

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“CARACTERIZAÇÃO E DIAGNOSE MOLECULAR DE *Xanthomonas*
sp, AGENTE CAUSAL DA FALSA ESTRIA VERMELHA DA CANA-
DE-AÇÚCAR NO BRASIL”**

Lídia de Souza

São Carlos

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“CARACTERIZAÇÃO E DIAGNOSE MOLECULAR DE *Xanthomonas*
sp, AGENTE CAUSAL DA FALSA ESTRIA VERMELHA DA CANA-
DE-AÇÚCAR NO BRASIL”**

Lídia de Souza

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

São Carlos

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S731cd

Souza, Lídia de.

Caracterização e diagnose molecular de *Xanthomonas* sp. Agente causal da falsa estria vermelha da cana-de-açúcar no Brasil / Lídia de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

83 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Bactérias gran-negativa. 2. *Xanthomonas*. 3. rep-PCR. 4. Hibridização DNA-DNA. I. Título.

CDD: 589.96 (20^a)

Orientador
Prof. Dr. Eder Antônio Giglioti

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida mãe Licia de Avelar Krüger, e ofereço ao meu namorado Chrystian Osami Watanabe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Éder Antônio Giglioti, por ter me acolhido como orientada no andamento do curso e por ter proporcionado orientação e compreensão nos momentos difíceis.

À minha mãe Licia, mulher de poucas palavras mas de extrema força e coragem, que soube mostrar pela sua conduta que humildade e o caminho da busca do conhecimento.

Ao Dr. Rui Pereira Leite Júnior, pesquisador do IAPAR, pelos isolados *Xanthomonas* cedidos.

Ao Dr. Julio Rodrigues Neto, pesquisador do IB, pelos isolados de *Xanthomonas* cedidos.

Aos membros titulares da banca examinadora pela disponibilidade e participação.

Ao programa de pos graduação de Genética e Evolução pela excelente oportunidade a qual proporcionou este trabalho de dissertação de mestrado.

Ao Departamento de Biotecnologia Vegetal e sua equipe pela estrutura e suporte cedido durante o desenvolvimento experimental.

A equipe do antigo LAFIMEG do CCA/ UFSCar de Araras.

Ao Departamento de Fisiologia do CCBS da UFSCar de São Carlos pela sua atenção e amparo na hora de extrema dificuldade.

À Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo a toda equipe do Laboratório de Bioquímica UFSCar/São Carlos, pelo profissionalismo, atenção e serenidade no auxílio à condução dos experimentos de hibridização DNA-DNA.

À FAPESP, CNPq pelo auxílio financeiro.

Com Paciência

Provações te buscaram.

Dificuldades te agitam.

Tudo parece noite ao redor de teus passos.

Não te detenhas, no entanto, a fim de medir as sombras.

Prosegue trabalhando e não te afastes da paciência.

Por nada te desespere.

Dá tempo a Deus para que Deus te acenda nova luz

Emmanuel

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fragmento de aproximadamente 1502 pares de bases de DNA 22
ribossômico amplificado com os iniciadores 16F27 e 16R1525. Amostras: M,
100bp marcador; 1, BRA 58 (*X.sp*); 2, BRA62 (*X.sp*).
- Figura 2.** Hibridização de DNA-DNA de espécies de *Xanthomonas* utilizando o 31
isolado BRA58 de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha, como
sonda. (A) Membrana hibridizada com sonda da região ribossomal 16S do isolado
BRA58 *X. sp* (B) Membrana hibridizada com sonda do DNA genômico do isolado
BRA58 *X. sp*
- Figura 3.** Homologia de DNA-DNA (%) entre o isolado BRA58 de *Xanthomonas* 32
sp., agente causal da falsa estria vermelha, utilizado como sonda (16S/DNA
genômico), e espécies descritas de *Xanthomonas*.
- Figura 4.** Perfil gerado por PCR com iniciadores complementares aos elementos 42
repetitivos, BOX-, ERIC- e REP-PCR, para os isolados representantes do gênero
Xanthomonas. Amostras: M 1Kb 1, *X. fragaria* 2, *X. hortorum* 3, *X. arboricola* 4, *X.*
cassavae 5, *X. codiae* 6, *X. bromi* 7, *X. axonopodis* pv. *axonopodis* 8, *X. axonopodis*
pv. *vasculorum* 9, *X. oryzae* 10, *X. vasicola* 11, *X. vasicola* pv. *vasculorum* 12, *X. vasicola* pv.
Holcicola 13, *X. pisi* 14, *X. melonis* 15, *X. vesicatoria* 16, *X. campestris* 17, *X. translucens*
18, *X. hyacinthi* 19, *X. sacchari* 20, *X. albilineans* 21 e *X.sp* 22(LAF62 e 58).

Figura 5. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo BOX-PCR.	47
Figura 6. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo ERIC-PCR.	48
Figura 7. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo REP-PCR.	49
Figura 8. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo rep-PCR.	50
Figura 9: Teste de patogenicidade do isolado BRA58, <i>Xanthomonas</i> sp (FEV), inoculado em cana-de-açúcar da variedade suscetível RB855113.	58
Figura 10. Perfil gerado por PCR com iniciadores complementares ao elemento repetitivo REP-, para os isolados representantes de seis <i>Xanthomonas</i> já isoladas de cana-de-açúcar. Amostras: M1, 1-Kb ladder marcador M2, 100-bp ladder marcador; 1 e 7, <i>X. sp</i> BRA 62; 2 e 8, <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> MUS 53; 3, <i>X. sacchari</i> GLP 17; 4, <i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> ZIM 97; 5, <i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i> REU 63; e 6, <i>X. albilineans</i> GLP 55.	59
Figura 11. Alinhamento das seqüências XSPFRS1 com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	61
Figura 12. Alinhamento das seqüências XSPFRS2 com os iniciadores (FRS1/FRS2) utilizados na diagnose da <i>X. sp.</i>	62

Figura 13. Hibridização com sonda 16S (A) e com fragmento gerado com iniciadores FRS1/FRS2 (302bp), *X. sp* (B). Amostras: 1, *X. codiae*; 2, *X. oryzae* pv. *oryzae*; 3, *X. pisi*; 4, *X. translucens*; 5, *X. campestri*; 6, *X. cynerae*; 7 e 8 *X. sp*; 9, *X. arboricola*; 10, *X. cucurbitae*; 11, *X. hortorum*; 12, *X. sacchari*; 13, *X. vasicola* pv. *holcicola*; 14, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*; 15, *X. vasicola* pv. *vasculorum*; 16, *X. albilineans*; 17, *X. vasicola*; 18, *X. melonis*; 19, *X. fragaria*; 20, *X. hyacinthi*; 21, *X. axonopodis* pv. *axonopodis*; 22, *X. vesicatória*; 23, *X. bromi* e 24, *X. theicola*

Figura 14. Amplificação do fragmento de DNA 303bp com PCR de colônia, em diluição em série, utilizando a *Xanthomonas* sp (BRA62). Amostras: M-1 kb ladder marcador; 1, 10^7 ; 2, 10^6 ; 3, 10^5 ; 4, 10^4 ; 5, 10^3 ; 6, 10^2 ; 7, 10^1 ; 8, 10^0 ; 9, 10 e 11, H₂O; 12, controle positivo DNA (*X. sp*, BRA62); e 13, controle negativo (*X. axonopodis* pv. *vasculorum*, MUS53)

Figura 15. (A) Limite de detecção para uma quantidade variável de DNA de *Xanthomonas* sp. usando FRS1 e FRS2 específico para *Xanthomonas* sp. Amostras; M, 1 kb ladder; 1- 2, 25pg/ ul; 3- 4, 25ng/ ul; 5-6, 250 ng/ ul DNA. (B) Amplificação de DNA genômico de Xanthomonads com FRS1 e FRS2. Amostras: M; 1-Kb ladder marcador; 1, *X. sp* (BRA58); 2, *X. sp* (BRA62); 3, *X. codiae*; 4, *X. oryzae* pv. *oryzae*; 5, *X. pisi*; 6, *X. translucens*; 7, *X. campestri*; 8, *X. cynerae*; 9, *X. arboricola*; 10, *X. cucurbitae*; 11, *X. hortorum*; 12, *X. sacchari*; 13, *X. vasicola* pv. *vasculorum*; 14, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*; 15, *X. vasicola* pv. *holcicola*; 16,

X. albilineans; 17, *X. vasicola*; 16, *X. melonis*; 18, *X. cassavae*; 19, *X. fragaria*; 20, *X. hyacinthi*; 21, *X. axonopodis* pv. *axonopodis*; 22, *X. vesicatória*; 23, *X. bromi* ; and 24, *X. theicola*. Lane:25-34, saprophytes; 35, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; 36, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*; and 37, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz de similaridade da região 16S do DNA entre o isolado de <i>Xanthomonas</i> sp. BRA58 e espécies descritas de <i>Xanthomonas</i> .	23
Tabela2. Matriz similariedade elemento BOX-PCR	43
Tabela 3. Matriz similariedade elemento ERIC-PCR	44
Tabela 4. Matriz similariedade elemento REP-PCR	45
Tabela 5. Matriz similariedade elemento rep-PCR	46

