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Cambé | 44 | 13 | 33 | 11 |
| Centenário do Sul | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Congoinhas | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Cornélio Procópio | 5 | 3 | 3 | 1 |
| Ibiporã | 5 | 4 | 3 | 2 |
| Ivaiporã | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Jaguapitã | 122 | 13 | 73 | 12 |
| Jataizinho | 17 | 4 | 9 | 3 |
| Lerrovile | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Londrina | 17 | 9 | 11 | 7 |
| Lunardeli | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Mauá da Serra | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Mirassolva | 6 | 1 | 6 | 1 |
| Nova Fátima | 6 | 1 | 6 | 1 |
| Pitangueiras | 85 | 10 | 33 | 7 |
| Prado Ferreira | 13 | 6 | 10 | 4 |
| Primeiro de Maio | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Rancho Alegre | 14 | 6 | 5 | 3 |

| | | | | |
|--------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Rolândia | 248 | 57 | 163 | 37 |
| Sabáudia | 12 | 7 | 9 | 5 |
| Santa Cecília do Pavão | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Santa Fé | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Santa Mariana | 4 | 3 | 3 | 2 |
| São Sebastião da Moreira | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Sertaneja | 5 | 1 | 5 | 1 |
| Sertanópolis | 5 | 5 | 1 | 1 |
| Santo Antonio do Paraíso | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Uraí | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sub-Total | 691 | 178 | 427 | 123 |

Continua...

Continuação...

| Município | Número de amostras examinadas | Número de propriedade | Número de amostra positiva para HLB | Número de propriedade positiva para HLB |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|--|
| Região Noroeste | | | | |
| Altônia | 4 | 3 | 4 | 3 |
| Alto Parará | 8 | 3 | 4 | 2 |
| Cidade Gaúcha | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Guairaçá | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Marilena | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Nova Londrina | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Paraíso do Norte | 2 | 1 | 2 | 1 |
| Paranavaí | 8 | 1 | 8 | 1 |
| São Jorge do Patrocínio | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Sub-total | 32 | 13 | 21 | 10 |
| Região Oeste | | | | |
| Cascavel | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Sub-total | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Total | 719 | 192 | 448 | 133 |

Os dados apresentados sobre os porta-enxertos se referem aos exames realizados para a copa cítrica. Desta forma, o porta-enxerto com maior incidência de HLB foi o limão-cravo com 369 positivas em um total de 602 amostras avaliadas, correspondendo a 61,30% de amostras positivas para a doença. Os demais porta-enxertos, como citromelo Swingle, tangerinas Sunki e Cleópatra, e limão Rugoso somaram 128 amostras com 78 positivas, correspondendo a 60,94% de amostras positivas (Figura 3.3). Desta forma, não foi observada tendência a maior incidência de HLB em plantas cítricas enxertadas sobre determinado porta-

enxerto.

Figura 3.1 – Ocorrência de HLB em municípios amostrados do Estado do Paraná. Os municípios são indicados pelos números: 1, Altônia; 2, São Jorge do Patrocínio; 3 Paranaíba; 4, Guairaçá; 5, Alto Paraná; 6, Cambé; 7, Jataizinho; 8, Londrina; 9, Paraíso do Norte; 10, Pitangueiras; 11, Rolândia; 12, Sabáudia; 13, Sertanópolis; 14, Alvorada do Sul; 15, Arapongas; 16, Astorga; 17, Bandeirantes; 18, Bela Vista do Paraíso; 19, Cornélio Procópio; 20, Ibiporã; 21, Jaguapitã; 22, Mirassolva; 23, Prado Ferreira; 24, Santo Antonio do Paraíso; 25, Uraí; 26, Assaí; 27, Nova Fátima; 28, Primeiro de Maio; 29, Rancho Alegre; 30, Santa Fé; 31, Santa Mariana; 32, Sertaneja; 33, Bom Sucesso; 34, Cambará; 35, Cidade Gaúcha; 36, Congoinhas; 37, Santa Cecília do Pavão.

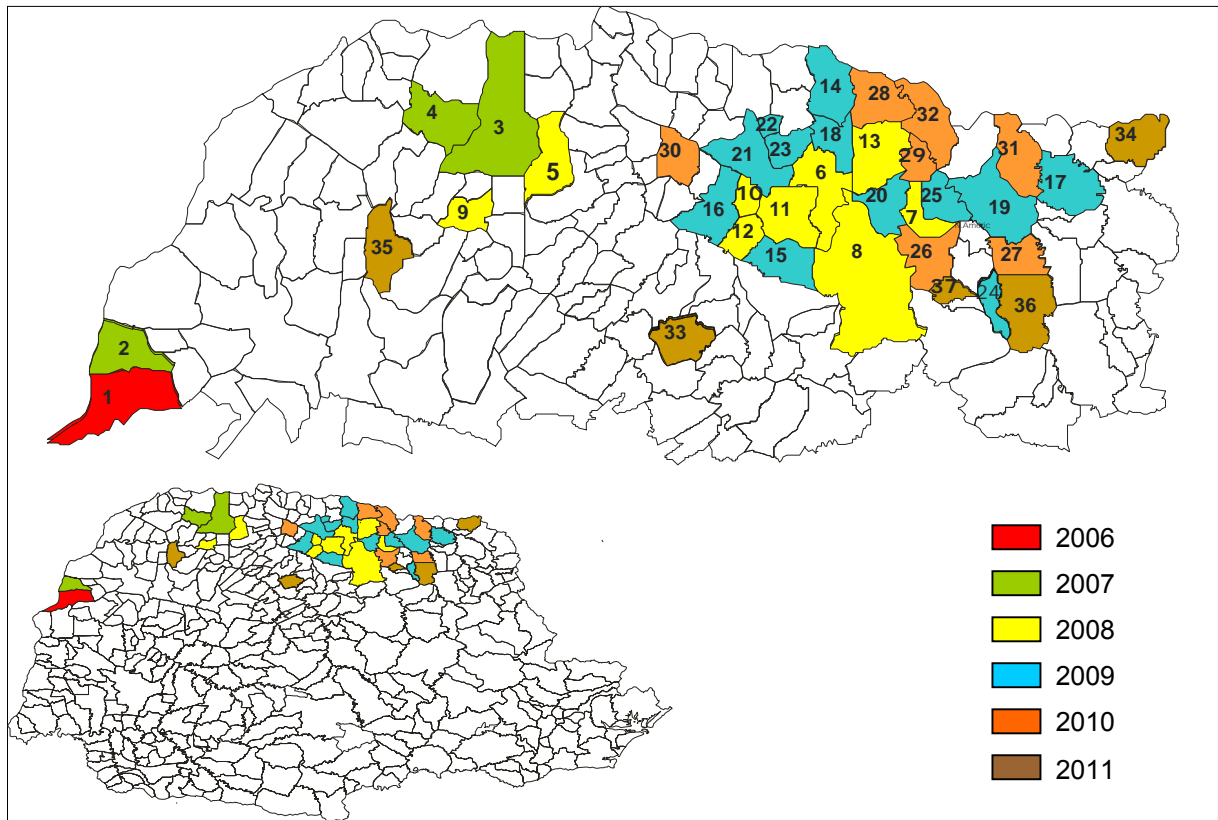


Figura 3.2 – Número de amostras de citros por cultivar submetidas à análise de PCR para diagnóstico de 'Ca. Liberibacter spp.' durante o período de agosto de 2007 a agosto de 2011.

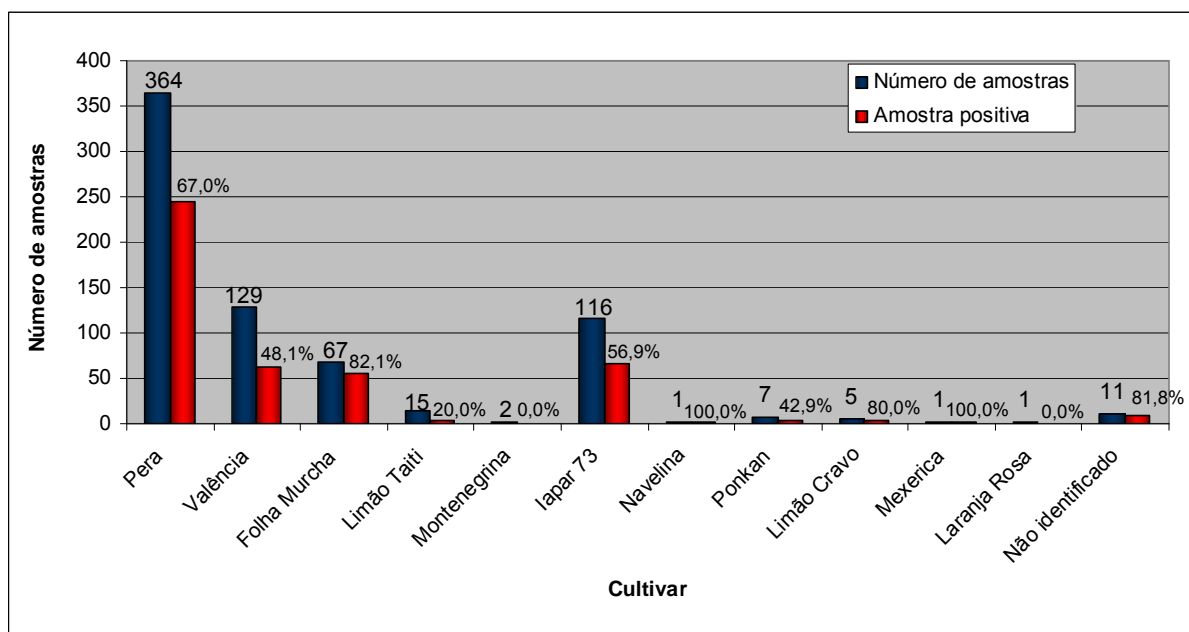
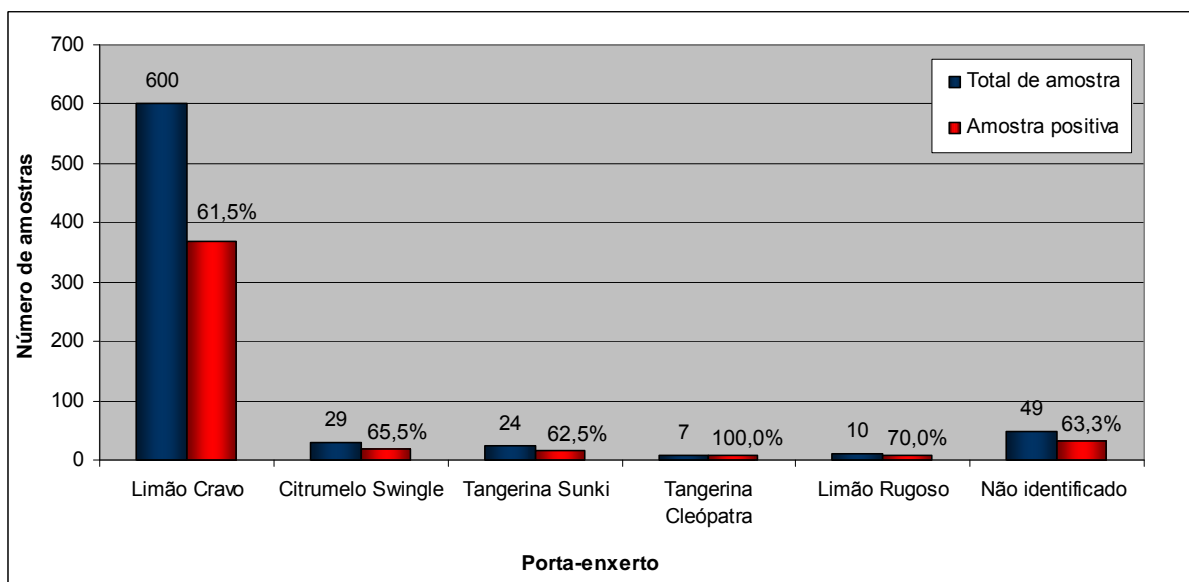


Figura 3.3 – Relação entre cultivares de porta-enxerto de citros e amostras de copa submetidas à análise de PCR para diagnóstico de 'Ca. Liberibacter spp.' durante o período de 2007 a agosto de 2011.



Quanto à idade das plantas avaliadas, esta variou de 0 a 20 anos, sendo que plantas com idade entre 6 e 10 anos foram as mais avaliadas, com 233 amostras sendo 152 positivas para HLB, e correspondendo a 65,24% de amostras

positivas (Figura 3.4). No ano de 2010 plantas mais jovens, com idade entre 3 e 5 anos, foram as que apresentaram maior número de amostras positivas (Figura 3.5). Já em 2011, plantas com idade entre 0 e 2 anos vem apresentando um acréscimo quanto ao número de amostras positivas (Figura 3.5). Essa grande proporção de amostras positivas para HLB entre plantas com até 2 anos de idade é preocupante pois evidencia a ocorrência de contaminação logo nos primeiros anos de vida do pomar e consequentemente um não efetivo trabalho de prevenção da doença.

Figura 3.4 – Idade das plantas de citros submetidas à análise de PCR para diagnóstico de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ durante o período de agosto de 2007 a agosto de 2011.

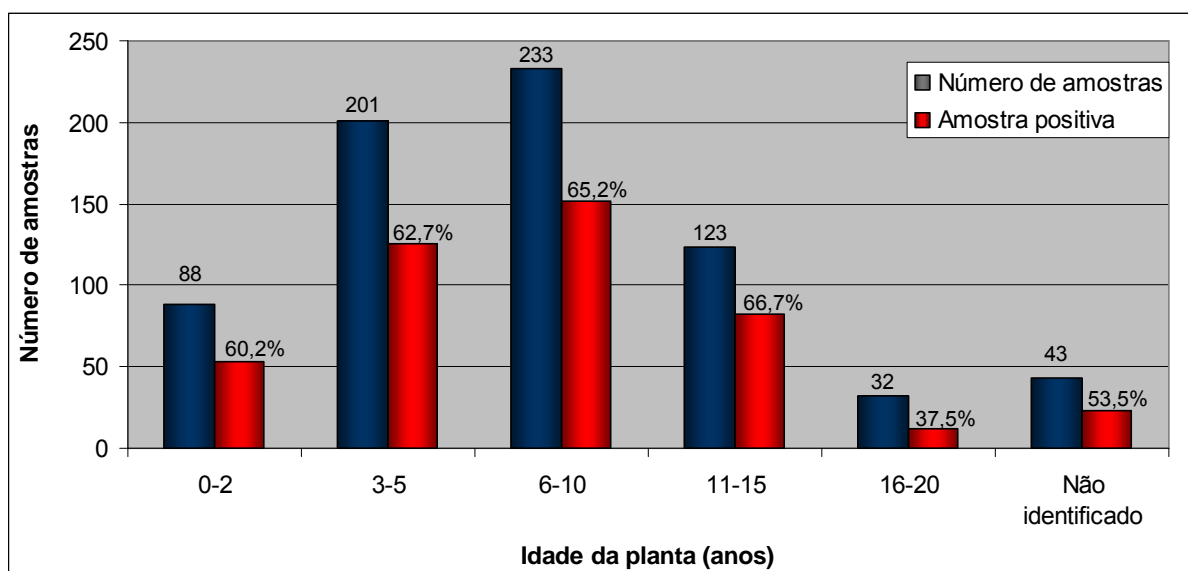
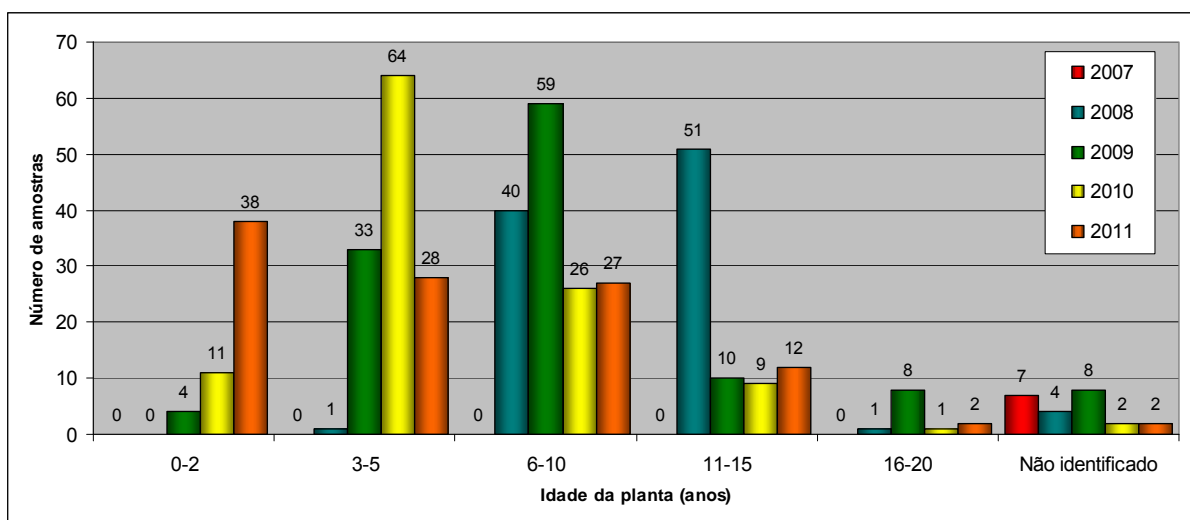


Figura 3.5 – Número de amostras positivas para ‘*Ca. Liberibacter spp.*’ em função da idade das plantas de citros submetidas à análise de PCR durante o período de agosto de 2007 a agosto de 2011.



3.5 CONCLUSÕES

Até o momento, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ foi a única espécie identificada nas principais regiões produtoras de citros do estado do Paraná causando HLB.

A presença de HLB foi constatada em plantas de todas as cultivares de *Citrus spp.* avaliadas das regiões Norte, Noroeste e Oeste do Paraná.

Não foi observada relação entre os cultivares de porta-enxertos utilizados nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Paraná e a ocorrência de HLB na copa cítrica.

O HLB ocorre de forma igual em plantas cítricas independente da idade da planta nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Paraná.

4 ARTIGO B**DIVERSIDADE GENÉTICA DE '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' PRESENTE
NO ESTADO DO PARANÁ**

DIVERSIDADE GENÉTICA DE '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' PRESENTE NO ESTADO DO PARANÁ

4.1 RESUMO

Resumo

Huanglongbing (HLB) é uma das doenças mais devastadoras para produção de citros em todo o mundo. Três espécies bacterianas estão associadas ao HLB, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. Liberibacter americanus*' e '*Ca. Liberibacter africanus*'. Atualmente, a diversidade de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' presente em diferentes regiões citrícolas tem sido estudada utilizando diversas técnicas moleculares para investigação de diferentes regiões do genoma bacteriano, incluindo genes da proteína ribossomal (*rplAJ*) e da proteína de membrana externa (*omp*). Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a diversidade genética de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' presente no estado do Paraná por meio das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento. Produtos de PCR obtidos da amplificação com os primers HP1/Lp1c foram digeridos com as enzimas *ApoI*, *HinI* e *TaqI*. Os primers OMP1F/OMP1R e A2/J5 foram utilizados para amplificar fragmentos de 600 e 703 pb, respectivamente. Os produtos foram purificados e utilizados diretamente no sequenciamento. Na análise de PCR-RFLP, foram avaliados 52 amostras de diferentes municípios das regiões Norte e Noroeste do Estado. Para cada enzima utilizada foi obtido um único perfil genético, sendo que para a enzima *ApoI* foram obtidos cinco fragmentos de aproximadamente 250, 270, 320, 640 e 790 pb, com a enzima *HinI* foram obtidos seis fragmentos de 150, 180, 220, 270, 300 e 320 pb e com a enzima *TaqI* geraram cinco fragmentos de 170, 250, 320, 450 e 580 pb. No entanto, com a enzima *TaqI*, o perfil obtido foi semelhante a '*Ca. Liberibacter asiaticus*' do Vietnã, Tailândia, Filipinas, Taiwan e Behai na China, porém foram distintos com a de Yunnan na China, do Nepal e da Índia. Com relação ao sequenciamento, foram analisadas 20 amostras das quais tendo sido obtidas sequências de 484 pb para o gene *omp* e 31 amostras com sequências de 546 pb para os genes da proteína ribossomal. Essas sequências foram 100 % idênticas entre si para cada gene e obtiveram similaridade de 99 a 100% com amostras de outras regiões produtoras de citros. Com base nesses resultados é possível afirmar que pouca variabilidade genética existe entre '*Ca. Liberibacter asiaticus*' tanto no estado do Paraná como de outras localidades.

Palavras – chave: PCR-RFLP. Enzimas de restrição. Huanglongbing. Proteína de membrana externa.

GENETIC DIVERSITY OF '*CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS*' PRESENT IN THE STATE OF PARANA

Abstract

Huanglongbing (HLB) is the most important disease of citrus around the world. The disease is caused by the bacteria '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' and '*Ca. Liberibacter americanus*', which colonize the phloem

vessels of the citrus trees (*Citrus* spp.). In Parana, citrus trees with HLB symptoms were first observed in the the municipality of Altonia, in the Northwest region of the State, in December 2006. The genetic diversity of 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' has been studied by using different molecular techniques for investigation of different regions of the bacterial genome, including genes of ribosomal protein (*rplAJ*) and of the external membrane protein (*omp*). Therefore, the objective of this study was to investigate the genetic diversity of 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' present in the State of Parana, Brazil, by using PCR-RFLP and genome sequencing. PCR products obtained by amplification with the primers HP1/Lp1c were digested with the restriction enzymes *ApoI*, *HinI* e *TaqI*. The set of primers OMP1F/OMP1R and A2/J5 were used to amplified DNA fragments of 600 and 703 bp, respectively. The purified PCR products were sequenced. In the PCR-RFLP analysis, a total of 52 samples from different municipalities of the North and Northwest regions of Parana were examined. For each enzyme, only one genetic profile was observed. Thus, for *ApoI* restriction enzyme five DNA fragments were obtained with approximately 250, 270, 320, 640 and 790 bp, for *HinI* six fragments of 150, 180, 220, 270, 300 and 320 bp and for *TaqI* five fragments of 170, 250, 320, 450 and 580 bp. The *TaqI* digestion profile was identical to the 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' from Vietnam, Tailandia, Philipines, Taiwan e Behai (China), but different from the profile obtained for strains from Yunnan (China), Nepal, and India. In regard to genome sequencing, a total of 20 samples of 484 bp for the *omp* gene and 31 samples of 546 bp for the ribosomal protein were examined. These sequences were 100 % identical among them for each gene. A similarity between 99 and 100% was obtained for samples of 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' from other citrus growing areas. Based on these results, very low variability exists among the 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' present in different citrus growing areas, including the State of Parana.

Key – Words: PCR-RFLP. Restriction enzymes. Huanglongbing. External membrane protein.

4.2 INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é a mais severa doença que afeta a citricultura no mundo (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). A doença é causada por bactérias do grupo α -proteobactéria, limitada ao floema das plantas, fastidiosas, e denominadas de 'Candidatus *Liberibacter* spp.'. Três espécies bacterianas estão associadas ao HLB, 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*', 'Ca. *Liberibacter americanus*' e 'Ca. *Liberibacter africanus*' (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; TEIXEIRA et al., 2005b). 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' é a mais agressiva e está amplamente disseminada em diversas regiões produtoras de citros das Américas, Ásia e África (COLLETA-FILHO et al., 2004; JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). 'Ca. *Liberibacter americanus*' e 'Ca. *Liberibacter africanus*' estão presentes no Brasil e em países da África, respectivamente (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994;

TEIXEIRA et al., 2005b). ‘*Ca. Liberibacter* spp.’ associadas ao HLB são transmitidas por insetos vetores como *Diaphorina citri* (Kuwayama) para ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, e *Trioza erytreae* (Del Guercio) para ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; YAMAMOTO et al., 2006).

No Brasil, o HLB foi detectado pela primeira vez no estado de São Paulo, em 2004, mas acredita-se que os sintomas causados pela doença já haviam sido observados há mais tempo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a). No Paraná, a doença foi observada pela primeira vez no município de Altônia na região Noroeste do Estado, no final do ano de 2006 (NUNES et al., 2007). A partir desta primeira ocorrência, a doença já foi constatada em cerca de 54 municípios das principais regiões produtoras de citros do Paraná (NUNES et al., 2010).

Atualmente, a diversidade de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ presente em diferentes regiões citrícolas tem sido estudada utilizando diversas técnicas moleculares para investigação de várias regiões do genoma bacteriano, incluindo a região intergênica 16SrDNA-23SrDNA e genes da proteína ribossomal (*rpIAJ*), e do gene de proteína de membrana (*omp*) (SUBANDIYAH et al., 2000; DENG et al., 2008; BASTIANEL et al., 2005; FURUYA et al., 2010). Alguns trabalhos têm demonstrado que pouca variabilidade ocorre entre ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (DENG et al., 2008; TOMIMURA et al., 2009). Por outro lado, o gene *omp*, o qual codifica uma proteína de membrana externa em bactérias, tem apresentado diferenças suficientes para estudo de diversidade com ‘*Ca. Liberibacter* spp.’ (BASTIANEL et al., 2005). Essa proteína, em bactérias, está envolvida com a troca de nutrientes e solutos hidrofílicos com o ambiente externo e em alguns casos, pode estar relacionada com a patogenicidade (MANNING; RESCHKE; JUDD, 1998).

O conhecimento da diversidade de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ associados ao HLB em uma determinada região citrícola é de extrema importância para o manejo da doença e também pode facilitar o desenvolvimento de medidas efetivas para a sua prevenção e controle, além de diminuir as perdas ocasionadas pela presença do HLB nos pomares de citros.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi investigar a diversidade genética de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ presentes no estado do Paraná por meio da técnica de PCR-RFLP e de sequenciamento de regiões específicas do DNA

genômico.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Amostras de Plantas Cítricas Utilizadas Neste Estudo

Todos os DNAs utilizados neste estudo foram obtidos de amostras de plantas cítricas com suspeita de HLB, submetidas ao laboratório de Bacteriologia e Virologia do Instituto Agonômico do Paraná para o diagnóstico de HLB. As amostras provenientes do campo, foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas a 7 °C até o momento do processamento. Foram utilizados DNA de plantas de diferentes variedades de *Citrus* spp., idades e de diversos municípios das regiões Norte e Noroeste do Estado (Tabela 4.1). Foi incluído também nesse estudo DNA de planta de citros contaminada proveniente do município de Avaré no estado de São Paulo (Tabela 4.1).

4.3.2 Extração de DNA de Amostras de Plantas Cítricas

O DNA total das amostras cítricas foi extraído utilizando o protocolo desenvolvido por Murray e Thompson (1980) com modificações. Para a extração de DNA das plantas, 0,5 g de nervura central e pecíolos foram removidos das folhas, segmentados e triturados em almofariz, contendo 3,5 mL de tampão de extração [0,7 M NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA e 1% 2β-mercaptoetanol]. O triturado foi transferido para microtubos de 2,0 mL e estes foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos, com agitação por inversão aos 15 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm (6.700 g) e o sobrenadante transferido para novos tubos, aos quais foram acrescentados 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguido de homogeneização em agitador de tubos tipo 'vortex'. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm (13.140 g) e a fase aquosa transferida para novos tubos. O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volume de isopropanol gelado. A solução foi mantida a -20 °C por 30 minutos e o DNA recuperado por centrifugação a 14.000 rpm (13.140 g) por 20 minutos. O *pellet* foi lavado pela adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm (13.140 g) e o processo foi repetido mais uma vez. O *pellet* foi

ressuspenso em 100 μ L de água ultra-pura. A qualidade e quantidade do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta depois que o DNA foi corado com brometo de etídio. O DNA foi estocado a -20 °C para posterior utilização.

4.3.3 Protocolo de PCR para Detecção de 'Ca. Liberibacter Asiaticus'

O DNA de todas as amostras foi analisado por PCR utilizando '*primers*' específicos para 'Ca. Liberibacter asiaticus'. Para amplificação do gene *omp* de 'Ca. Liberibacter asiaticus' foi utilizado os '*primers*' HP1 (5' – GAT GAT AGG TGC ATA AAA GTA CAG AAG –3') e Lp1c (5' – AAT ACC CTT ATG GGA TAC AAA AA – 3'), que amplificam fragmento de 2.400 pb (BASTIANEL et al., 2005) e OMP1F (5' – GAT GAT AGG TGC ATA AAA GTA CAG AAG – 3') e OMP1R (5' – AATATTAAGCGTTGTCGGAG – 3') que amplificam fragmento de aproximadamente de 600 pb (AHMAD et al., 2009). Para amplificação de sequencias do gene *rpIAJ* foram utilizados os '*primers*' A2 (5' – TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT – 3') e J5 (5' – ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A – 3') que amplificam fragmento de 703 pb (HOCQUELLET et al., 1999). Para cada reação de PCR foi utilizado 1 μ L de DNA em 39 μ L da solução de reação. A solução para a reação de PCR de cada amostra continha 4,0 μ L de tampão 10X (Invitrogen); 1,6 μ L de dNTP 5 mM (Invitrogen); 1,6 μ L de MgCl₂ 50 mM; 0,2 μ L de cada primer (100 mM); 30,7 μ L de H₂O Milli-Q autoclavada, e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen). Em todos os experimentos de PCR, foram incluídos um controle negativo, onde o DNA foi substituído por H₂O Milli-Q e um positivo para 'Ca. Liberibacter asiaticus'. As amostras foram colocadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) com as seguintes condições para os '*primers*' que codificam o gene *omp*: 40 ciclos de 92 °C por 40 segundos, 55 °C por 40 segundos e 72 °C por três minutos, seguido pela extensão final de 72 °C por 10 minutos. Já para os primers A2/J5, as condições foram de 35 ciclos de 92 °C por 20 segundos, 62 °C por 20 segundos e 72 °C por 45 segundos.

4.3.4 Análise por PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A diversidade genética entre as amostras de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ foi investigada por meio da técnica de PCR-RFLP, analisando os genes que codificam a proteína de membrana externa *omp*. Os produtos de PCR amplificados com os primers HP1/Lp1c foram digeridos com as enzimas *ApoI*, *HinfI* e *TaqI*. A digestão foi feita em um volume final de 10 µL, contendo 2,5 unidades de cada endonuclease usando o tampão e temperatura recomendados pelo fabricante (Invitrogen). Os fragmentos de DNA produzidos pela digestão com enzimas de restrição foram separados em gel de agarose 2,0%, a 4 V/cm por 2 h, tendo sido incluído marcador de peso molecular 1 kb Plus (Amersham Biosciences). O material foi corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultra-violeta e fotodocumentado com o programa L-Pix Image (Loccus Biotecologia). Os padrões de PCR-RFLP, para cada enzima, foram baseados no número de bandas de DNA e sua posição no gel de agarose.

Tabela 4.1– Amostras de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ de diferentes regiões do Estado do Paraná, incluídos na análise por PCR-RFLP e sequenciamento dos genes que codificam a proteína de membrana externa e a proteína ribossomal.

| Amostra | Origem/Região | Cultivar de Citros | Ano de Plantio | RFLP | Sequenciamento | |
|---------|---------------------|--------------------|----------------|------|----------------|--------------|
| | | | | | <i>omp</i> | <i>rplAJ</i> |
| 1 | Altônia/NE | n.d. | n.d. | Sim | Sim | n.r. |
| 2 | Altônia/NE | n.d. | n.d. | Sim | n.r. | Sim |
| 3 | Paranavaí/NE | Pera | n.d. | Sim | Sim | n.r. |
| 8 | Paraíso do Norte/NE | n.d. | n.d. | Sim | n.r. | n.r. |
| 10 | Paranavaí/NE | Pera | n.d. | Sim | Sim | Sim |
| 11 | Paranavaí/NE | Pera | n.d. | Sim | n.r. | n.r. |
| 13 | Paranavaí/NE | Pera | n.d. | Sim | n.r. | n.r. |
| 14 | Paranavaí/NE | Pera | n.d. | Sim | n.r. | n.r. |
| 16 | Alto Paraná/NE | Pera | 2002 | Sim | Sim | Sim |
| 18 | Rolândia/N | lapar 73 | 1997 | Sim | n.r | Sim |
| 35 | Rolândia/N | lapar 73 | 1997 | n.r | Sim | n.r |
| 36 | Rolândia/N | lapar 73 | 1997 | Sim | n.r | n.r |
| 45 | Pitangueiras/N | Pêra | n.d. | n.r | Sim | n.r |
| 46 | Pitangueiras/N | Pera | n.d. | Sim | n.r | n.r |
| 76 | Cambé/N | Valência | 2003 | Sim | n.r | Sim |
| 109 | Sabáudia/N | Valência | n.d. | Sim | n.r | Sim |
| 112 | Rolândia/N | lapar 73 | 1997 | Sim | n.r | n.r |

| | | | | | | |
|-----|----------------|--------------|------|-----|------|------|
| 114 | Rolândia/N | lapar 73 | 1997 | Sim | n.r | n.r |
| 117 | Pitangueiras/N | Valência | n.d. | Sim | n.r | n.r |
| 119 | Alto Paraná/NE | n.d. | n.d. | Sim | n.r | Sim |
| 121 | Sertanópolis/N | Pera | 2001 | n.r | Sim | n.r |
| 139 | Pitangueiras/N | Pera | 2002 | Sim | n.r. | n.r |
| 147 | Cambé/N | Pera | 2003 | Sim | n.r | Sim |
| 150 | Rolândia/N | Folha Murcha | 1997 | Sim | n.r | Sim |
| 151 | Rolândia/N | Folha Murcha | 1997 | Sim | n.r | n.r. |
| 152 | Sabáudia/N | Valência | 1997 | Sim | n.r | Sim |
| 153 | Sabáudia/N | Valência | 1997 | Sim | n.r | n.r |
| 157 | Rolândia/N | Pera | 1997 | Sim | n.r | Sim |
| 175 | Pitangueiras/N | Valência | 1996 | Sim | n.r | Sim |
| 207 | Cambé/N | Folha Murcha | 2002 | Sim | n.r | n.r |
| 208 | Cambé/N | Folha Murcha | 2002 | Sim | n.r | n.r |
| 209 | Cambé/N | Folha Murcha | 2002 | Sim | n.r | n.r |
| 210 | Cambé/N | Folha Murcha | 2002 | Sim | n.r | n.r |
| 215 | Cambé/N | Valência | 2003 | Sim | Sim | Sim |
| 232 | Bandeirantes/N | Pera | 2006 | Sim | n.r | Sim |
| 233 | Pitangueiras/N | lapar 73 | 1997 | Sim | n.r | Sim |

Continua...