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
4. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S DE <i>Xanthomonas</i> sp (FEV)	
4.1. INTRODUÇÃO	13
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA DE <i>Xanthomonas</i> sp, AGENTE CAUSAL DA FALSA ESTRIA VERMELHA, E ESPÉCIES DESCRITAS DE <i>Xanthomonas</i>	
5.1. INTRODUÇÃO	24
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Xanthomonas</i> sp PATOGÊNICA A CANA-DE-AÇÚCAR ATRAVES DE REP-PCR	
6.1. INTRODUÇÃO	33
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	34
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
7. DIAGNOSE ESPECÍFICA DE <i>XANTHOMNAS</i> SP.(FALSA ESTRIA VERMELHADA CANA-DE-AÇÚCAR) COM INICIADORES IDENTIFICADOS POR REP-PCR	
7.1. INTRODUÇÃO	51
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	53
7.3. RESULTADOS	58
7.4. DISCUSSÃO	66
8. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10. ANEXOS	83

1. INTRODUÇÃO

Em Dezembro de 1995, inspeções de campo, na Estação Experimental da Universidade Federal de São Carlos em Valparaíso (SP), enfrentamos uma grande dificuldade para padronizar um método para determinar a intensidade de doença e, conseqüentemente, avaliar a resistência de genótipos de cana-de-açúcar à estria vermelha (ESV) causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Giglioti et al., 1999; Giglioti & Matsuoka, 2000). Não havia coerência epidemiológica, principalmente quanto ao tipo de sintomas e distribuição de plantas doentes no campo. Embora tenha sido inicialmente suspeitado do comportamento diferencial entre genótipos ser o responsável por tal observação, logo em seguida foi demonstrado por Giglioti et al. (1996ab) que sintomas causados por uma *Xanthomonas* (Almeida, 1994; Almeida et al., 1989; Carvalho, 1991) tinham sido erroneamente creditados a ESV. Então, o nome falsa estria vermelha (FEV) foi adotado para designar a nova doença (CCA/UFSCar, 1997; Giglioti et al., 1998, Giglioti et al., 1999; Giglioti & Matsuoka, 2000) aparentemente diferente de todas as outras já descritas em cana-de-açúcar.

A bactéria agente causal da FEV foi inicialmente identificada como *Xanthomonas campestris* (Almeida et al., 1989; Carvalho, 1991) e, desde que não haviam sido detectadas significativas diferenças culturais, bioquímicas, fisiológicas e sorológicas entre o patógeno da FEV e da gomose (*Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*) foi sugerido que as duas bactérias poderiam ser a mesma (Almeida, 1994; Carvalho, 1991). Contudo, sabe-se que inúmeras tentativas de identificação de estirpes, patovares e espécies de *Xanthomonas* por características bioquímicas e fisiológicas falharam. Isolados similares patogênicos ao mesmo hospedeiro podem apresentar uma estrutura genética diversa, tornando difícil a

caracterização apenas por técnicas bioquímicas e fisiológicas. Mesmo usando o sistema de microplacas “Biolog GN microplat system” (Biolog. Inc., Hayward, Calif.) para identificar características fenotípicas que distinguem xanthomonads, ambos *X. axonopodis* e *X. vasicola* produziram tanto padrões heterogêneos ou padrões que não foram característicos e, por esse motivo, não puderam ser devidamente descritos em termos de seus padrões de utilização de diferentes fontes de carbono (Vauterin et al., 1995). O comportamento heterogêneo de *X. axonopodis* foi também determinado por hibridização de DNA-DNA e pela técnica “fatty acid methyl esters” – FAME. De acordo com esses autores, a dificuldade de separar espécies de *Xanthomonas* sugere a necessidade de mais de uma simples técnica para permitir a não ambígua identificação de qualquer nova espécie do gênero.

Além da dificuldade de diferenciar espécies de *Xanthomonas*, a taxonomia do agente causal da gomose da cana-de-açúcar é também confusa, sendo os sintomas atribuídos a duas espécies xanthomonads: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, ambos inicialmente denominados *X. campestris* pv. *vasculorum* (Vauterin et al., 1995). *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola*, agente causal de estria em sorgo (Valterin et al., 1995), foi também encontrado causando estrias foliares em cana-de-açúcar (ex. *X. c.* pv. *holcicola*).

Numa tentativa de determinar a posição taxonômica da bactéria da FEV, Giglioti et al. (1999) analisaram a relação genética entre o grupo xanthomonad que ataca cana-de-açúcar através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE). Os padrões de bandas obtidos para sete isolados de *X. sp.* agente causal da FEV não pareceu com nenhum outro haplotipo já identificado entre as *Xanthomonas* que atacam cana-de-açúcar ou outras Poaceae. A maior similaridade entre xanthomonad foi de apenas 35% com *X. a.* pv. *vasculorum*. Portanto, todas as evidências são que a bactéria causadora da FEV pode ser

uma nova espécie ou patovar de *Xanthomonas*. No entanto, isso necessita de comprovação, o que requer um estudo polifásico, utilizando-se várias técnicas para caracterização fenotípica e molecular e inoculações cruzadas. O gênero *Xanthomonas* apresenta a região ribossomal 16S muito conservada (Hauben et al., 1997) e seu sequenciamento é imprescindível para definir corretamente o gênero. Em 1995, a reclassificação do gênero *Xanthomonas*, resultando em 20 espécies, foi feita por Vauterin et al. (1995), considerando principalmente a porcentagem de homologia de DNA-DNA para definir as espécies. Bactérias com 70% ou mais de homologia foram agrupadas e consideradas de uma mesma espécie.

Como os estudos de hibridação DNA-DNA são bastante laboriosos, os elementos repetitivos REP, ERIC e BOX, conjuntamente chamados de rep, têm sido alternativamente utilizados para caracterização de bactérias fitopatogênicas (Louws et al., 1994), incluindo *Xanthomonas* (Egel et al., 1991; Louws et al., 1994; Louwis et al., 1995; Vera Cruz et al., 1996). Excelente correlação entre os grupos determinados por Vauterin et al. (1995) e coeficientes de similaridade obtidos a partir de análises de perfis de bandas gerados por rep-PCR foram obtidos por Rademaker et al. (2000), sugerindo o uso de rep-PCR como uma técnica ao menos auxiliar.

Isolamento em meio de cultura pode ser um método bastante útil para a detecção de *Xanthomonas* sp. (*X.sp*), agente causal da falsa estria vermelha em cana-de-açúcar (FEV), uma nova doença no Brasil (Giglioti et al., 1999). O meio de cultura frequentemente utilizado consiste de uma modificação do meio DYGS desenvolvido por Rodrigues Neto et al. (1986). Os isolados de *X. sp* podem ser obtidos de folhas sintomáticas. Crescimento confluyente em meio DYGS modificado fica visível após 1,5 dias e as colônias isoladas aparecem após 3 a 4 dias a 28° C. As colônias são circulares com borda irregulares,

convexas, viscosas, brilhantes e de coloração amarelo-limão. A bactéria causa uma pigmentação no meio sólido com aproximadamente 7 dias de incubação. Testes serológicos de microprecipitação em lâminas de microscopia têm sido utilizados para rapidamente distinguir o agente causal da FEV de outras bactérias amarelas, endofíticas em folhas de cana-de-açúcar, que crescem conjuntamente no meio de cultura (Giglioti et al., 1999).

Como se trata de uma nova doença da cana-de-açúcar, ainda não foram conduzidos estudos sobre os modos de disseminação/penetração da bactéria, o padrão de colonização de tecidos e também o modo de sobrevivência do patógeno na natureza. Para tanto, um método de detecção bastante sensível e rápido é necessário para poder testar um grande número de amostras. Tal método será também bastante útil para as estações de quarentena, uma vez que a doença só foi, por enquanto, detectada no Brasil e sua entrada em outros países deve ser evitada (Giglioti et al., 1999). Neste particular, o uso de técnicas baseadas na amplificação de fragmentos específicos de DNA, através da reação da polimerase em cadeia (PCR), tem proporcionado rápida e precisa detecção de outras *Xanthomonas* patogênicas a plantas, inclusive a cana-de-açúcar (Lopes et al., 1998; Davis et al., 1998, Pan et al., 1999). Em alguns casos, alguns genes específicos, tal como o hrp em espécies de *Xanthomonas* (Leite et al., 1994), tem sido utilizado para detecção.

Diante do exposto, o presente trabalho utilizou as técnicas moleculares de hibridação de DNA-DNA, rep-PCR, clonagem e sequenciamento para caracterizar a nova *Xanthomonas* patogênica à cana-de-açúcar e para desenvolver um método de diagnose da doença.

2. OBJETIVOS

- Determinar a posição taxonômica da nova *Xanthomonas* sp. agente causal da FEV através de:
 - Sequenciamento e análise da região ribossomal 16S;
 - Hibridação de DNA-DNA; e
 - Análise de padrões de bandas obtidos por rep-PCR.

- Desenvolver um método sensível, específico e prático para detecção de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha da cana-de-açúcar, através da técnica da reação de polimerase em cadeia (PCR)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Taxonomia de *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* inclui bactérias Gram-negativas, geralmente apresentando pigmento amarelo, distribuídas no mundo todo causando importantes doenças em mais de 392 espécies de plantas cultivadas. A especialização fitopatogênica e a ampla gama de hospedeiros dos membros do gênero *Xanthomonas* têm feito destes microorganismos objetos de inúmeros estudos taxonômicos. Inicialmente, a taxonomia de *Xanthomonas* foi dominada por técnicas de análise fenotípica pelas quais uma única característica (bioquímica ou fisiológica), especificidade por hospedeiro, determinava a classificação do gênero. Desde a primeira xanthomonad descrita até 1974, era comum a prática de definir uma xanthomonad fitopatogênica isolada de uma nova planta hospedeira como uma nova espécie de *Xanthomonas*. O número sem razão de espécies resultantes dessa prática foi drasticamente reduzido por Dye e Lelliott (1974), justificando a reclassificação pela impossibilidade de diferenciar espécies por outras características além da especificidade por hospedeiro. De acordo com essa reclassificação, apenas quatro espécies de *Xanthomonas* (*X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris* e *X. fragariae*) puderam ser diferenciadas pelos testes bioquímicos e fisiológicos, sendo os 143 patovares de *X. campestris* não diferenciados pelo metabolismo celular ou outras características fenotípicas além da especificidade por hospedeiros. No entanto, identificação baseada em testes de patogenicidade que podem ser não conclusivos e abertos a interpretações alternativas (Gabriel et al., 1989; Gabriel & Fuyter, 1992; Lazo et al., 1987). Nos últimos anos, trabalhos têm proporcionado evidências que a diferenciação de patovares baseadas na especificidade de hospedeiros não é uma reflexão de relações genéticas. Várias tentativas

têm sido feitas para classificar patovares e raças usando características alternativas do patógeno.

Técnicas moleculares têm sido utilizadas cada vez mais em estudos de taxonomia e epidemiologia de espécies de *Xanthomonas*. Tal fato tem permitido o desenvolvimento de diferentes provas para detecção e identificação por hibridização ou PCR e para análise de estrutura de populações no campo. Vauterin et al. (1995) apresentaram e sintetizaram todos os dados disponíveis de homologia de DNA para o gênero *Xanthomonas* e propuseram uma nova classificação para espécies nas quais tanto as relações genéticas quanto às necessidades para a fitopatologia foram consideradas. Dados fenotípicos, incluindo aqueles obtidos por “Biolog GN microplate System”, foram utilizados para descrever e diferenciar as xanthomonads em 20 diferentes grupos (espécies).

Análise de estrutura populacional de bactérias por rep-PCR

Os organismos procariotos, incluindo *Xanthomonas* fitopatogênicas, possuem famílias de sequências de DNA repetitivo dispersas ao longo de seus genomas que podem ser utilizadas como regiões para o anelamento de primers específicos. Três famílias têm sido estudadas em maior detalhe: “repetitive extragenic palindromic (REP)” de 35 a 40-pb (Stern et al., 1984); “enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)” de 124 a 127-pb (Hulton et al., 1991); e “BOX element” de 154-pb (Martin et al., 1992). Estas sequências parecem estar localizadas em posições intergênicas distintas ao redor dos cromossomos. Os elementos repetitivos podem estar presentes nas duas orientações nos cromossomos, e primers específicos têm sido desenhados para leitura (“read outward”) de repetições invertidas nas sequências REP e ERIC, e da subunidade boxA de BOX (Versalovic et al.,

1994). O uso desses iniciadores e a técnica de PCR permitem a amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre cada uma das seqüências REP, ERIC ou BOX. O correspondente protocolo para REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR é chamado coletivamente **rep-PCR** (Versalovic et al., 1991; 1994). Bandas amplificadas apresentam tamanhos diferentes e são separados por eletroforese em gel de agarose, lembrando padrões de código de barras, análogos a códigos UPC utilizados em supermercados e lojas, funcionando como uma assinatura para o isolado bacteriano em estudo.

Os elementos REP, ERIC e BOX têm potencial para formar estruturas “stem-loop” e podem desempenhar um importante papel na organização do genoma bacteriano (Krawiec, 1985; Krawiec & Riley, 1990; Lupski & Weinstock, 1992). Acredita-se que a organização genômica é configurada pela seleção e, portanto, a dispersão das seqüências REP, ERIC e BOX pode ser indicativa da estrutura e evolução do genoma da bactéria. Com base nesta premissa e no conhecimento sobre a natureza clonal e dinâmica populacional de bactérias patogênicas, Louws et al. (1994) formularam a hipótese de que cada isolado especializado ou patovar do patógeno tem distribuição ou arranjo único das seqüências repetitivas ao longo do genoma. Então, podemos gerar “fingerprints” únicos que correlacionam com um isolado específico ou patovar. Por este motivo, a técnica rep-PCR tem sido utilizada rotineiramente para identificação e estudo de dinâmica populacional e variabilidade de *Xanthomonas* (Egel et al., 1991; Louws et al., 1994; Louwis et al., 1995; Vera Cruz et al., 1996).

Além de útil para análises filogenéticas, através da técnica rep-PCR é possível identificar bandas específicas a uma espécie de bactéria. Através da clonagem e sequenciamento dos fragmentos de DNA correspondentes a essas bandas específicas, primers são desenhados e protocolos de PCR desenvolvidos, permitindo rápida, específica e

sensível detecção de bactérias. No caso de *Xanthomonas*, este tipo de trabalho já foi realizado para algumas espécies (Louws et al., 1994; Pooler et al., 1996), estimulando o presente projeto para desenvolver um método molecular para detectar *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha, em tecidos de cana-de-açúcar.

Detecção de xanthomonads por PCR

Como revisado por Leite et al. (1994), identificação e detecção de xanthomonads são tradicionalmente baseadas no isolamento do organismo em cultura pura, testes de patogenicidade e testes bioquímicos e sorológicos (Saettler et al. 1989; Schaad, 1988). Algumas vezes, o isolamento pode ser dificultado pelo rápido crescimento de contaminantes associados ao tecido da planta (Saettler et al., 1989). Testes de patogenicidade geralmente requerem entre 10 e 15 dias, um constante suprimento de plantas livres da doença e, conseqüentemente, considerável espaço em casa-de-vegetação para a propagação dessas plantas e área reservada para inoculações. Testes serológicos utilizando anti-soros policlonais podem gerar resultados não conclusivos devido à reação cruzada (Benedict et al., 1990). Por sua vez, a obtenção de anticorpos monoclonais específicos é difícil e trabalhosa.

Métodos baseados no metabolismo e perfis protéicos e análises de ácidos graxos têm sido utilizados para identificação (Vauterin et al., 1991), mas o isolamento e purificação da bactéria são ainda necessários. Por esta razão, métodos baseados em análise de DNA, utilizando a reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction – PCR”), têm sido recentemente desenvolvidos para rápida e específica identificação e diagnose de xanthomonads, incluindo primers específicos (Davis et al, 1998; Pain et al, 1998), ao acaso,

relacionados genes *hrp* (Leite et al., 1994), e relacionados com rep-PCR (de Bruijin, 1992; Lopes et al, 1998; Louws et al., 1994; Versalovic et al., 1991).

Região 16S

Uma técnica que vem sendo muito utilizada em estudos filogenéticos é a análise de seqüências de rRNA 16S e regiões espaçadoras rDNA 16S-23S. A análise filogenética da seqüência de genes de rDNA tem sido empregada com grande sucesso na identificação de microrganismos até o nível de espécie, em classificações filogenéticas e em estudos evolutivos de microrganismos (Woese, 1987; Gürtler e Stanisish, 1996; Doolittle, 1999). Essas seqüências devido à sua universalidade possuem alto grau de conservação ao longo do processo evolutivo (Woese, 1987). Uma dificuldade no uso de seqüências de rDNA 16S na análise de *Xanthomonas* sp. é a baixa variação que ocorre no gênero devido serem muito conservadas, dificultando o desenvolvimento de “primers” específicos para diferenciação de espécies. O trabalho de Hauben *et al.* (1997), incluindo todas as espécies de *Xanthomonas* com descrição válida, mostrou um índice de similaridade médio de 98,2% entre linhagens-tipo. Entretanto, o alinhamento de seqüências de região espaçadora do rDNA 16S-23S disponíveis em bancos de dados revelou que existem regiões altamente conservadas nesta molécula.

Hibridização DNA-DNA.