Continuação...

| Amostra | Origem/Região | Cultivar de Citros | Ano de Plantio | RFLP | Sequenciamento | |
|---------|----------------------------|--------------------|----------------|------|----------------|-------|
| | | | | | omp | rplAJ |
| 239 | Sabáudia/N | Valência | 1995 | Sim | n.r | Sim |
| 251 | Sto. Antonio do Paraíso/NE | lapar 73 | 2004 | Sim | Sim | Sim |
| 253 | Prado Ferreira/N | Pera | 2004 | Sim | Sim | Sim |
| 256 | Rolândia | Pera | 1991 | n.r. | n.r. | Sim |
| 258 | Sabáudia/N | Folha Murcha | 1996 | Sim | n.r | n.r |
| 259 | Sabáudia/N | lapar 73 | 1996 | Sim | n.r | Sim |
| 262 | Astorga/N | Pera | 2005 | Sim | n.r | n.r |
| 263 | Astorga/N | Pera | 2005 | Sim | n.r | Sim |
| 266 | Cambe/N | Pera | 2004 | Sim | n.r | Sim |
| 268 | Rolândia/N | Pêra Rio | 2002 | Sim | n.r | n.r |
| 274 | Rolândia/N | lapar 73 | 2005 | Sim | n.r | n.r |
| 293 | Prado Ferreira/N | Pêra | 2007 | Sim | n.r | n.r |
| 300 | Rolândia | Mexerica | n.d. | n.r. | n.r. | Sim |
| 302 | Cornélio Procópio/N | Pera | 2004 | Sim | Sim | Sim |
| 305 | Pitangueiras/N | Pera | 2002 | Sim | n.r. | Sim |
| 309 | n.d. | Ponkan | n.d. | Sim | Sim | n.r |
| 311 | Rolândia/N | Valência | 2003 | Sim | n.r | Sim |
| 312 | Rolândia/N | Pera | n.d. | Sim | n.r | n.r |
| 317 | Arapongas | Folha Murcha | n.d. | n.r | Sim | Sim |
| 323 | Arapongas/N | Folha Murcha | n.d. | Sim | n.r | n.r |
| 330 | Bela Vista do Paraíso/N | Pera | 2006 | Sim | Sim | Sim |

| | | | | | | |
|-----|------------------------|--------------|------|-----|-----|-----|
| 335 | Prado Ferreira/N | Pera | 2004 | n.r | n.r | Sim |
| 350 | Rolândia/N | n.d. | n.d. | Sim | n.r | Sim |
| 410 | Jataizinho/N | Valência | 2005 | n.r | Sim | n.r |
| 540 | Sertaneja/N | Pera | 2009 | n.r | Sim | n.r |
| 573 | Jataizinho/N | Pera | 2004 | n.r | Sim | n.r |
| 666 | Santa Helena/NO | Pera | n.d. | n.r | Sim | n.r |
| 738 | Santa Cecília do Pavão | Pera | 2008 | n.r | Sim | n.r |
| 748 | Londrina/N | Folha Murcha | 2007 | n.r | Sim | Sim |
| 757 | Ibiporã/N | Folha Murcha | 2007 | n.r | Sim | n.r |
| 790 | Bom Sucess/N | Ponkan | 1999 | n.r | Sim | n.r |
| - | Avaré/SP | Pera | n.d. | n.r | Sim | Sim |

n.d.: não determinado; NO, Região Noroeste/ N, Região Norte; n.r., não realizado

4.3.5 Sequenciamento e Análises das Sequências de DNA

Os produtos amplificados obtidos por PCR foram purificados, utilizando o kit PureLink Gel Extraction (Invitrogen) e o produto final foi quantificado em gel de agarose utilizando como padrão de comparação o marcador de peso molecular fago Lâmbda (λ). Os produtos foram sequenciados diretamente em ambas as orientações com os mesmos '*primers*' utilizados na PCR. As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando o Kit Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction v3.1 com o sequenciador ABI 3130 DNA Analyzers de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). As sequências gênicas obtidas foram comparadas entre si e também com as sequências depositadas no banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), através do sistema BLAST. O programa ClustalW foi utilizado para o alinhamento das sequências (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

Para confirmação dos '*contigs*', inicialmente foi feita análise comparativa através do Blastn com sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências obtidas e também com as depositadas no Genbank, utilizando o programa Mega 5.1 com o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Análises por PCR-RFLP de Amostras de 'Ca. Liberibacter Asiaticus' Baseadas no Gene *omp*

As análises de PCR-RFLP baseadas no gene *omp* foram realizadas com o objetivo de avaliar a variabilidade genética entre as amostras de 'Ca. Liberibacter asiaticus' provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná.

Neste trabalho, os primers HP1/Lp1c foram utilizados para amplificar sequências de amostras de 'Ca. Liberibacter asiaticus' obtidos de plantas de laranja doce de 52 amostras, provenientes de diferentes municípios das regiões Norte e Noroeste do estado do Paraná (Tabela 4.1). O fragmento obtido para todas as amostras foi de aproximadamente 2.400 pb (Figura 4.1).

Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *ApoI*, *HinfI* e *TaqI*. Estas enzimas foram selecionadas com base na análise *in silico* de sequências utilizando o programa NebCutter 2.0 (VINCZE; POSTAI; ROBERTS, 2003).

Com base no perfil de restrição, não foi possível observar variabilidade genética entre as 52 amostras de "Ca. Liberibacter asiaticus" examinadas (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4). Para cada enzima utilizada foi obtido apenas um único perfil genético. Os produtos de PCR de todas as amostras digeridos com a enzima *ApoI* geraram cinco fragmentos de aproximadamente 250, 270, 320, 640 e 790 pb (Figura 4.2), com a enzima *HinfI* foram seis fragmentos de 150, 180, 220, 270, 300 e 320 pb (Figura 4.3) e com a enzima *TaqI* foram cinco fragmentos de 170, 250, 320, 450 e 580 pb (Figura 4.4).

Figura 4.1– Gel de agarose dos produtos da amplificação da PCR com os primers HP1/Lp1c, mostrando o fragmento de 2,4 Kb de algumas das amostras, as quais foram utilizadas nas análises de PCR-RFLP. Linhas: M, marcador molecular 1kb plus, 1 a 9, DNA de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de diferentes amostras; 10, controle positivo da reação para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’; e 11, controle negativo da reação.

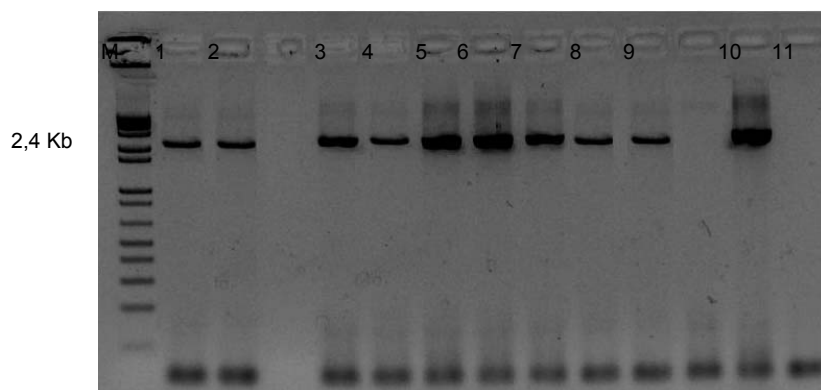


Figura 4.2 – Perfil de restrição dos produtos de PCR digeridos com a enzima *ApoI*. A amplificação foi obtida com os primers HP1/Lp1c, que codificam o gene da proteína de membrana *omp* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de amostras provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná. M, marcador de peso molecular 1kb Plus; 1, Altônia; 3, Paranavaí; 16, Alto Paraná; 18, Rolândia; 109, Sabáudia; 175, Pitangueiras; 232, Bandeirantes; 251, Santo Antonio do Paraíso; 262, Astorga; 293, Prado Ferreira; 302, Cornélio Procópio; 330, Bela Vista do Paraíso; e nd, produto não digerido.

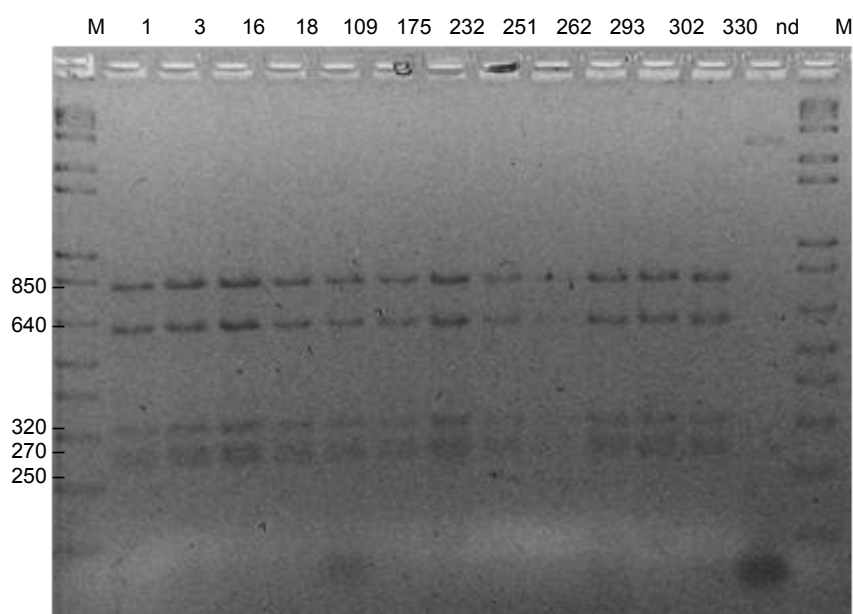


Figura 4.3 – Perfil de restrição dos produtos de PCR digeridos com a enzima *Hinf*I. A amplificação foi obtida com os primers HP1/Lp1c, que codificam o gene da proteína de membrana *omp* de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' de amostras provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná. M, marcador de peso molecular 1kb Plus; 1, Altônia; 3, Paranavaí; 16, Alto Paraná; 18, Rolândia; 109, Sabáudia; 175, Pitangueiras; 232, Bandeirantes; 251, Santo Antonio do Paraíso; 262, Astorga; 293, Prado Ferreira; 302, Cornélio Procópio; 330, Bela Vista do Paraíso; e nd, produto não digerido.

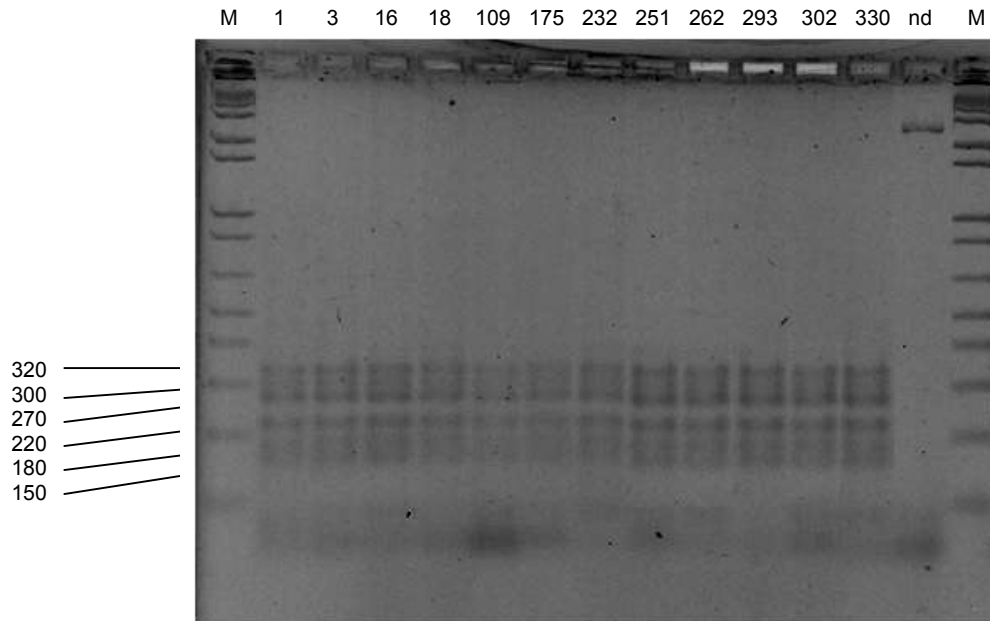
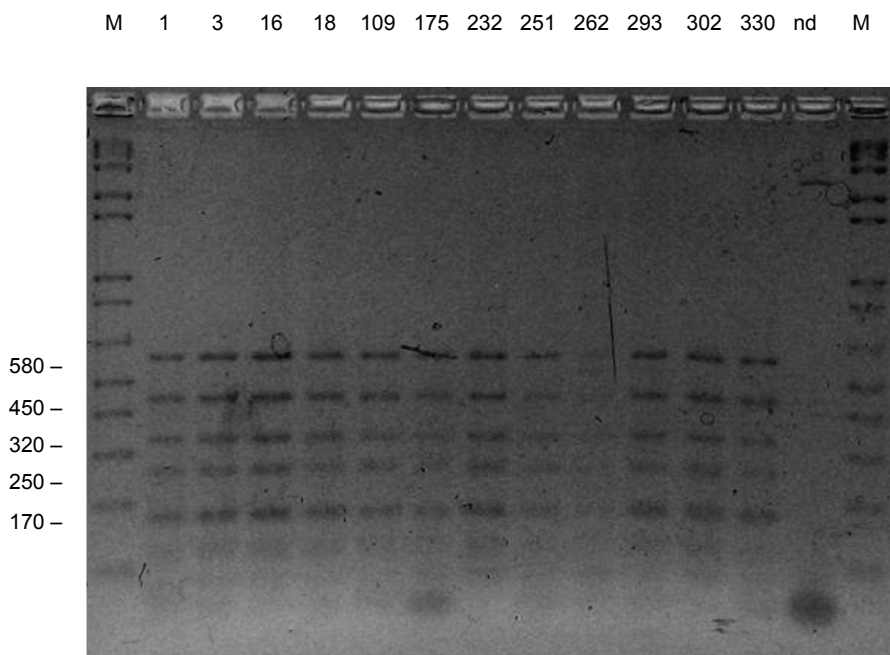


Figura 4.4 – Perfil de restrição dos produtos de PCR digeridos com a enzima *TaqI*. A amplificação foi obtida com os primers HP1/Lp1c, que codificam o gene da proteína de membrana *omp* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de amostras provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná. M, marcador de peso molecular 1kb Plus; 1, Altônia; 3, Paranavaí; 16, Alto Paraná; 18, Rolândia; 109, Sabáudia; 175, Pitangueiras; 232, Bandeirantes; 251, Santo Antonio do Paraíso; 262, Astorga; 293, Prado Ferreira; 302, Cornélio Procópio; 330, Bela Vista do Paraíso; e nd, produto não digerido.



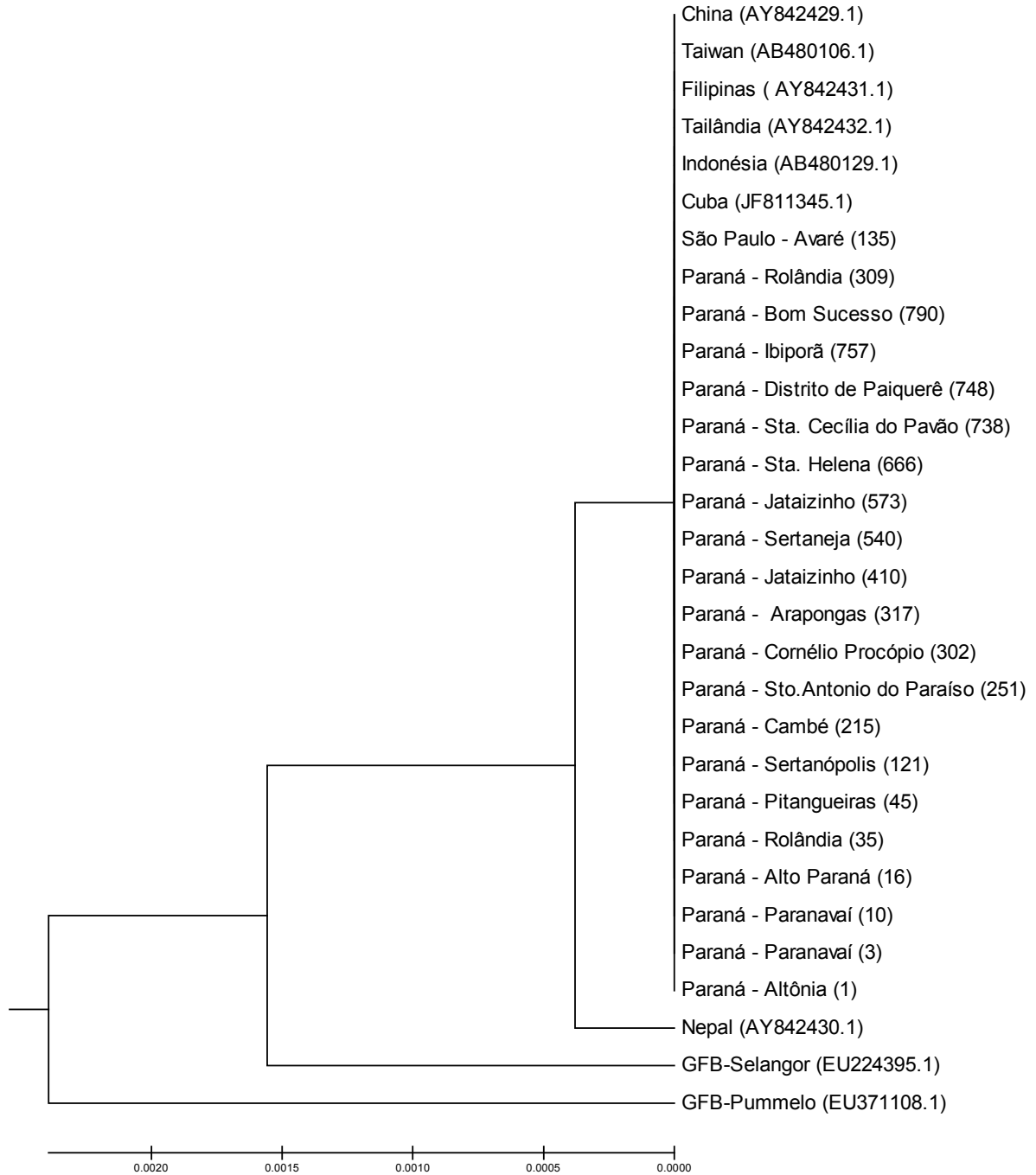
4.4.2 Análise Genética por Sequenciamento do Gene *omp* de ‘*Ca. Liberibacter Asiaticus*’

O sequenciamento do fragmento de 600 pb, o qual faz parte do gene *omp*, foi realizado diretamente do produto da reação de PCR purificado, utilizando os ‘primers’ OMP1F e OMP1R. Foram sequenciadas 21 amostras, provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná e uma amostra do município de Avaré do estado de São Paulo (Tabela 4.1). Para cada amostra foi obtida uma sequência de 484 pb e após o alinhamento utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), as sequências se mostraram idênticas entre si. Além disso, as sequências obtidas foram analisadas pelo programa Blastn (NCBI) e apresentaram 100% de identidade com o gene *omp* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Figura 4.5).

Ao comparar as sequências obtidas nesse trabalho com as

depositadas no banco GenBank, as amostras paranaenses mostraram 99% de identidade com as sequências de referência de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' do Nepal (AY842430.1), Irã (HQ267229.1), Índia (AY642159.1) e da Malásia (EU224395.1; EU371108.1) e 100% de identidade com a de Cuba (JF811345.1), Indonésia (AB480132.1), Tailândia (AY842432.1), Vietnã (AB480114), Filipinas (AY842431.1), China (AY842429.1) e Japão (AB48010.1) (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Árvore filogenética construída utilizando o método UPGMA para as sequências parciais do gene *omp* de '*Ca. Liberibacter asiaticus*', obtidas nesse trabalho com amostras dos estados do Paraná e São Paulo e também aquelas depositadas no banco de dados Genbank.

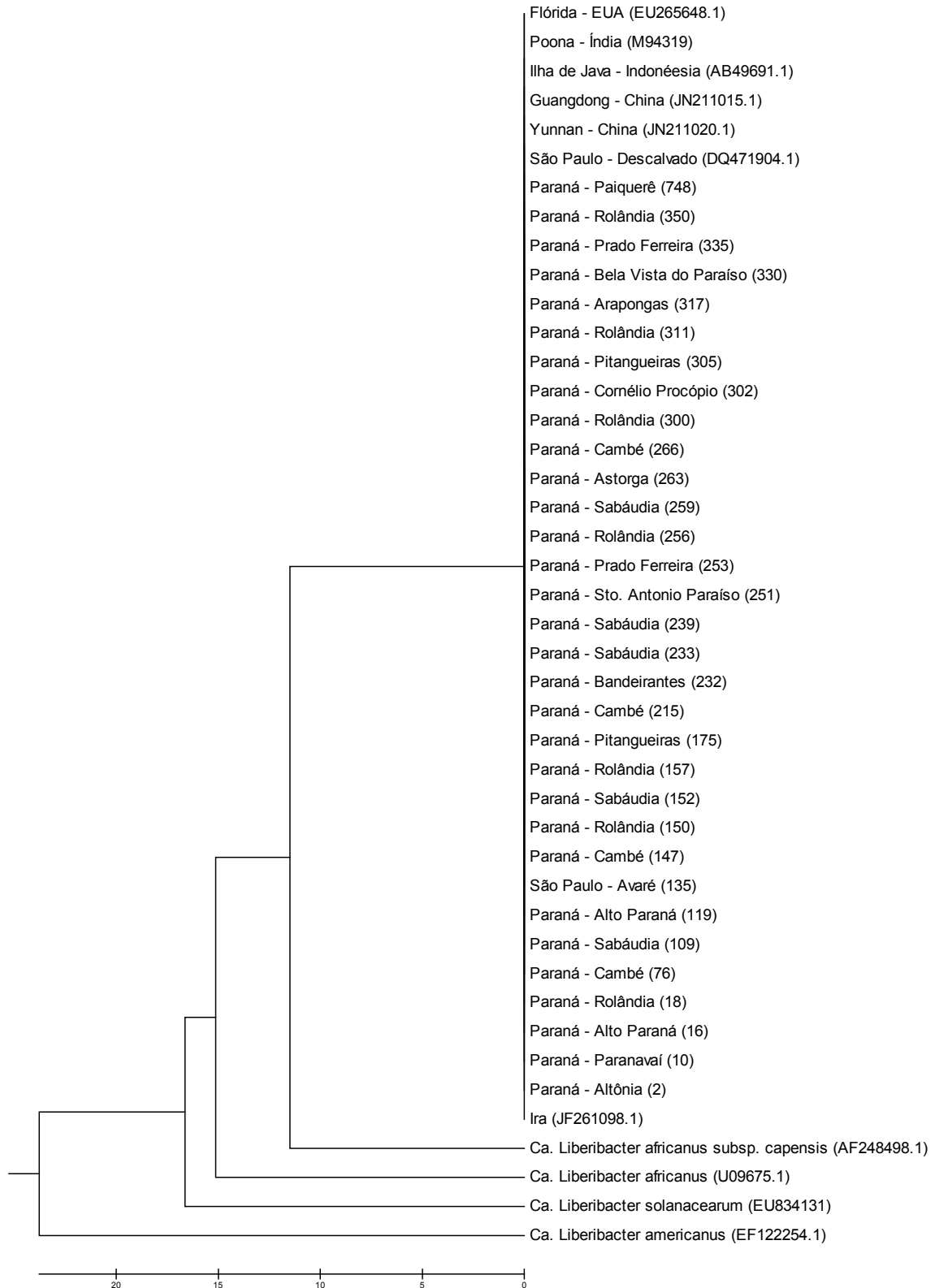


4.4.3 Análise Genética por Sequenciamento do Gene *rplAJ* de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’

Fragmento de 703 pb foi obtido a partir da amplificação de DNA com os primers A2/J5 de 32 amostras de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’. Foram sequenciados 32 amostras de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ provenientes de diferentes municípios do estado do Paraná e uma do município de Avaré, estado de São Paulo (Tabela 4.1). As sequências obtidas foram de aproximadamente 540 pb e foram utilizadas para as análises de similaridade. Quando essas sequências foram alinhadas pelo programa CLUSTAL W, não foi observada nenhuma alteração de base nucleotídica, ou seja, apresentaram 100% de identidade entre si (Figura 4.6).

Ao contrastar as sequências das amostras com as depositadas no banco GenBank, foi observada identidade de 100% com o gene que codifica a proteína ribossomal de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ provenientes de Guangdong na China (JN211015.1), da Indonésia (AB490691.1), da Flórida (EU265648.1) e com uma do estado de São Paulo (DQ471904) (Figura 4.6). Identidade de 99% foi obtida com sequências de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de Yunnan na China (JN211020.1) e do Irã (JF261098). Quando comparadas com as sequências de outras espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’ foi possível observar identidade de 80% com ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ (U09675.1), 78% com ‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’ (EU834131-1), 76% com ‘*Ca. Liberibacter africanus subsp. capensis*’ (AF248498.1) e 72% com ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ (EF122254.1) (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Árvore filogenética construída utilizando o método UPGMA para as sequências parciais do gene *rplAJ* de ‘*Ca. Liberibacter* spp.’, obtidas nesse trabalho com amostras dos estados do Paraná e São Paulo e também aquelas depositadas no banco de dados Genbank.



4.5 DISCUSSÃO

A diversidade genética de bactérias pode ser avaliada por meio da análise de sítios específicos digeridos com enzima de restrição, elementos repetitivos, ‘*amplicons*’ obtidos com primers randômicos, ou ainda por meio de sequenciamento gênico (LOUWS; RADEMAKER; BUIJN, 1999). Neste trabalho, a diversidade genética de amostras de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, obtidos de diferentes municípios do estado do Paraná, foi estudada com base em técnicas de PCR-RFLP do gene *omp* e sequenciamento de parte das regiões do gene *omp* e também do gene *rplAJ*.

O gene *omp*, que codifica uma proteína de membrana externa, tem sido identificado como um gene promissor no estudo da diversidade genética entre isolados de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (BASTIANEL et al., 2005). Este gene exhibe variações de sequências suficientes para estudo de diversidade intra e interespecíficas (DAVIES et al., 2003; STOHARD; BOGUSLAWKI; JONES, 1998; YU; MCBRIDE; WALKER, 1999).

No presente estudo foi observado pela técnica de PCR-RFLP com produtos amplificados do gene *omp* que as amostras paranaenses de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ apresentam apenas um único perfil genômico quando digeridos com as enzimas de restrição *ApoI*, *HinfI* e *TaqI*. Esse resultado foi diferente do obtido por Bastianel et al. (2005), quando avaliaram a diversidade genética de amostras de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de diferentes regiões da Ásia, onde encontraram quatro perfis distintos com a enzima *TaqI* e dois perfis com a enzima *ApoI*. Foi possível observar também, que as amostras paranaenses apresentaram o mesmo perfil obtido para as amostras de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ do Vietnã, Tailândia, Filipinas, Taiwan e Behai na China, quando digerido com a enzima *TaqI* e foram diferentes das amostras de Yunnan na China, do Nepal e da Índia (BASTIANEL et al., 2005).

Com relação ao sequenciamento parcial do gene *omp*, nenhuma diferença foi observada entre as amostras paranaenses de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ e também com a amostra do município de Avaré no estado de São Paulo. Essas sequências quando comparadas com as amostras de referência da Índia, China, Indonésia, Taiwan, Malásia, Indonésia e Vietnã, apresentaram variabilidade genética entre 99 a 100%.

Resultados semelhantes também foram obtidos com o sequenciamento parcial do gene *rpIAJ*, tendo a variabilidade genética entre as amostras paranaense de 'Ca. Liberibacter asiaticus' e as amostras de referência dessa bactéria provenientes de diversos países do sudeste asiático variado entre 99 e 100%. Além disso, poucos estudos com diferentes loci do genôma de 'Ca. Liberibacter asiaticus' têm apresentado variabilidade genética entre amostras da Oceania, da Ásia e das Américas (BASTIANEL et al., 2005; DENG et al., 2008; OKUDA et al., 2005; SUBANDIYAH et al., 2000; TOMIMURA et al., 2009).

No presente estudo não pode ser observada relação entre cultivares de citros avaliados e 'Ca. Liberibacter asiaticus'. No entanto, pôde-se verificar que, baseado no gene *omp*, as sequências obtidas bem como as de outros 'Ca. Liberibacter asiaticus' pertencem a um grupo diferente daqueles de pomelo (*Citrus paradisi*) e tangerina (*Citrus reticulata*) da Malásia (Figura 4.5). Esses resultados confirmam aqueles obtidos por Ahmad et al. (2009) ao caracterizar isolados de 'Ca. Liberibacter asiaticus' dessas duas espécies de *Citrus*. A relação entre 'Ca. Liberibacter asiaticus' e essas duas espécies de citros, segundo os autores, atribui ao fato de que em tangerinas e pomelos os sintomas apresentados em plantas infectadas com HLB são mais severos. Estudos realizados por Tomimura et al. (2009) com 'Ca. Liberibacter asiaticus' de diferentes hospedeiros na Indonésia sugerem que a população da bactéria é homogênea independentemente do hospedeiro e da localização. Entretanto, os autores sugerem também que são necessários estudos mais aprofundados de genes envolvidos com a patogenicidade em 'Ca. Liberibacter asiaticus'.

A similaridade entre 'Ca. Liberibacter asiaticus' encontrada no presente trabalho pode ser atribuída à recente introdução da bactéria nos pomares paranaenses e também no estado de São Paulo. Porém, até o presente momento, este é o primeiro estudo desenvolvido sobre a diversidade genética de 'Ca. Liberibacter asiaticus' que ocorre no estado do Paraná. Entretanto, para se realizar um estudo mais abrangente da bactéria que ocorre nessa região é necessário examinar um maior número de amostras da bactéria e também analisar sequências mais completas dos genes estudados, bem como a utilização de outras técnicas moleculares.

4.6 CONCLUSÕES

Tanto pelas análises de PCR-RFLP com as enzimas *ApoI*, *HinfI* e *TaqI* baseadas no gene *omp*, como pelo sequenciamento parcial dos genes *omp* e *rplAJ*, não foi observada diversidade genética entre 'Ca. Liberibacter asiaticus' presentes nos pomares de citros do estado do Paraná.

'Ca. Liberibacter asiaticus' presentes no estado do Paraná apresentaram alta similaridade (99 a 100%) com a mesma espécie de outras localidades no mundo.

5 ARTIGO C

**ISOLAMENTO DE '*CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS*' ASSOCIADA
COM HUANGLONGBING**

ISOLAMENTO DE 'CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS' ASSOCIADA COM HUANGLONGBING

5.1 RESUMO

Resumo

Huanglongbing (HLB) é uma das principais doenças que ocorre na cultura dos citros. O HLB está associado a bactérias Gram-negativas pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias, denominadas 'Candidatus Liberibacter africanus', 'Candidatus Liberibacter asiaticus' e 'Candidatus Liberibacter americanus'. São consideradas bactérias fastidiosas, restritas aos vasos do floema e até o momento seu cultivo em meio de cultura não foi completamente estabelecido. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi isolar 'Ca. Liberibacter asiaticus' em meio de cultura. Foram utilizados para isolamento ramos de plantas de laranja doce cv. Valência enxertadas sobre limão Cravo e plantas de pé-franco da mesma cultivar, infectadas artificialmente. Para a extração da seiva, foi utilizada bomba de pressão de Scholander, onde os ramos foram submetidos a uma pressão de 3,0 mpascal. A seiva resultante foi coletada e plaqueada sobre os meios de cultura BCYE, PD2+E e LiberA sem a adição de NADP. As placas foram mantidas a 28 °C em câmara de crescimento. Após período de 72 a 96 horas, colônias bacterianas foram observadas, porém apenas uma foi positiva para 'Ca. Liberibacter asiaticus' no meio de cultura PD2+E, em teste de PCR com os primers A2/J5. Essa colônia foi transferida para o meio BCYE, onde apresentou melhor crescimento. Produto de PCR com os primers A2/J5 foi sequenciado e revelou 99% de identidade com 'Ca. Liberibacter asiaticus', porém quando realizado o sequenciamento do produto de PCR obtido com primers para 16S rDNA, apresentou similaridade de 99% com uma bactéria não culturável e também com bactérias do gênero *Paenibacillus*, principalmente da espécie *P. barengoltzii*. Foram realizadas microscopia eletrônica de varredura (MEV), tanto da cultura bacteriana como de tecido infectado com 'Ca. Liberibacter asiaticus'. Foi possível observar células bacterianas de diferentes formatos na MEV da cultura e a mesma morfologia foi observada no tecido vegetal contaminado. Plantas inoculadas com a cultura obtida não apresentaram sintomas de HLB, porém resultados de PCR com os primers A2/J5 foram positivos dois meses após a inoculação e após esse período todos os resultados foram negativos. Não está clara qual a relação entre 'Ca. Liberibacter asiaticus' e outras bactérias endofíticas, porém novos estudos com a bactéria isolada devem ser conduzidos para confirmar e esclarecer os resultados obtidos.

Palavras – chave: Cultivo *in vitro*. *Paenibacillus* spp. Bactérias endofíticas

ISOLATION 'CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS' ASSOCIATED WITH HUANGLONGBING

Abstract

Huanglongbing (HLB) is one of the major diseases for citrus production around the world. This disease is associated with Gram-negative bacteria belonging to the alfa-

proteobacteria group, named '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberibacter americanus*'. These bacteria are fastidious, restricted to the phloem vessels of the plant and they have been not properly cultivated in pure culture. Therefore, the objective of this work was to establish a protocol for isolation of '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in pure culture. Isolation was carried out by using HLB diseased plant material of sweet orange cv. Valencia grafted onto Rangpur lime, as well as material from non-grafted citrus plants of the same cultivar. Sap was extracted by using the Scholander pressure pump. Fresh cut branches were subject to 3.0 mpascal of pressure and the sap was collected and plated onto the media BCYE, PD2+E e LiberA without addition of NADP. The Petri plates were kept in a growth chamber at 28 °C. After a period of incubation of 72 to 96 hours, bacterial colonies were observed. However, only one colony in the PD2+E medium was positive for '*Ca. Liberibacter asiaticus*', based on PCR test with the primers A2/J5. This colony was transferred to BCYE medium for propagation. PCR products of the primers A2/J5 were sequenced and showed 99% similarity to '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. However, the sequencing of PCR products obtained with primers for the 16S rDNA region showed 99% similarity to a non-cultivable bacteria, and also to bacteria of the genus *Paenibacillus*, mainly to *P. barengoltzii*. The MEV examination of the bacterial culture, as well as of diseased plant tissue revealed bacterial cells of same morphology. Citrus plants inoculated with the bacterial isolate did not show HLB symptoms, but PCR positive results were obtained for '*Ca. Liberibacter asiaticus*' with the primers A2/J5 two months after inoculation. After this period, PCR tests were negative for the inoculated plants. It is not clear the relationship between '*Ca. Liberibacter asiaticus*' and other endophytic bacteria, but additional studies with the bacteria isolated are necessary to better understand this possible interaction.

Key – words: Isolation. *Paenibacillus* spp. Endophytic bacteria.

5.2 INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é uma das mais importantes doenças que ocorre na cultura dos citros (BOVÉ, 2006). O HLB está associado a bactérias Gram-negativas (GARNIER; DANIEL; BOVE, 1984) pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias, denominadas '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; TEIXEIRA et al., 2005b). Essas bactérias são transmitidas naturalmente pelos psíldeos, *Trioza erytrae* Del Guercio e *Diaphorina citri* Kuwayama (BOVÉ, 2006; YAMAMOTO et al., 2006).

'*Candidatus Liberibacter* spp.', (*Candidatus* é o termo utilizado para descrever bactérias que ainda não foram totalmente caracterizadas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (MURRAY; STACKEBRANDT,

1995)) é uma bactéria fastidiosa e limitada ao floema da planta hospedeira (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). Os sintomas causados pela presença da bactéria nas plantas de citros são folhas com aspecto mosqueado, frutos de tamanho reduzido, sementes abortadas, seca de ramos e em casos mais avançados pode ocasionar a morte da planta (BOVÉ, 2006).

Os primeiros relatos sobre o cultivo de organismos associados ao HLB remontam à década de 1970 (GHOSH et al., 1971) e 1980 (GARNETT, 1984), quando ficou estabelecida a associação de bactérias com a doença. No entanto, esses trabalhos não se confirmaram e as recentes tentativas de isolamento de 'Ca. Liberibacter spp.', resultaram em um sucesso parcial em relação ao estabelecimento de culturas puras da bactéria (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009).

Davis et al. (2008) utilizando meio de cultura complexo obtiveram o co-cultivo de 'Ca. Liberibacter asiaticus' associada a uma actinobactéria denominada *Propionibacterium acnes*. Sechler et al. (2009) realizaram o isolamento das três espécies de 'Ca. Liberibacter spp.', utilizando um meio de cultura simples denominado LiberA. No entanto, o postulado de Koch ainda não pode ser completado integralmente.

A obtenção de culturas puras de 'Ca. Liberibacter spp.' é de extrema importância no estudo da bactéria, incluído a sua caracterização completa, o desenvolvimento de metodologias de detecção e identificação, auxílio em trabalhos de epidemiologia e da interação planta/patógeno/vetor e, principalmente para desenvolver técnicas de manejo do HLB.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo estabelecer isolados da bactéria do HLB utilizando diferentes meios de cultura desenvolvidos para o cultivo de bactérias fastidiosas.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Material Vegetal

Para a realização do isolamento de 'Ca. Liberibacter asiaticus' foram utilizados ramos de plantas de laranja doce cv. 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertadas sobre limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e de plantas pé-franco de laranja doce também da cv. Valência, apresentando folhas com sintomas

característicos de HLB. Essas plantas foram infectadas artificialmente por meio de enxertia de material propagativo proveniente de plantas cítricas com HLB. Foram utilizados também ramos sintomáticos de planta de laranja 'Valência' infectadas naturalmente. Todas as plantas foram confirmadas como positivas para presença de 'Ca. Liberibacter asiaticus' por meio de PCR.