A filogenia de procariontes, em particular bactérias, permaneceu um enigma por muitos anos. De Ley (1974) resumiu vários métodos para analisar o parentesco

filogenético entre bactérias como; taxonomia clássica e ortodoxa, análise numérica adamsiana, metabolismo comparativo, eletroferogramas de proteínas solúveis, % GC, hibridização DNA-DNA e seqüenciamento de pequenas proteínas e moléculas de RNA. Desde então, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos para elucidar as diferenças entre linhagens bacterianas incluindo as do gênero *Xanthomonas*. Recentemente com esse intuito o gênero que havia um amplo número de raças devido terem considerado por muitos anos o conceito “um novo hospedeiro uma nova espécie”, o qual levou o complexo do gênero. Recentemente o gênero *Xanthomonas* foi reclassificado em vinte grupos distintos através da técnica de hibridização DNA-DNA e utilização de fontes de carbono (Vauterin et al., 1995; Vauterin e Swings, 1997). Segundo esta nova classificação formaram seguintes grupos; *X. fragaria*, *X. hortorum*, *X. populi*, *X. arboricola*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. bromi*, *X. cucurbitae*, *X. axonopodis*, *X. oryzae*, *X. vasicola*, *X. pisi*, *X. melonis*, *X. vesicatoria*, *X. campestris*, *X. translucens*, *X. hyacinthi*, *X. theicola*, *X. sacchari* e *X. albilineans*.

A hibridização de ácidos nucléicos em filtros tem sido muito empregada com uso de marcação tanto radioativa como não radioativa, sendo que maioria permite trabalhar com número amplo de isolados bacterianos. Estudos para diferenciação entre patogênicos e não patogênicos, através de construção de sonda têm sido empregados para bactérias que são patogênicas em humanos, contrastando com raças ambientais que parecem não ter significância clínica (Durusin et al., 1998). A aplicação da técnica tanto na área médica como na detecção de bactérias fitopatogênicas podem ser feitas por diferentes métodos como o uso ³²P radiativo, dinitrofenil (DNP), biotina (bio), fluorescência (flúor) e digoxigenina (DIG). Todos requerem estratégia no seu desenvolvimento experimental para obter resultados consistentes, sendo que as condições de temperatura na hibridização,

tempo de hibridização, concentração de sal e conhecimento da sonda são fatores críticos na obtenção dos dados (Margaret et al., 1995). A marcação não radiativa é sistemas baseados na detecção de várias moléculas alvos por interação seletiva com ligação de um parceiro específico, ou seja sonda (Kessler et al. , 1995).

Em estudos comparativos, o uso de diferentes técnicas e necessário e a técnica de hibridização DNA-DNA tem sido muito utilizada para posicionar em um grupo. Hibridização é método realizável para determinação parentesco taxonômico entre e dentro espécie, sendo este método essencialmente uma medida do nível de homologia genoma total (Vauterin et al., 1991).

Tabela 1. Matriz de similaridade da região 16S do DNA entre o isolado de *Xanthomonas* sp. BRA58 e espécies descritas de *Xanthomonas*.

Isolado/Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1 – BRA 58	-																					
2 - <i>X. cucurbitae</i>	0,995	-																				
3 - <i>X. albilineans</i>	0,967	0,978	-																			
4 - <i>X. arboricola</i>	0,999	0,999	0,977	-																		
5 - <i>X. axonopodis</i>	0,994	0,999	0,977	0,998	-																	
6 - <i>X. bromi</i>	0,995	0,999	0,978	0,999	0,999	-																
7 - <i>X. campestris</i>	0,997	1,000	0,978	0,999	0,998	0,999	-															
8 - <i>X. cassavae</i>	0,996	0,999	0,977	0,999	0,999	1,000	0,999	-														
9 - <i>X. pisi</i>	0,997	0,999	0,977	0,999	0,999	1,000	0,999	1,000	-													
10 - <i>X. oryzae</i>	0,997	0,999	0,977	0,999	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	-												
11 - <i>X. melonis</i>	0,969	0,977	0,996	0,977	0,976	0,977	0,977	0,976	0,976	0,976	-											
12 - <i>X. hyacinthi</i>	0,968	0,977	0,995	0,977	0,976	0,977	0,977	0,976	0,976	0,976	0,998	-										
13 - <i>X. hortorum</i>	0,999	0,999	0,977	1,000	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,977	0,977	-									
14 - <i>X. fragariae</i>	0,994	0,997	0,974	0,996	0,997	0,997	0,996	0,997	0,997	0,996	0,973	0,973	0,996	-								
15 - <i>X. vesicatoria</i>	0,996	1,000	0,978	0,999	0,998	0,999	1,000	0,999	0,999	0,999	0,977	0,977	0,999	0,996	-							
16 - <i>X. vasicola</i>	0,999	0,999	0,978	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,977	0,977	0,999	0,996	0,999	-						
17 - <i>X. translucens</i>	0,996	0,977	0,995	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,998	0,997	0,977	0,973	0,977	0,977	-					
18 - <i>X. theicola</i>	0,995	0,999	0,977	0,998	0,997	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	0,976	0,976	0,998	0,995	0,999	0,998	0,977	-				
19 - <i>X. sacchari</i>	0,975	0,987	0,987	0,985	0,986	0,986	0,987	0,986	0,986	0,986	0,987	0,985	0,985	0,983	0,987	0,987	0,986	0,986	-			
20 - <i>X. cynarae</i>	0,997	0,999	0,977	0,998	1,000	0,999	0,998	0,999	0,999	0,998	0,976	0,976	0,998	0,997	0,998	0,999	0,977	0,997	0,986	-		
21 - <i>X. codiae</i>	0,995	0,999	0,977	0,998	1,000	0,999	0,998	0,999	0,999	0,998	0,976	0,976	0,998	0,997	0,998	0,999	0,977	0,997	0,986	1,000	-	

4. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S DE *Xanthomonas sp* (FEV) AGENTE CAUSAL DA FALSA ESTRIA VERMELHA.

4.1. INTRODUÇÃO

A análise filogenética da seqüência de genes da região 16S do rDNA é uma metodologia simples e com alto poder de resolução até ao nível de espécies (Woese, 1987; Gürtler e Stanisich, 1996), bem como em estudos de classificação filogenética e relações evolutivas entre microrganismos (Woese, 1987; Doolittle, 1999). Várias seqüências de rDNA 16S foram determinadas e estão disponíveis nas bases de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e EMBL Data Library (<http://www.ebi.ac.uk/embl>).

A utilização de moléculas de rDNA 16S utilizando linhagens-tipo exibem índice de similaridade médio de 98,2%, correspondendo a uma diferença média de apenas 14 nucleotídeos entre elas. A comparação das seqüências de rDNA 16S, cujo tamanho variou de 1.498 a 1.502 nucleotídeos, confirmam que espécies desse gênero são agrupadas na subdivisão gama de *Proteobacteria* (Hauben *et al.*, 1997).

O objetivo deste trabalho foi sequenciar a região 16S do rDNA de *Xanthomonas sp.* e comparar esta seqüência com as de outras espécies descritas de *Xanthomonas*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA

O procedimento desenvolvido por Ausubel et al (1994) foi utilizado para extração de DNA. Células bacterianas foram transferidas para meio apropriado para crescimento durante uma noite. A cultura foi ajustada para 0,3 O.D de 600 nm (5×10^9 células/ ml), centrifugada por 5 minutos e o precipitado resultante foi re- suspendido em 10 ml de água destilada, seguida de outra centrifugação por 5 minutos a 4.000 x rpm a 20 °C. O precipitado foi re- suspendido em 5670 µl de TE, adicionando-se 300µl de SDS 10 % e 340µl de proteinase K (20 mg/ml), agitando vigorosamente e incubando a 37° C por 1,5 hora. A seguir, foram adicionados 1 ml de NaCl 5M sob agitação vigorosa, acrescentando-se 800µl de solução CTAB/NaCl (4,1 g NaCl e 10 g de CTAB, em 100ml de água milliQ estéril), seguido de agitação vigorosa e posterior incubação por 10 minutos a 65°C . O próximo passo foi adicionar igual volume de fenol/clorofórmio/álcool iso-amílico (25:24:1), agitando-se por 10 minutos e centrifugando por 7 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para novos tubos e foram adicionados 7 ml de clorofórmio/álcool iso-amílico (24:1), agitando por 10 minutos e centrifugando por 7 minutos. Novamente o sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionado 0,6 volume de isopropanol para precipitar o DNA. Os tubos foram homogeneizados por inversão (20X) lentamente até que o precipitado se tornasse visível. O material foi então incubado por 10 minutos a -70 °C e centrifugado por 30 minutos a 4.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. O DNA foi lavado com 5 ml de etanol 70 % e centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm. O

sobrenadante foi removido cuidadosamente e o precipitado foi seco e re-dissolvido em 1 ml de TE. O DNA resultante foi alíquotados em tubos de microcentrifuga de 1,7 ml, sendo que um foi armazenado a -4°C para manuseio e os demais em -20 °C (estoque).