Para a extração da seiva dos ramos foi utilizado o método de bomba de pressão (HALLMANN; KLOEPPER; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1997), onde os ramos após serem fixados na bomba de pressão, tiveram sua extremidade cortada com auxílio de bisturi esterelizado. Os ramos foram submetidos a uma pressão de aproximadamente 3,0 mpascal e a seiva extraída foi recuperada com auxílio de micropipeta e depositada em microtubos plásticos de 1,5 mL. Após a recuperação da seiva, 20 μ L foram depositados em placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura e distribuídos na superfície do meio com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C até a formação de colônias bacterianas.

5.3.2 Meio de Cultura e Condições de Crescimento

Os meios de cultura testados foram o BCYE (WELSS et al., 1981), PD2 acrescido de extrato de pecíolo e nervura central de folhas de citros (PD2+E) (DAVIS; PURCELL; THOMPSON, 1980; SECHLER et al., 2009) e LiberA modificado (sem adição de NADP) (SECHLER et al., 2009). As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C até a formação de colônias bacterianas

5.3.3 Extração de DNA e PCR

As colônias bacterianas desenvolvidas em meio de cultura foram submetidas à extração de DNA segundo o protocolo de Ausubel et al. (1996).

Para a realização da reação de PCR foram utilizados os pares de 'primers' A2 (5' TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT 3') e J5 (5' ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A 3') que amplificam fragmento de 703 pb do gene *rpIAJ* (HOCQUELLET; BOVÉ; GARNIER, 1999), Oi1 (5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA 3') e Oi2c (5' GCC TCG GCA CTT CGC AAC CCA T 3') que amplificam fragmento de 1160 pb da região 16S do DNA ribossomal (JAGOUÉIX; BOVÉ;

GARNIER, 1994), HP1 (5' – GAT GAT AGG TGC ATA AAA GTA CAG AAG –3') e Lp1c (5' – AAT ACC CTT ATG GGA TAC AAA AA – 3') (BASTIANEL et al., 2005) e OMP1F (5' GAT GAT AGG TGC ATA AAA GTA CAG AAG 3') e OMP1R (5' AAT ATT AAG CGT TGT CGG AG 3') (AHMAD et al., 2009) que amplificam fragmentos de 2.400 pb e de 600 pb do gene *omp* que codifica uma proteína de membrana, respectivamente. Todos esses '*primers*' são utilizados para identificar '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Para detecção de '*Ca. Liberibacter americanus*' foram utilizados os '*primers*' GB1 (5'– AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT – 3') e GB3 (5'– CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG – 3'), que amplificam fragmento de 1.027 pb (TEIXEIRA et al., 2005b).

Para cada reação de PCR foi utilizado 1 μ L de DNA em 39 μ L da solução de reação. A solução para a reação de cada amostra continha 4,0 μ L de tampão 10X (Invitrogen, CA, EUA); 1,6 μ L dNTP 5 mM (Invitrogen, CA, EUA); 1,6 μ L MgCl₂ 50 mM; 0,2 μ L de cada primer a 100 mM; 30,7 μ L H₂O Milli-Q autoclavada, e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen, CA, EUA). Em todos os experimentos, foi adicionado um controle negativo onde o DNA foi substituído por H₂O Milli-Q e um controle positivo para '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. As reações foram colocadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) e para amplificação com os primers A2/J5 utilizou-se um passo inicial de 94 °C por 30 segundos e 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto. Para os primers Oi1/Oi2c, a amplificação foi de 35 ciclos de 92°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos e para os primers GB1/GB3, a amplificação foi de 35 ciclos com 94 °C por 45 segundos, 64 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos.

Foi realizada também PCR utilizando os primers universais fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e rD1 (5' AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'), que amplificam a região do gene codificador do RNA ribossomal 16S (WEISBURG et al., 1991). A PCR foi feita com volume final de 50 μ L contendo 1X tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada primer universal, 1,5 U de Taq DNA polimerase e 5 μ L de DNA genômico (a 100 ng/ μ L). Para amplificação utilizou-se um passo inicial de 94 °C por 3 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 90 segundos, e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Para todas as reações foram aplicados 20 µL da reação de PCR em gel de agarose a 1% com tampão SB 1X (sodium borate). O gel foi corado com brometo de etídio 5 µg/mL e fotodocumentado com o programa L-Pix Image (Loccus Biotecologia).

5.3.4 Sequenciamento dos Genes *rplAJ* e 16S rDNA

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen), e o produto final foi quantificado em gel de agarose utilizando como padrão de comparação o marcador de peso molecular fago Lâmbda (λ). Os produtos foram sequenciados diretamente com os 'primers' A2/J5 para o gene *rplAJ* e com os 'primers' fD1, Y2 (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991), 362f, 786f e 1203 (MENNA et al., 2006) para a região 16S rDNA. As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando o Kit *Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction v3.1* com o seqüenciador ABI 3130 DNA Analyzers de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). As sequências gênicas obtidas foram comparadas entre si e também com as sequências depositadas no banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), através do programa BLAST. O programa ClustalW foi utilizado para o alinhamento das sequências.

Para confirmação dos 'contigs', inicialmente foi feita análise comparativa através do programa Blastn com sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências obtidas no sequenciamento e também com aquelas depositadas no Genbank, utilizando o programa Mega 5.1. com o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

5.3.5 Inoculação de Isolados Bacterianos

Para o preparo do inóculo foram utilizadas culturas bacterianas de seis isolados mantidos a 28 °C em meio de cultura BCYE. A suspensão foi preparada para cada isolado da bactéria em água destilada esterilizada com

concentração de aproximadamente 10^9 UFC/mL.

Plantas de laranja doce da cultivar 'Valência' com aproximadamente cinco meses de idade, mantidas em casa de vegetação semiclimatizada, foram utilizadas para realização dos testes de patogenicidade. Dois métodos de inoculação foram utilizados. O primeiro método consistiu na deposição da suspensão bacteriana na extremidade do tronco da planta imediatamente após ter sido realizada poda drástica. No segundo método foi feita infiltração da suspensão bacteriana, com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL sem agulha, em folhas jovens totalmente expandidas. Plantas controles foram inoculadas com água destilada esterilizada. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação semiclimatizada e submetidas a observações periódicas para verificar o desenvolvimento de sintomas foliares característicos de HLB.

5.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Culturas bacterianas e tecidos vegetais sadios e infectados com '*Ca. Liberibacter sp.*' foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura. O material foi encaminhado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (LMEM/UEL) para realização dos testes de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O processamento das amostras foi realizado de acordo com o protocolo de Bozzola; Russel (1992). Alíquotas de 20 μ L da suspensão bacteriana foram transferidas para lâminas de vidro previamente revestidas com poli-lisina e colocadas em estufa a 28°C por 1 hora para secagem. Em seguida, as lâminas foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), por um período de 12 h. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1%, em tampão cacodilato de sódio por 2h. As amostras foram desidratadas em etanol nas concentrações de 70, 80, 90 e 100%, e secas em ponto crítico de CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Após a secagem, as lâminas foram revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

Para realização da MEV do tecido vegetal contaminado com '*Ca. Liberibacter asiaticus*' foi utilizada a nervura central de folhas sintomáticas e

assintomáticas. As amostras foram fixadas com aldeído, infiltrada com glicerol, imerso em azoto líquido e fracturadas com bisturi. As peças pós-fixadas em 0,1% OsO₄ durante 24 h, foram desidratadas em acetona, secas no ponto crítico, revestidas com ouro por pulverização catódica e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Isolamento e Meio de Cultura

As tentativas de isolamento de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' resultaram no desenvolvimento de 18 colônias bacterianas, três a quatro dias após o plaqueamento. Foram obtidas três colônias no meio BCYE, seis no meio LiberA modificado e nove no meio PD2+E. O desenvolvimento das colônias bacterianas ocorreu tanto nos isolamentos realizados a partir de plantas pé-franco de laranja Valência como também das plantas de laranja 'Valência' enxertadas sobre limão Cravo, as quais foram infectadas artificialmente com a bactéria do HLB.

O isolado 14 obtido no meio PD2+E apresentou resultado positivo na reação de PCR, utilizando os primers A2/J5, específicos para '*Ca. Liberibacter asiaticus*', amplificando um fragmento de 703 pb (Figura 5.1). Esse isolado foi transferido para os três meios de cultura testados e pôde-se observar um crescimento maior no meio BCYE (Figura 5.2). A partir de então, esse meio foi utilizado para a manutenção desse isolado. Durante o processo de purificação do isolado 14, foram observadas a presença de colônias com morfologia diferente da original (Figura 5.3). No entanto, todas essas colônias apresentaram resultados positivos na reação de PCR utilizando os primers A2/J5 (Figura 5.4).

As culturas bacterianas do isolado 14 mantidas em glicerol a -80 °C foram recuperadas em meio de cultura BCYE, permanecendo viáveis e com resultados positivos na reação de PCR utilizando os primers A2/J5, mesmo após o período de 12 meses.

Para confirmar a identidade do isolado 14, os DNA's obtidos de diferentes colônias foram também submetidos a reações de PCR com os primers HP1/Lp1c, Oi1/Oi2c e OMP1F/OMP1R, também específicos para '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Nessas reações, foram obtidos ampliações de fragmento de 600 pb

com os primers OMP1F/OMP1R (Figura 5.5). Nas ampliações com os primers HP1/Lp1c e Oi1/Oi2c não foram observadas ampliações dos fragmentos de 1.160 pb e 2.400 pb, respectivamente (Figuras 5.6 A e B).

Figura 5.1 – Amplificação de fragmento de 703 pb em PCR com os primers A2/J5, específicos para '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2, a 4, DNA obtido de culturas bacterianas obtidas no meio BCYE; 5 a 10, DNA obtido de culturas bacterianas obtidas no meio LiberA; 11 a 18, DNA obtido de culturas bacterianas obtidas no meio PD2+E; 19, controle negativo da reação; e 20, controle positivo da reação para '*Ca. Liberibacter asiaticus*'.

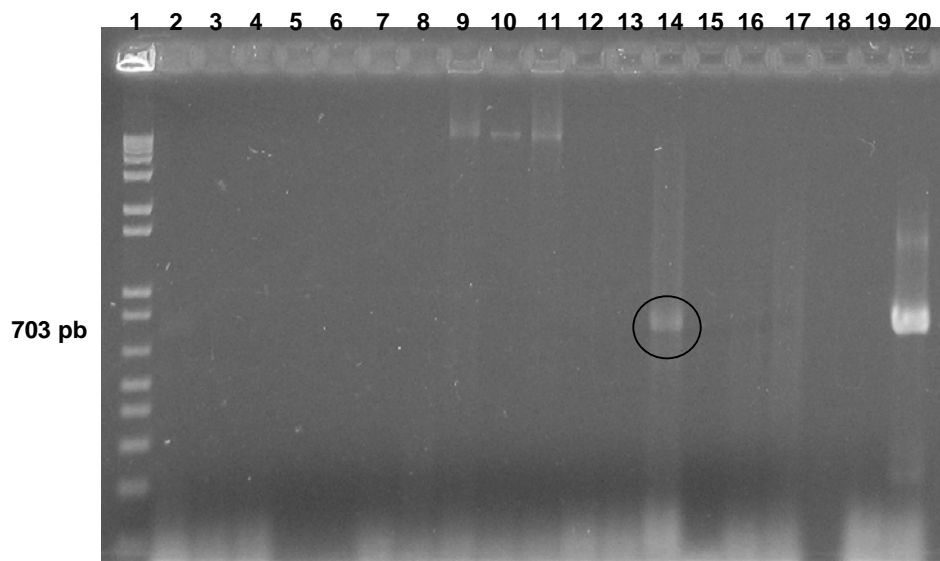


Figura 5.2 – Isolado bacteriano número 14, positiva em reação de PCR com os primers A2/J5 específicos para '*Ca. Liberibacter asiaticus*', cultivada em meio de cultura BCYE, observada três a quatro dias após plaqueamento e mantida a 28 °C.



Figura 5.3 – Culturas bacterianas apresentando diferentes morfologias obtidas a partir de uma única colônia da cultura 14, desenvolvidas em meio BCYE após sucessivas repicagens.

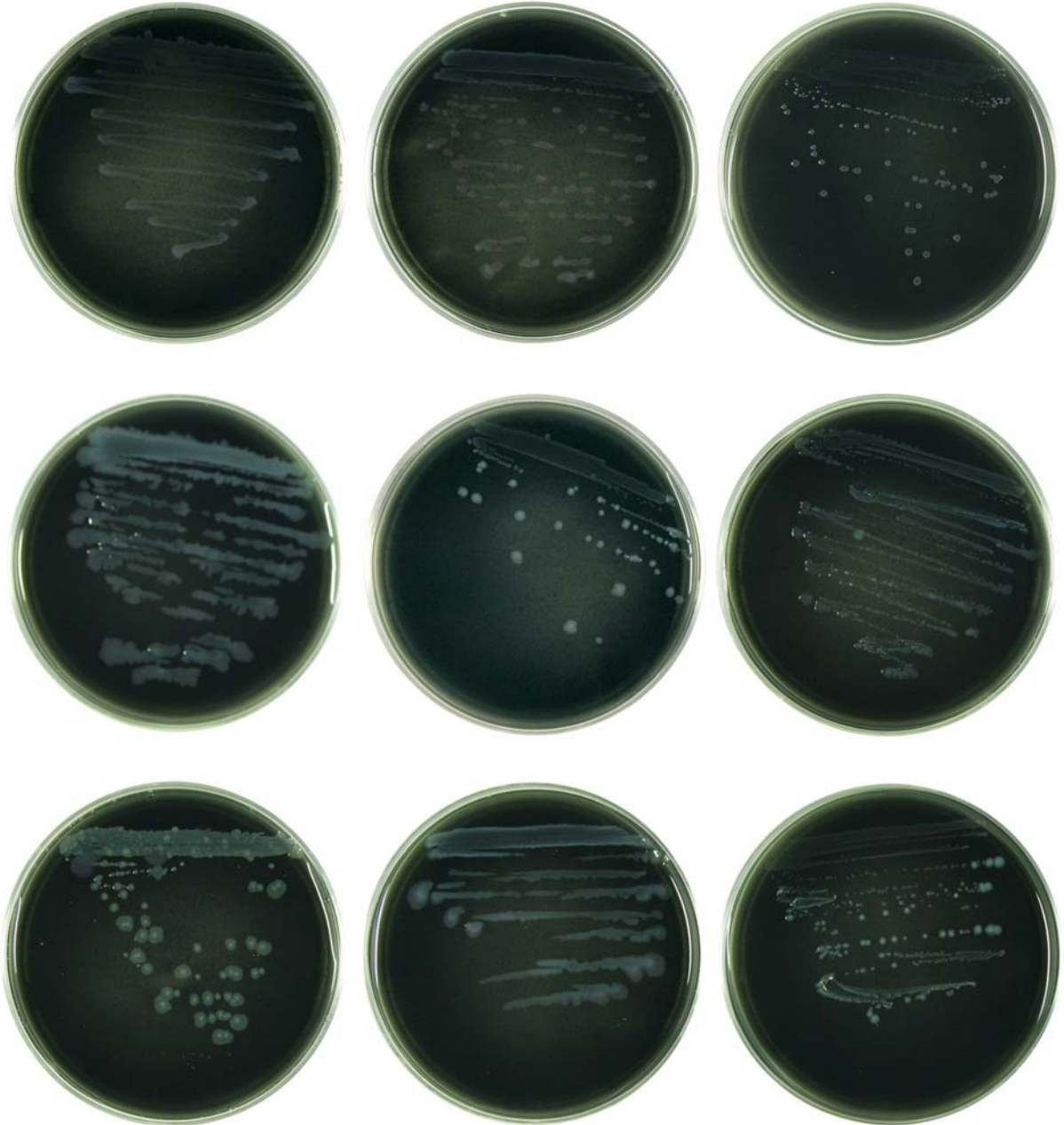


Figura 5.4 – Amplificação de fragmento de 703 pb em PCR com os ‘primers’ A2/J5, específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, das subculturas do isolado 14 com diferentes morfologias. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2 a 10, DNA obtido de subculturas bacterianas crescidas no meio BCYE; 11, controle negativo da reação; e 12, controle positivo da reação para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’.

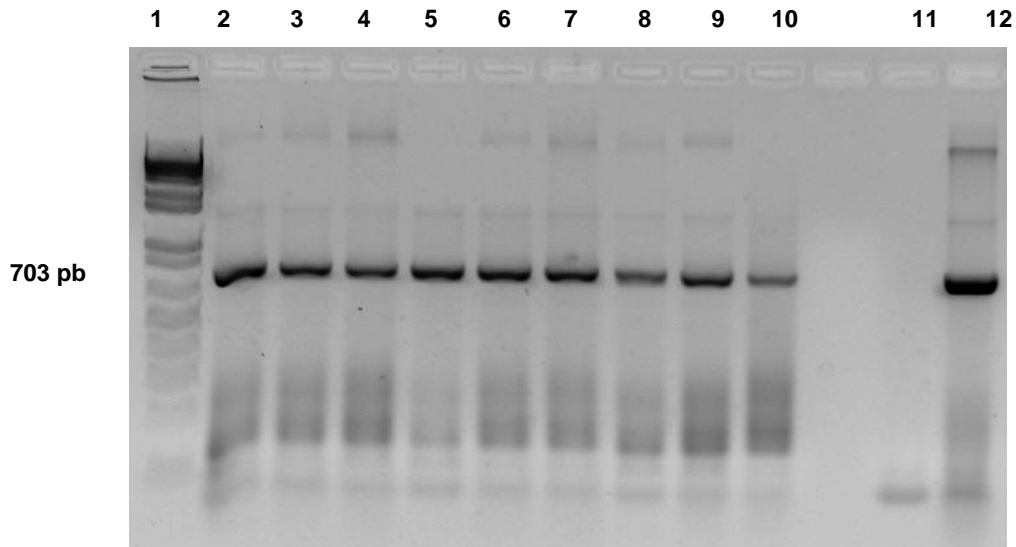


Figura 5.5 – Amplificação de fragmento de 600 pb em PCR com os ‘primers’ OMP1F/OMP1R, específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de subculturas do isolado 14 obtidas após plaqueamento em meio BCYE. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2 a 8, DNA obtido de culturas bacterianas; 9, controle negativo da reação; e 10, controle positivo da reação para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’.