Amplificação da região 16S via PCR

Foi seguido o procedimento descrito por Hauben *et al.* (1997). Fragmentos de DNA ribossômico da região 16S foram obtidos para análise de sequência por meio da amplificação por PCR, utilizando-se o procedimento descrito por Hauben *et al.* (1997). O “primer” de 20 mer 16F27, com sequência 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', e o “primer” reverso de 30 mer 16R1525, com sequência 5' TTCTGCAGTCTAGAAGGAGGTGWTCCAGCC 3' (Saiki *et al.*, 1988) foi utilizado nas reações feitas em termociclador Gene Amp. PCR System 9700 (Applied Biosystems). As condições de reação foram as seguintes: denaturação inicial por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 55°C e extensão por 2 minutos a 72°C repetindo durante 35 vezes (Hauben *et al.*, 1997). Todas as reações tiveram um volume final de 50 µl contendo 5 µl de tampão de *Taq* 10x (3 µl MgCl₂ (25 mM), 8 µl da mistura dos quatro dNTPs (1,25 mM de cada nucleotídeo), 0,5 µl de cada primer (25 pmol), 0,25 µl (5 U/µl) da enzima *Taq* polimerase (GIBCO BRL, Rockville, MD, EUA), 1,8 µl de DNA (50 ng/µl) da bactéria e 30,95 µl de água destilada e estéril. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,0% em tampão TAE (242 g Tris-base, 57,1 ml ácido acético glacial, 37,2 g EDTA, água destilada para completar 1000 ml) sob voltagem de 5 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio e, em seguida levado ao transluminador (TFX-35m Life

Technologies) e fotografado em Fotodocumentação EDAS-120 Kodak Digital Science SP700 Color Printer).

Seqüenciamento do fragmento de PCR.

Clonagem do produto de PCR.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point” agarose) e o fragmento foi purificado conforme a metodologia descrita por Birren *et al.* (1997). Nesta metodologia, pequenos cubos do gel contendo o fragmento a ser purificado foram cortados e solubilizados por incubação a 65°C por 15 minutos. A agarose foi removida através de uma dupla extração com fenol. Após a precipitação com etanol, a amostra de DNA foi re-suspendido em água e quantificada por espectrofotometria.

O fragmento purificado foi clonado no vetor pGEm –T Easy , utilizando o Kit de Clonagem pGem-T Easy Vector Systems (Promega, USA) conforme especificação do fabricante. Esta construção foi utilizada para transformar células de *Escherichia coli* linhagem DH5 α por choque térmico. Os transformantes obtidos foram cultivados em meio líquido (Circle Grow, contendo ampicilina 100mg/ml) e utilizados para a obtenção de minipreparação de DNA plasmidial pelo método da lise alcalina, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Os fragmentos clonados foram seqüenciados a partir das extremidades 5' e 3' utilizando-se o kit Big Dye terminator V.3 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), e seqüenciador de capilar 3100 (Applied Biosystems, NJ, EUA), conforme as

recomendações dos fabricantes. Um clone contendo a sequência correta foi utilizado para a obtenção do seqüenciamento completo utilizando a técnica de fragmentação randômica (“shotgun”).

Construção da biblioteca utilizando fragmentação randômica do DNA por sonicação

O clone contendo o fragmento amplificado por PCR foi crescido por 18 horas em 500 mL de meio 2XTY contendo ampicilina (50 µg/ml). A bactéria foi coletada por centrifugação (5.000 x g x 15 minutos, 4 °C) e o “pellet” foi então utilizado para obtenção do DNA plasmidial utilizando-se o "kit" Wizard® Plus Maxipreps (Promega #A7270, Madison, WI, EUA).

A fragmentação do DNA plasmidial foi feita por meio de sonicação por duas vezes durante 10 segundos cada. Posteriormente, foi verificado o tamanho dos fragmentos presentes através de eletroforese em gel de agarose. As extremidades do DNA fragmentado foram reparadas para que as duas extremidades dos fragmentos fossem abruptas (Ausubel *et al.*, 1994).

Os fragmentos foram clonados no vetor pGem -T. Para clonagem, preparou-se a reação de ligação (50 ng de pGem T, 150 ng dos fragmentos de DNA sonicado, 2X tampão de ligação, 1,0 µl de T₄ DNA ligase e água Milli-Q q.s.p 10 µl . A seguir, incubou-se por uma hora a temperatura ambiente. O passo seguinte foi transformar bactérias competentes para a obtenção dos clones recombinantes.

O material ligado foi utilizado para transformar, por choque térmico, células competentes de *E. coli* JM 109, nas seguintes condições: adicionou-se 10µl da ligação em 100µl de células competentes e incubadas no gelo por 20 minutos. Em seguida, a suspensão foi colocada imediatamente em banho-maria a 42°C por exatamente 90 segundos e, 2 minutos, em gelo. Após este processo, foram adicionados, lentamente, 900 µl de meio SOC, sendo este incubado a 37°C por 1 hora em “shaker” moderado. Alíquotas de 100 µl do volume foi plaqueado em meio 2xTY sólido contendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG e X-GAL. Para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 ml de meio, foram espalhados 25 µL de IPTG (100 mM em água) e 40 µl de X-GAL (2% em DMSO ou DMF). Após 14-16 horas a 37 °C os clones recombinantes foram então palitados para placas de 96 poços contendo 150 µl de meio líquido 2xTY (8% de glicerol e 50 µg/ml de ampicilina), as quais foram novamente incubadas por 14 - 16 horas a 37 °C.

Minipreparação de DNA em placas tipo ELISA de 96 poços

Uma vez obtidos os clones provenientes da ligação de fragmentos quebrados ao acaso pela sonicação, os mesmos foram utilizados para a extração de DNA plasmidial em placas de 96 poços e posterior seqüenciamento. A microplaca contendo os clones foi removida do freezer (-80°C) e mantida à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Os 96 poços foram preenchidos com 1 ml do meio Circle Grow autoclavado (40 g Circle Grow, 1000 ml H₂O) contendo ampicilina na concentração de 100 µg/ml. Em seguida, os poços foram inoculados com 2 µl de cultura bacteriana permanente. A placa foi selada com adesivo e cada poço foi perfurado com uma agulha para permitir aeração

durante o crescimento. Após agitar a caixa a 300 rpm, à temperatura de 37°C, por 22 horas, a cultura foi retirada do agitador e centrifugada a 4000 rpm por 6 minutos para formação do “pellet” das células. Em seguida, foi removido o adesivo, decantou-se o sobrenadante e foi feita a drenagem vertendo o lado superior sobre papel toalha por 5 minutos. Em cada um dos poços foram adicionados 240 µl de meio GTE (23 ml Glicose 20%, 10 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0, 13 ml Tris-HCl 1 M, pH 7,4, 500 ml de água). A placa foi selada com um adesivo e submetida ao vortex para re- suspender as células. Após centrifugar a 4.000 rpm por 6 minutos para formar o "pellet" das células, o adesivo foi removido e o sobrenadante foi decantado em uma pia. As caixas foram vertidas sobre papel toalha para drenar por 5 minutos e em seguida, foram embaladas em papel absorvente para remover todo o meio. Na seqüência, adicionou-se 80 µl de meio GTE a cada poço, a placa foi selada com um adesivo e submetida a “vortex” para re- suspender as células. Posteriormente, adicionou-se 5 µl de RNase (10 mg/ml) e transferiu-se 60 µl das células e 60 µl de NaOH/ SDS a cada um dos 96 poços da microplaca. As placas foram então seladas com um adesivo e invertidas 10 vezes para uniformizar. O material foi deixado em repouso por 10 minutos e centrifugado por alguns segundos. A seguir adicionou-se 60 µl de 3 M KOAc (armazenado a 4°C) a cada poço da microplaca. A placa foi selada com um adesivo e homogenizada invertendo-a por 10 vezes. Novamente o material foi deixado em repouso por 10 minutos e em seguida, agitou-se por alguns segundos, removeu-se o adesivo e levou-se a placa ao forno a 90°C por 30 minutos exatos. A microplaca foi então resfriada em gelo por 10 minutos, seguido de agitação por 4 minutos a 4.000 rpm, à temperatura de 20°C. Uma placa de filtro Millipore (MAGV N22) foi ajustada no topo de uma nova microplaca receptora com 96 poços de 250 µl, assegurando-se de que os filtros e os poços receptores estavam ajustados. O volume total de "lysate" foi transferido para a placa de filtro, seguido de agitação por 4

minutos a 4.000 rpm, à temperatura de 20°C. A placa de filtro foi removida e descartada e adicionou-se 110 µl de isopropanol ao filtrado. A placa foi selada com um adesivo e homogeneizada por inversão de 10-20 vezes e então, centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 rpm à temperatura de 20°C, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 200 µl de etanol 70% resfriado. Após centrifugar novamente por 5 minutos a 4.000 rpm à temperatura de 20°C, removeu-se o sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel toalha e agitou-se por 3 minutos a 900 rpm e 20°C. As placas foram colocadas para secarem por 60 minutos à temperatura ambiente e a seguir o DNA foi dissolvido em 40 µl de água por uma noite.

Seqüenciamento

A reação de sequenciamento foi constituída de 2 µl de Big Dye Terminator, 2 µl de Tampão Save Money, 2 µl de Primer Direto ou Reverso (5,0 pmoles/µl), 2 µl de DNA2 e 2µl água MilliQ autoclavada. As condições de PCR foram 96°C por 10 minutos, 50°C por 5 minutos e 60°C por 4 minutos realizados em 40 ciclos e posteriormente seqüenciadas no seqüenciador automático 3100.