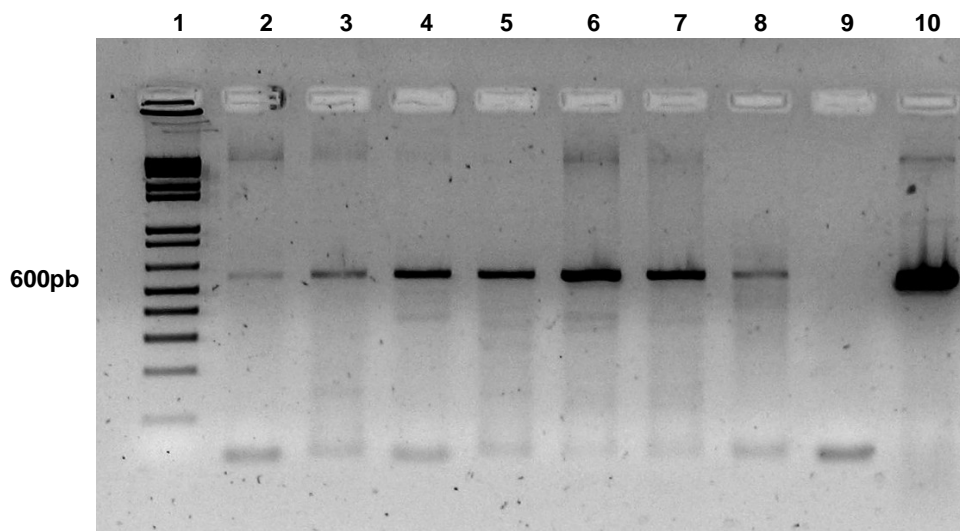
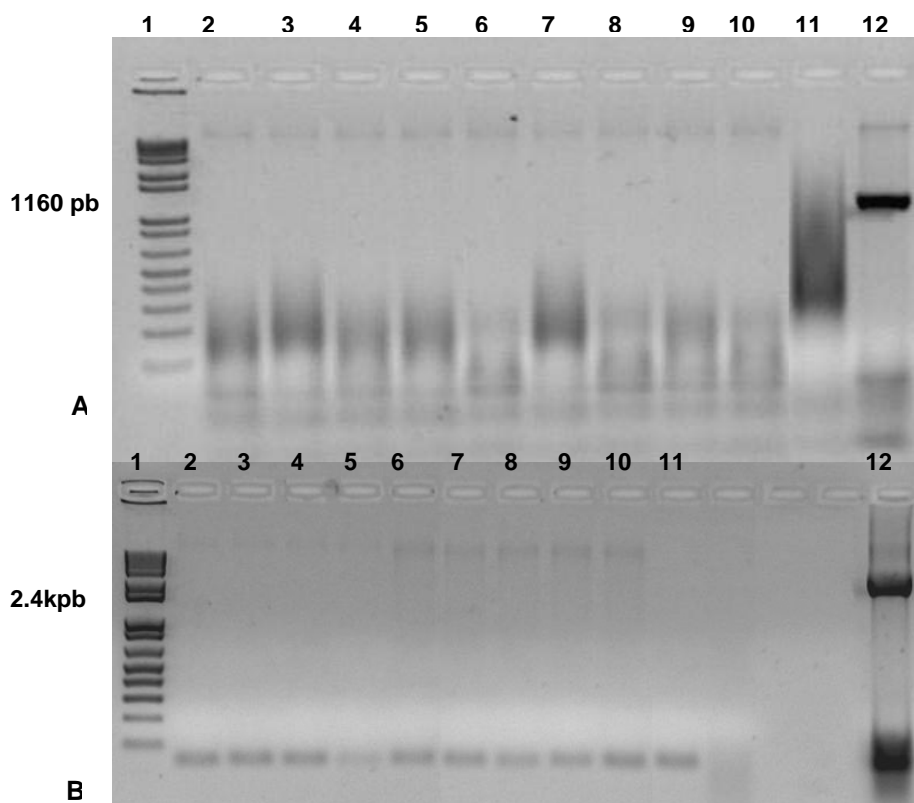


Figura 5.6 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os primers Oi1/Oi2c (A) e Hp1/Lp1c (B) específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ de subculturas do isolado 14, obtidas após plaqueamento em meio BCYE. Linhas: 1, marcador de peso molecular 1kb Plus; linhas 2 a 10, DNA obtido de culturas bacterianas crescidas no meio BCYE; 11, controle negativo da reação; e 12, controle positivo da reação para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’.



5.4.2 Sequenciamento do Gene *rplAJ* Amplificado do Isolado 14

O sequenciamento do produto de PCR com os primers A2/J5 das culturas bacterianas 1, 6, 7 e 10 do isolado 14 resultou em seqüências de aproximadamente 500 pb. Essas seqüências, após serem alinhadas pelo programa ClustalW, revelaram identidade de 100% entre si. A análise das seqüências utilizando o programa BLAST mostrou similaridade de 99% com seqüências de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ depositadas no banco de dados GenBank (Figura 5.7). Uma árvore filogenética foi construída com as seqüências obtidas nesse estudo e também com as seqüências depositadas no GenBank e foi possível observar que as subculturas do isolado 14 estão agrupadas em um mesmo ramo juntamente com ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Figura 5.8). Outros dois ramos foram formados, sendo um com ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ e ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ subsp. *capensis*’ e

outro com ‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’ e ‘*Ca. Liberibacter psyllaurosus*’ (Figura 5.8). Esses resultados mostram a alta similaridade genética das subculturas do isolado 14 com ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, baseada na região do gene *rpIAJ*.

5.4.3 Sequenciamento do gene 16S rDNA Amplificado do Isolado 14

O sequenciamento da região 16S rDNA de três subculturas do isolado 14 obtido de planta cítrica com HLB, gerou sequências de aproximadamente 1.500 pb que após serem alinhadas pelo programa ClustalW apresentaram 100% de identidade entre si. Ao serem contrastadas com as sequências gênicas depositadas no banco de dados GenBank com o programa BLAST, revelaram similaridade de 99% com bactérias não cultiváveis e bactérias do gênero *Paenibacillus*, principalmente com a espécie *P. barengoltzii* (Figura 5.9). Foi construída uma árvore filogenética a partir das sequências obtidas de culturas bacterianas do isolado 14 obtido de plantas cítricas com HLB, juntamente com as sequências de *Paenibacillus* spp., de bactérias não-cultivadas e de sequências de diferentes espécies de ‘*Ca. Liberibacter* spp.’ (Figura 5.10).

Figura 5.7 – Tabela de similaridade, gerada pelo programa Blastn, entre a sequência obtida do gene *rplAJ* da subcultura 14.1 do isolado 14 com as sequências depositadas no banco de dados Genbank.

Sequences producing significant alignments:

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|---|---------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| JN211021.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Zhejiang001 ribosc | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211020.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Yunnan001 ribosom | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211019.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Jiangxi001 ribosom | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211018.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Hunan001 ribosom | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211017.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Guizhou001 ribosom | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211016.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Guangxi001 ribosom | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211015.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Guangdong001 ribo | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| JN211014.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Fujian001 ribosom | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| CP001677.5 | Candidatus Liberibacter asiaticus str. psy62, complete gene | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490691.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490690.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490689.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490688.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490687.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490686.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490685.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490684.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490683.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490682.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus psi-serA-trumU-tufB-secE | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB490292.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus trmU, tufB, secE, nus, rplI | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| GU074017.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate Sat-2 ribosomal pr | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| GQ890156.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate ET-LAS02 50S ribo | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| GQ890155.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus isolate ET-LAS01 50S ribo | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB480161.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus trmU, tufB, secE, nusG, r | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB480160.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus trmU, tufB, secE, nusG, r | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |
| AB480159.1 | Candidatus Liberibacter asiaticus trmU, tufB, secE, nusG, r | 900 | 900 | 100% | 0.0 | 99% |

Figura 5.8 – Árvore filogenética contruída utilizando o método UPGMA com as sequências parciais do gene *rplAJ* provenientes de subculturas do isolado 14 obtido de plantas cítricas com HLB e com sequências depositadas no banco de dados Genbank.

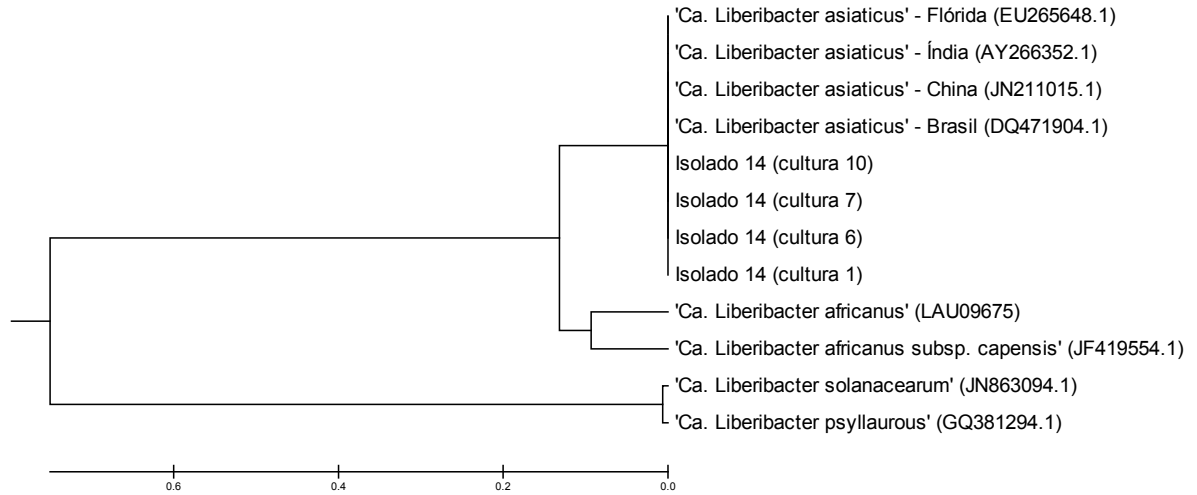
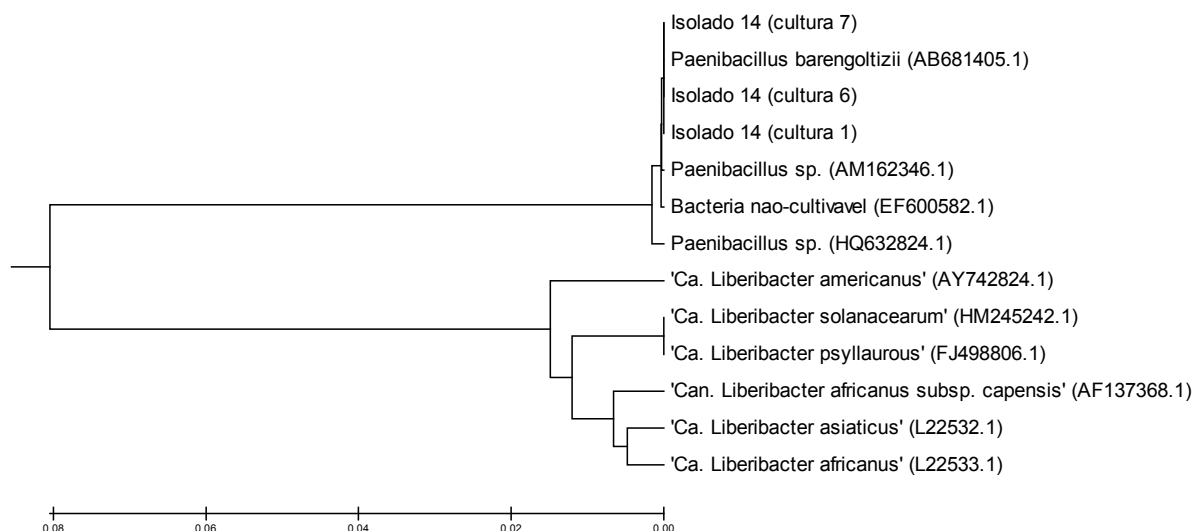


Figura 5.9 – Tabela de similaridade, gerada pelo programa Blastn, entre a sequência obtida da região 16S rDNA da subcultura 14.1 do isolado 14 com as sequências depositadas no banco de dados Genbank.

Sequences producing significant alignments:

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|----------------------------|--|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|
| EF600582.1 | Uncultured bacterium clone E2-2 16S ribosomal RNA gene, I | 2763 | 2763 | 99% | 0.0 | 99% |
| HQ632824.1 | Paenibacillus sp. AGM100 16S ribosomal RNA gene, partial s | 2750 | 2750 | 100% | 0.0 | 99% |
| AM162346.1 | Paenibacillus sp. 5T01 partial 16S rRNA gene | 2750 | 2750 | 99% | 0.0 | 99% |
| FJ930068.1 | Paenibacillus sp. enrichment culture clone 9 16S ribosomal I | 2737 | 2737 | 98% | 0.0 | 99% |
| AB681405.1 | Paenibacillus barengoltzii gene for 16S rRNA, partial sequen | 2713 | 2713 | 97% | 0.0 | 99% |
| AM162347.1 | Paenibacillus sp. 5M01 partial 16S rRNA gene | 2712 | 2712 | 97% | 0.0 | 99% |
| AB681406.1 | Paenibacillus barengoltzii gene for 16S rRNA, partial sequen | 2704 | 2704 | 97% | 0.0 | 99% |
| GQ284356.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCS9 16S ribosomal RNA | 2684 | 2684 | 96% | 0.0 | 99% |
| GQ284355.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCS8 16S ribosomal RNA | 2684 | 2684 | 96% | 0.0 | 99% |
| GQ422747.1 | Paenibacillus sp. oral taxon 786 strain F0064 16S ribosomal | 2665 | 2665 | 99% | 0.0 | 98% |
| GQ284368.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCSN26 16S ribosomal R | 2663 | 2663 | 96% | 0.0 | 99% |
| GQ284358.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCS11 16S ribosomal RN | 2660 | 2660 | 96% | 0.0 | 99% |
| AM283040.1 | Paenibacillus sp. HanTHS1 partial 16S rRNA gene, strain Hai | 2652 | 2652 | 100% | 0.0 | 98% |
| GQ284362.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCSN14 16S ribosomal R | 2639 | 2639 | 95% | 0.0 | 99% |
| JF309265.1 | Paenibacillus timonensis strain 3584BRRJ 16S ribosomal RNA | 2636 | 2636 | 100% | 0.0 | 98% |
| HM635211.1 | Paenibacillus sp. enrichment culture clone WSC-33 16S ribc | 2634 | 2634 | 94% | 0.0 | 99% |
| GQ284352.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCS4 16S ribosomal RNA | 2634 | 2634 | 96% | 0.0 | 99% |
| GQ284370.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCSN47 16S ribosomal R | 2627 | 2627 | 96% | 0.0 | 99% |
| GQ284371.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCSN50 16S ribosomal R | 2625 | 2625 | 95% | 0.0 | 99% |
| DQ124699.1 | Paenibacillus barengoltzii strain SAFN-125 16S ribosomal RN | 2619 | 2619 | 95% | 0.0 | 99% |
| EU250945.1 | Paenibacillus sp. NFC7-1 16S ribosomal RNA gene, partial se | 2604 | 2604 | 93% | 0.0 | 99% |
| GQ284354.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCS7 16S ribosomal RNA | 2601 | 2601 | 94% | 0.0 | 99% |
| GQ284367.1 | Paenibacillus barengoltzii strain THWCSN25 16S ribosomal R | 2595 | 2595 | 96% | 0.0 | 99% |
| EU250946.1 | Pseudoxanthomonas taiwanensis strain NFC7-12 16S riboso | 2595 | 2595 | 93% | 0.0 | 99% |
| HM212646.1 | Paenibacillus sp. CIP 101062 16S ribosomal RNA gene, parti | 2590 | 2590 | 97% | 0.0 | 98% |
| EU250942.1 | Paenibacillus sp. NFC7-F10 16S ribosomal RNA gene, partial | 2588 | 2588 | 93% | 0.0 | 99% |

Figura 5.10 – Árvore filogenética construída utilizando o método UPGMA com as sequências parciais da região 16S rRNA provenientes de subculturas do isolado bacteriano 14, obtido nesse estudo e de sequências depositadas no banco de dados Genbank.



5.4.4 Teste de Patogenicidade

As subculturas bacterianas 14.1, 14.2, 14.3, 14.4, 14.5 e 14.6 do isolado 14 foram inoculadas em plantas de laranja 'Valência', utilizando dois métodos de inoculação, infiltração e deposição de gotas de inóculo sobre a superfície cortada do caule. Durante o período de um ano após a inoculação da suspensão bacteriana pelos dois métodos de inoculação, as plantas não apresentaram sintomas foliares característicos de HLB. Entretanto, dois meses após a inoculação a presença da bactéria inoculada foi confirmada, por PCR, utilizando os primers A2/J5 específicos para '*Ca. Liberibacter asiaticus*', em oito das 24 plantas inoculadas com as subculturas 14.1, 14.2, 14.3 e 14.5 (Figura 5.11). Ambos os métodos de inoculação proporcionaram igual número de plantas positivas. Estes resultados indicam que os métodos de inoculação possibilitaram infectar as plantas cítricas com as culturas bacterianas do isolado 14 estabelecido de plantas cítricas com HLB. Entretanto, novas extrações de DNA, realizadas após esse período de dois meses, não mais revelaram a presença da bactéria com base em teste de PCR com os primers A2/J5 (Figura 5.12).