Alinhamento das seqüências

As seqüências de espécies de *Xanthomonas* fitopatogênicas descritas e depositadas no banco de dados do EMBL por Hauben *et al.* (1997) (Anexo 10.2) foram comparadas com a de *Xanthomonas* sp. Linhagem BRA 67 utilizando o programa ClustalW (Thompson

et al., 1994) e o programa NTSYS-pc v. 1.8 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY, EUA), utilizando a opção UPGMA e coeficiente de similaridade de Dice.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento amplificado por meio de reação de PCR da região 16S do DNA do isolado BRA67 de *Xanthomonas* sp. ,agente causal da FEV, está representado na Figura 1. Este fragmento foi utilizado nas reações de sequenciamento.

As seqüências geradas foram montadas e analisadas pelo pacote de programas Bio Edit. Todas as posições foram confirmadas nas duas fitas

As seqüências de espécies de *Xanthomonas* fitopatogênicas depositadas no banco de dados do EMBL (Anexo 10.2) foram comparadas com a de *Xanthomonas* sp. Linhagem BRA 67, utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e o programa NTSYS-pc v. 1.8 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY, EUA).

Os resultados obtidos são consistentes com os apresentados por Hauben *et al.* (1997), em que ficou evidente que a região 16S do DNA de *Xanthomonas* apresenta variabilidade muito restrita. A alta similaridade da *X.sp.* agente causal da FEV com todas as xanthomonads não deixa dúvidas quanto à sua inclusão neste gênero. O menor valor de similaridade encontrado foi de 0,966, entre a linhagem BRA 58 de *Xanthomonas* sp. e a espécie *Xanthomonas translucens* (Tabela 1). Similaridade quase total ocorreu entre a linhagem BRA 58 e as espécies *X. arboricola*, *X. hortorum*, *X. vasicola* (Tabela 1). Foi também seqüenciado o isolado BRA62 de *Xanthomonas* sp., apresentando 99,3% de similaridade com o isolado BRA 62.

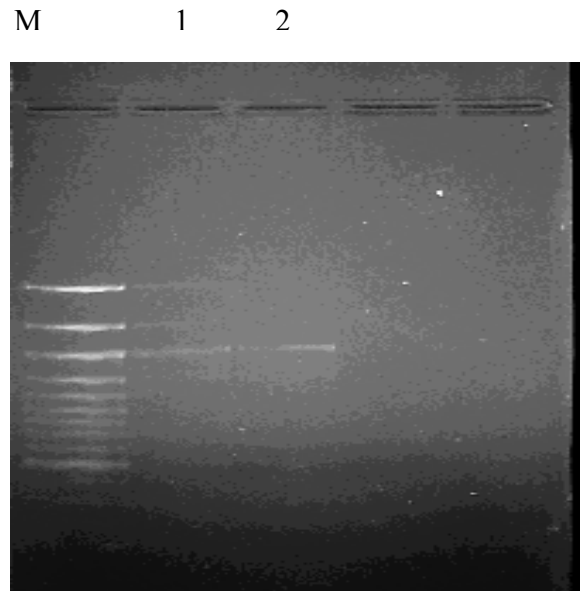


Figura 1. Fragmento de aproximadamente 1502 pares de bases de DNA ribossômico amplificado com os iniciadores 16F27 e 16R1525.

Amostras: M, 100bp marcador; 1, BRA 58 (*X.sp*); 2, BRA62 (*X.sp*).

Tabela 1. Matriz de similaridade da região 16S do DNA entre o isolado de *Xanthomonas* sp. BRA58 e espécies descritas de *Xanthomonas*.

Isolado/Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1 – BRA 58	-																					
2 - <i>X. cucurbitae</i>	0,995	-																				
3 - <i>X. albilineans</i>	0,967	0,978	-																			
4 - <i>X. arboricola</i>	0,999	0,999	0,977	-																		
5 - <i>X. axonopodis</i>	0,994	0,999	0,977	0,998	-																	
6 - <i>X. bromi</i>	0,995	0,999	0,978	0,999	0,999	-																
7 - <i>X. campestris</i>	0,997	1,000	0,978	0,999	0,998	0,999	-															
8 - <i>X. cassavae</i>	0,996	0,999	0,977	0,999	0,999	1,000	0,999	-														
9 - <i>X. pisi</i>	0,997	0,999	0,977	0,999	0,999	1,000	0,999	1,000	-													
10 - <i>X. oryzae</i>	0,997	0,999	0,977	0,999	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	-												
11 - <i>X. melonis</i>	0,969	0,977	0,996	0,977	0,976	0,977	0,977	0,976	0,976	0,976	-											
12 - <i>X. hyacinthi</i>	0,968	0,977	0,995	0,977	0,976	0,977	0,977	0,976	0,976	0,976	0,998	-										
13 - <i>X. hortorum</i>	0,999	0,999	0,977	1,000	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,977	0,977	-									
14 - <i>X. fragariae</i>	0,994	0,997	0,974	0,996	0,997	0,997	0,996	0,997	0,997	0,996	0,973	0,973	0,996	-								
15 - <i>X. vesicatoria</i>	0,996	1,000	0,978	0,999	0,998	0,999	1,000	0,999	0,999	0,999	0,977	0,977	0,999	0,996	-							
16 - <i>X. vasicola</i>	0,999	0,999	0,978	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,977	0,977	0,999	0,996	0,999	-						
17 - <i>X. translucens</i>	0,996	0,977	0,995	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,998	0,997	0,977	0,973	0,977	0,977	-					
18 - <i>X. theicola</i>	0,995	0,999	0,977	0,998	0,997	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	0,976	0,976	0,998	0,995	0,999	0,998	0,977	-				
19 - <i>X. sacchari</i>	0,975	0,987	0,987	0,985	0,986	0,986	0,987	0,986	0,986	0,986	0,987	0,985	0,985	0,983	0,987	0,987	0,986	0,986	-			
20 - <i>X. cynarae</i>	0,997	0,999	0,977	0,998	1,000	0,999	0,998	0,999	0,999	0,998	0,976	0,976	0,998	0,997	0,998	0,999	0,977	0,997	0,986	-		
21 - <i>X. codiae</i>	0,995	0,999	0,977	0,998	1,000	0,999	0,998	0,999	0,999	0,998	0,976	0,976	0,998	0,997	0,998	0,999	0,977	0,997	0,986	1,000	-	

5. HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA DE *Xanthomonas* sp., AGENTE CAUSAL DA FALSA ESTRIA VERMELHA, E ESPÉCIES DESCRITAS DE *Xanthomonas*

5.1. INTRODUÇÃO

A análise de hibridização DNA-DNA em estudos taxonômicos tem sido amplamente utilizada para distinguir bactérias em nível de gênero e espécie. Esta técnica baseia-se na similaridade entre bases do genoma que são medidos pela capacidade de reassociação da molécula quando denaturado e renaturado formando moléculas híbridas, revelando assim o grau de homologia entre organismos distintos.

Vários métodos têm sido utilizados: método de hidroxapatite, método de taxa cinética renaturação, e método S1 nuclease são os mais comuns (Vandamme et al,1996). Procedimentos hibridização baseiam-se na cinética de nível de renaturação da molécula que é feita pela leitura em espectrofotômetro, por hibridização radiativa em filtros de nylon (Sakthivel et al, 2001) e métodos de hibridização não radiativos (Ezaki et al,1989; Gonçalves et al, 2000).

As técnicas utilizam a marcação não radiativa tem sido amplamente empregadas devido à facilidade de manipulação, rapidez e requerer uma quantidade baixa de DNA. A marcação pode ser realizada por diferentes kits comerciais dispostos no mercado como “Alkphos“ (Amersham) e “DIG DNA labeling” (Roche).

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Extração de DNA

O procedimento de extração de DNA total seguiu o protocolo de Ausubel et al. (1994), conforme descrito página 14.

Marcação da sonda

A sonda de DNA foi preparada usando 5 ng de DNA, denaturado por meio de aquecimento em banho maria (100°C) por 10 minutos e imediatamente colocado em gelo/álcool por no mínimo 5 minutos. Os reagentes utilizados foram mantidos à temperatura de -15°C em uma solução de gelo/álcool e adicionados posteriormente ao tubo de microcentrifuga: 2µl da mistura de hexanucleotídeo, 2µl da mistura de marcação dNTP, completando-se o volume para 19µl de água milliQ estéril. Em seguida, 1µl da enzima polimerase Klenow foi adicionado e a mistura foi brevemente centrifugada e incubada por 1 hora a 37°C.

Na etapa seguinte, a reação foi bloqueada por meio da adição de 2µl de EDTA (0,2 M) e o DNA foi precipitado com adição: 2,5µl de cloreto de lítio e 100µl de etanol -80°C. A mistura foi homogeneizada por “vortex” por 10 segundos e incubada a -70 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugada (12.000 g) por 20 minutos. Após a centrifugação, o DNA foi seco em câmara de vácuo e re-suspendido em 50µl de TE.