5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Culturas Bacterianas e de Tecido Vegetal

Observações de culturas bacterianas 2 e 7 do isolado 14, mantidas no meio BCYE sob MEV, revelaram a presença de células com formatos diferenciados. Células tipicamente bastonetes foram encontradas em maior número (Figura 5.13 B). Essas células apresentaram tamanho variando de 2,5 a 5,0 μm de comprimento e 0,3 a 0,5 μm de largura (Figura 5.13 D). Células menores, com tamanho de 2,0 μm de comprimento e 0,5 μm de largura também foram observadas (Figura 5.13 D e E). Foi.

Secções de pecíolo de planta infectada artificialmente com '*Ca. Liberibacter asiaticus*', quando submetidas à MEV, revelaram a presença de células bacterianas semelhantes às observadas em cultura bacterianas 2 e 7 do isolado 14, aderidas à parede dos vasos do floema (Figuras 5.14 C, D e E). Foi também possível observar a formação de biofilme nos vasos do floema colonizados por '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (Figuras 5.14 A e B). Em contraste, em tecidos sadios não foi observada a presença de células bacterianas como descrito acima (Figura 5.14 F).

Figura 5.11 – Reação de PCR utilizando os primers A2/J5, específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, com DNA extraído de plantas inoculadas com subculturas do isolado 14, por dois métodos de inoculação: (A) infiltração nas folhas e (B) deposição no tronco em local da poda, dois meses após a inoculação. Linhas: M, marcador de peso molecular 1kb; T, testemunha inoculada com água; +, controle positivo da reação com DNA de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’; -, controle negativo da reação.

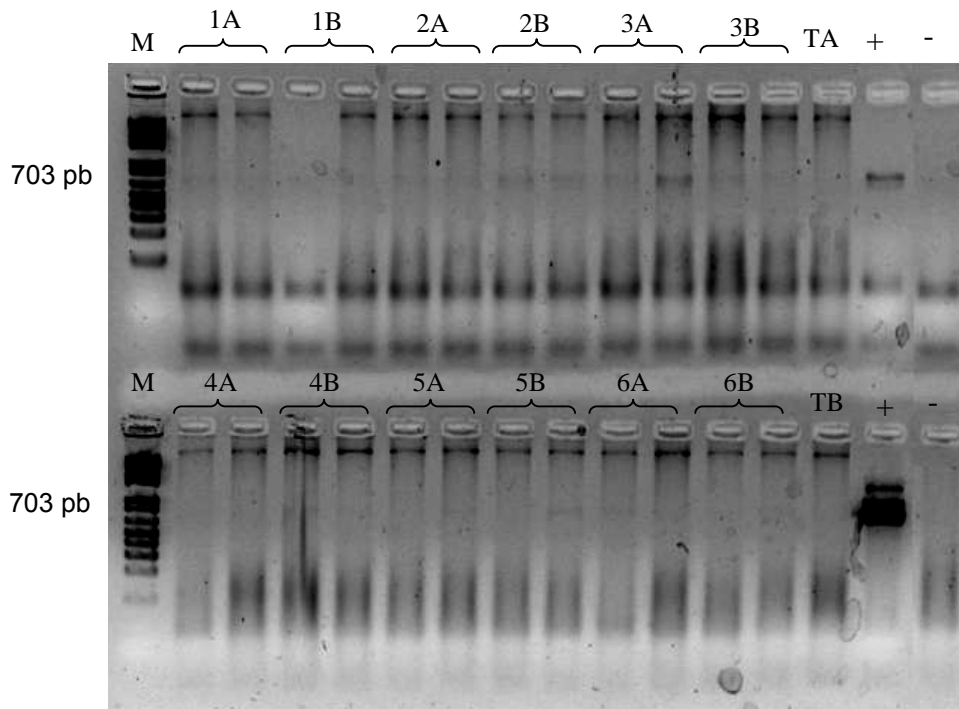


Figura 5.12 – Reação de PCR utilizando os primers A2/J5, específicos para ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, com DNA extraído de plantas inoculadas com subculturas do isolado 14, por dois métodos de inoculação: (A) infiltração nas folhas e (B) deposição no tronco em local da poda, oito meses após a inoculação. Linhas: M, marcador de peso molecular 1kb; T, testemunha inoculada com água; -, controle negativo da reação; +, controle positivo da reação com DNA de ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’.

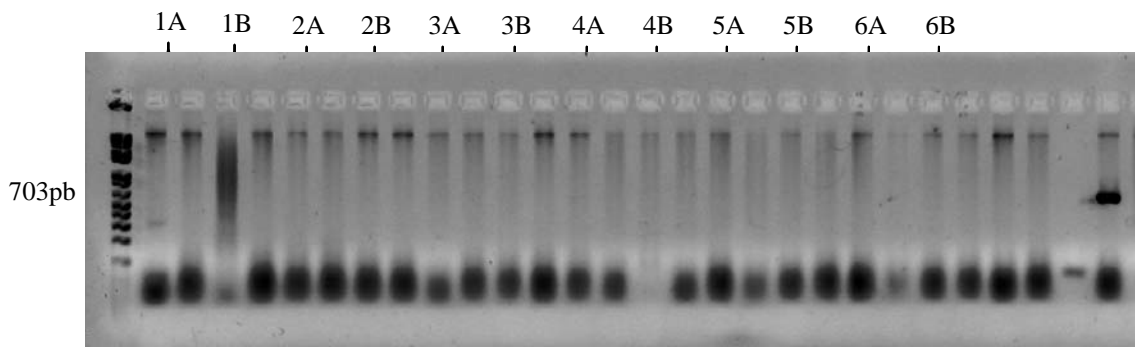


Figura 5.13 – Microscopia eletrônica de varredura de células bacterianas da subcultura 14.2 do isolado 14, obtidas de cultivos com 72 hrs em meio BCYE.

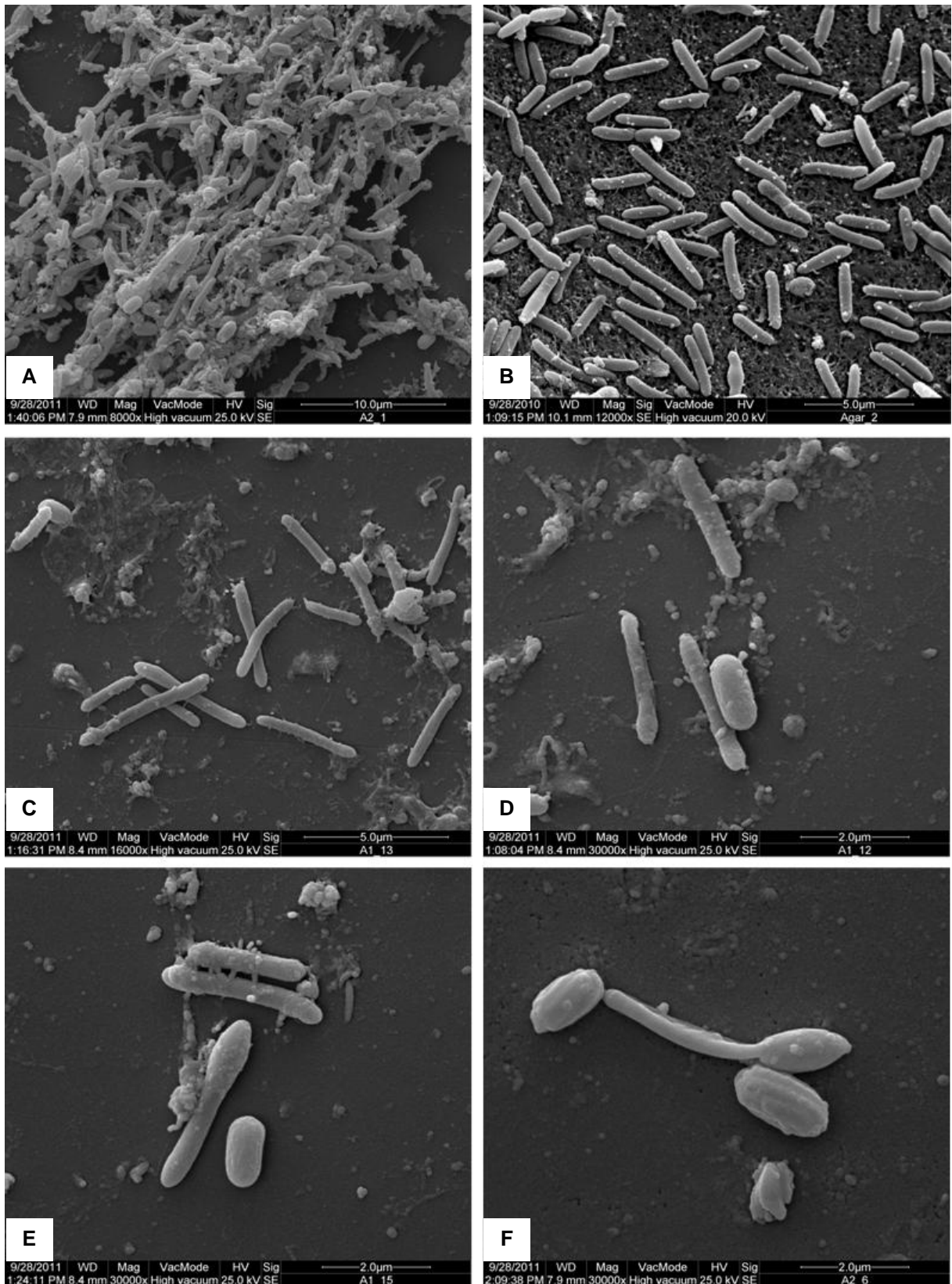
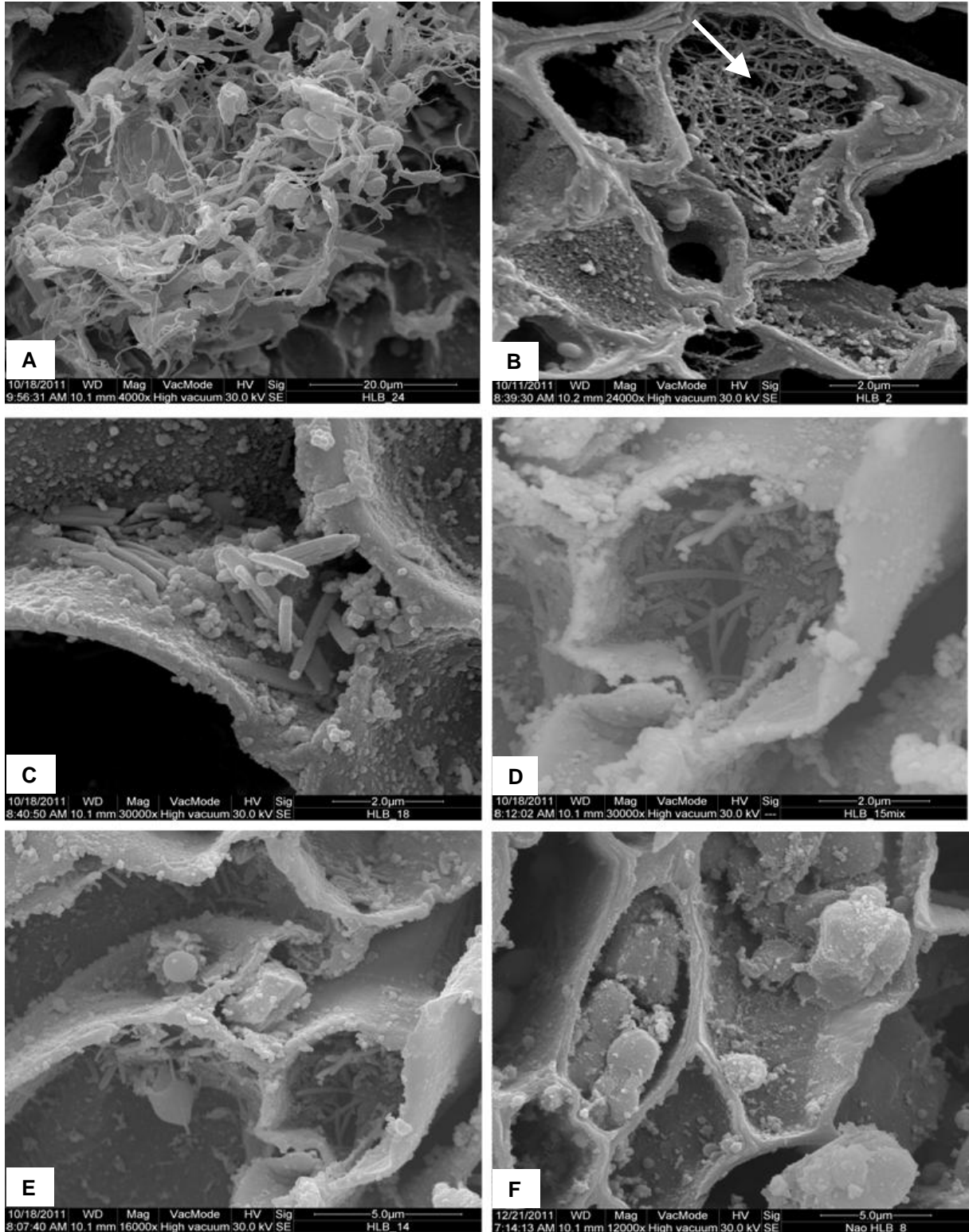


Figura 5.14 – Corte transversal do pecíolo de tecido de citros infectados com ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ em A, B, C, D e E e tecido sadio em F examinados por microscopia eletrônica de varredura. A seta em B indica a presença de biofilme no interior do vaso.



5.5 DISCUSSÃO

As tentativas de isolamento de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' em meio de cultura axênico resultaram na obtenção de 18 isolados bacterianos nos meios BCYE, PD2+E e LiberA modificado. No entanto, a confirmação para '*Ca. Liberibacter asiaticus*', por meio de PCR com os '*primers*' A2/J5, se deu apenas para o isolado 14, obtido no meio de cultura PD2+E. Cabe salientar que o meio de cultura PD2+E foi um dos meios de cultura que possibilitaram o cultivo das três espécies de *Ca. Liberibacter* spp. em trabalhos anteriores (SECHLER et al., 2009).

As transferências sucessivas da cultura original no meio BCYE geraram colônias com morfologias variadas e com rápido crescimento nesse meio. Embora as subculturas do isolado 14 tenham apresentado resultados positivos em PCR com os primers A2/J5 e OMP1F/OMP1R, específicos para '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (AHMAD et al., 2009; HOCQUELLET; BOVÉ; GARNIER, 1999), essas mesmas subculturas bacterianas apresentaram resultados negativos em PCR com os '*primers*' Oi1/Oi2c e Hp1/Lp1c, também específicos para a bactéria do HLB (BASTIANEL et al., 2005; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). Além disso, também foram observadas diferenças na morfologia das células bacterianas dessas subculturas do isolado 14 quando visualizadas por MEV, tanto para as bactérias presentes na cultura *in vitro*, obtidas neste trabalho, como daquelas presentes nos vasos do floema de plantas cítricas sintomáticas para HLB. Resultados semelhantes foram descritos por Sechler et al. (2009). Porém, as características da morfologia das células bacterianas assemelham-se às descritas por Tanaka et al. (2007), quando examinaram '*Ca. Liberibacter americanus*' em vasos do floema de *Catharantus roseus*, infectadas artificialmente.

Para a identificação dessas culturas foram realizados sequenciamento utilizando os produtos obtidos nas reações de PCR com os '*primers*' A2/J5 da região *rplAJ*, e com os '*primers*' genéricos fD1/rD1 da região 16S rDNA (WEISBURG et al., 1991). As sequências obtidas para o gene *rplAJ*, revelaram identidade de 99% das subculturas do isolado 14 obtidas com '*Ca. Liberibacter asiaticus*', enquanto que para as sequências obtidas para o gene 16S RNA revelaram identidade de 99% com *Paenibacillus barengoltizii*, *Paenibacillus* spp., e uma bactéria não cultivada. Os '*primers*' A2/J5 foram desenvolvidos especificamente para identificação de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (HOCQUELLET; BOVÉ; GARNIER,

1999) e o sequenciamento do fragmento de DNA amplificado confirmou a total similaridade da sequência gênica da subcultura do isolado 14 com a bactéria do HLB. Entretanto, quando foi analisada a região 16S rDNA flanqueada pelos 'primers' fD1/rD1, a similaridade das subculturas isolado 14 foi com outras bactérias, principalmente *Paenibacillus* spp. Como não existem estudos mais aprofundados sobre a real especificidade dos 'primers' A2/J5, é possível que esses 'primers' não tenham realmente elevada especificidade para 'Ca. Liberibacter asiaticus' ou que esta bactéria esteja em mistura com outras bactérias, como será discutido a seguir. Cabe ressaltar que todos os 'primers' para 'Ca. Liberibacter spp.' foram desenvolvidos a partir de extrações de DNA de plantas cítricas com HLB e não de culturas puras da bactéria (HOCQUELLET; BOVÉ; GARNIER, 1999; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

O crescimento de 'Ca. Liberibacter asiaticus' em associação com outra bactéria foi observado por Davis et al. (2008), porém, a bactéria associada foi identificada como sendo uma actinobactéria, próxima a *Propionibacterium acnes* (DAVIS et al., 2008). Os resultados obtidos no presente estudo também levantam a possibilidade de 'Ca. Liberibacter asiaticus' se desenvolver juntamente com outras espécies bacterianas. Segundo Davis et al. (2008), a permanência das duas bactérias em cultivos sucessivos sugerem que ambas bactérias beneficiam uma a outra para sobreviverem em meio de cultura.

Bactérias do gênero *Paenibacillus* são classificadas como Gram-positivas e estão constantemente associadas a plantas de citros infectadas ou não por HLB (SAGARAN et al., 2009; TRIVED; SPANN; WANG, 2011). Esse gênero bacteriano apresenta características benéficas para as plantas como, solubilização e fixação de nutrientes, produção de hormônios de crescimento, diminuição de stress e a supressão de patógenos (TRIVED; SPANN; WANG, 2011).

Estudos indicam que para ocorrer o desenvolvimento de sintomas em plantas contaminadas com HLB é necessário que a população de 'Ca. Liberibacter asiaticus' atinja um limiar de concentração (TRIVED et al., 2009). Isso pode explicar o fato de que, neste trabalho, embora as plantas inoculadas tenham apresentado resultados positivos para 'Ca. Liberibacter asiaticus', possivelmente, a população bacteriana não tenha atingido a concentração mínima requerida para o desenvolvimento de sintomas de HLB. No entanto, mesmo após um período de 12 meses as plantas não apresentaram sintomas e também foram obtidos resultados

negativos em PCR.

Trivedi; Spann; Wang (2011) isolaram e caracterizaram estirpes de bactérias benéficas de raízes de plantas de citros com potencial para aumentar o crescimento de plantas e suprimir doenças. Um dos seis isolados bacterianos com propriedades antagônicas mostraram máxima similaridade com *Paenibacillus validus* (TRIVED; SPANN; WANG, 2011). No presente estudo, o isolado 14 obtido apresentou 99% com *Paenibacillus barengoltizii* e *Paenibacillus* spp. com base no alinhamento de sequências do gene 16S rRNA. As propriedades antagônicas de *P. validus* contra '*Ca. Liberibacter asiaticus*' foram avaliadas *in vitro* por meio de teste de inibição, tendo sido observada maior porcentagem de redução de células vivas de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' na presença do isolado ATY16 (TRIVED; SPANN; WANG, 2011). Estas informações podem eventualmente explicar, em parte, a ausência de sintomas nas plantas inoculadas com o isolado 14, onde poderiam estar presentes em mistura '*Ca. Liberibacter asiaticus*' e *Paenibacillus* sp., e possivelmente ter promovido supressão do desenvolvimento de '*Ca. Liberibacter asiaticus*'.

A utilização da bomba de pressão de Scholander, para a extração da seiva dos ramos e folhas de citros, foi um dos diferenciais deste estudo em relação às metodologias descritas anteriormente para o isolamento de '*Ca. Liberibacter* spp.' (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). Com a bomba de pressão é possível recuperar células de bactérias endofíticas com maior eficiência do que com outros métodos de extração, pelo fato de não haver necessidade de desinfestação superficial do tecido, onde reagentes, como hipoclorito, etanol e detergentes, podem interferir na recuperação de alguns endófitos (HALLMANN; KLOEPPER; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1997). No entanto, a pequena quantidade de colônias bacterianas obtidas nos meios de cultura testados pode estar relacionada a um efeito negativo da pressão utilizada sobre a viabilidade das células bacterianas. Desse modo, ajustes na pressão pode proporcionar em melhoria da recuperação de bactérias endofíticas.

5.6 CONCLUSÕES

O isolamento de '*Ca. Liberibacter asiaticus*' em meio de cultura PD2+E e posterior cultivo em meio de cultura BCYE, é confirmada por PCR e por

sequenciamento.

A presença de bactérias do gênero *Paenibacillus* em possível associação com 'Ca. Liberibacter asiaticus' em cultura bacteriana é confirmada por PCR e por sequenciamento da região gênica 16S rDNA.

Estudos adicionais são necessários para confirmar e esclarecer os resultados obtidos neste estudo e ainda, possibilitar o estabelecimento de um protocolo consistente de isolamento e cultivo de 'Ca. Liberibacter asiaticus' em meio de cultura.

6 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com o estudo da ocorrência do HLB apenas '*Ca. Liberibacter asiaticus*' foi identificado nos pomares paranaenses;

Não há diversidade genética, baseada nas técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento parcial dos genes *omp* e *rplAJ*, entre '*Ca. Liberibacter asiaticus*' presente no Paraná e também com '*Ca. Liberibacter asiaticus*' de outras regiões citrícolas;

'*Ca. Liberibacter asiaticus*' pode estar associada a bactérias do gênero *Paenibacillus* para o seu desenvolvimento em meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ADKAR-PURUSHOTHAMA, C. R. Et al. Genetic diversity among 'Candidatus Liberibacter asiaticus' isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes. **Annals of Microbiology**, v.59, n.4, p. 681-688, 2009.
- AHMAD, K. et al. Characterization of Candidatus Liberibacter asiaticus isolated from *Citrus grandis* and *Citrus reticulata* based on 16S rDNA and Outer Membrane Protein (OMP) genes. **International Journal of agriculture and Biology**, v.11, n.4, p. 401-407, 2009.
- AUBERT, B. Integrated activities for the control of huanglongbing-greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. In: Aubert B, Tontyaporn S, Buangsuwon D (eds.) Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Region. **Proceedings of Asia Pacific International Conference on Citriculture**, Chiang Mai, Thailand, 4-10 February 1990. UNDP-FAO, Rome, p. 133-144, 1990.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: Journal. Wiley, 606 p., 1996.
- AYRES, A. J. et al. Current status of citrus HLB and efforts toward its eradication in Sao Paulo State, Brazil. In: **Second International Citrus Canker and Huanlongbing Research Workshop**, Orlando, Florida. 2005. p. 51.
- BASTIANEL, C. et al. Diversity of "Candidatus Liberibacter asiaticus", based on the Omp Gene Sequence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p. 6473-6478, 2005.
- BELASQUE JR., J. et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p. 137-145, 2009.
- BOVÉ, J. M. et al. Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India citrus decline, and Philippines leaf mottling diseases. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Proceedings of 6th Conference IOCV**, Riverside: University of California, p.12-15. 1974.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p. 7-37, 2006.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. Electron microscopy: principles e techniques for biologists. **Jones and Bartlett Publishers**, New York, 452p, 1992.
- CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.37, p. 572-576, 1967.
- CHEN J. et al. A Phytoplasma Related to "Candidatus Phytoplasma asteri" detected in Citrus showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, v.99, n.3, p. 236-242, 2009.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. First report of the causal agent of huanglongbing “*Candidatus Liberibacter asiaticus* in Brazil”. **Plant Disease**, v.88, p. 1382, 2004.

COLETTA-FILHO, H. D., et al. Analysis of 16S rDNA Sequences from Citrus Huanglongbing Bacteria Reveal a Different “*Ca. Liberibacter*” Strain Associated with Citrus Disease in São Paulo. **Plant Disease**, v.89, n.8, p. 848-852, 2005.

DA GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29. p.109-136, 1991.

DA GRAÇA, J. V.; KORSTEN, L. Citrus huanglongbing: review, present status and future strategies. **Diseases of Fruits and Vegetables**, v.1, p. 229-245, 2004.

DAVIES, R. L., MACCORQUODALE, R; CAFFREY, B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. **Veterinary Microbiology**, v.91, p.169–182, 2003.

DAVIS, M. J. 2001. Fastidious phloem-limited bacteria. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria**; 3th ed. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 2001. p. 275-282.

DAVIS, M. J. et al. Co-cultivation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* with Actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Disease**, v.92, n.11, p. 1547-1550, 2008.

DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the Pierce’s disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p. 425-429, 1980.

DENG, X. et al. Identification and characterization of the huanglongbing bacterium in pummelo from multiple locations in Guangdong, P. R. China. **Plant Disease**, v.92, n.4, p. 513-518, 2008.

DODDAPANENI, H. et al. Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of the citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium *Candidatus Liberibacter*. **BMC Research**, v.1, n.72, p. 1-9, 2008.

FURUYA, N. et al. Sequence homogeneity of the psiserA-trmU-tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB gene cluster and the flanking regions of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates around Okinawa Main Island in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v.76, n.2, p. 122-131, 2010.

GARNETT, H. M. Isolation of the greening organism. **Citrus and Subtropical Fruit Journal**, v.611, p. 4-5, 1984.

GARNIER, M. et al. Genomic characterization of a liberibacter present in a ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of “*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p. 2119-2125, 2000.

- GARNIER, M. et al. Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies: serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Proceedings of 11th Conference IOCV**, Riverside: University of California, p.428-435, 1991.
- GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Distribution of the huanglongbing (greening) liberobacter species in fifteen African and Asian countries. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Proceedings of 13th Conference IOCV**, Riverside, p. 388-391, 1996.
- GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Proceedings of 9th Conference IOCV**, Riverside: University of California, p.115-124, 1984.
- GARNIER, M.; MARTIN-GROS, G.; BOVÉ, J. M. Monoclonal antibodies against the bacteria-like organism associated with citrus greening disease. **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie**, v.138, p.639-650, 1987.
- GHOSH, et al. Isolation and culture of mycoplasma associated with citrus greening disease. **Current Science**, v.40, p.299-300, 1971.
- GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**. Doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV. 2007
- HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v.87, p.330-353, 2004.
- HALLMANN; KLOEPPER; RODRÍGUEZ-KÁBANA, Application of scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 411-416, 1997.
- HOCQUELLET, A. et al. Detection and identification of the two "*Candidatus Liberobacter*" species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the b operon. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, p. 373-379, 1999.
- HOCQUELLET, A.; BOVÉ, J. M.; GARNIER M. Isolation of DNA from the uncultured "*Candidatus Liberobacter*" species associated with citrus huanglongbing by RAPD. **Current Microbiology**, v.38, p. 176-82, 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201111.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 379-386, 1994.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. PCR detection of the two '*Candidatus liberobacter*' species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, p.43-50, 1996.

LIN, K. H. Yellow shoot of citrus. Symptomatology. Investigations in the cause of huanglongbing. Natural transmission and spread. General conclusions. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.2, p. 1-42, 1956.

LIN, K. H., et al. Acquisition of uncharacterized sequences from '*Candidatus Liberibacter*', an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p. 30-37, 2008.

LLAUGER, R. et al. PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with Citrus Huanglongbing in Cuba. **Tropical Plant Pathology**, v.33, S93, 2008.

LOPES, S. A. et al. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by '*Candidatus Liberibacter americanus*'. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p. 463-468, 2007.

LOPES, S. A. et al. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopathology**, v.99, n.3, p.301-306, 2009a

LOPES, S. A. et al. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, v.93, n.3, p. 257-262, 2009b.

LOPES, S. A.; MARTINS, E. C.; FRARE, G. F. Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathologica**, v.31, p. 48-49, 2005.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p. 81-125, 1999.

MANNING, D. C.; RESCHKE D. K.; JUDD, R. C. Omp85 proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* are similar to *Haemophilus influenzae* D-15-Ag and *Pasteurella multocida* Oma87. **Microbiology and Pathology**, v. 25, p. 11-21, 1998.

MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. *Citrus psylla*, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Science**, v.8, p. 297-298, 1965.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology**, v.29, p. 315-332, 2006.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Stanford, v.8, n.19, p.4321-4325, 1980.

MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E. Taxonomic Note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.45, p. 186-187. 1995.

NUNES, W. M. C. et al. Plano de ação para o controle de huanglongbing no Estado do Paraná, Brasil. **Citrus Research and Tecnology**, v.31, n.2, p.169-177, 2010.

NUNES, W. M. C. et al. Primeira constatação de huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, S.1094, 2007.

OKUDA, M., et al. Characterization of the *tuFB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. **Plant Disease**, v.89, p. 705-711. 2005.

PLANET, P. et al. Detection and characterization of the African citrus greening *Liberibacter* by amplification, cloning and sequencing of the *rplKAJL-rpoBC* operon. **Current Microbiology**, v.30, n.1, p. 37-141, 1995

SAGARAN, U. S. et al. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected citrus using PhyloChip Arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1566-1574, 2009.

SECHLER, A. et al. Cultivation of '*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v.99, n.5, p.408-486, 2009.

STENZEL, N. M. C. et al. Comportamento da laranjeira 'Folha Murcha' em sete porta-enxertos no Noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.3, p. 408-411, 2005.

STOHARD, D. R.; BOGUSLAWKI, G.; JONES, R. B. Jones. Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. **Infection and Immunity**, v.66, p. 3618-3625. 1998.

SUBANDIYAH, S. et al. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. **Plant Disease**, 84: 15-18. 2000.

TANAKA, F. A. O. et al. Detection of the "*Candidatus* *Liberibacter americanus*" in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseous* by scanning electron microscopy. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p.519, 2007.

TEIXEIRA, D. C. et al. '*Candidatus* *Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1857-1862, 2005b.

TEIXEIRA, D. C. et al. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v.98, n.9, p. 977-984, 2008.

- TEIXEIRA, D. C. et al. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus Liberibacter*' species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.173-179, 2005a.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p. 4673-4680, 1994.
- TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM J. H. (eds.). **Compendium of Citrus Diseases** (2nd ed.). APS Press, St. Paul, MN. 80 p., 2000.
- TOMIMURA, K. et al. Evaluation of genetic diversity among '*Candidatus Liberibacter* spp.' isolates collected in Southeast Asia. **Phytopathology**, v.99, n.9, p. 1062-1069. 2009.
- TRIVEDI, P.; SPANN, T.; WANG, N. Isolation and Characterization of Beneficial Bacteria Associated with Citrus Roots in Florida. *Microbial Ecology*, v.62, n.2, p. 324-336, 2011.
- TRIVEDI, P. et al. Quantification of viable *Candidatus Liberibacter asiaticus* in host using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). **Europe Journal Plant Pathology**, v.124, p.553-563, 2009.
- TYLER, H. L. et al. Confirmation of the Sequence of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" and Assessment of Microbial Diversity in Huanglongbing-Infected Citrus Phloem Using a Metagenomic Approach. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, n.12, p. 1624-1634, 2009.
- VILLECHANOUX, S. et al. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rpKAJL-rpoBC* gene-walking method. **Current Microbiology**, v.26, p. 161-166, 1993.
- VINCZE, T.; POSTAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to ceave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.13, p. 3688-3691, 2003.
- WEISBURG, W. G. et al. 16S ribossomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.
- WELLS, J. M. et al. Media for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. **Applied Environmental Microbiology**, n.42, p. 357-363, 1981.
- WULFF, N. A. et al. rRNA operons and genome size of "*Candidatus Liberibacter americanus*", a bacterium associated with citrus huanglongbing in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.59, p.1984-1991, 2009.
- YAMAMOTO, P. T. et al. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop**, Ribeirão Preto, SP, Brazil, p. 96, 2006.

YAMAMOTO, P. T. et al. Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. **BioAssay**, v.4, n.4 (*on line*). 2009

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, n.73, p. 2271-2277, 1991.

YU, X. J.; MCBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Genetic diversity of the 28-kilodalton outer membrane protein gene in human isolates of *Ehrlichia chaffensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 1137-1143, 1999.

ANEXOS

ANEXO 4.1 – Alinhamento entre as sequências obtidas neste estudo com gene *omp*, utilizando o programa CLUSTAL W.

```

1          TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
3          TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
10         TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
16         TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
35         TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
45         TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
121        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
215        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
251        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
302        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
317        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
410        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
540        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
573        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
666        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
738        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
748        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
757        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
309        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
790        TATGGATGCGTATGCTTGCTTGATGTTATGCACATCAGCATTGACGGTATCTTCATCGTA 60
*****

1.         TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
3.         TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
10        TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
16        TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
35        TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
45        TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
121       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
215       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
251       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
302       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
317       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
410       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
540       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
573       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
666       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
738       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
748       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
757       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
309       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
790       TGCAGCCGAGATCGAGAGCGAACTATCATCTTCAATTGATCATCTTTGAGATTATTATT 120
*****

1.         CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
3.         CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
10        CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
16        CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
35        CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
45        CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
121       CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
215       CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
251       CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
302       CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
317       CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
410       CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180

```

540 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
573 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
666 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
738 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
748 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
757 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
309 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180
790 CCCACTAAAAAAAAAGATGATTGATAAATCTTTCTTTCTATTAAATCTATAATAAGAACAGA 180

1. ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
3. ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
10 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
16 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
35 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
45 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
121 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
215 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
251 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
302 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
317 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
410 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
540 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
573 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
666 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
738 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
748 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
757 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
309 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240
790 ATCTACAATTTTGATTTTTACATTAGAAAAATATCCCATAGCGTAAATATTTTTTCACGGC 240

1. ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
3. ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
10 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
16 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
35 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
45 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
121 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
215 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
251 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
302 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
317 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
410 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
540 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
573 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
666 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
738 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
748 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
757 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
309 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300
790 ATGATCCAAATCTGCATCAGAAATAGATTGTCCCTACTACTACAGGAATACGAGACAAAAT 300

1. TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360
3. TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360
10 TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360
16 TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360
35 TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360
45 TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360
121 TACCTCTTTACCTACATTCGTGGCACCTCGAATCTCAATCCGGCGAACAATAGATGTATT 360

1. TTTA 484
3. TTTA 484
10 TTTA 484
16 TTTA 484
35 TTTA 484
45 TTTA 484
121 TTTA 484
215 TTTA 484
251 TTTA 484
302 TTTA 484
317 TTTA 484
410 TTTA 484
540 TTTA 484
573 TTTA 484
666 TTTA 484
738 TTTA 484
748 TTTA 484
757 TTTA 484
309 TTTA 484
790 TTTA 484

ANEXO 4.2 – Alinhamento entre as sequências obtidas neste estudo com gene *rplAJ*, utilizando o programa CLUSTAL W.

```

2          GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
10         GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
16         GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
18         GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
76         GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
109        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
119        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
135        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
147        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
150        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
152        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
157        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
175        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
215        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
232        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
233        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
239        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
251        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
253        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
256        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
259        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
263        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
266        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
300        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
302        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
305        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
311        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
317        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
330        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
335        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
748        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
350        GTTTTTTGTGTGGATTCCTTTTTCGCTATCGGATCGCTTCTTTTTTGTAAGGGATGCGTT 60
*****

2          AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
10         AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
16         AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
18         AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
76         AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
109        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
119        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
135        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
147        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
150        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
152        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
157        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
175        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
215        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
232        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
233        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
239        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
251        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
253        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
256        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
259        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120
263        AGGATTTTTGTTCTTCTTCGAAATCAAGATATGAAAATATTTTCTTGGTATAGATATAGG 120

```


330 GGTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAATTGCTTCTTTACCCGA 540
335 GGTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAATTGCTTCTTTACCCGA 540
748 GGTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAATTGCTTCTTTACCCGA 540
350 GGTGTAGAGAAGGGCGTCCTTAATCAAGATTCTATCAAGCAAATTGCTTCTTTACCCGA 540

2 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
10 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
16 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
18 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
76 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
109 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
119 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
135 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
147 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
150 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
152 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
157 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
175 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
215 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
232 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
233 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
239 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
251 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
253 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
256 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
259 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
263 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
266 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
300 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
302 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
305 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
311 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
317 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
330 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
335 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
748 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
350 TCTTGAGGGTATTCGAGCTGGTATCATAA 569