Primeiramente antes da marcação da sonda do DNA genômico da FEV, este foi fragmentado por sonicação durante 30 segundos com 75% de intensidade utilizando sonificador a fim de obter sucesso na marcação. Já a sonda feita com região 16S não foi necessária devida ser um fragmento pequeno (1504bp).

O DNA da falsa estria vermelha (FEV) foi marcado por meio da incorporação de “random primers” (Feinberg e Vogelstein, 1983), utilizando digoxigenina deoxiuridina-trifosfato marcado (DIG-UTP) e detectado por meio do uso “kit” de marcação e detecção de DNA não radioativo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha) conforme especificado pelo fabricante.

Quantificação e Preparação das Amostras

A concentração de DNA das *Xanthomonas* utilizada foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (Eppendorf) e depois diluídos ou concentrados a fim de obter-se uma concentração de 100ng/μl. Além disso, foi feita uma avaliação visual do DNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e quantificado por comparação com um padrão de concentração conhecida (pGem T).

Transferência por “Southern Blotting”

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Após a eletroforese o gel foi documentado e mergulhado por 30 minutos em 100ml de solução denaturante (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) sob leve agitação a temperatura ambiente. Em seguida o gel foi colocado por 20 minutos em 100ml de solução

neutralizante (1,5M NaCl, 0,5M Tris base; pH7,4) com duas trocas sob agitação lenta à temperatura ambiente.

A montagem foi realizada em uma bandeja onde tanto o papel filtro Whatman 3MM e a membrana de nylon foram molhados em 10X SSC (1,5M NaCl, 0,15M Citrato de sódio; pH7,0). O sistema foi montado na seguinte ordem: papel, gel (com face para baixo), membrana e dois papéis filtros. Em cima deste sanduíche colocou-se uma pilha de papel toalha e um peso para comprimir as folhas. A bandeja foi fechada com filme PVC e deixada durante uma noite para realizar a transferência. Após este período a membrana foi removida e o DNA foi fixado em luz ultra-violeta sob auxílio de um aparelho “Crosslinker”. A membrana foi seca em câmara de fluxo e guardada entre dois papéis filtros.

Pré-hibridização, Hibridização e Lavagem de Membranas

A membrana foi colocada em saco plástico com solução de pré-hibridização (5X SSC, 0,1% N-laurylsarcosine, 0,02% SDS, 1% reagente bloqueador) aquecida previamente e incubada por 4 horas a 65°C em forno de hibridização. Depois foi substituída por solução de hibridização pré-aquecida onde a sonda marcada desnaturada (100°C/10minutos) foi adicionada (5-25ng/μl).

Após hibridização a membrana foi submetida as seguintes lavagens: 1º Etapa - 2X 5 minutos em solução de 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente sob leve agitação; 2º Etapa- 2X 15 minutos em solução 0,1X SSC, 0,1% SDS a 68°C sob constante agitação.

Detecção Imunológica

Após as lavagens estringência a membrana foi submetida as seguintes etapas sob leve agitação a temperatura ambiente: 1º Solução tampão de ácido maléico (0,1M de ácido maléico, 0,15M NaCl; pH 7,5) por 5 minutos; 2º Solução bloqueadora por 30 minutos e depois foi incubada por 30 minutos em solução com anti DIG- AP (diluído 1:5000 em solução bloqueadora). Em seguida a membrana foi lavado 2X 15 minutos em Solução tampão de ácido maléico e equilibrado depois por 5 minutos em solução tampão de detecção (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂; pH9,5).

Reação Colorimétrica

As membranas foram colocadas em saco plástico e incubadas em solução colorida contendo 45µl de NBT (sal tetrazolium nitro azul), diluída em 10 ml de tampão de detecção e misturada com 35µl de BCIP (5- bromo-4cloro-indoyfosfato em sal toluidinium, ambos da Promega).

Após incubação por período de 16 horas as bandas esperadas foram nitidamente visíveis. A solução colorida foi descartada e a membrana foi lavada em água por 10 minutos para interromper a reação. A membrana foi documentada por meio de câmera fotográfica digital da Sony e posteriormente analisada.

Análise dos resultados

A imagem foi tratada por meio de um software e processada por meio de um programa NIH- IMAGE Software. A intensidade total de pixel na banda foi obtida pela relação da área pela intensidade média. Com os valores obtidos dos três experimentos foi calculada a média e com esses valores normalizou-se a membrana dividindo a leitura da sonda do DNA genômico pela sonda da região 16S obtendo-se a porcentagem de homologia entre as linhagens foi comparada.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imagem digitalizada de uma membrana obtida no processo de hibridização DNA-DNA de espécies de *Xanthomonas* é apresentada na Figura 2. A hibridização foi realizada com DNA de 20 espécies descritas de *Xanthomonas*, utilizando o isolado BRA58 de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha, como sonda. A homologia do rDNA da região 16S nesta etapa foi assumida como equivalente para todas as espécies de *Xanthomonas*, devido ao elevado grau de similaridade observado neste gênero para a região 16S do DNA (Hauben *et al.*, 1997).

As porcentagens de homologia obtidas entre os isolados da bactéria da FEV e isolados tipos das espécies de *Xanthomonas* descritas são apresentadas na Figura 3, destacando-se as espécies mais distantes dos isolados de bactéria da falsa estria vermelha que foram *X. albilineans*, *X. vesicatória*, *X. translucens* pv. *translucens*, *X. sacchari*, *X. codiae*, *X. pisi* e *X. hyacinthi* que apresentaram valor abaixo de 40% (Figura 3). A seguir, posicionou-se mais um grupo com 40 a 70% de homologia, representado pelas espécies *X.*

cynerae, *X. vasicola* pv. *vasculorum*, *X. cucurbitae*, *X. bromi*, *X. vasicola* pv. *holcicola*, *X. melonis*, *X. theicola*, *X. vasicola* pv. *holcicola* (tipo), *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. fragariae* e *X. hortorum* pv. *pelargonii*. Acima de 70%, apenas *X. cassavae*, *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e o outro isolado da bactéria da falsa estria vermelha BRA62 estiveram presentes

De acordo com os resultados obtidos, a relação entre isolados tipos de espécies de *Xanthomonas* e o isolado BRA62 da bactéria da falsa estria vermelha variou de 24,53% a 81,22%. A maior homologia, foi com *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*. Homologia de 81,22% é maior que o valor mínimo de 70% necessário para definir uma espécie (Vauterin et al., 1995), indicando que o agente causal da falsa estria vermelha deve ser incluído como *Xanthomonas axonopodis*, ou seja, no grupo 9 definido por Vauterin et al. (1995). O fato de outra espécie do grupo 9, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, agente causal da gomose da cana-de-açúcar, ter apresentado homologia igual a 88,91%, cujo valor é ainda maior que aquele apresentado por *X. axonopodis* pv. *axonopodis* isolado tipo, dá mais suporte a esta classificação.

O fato de *X. cassavae* ter apresentado homologia acima do “limite espécie”, 71,46%, pode ser atribuído às condições de realização do presente estudo favorecendo a hibridação DNA-DNA. No estudo de Vauterin et al. (1995), o menor e o maior valor de homologia entre *X. axonopodis* (grupo 9) e qualquer outra espécie do gênero foi igual a 10% e 43% com *X. albilineans* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, respectivamente. No presente estudo o menor e o maior valor de homologia entre a bactéria da falsa estria vermelha e qualquer outra espécie do gênero foi de 24,53% e 71,46% com *X. albilineans* e *X. cassavae*,

respectivamente. Fato semelhante foi também observado por Roumagnac et al. (2003), num estudo polifásico para caracterizar isolados de *Xanthomonas* de alho e cebola.

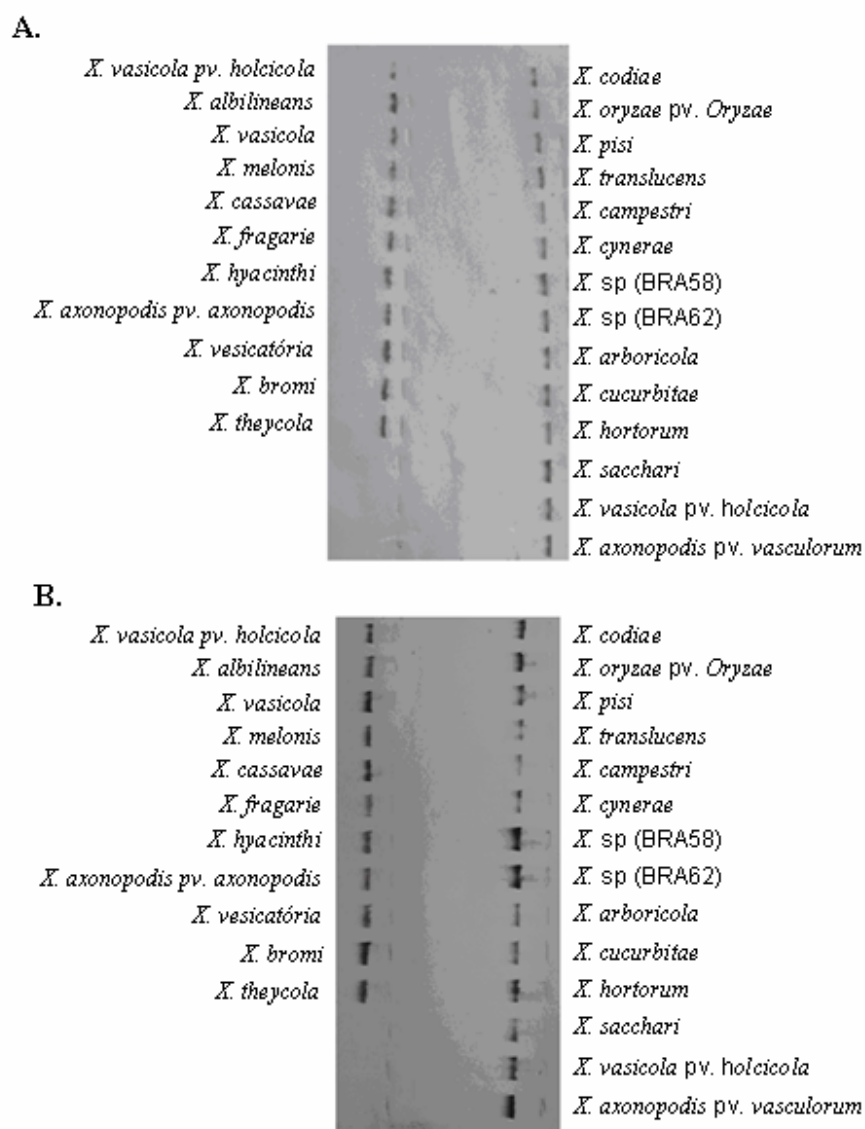


Figura 2. Hibridização DNA-DNA de espécies de *Xanthomonas* utilizando o isolado BRA58 de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha, como sonda. (A) Membrana hibridizada com sonda da região ribossomal 16S do isolado BRA 58 *X.sp.* (B) Membrana hibridizada com sonda do DNA gênomico do isolado BRA 58 *X.sp.*

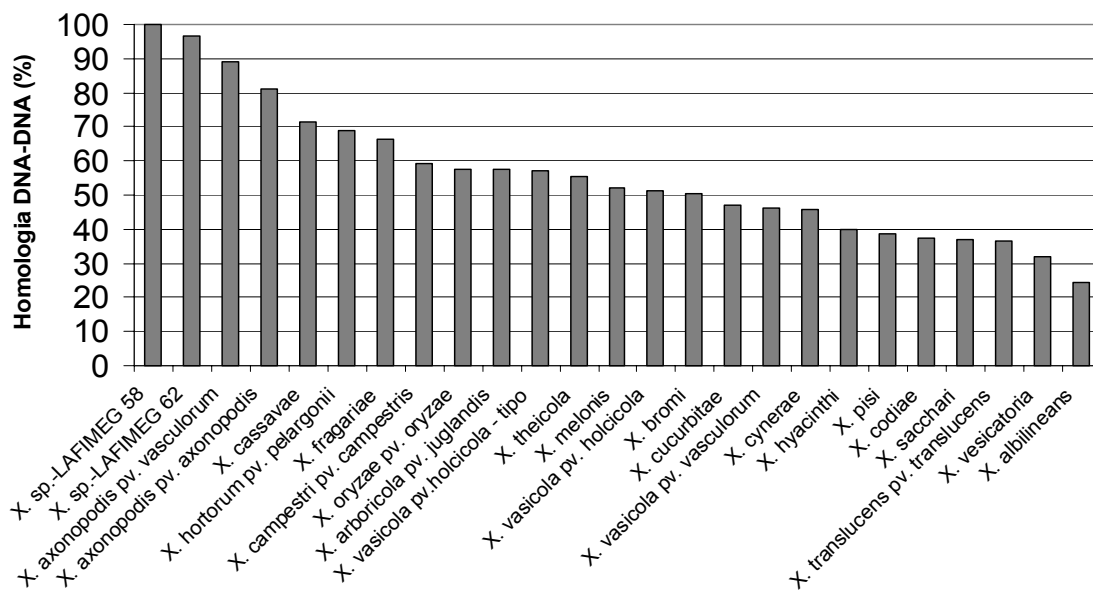


Figura 3. Homologia de DNA-DNA (%) entre o isolado BRA58 de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha, utilizado como sonda (16S/DNA genômico), e espécies descritas de *Xanthomonas*.

6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Xanthomonas sp* PATOGÊNICA À CANA-DE-AÇÚCAR ATRAVÉS DE REP-PCR

6.1. INTRODUÇÃO

Os elementos repetitivos REP, ERIC e BOX têm sido utilizados para caracterização de bactérias fitopatogênicas (Louws et al., 1994), incluindo *Xanthomonas* (Egel et al., 1991; Louws et al., 1994; Louwis et al., 1995; Vera Cruz et al., 1996). O rep-PCR é uma importante ferramenta utilizada em estudos taxonômicos polifásicos e os seus resultados são processados em um período relativamente curto de tempo e reflete uma visualização dos grupos de maneira correlacionada com outras técnicas tal como hibridização DNA-DNA. Apesar disso, alguns laboratórios quando comparam árvores filogenéticas de uma espécie obtida por esses elementos percebem algumas diferenças na impressão digital genoma. Isto é para ser esperado, devido a número diferente bandas podem ser geradas com cada iniciador, condições de anelamento variam entre os iniciadores ou etapas, e distribuição prevalecente dos elementos repetitivos alvos em questão pode variar (Rademaker et al, 2000). A forma da análise dos resultados obtidos e um parâmetro crítica na obtenção do dendrograma. Com isso, além dessa técnica outras devem ser utilizadas para estudo taxonômico de uma nova espécie ou patovar.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar sua posição taxonômica com resultados gerados por elementos repetitivos.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados da bactéria.

Isolados de referência das diferentes espécies de *Xanthomonas* reconhecidas por Vauterin et al. (1995), provenientes da coleção bacteriana do Instituto Biológico, Seção de Fitopatologia e Bacteriologia, Campinas, SP, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, e Departamento de Biotecnologia Vegetal (DBV-UFSCar) que cederam os isolados de *Xanthomonas sp.* (FEV) serão utilizados neste estudo. Imediatamente antes de cada teste, os isolados serão repicados para placas de Petri contendo meio de Wilbrink (Wilbrink, 1920) e incubados por 72 h a 28 °C. Entre um teste e outro, os isolados foram mantidos em meio líquido com 20% de glicerol à temperatura de -80 °C.

Extração de DNA.

O procedimento de extração de DNA foi feito conforme página 14.

Condições para rep-PCR

Seqüências iniciadoras correspondendo às regiões repetitivas REP (REP1R-I [5'-IIICGICGICATCIGGC-3'] e REP2-I [5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3']), ERIC (ERIC1R [5'-ATGTA AGCTCCTGGGGATTCAC-3'] e ERIC2 [5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGACGG-3']) e BOX (BOXA1R [5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3']) foram adquiridas pela Invitrogen (São Paulo,

SP). Com esses iniciadores, a reação rep-PCR foi otimizada com base nos protocolos de reações de ampliações do DNA genômico de *Xanthomonas albilineans* (Lopes et al. 1998) o qual foi testado com isolados das Xanthomonads. O volume total de reação de 25µl foi constituído para cada iniciador. A reação de amplificação pelo iniciador BOX-PCR: 1X de tampão de amplificação (Promega, Madison, WI), 2,5mM MgCl₂, 0,4mM deoxynucleoside triphosphate, 50 ng de DNA, 2 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) e 2µM do iniciador. As amostras foram amplificadas com um ciclo inicial de 7 min a 95 °C seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 8 min a 65 °C, com uma extensão final de 15 min a 65 °C. A reação de amplificação pelo iniciador ERIC-PCR: 1X de tampão de amplificação (Promega, Madison, WI), 3mM MgCl₂, 0,624mM deoxynucleoside triphosphate, 100 ng de DNA, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) e 2µM do iniciador. Amplificações de DNA foram conduzidas com um ciclo inicial de 7 min a 95 °C seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 44 °C e 8 min a 65 °C, com uma extensão final de 15 min a 65 °C. A reação de amplificação pelo iniciador REP-PCR: 1X de tampão de amplificação (Promega, Madison, WI), 2,5mM MgCl₂, 0,4mM deoxynucleoside triphosphate, 100 ng de DNA, 2U de Taq DNA polymerase (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) e 0,8µM de cada primer. Amplificações de DNA foram conduzidas com um ciclo inicial de 7 min a 95 °C seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 40 °C e 4 min a 65 °C, com uma extensão final de 15 min a 65 °C. Todas as ampliações de DNA foram feitas em um termociclador automático ABI- 9700 (Applied Biosystem, Nowalk, Conn) a fim de evitar variações no resultado. As amostras após ampliações com seus iniciadores foram mantidas a -20 °C. Para análise, uma alíquota de 10 µl de cada amostra amplificada foi separada por

eletroforese em gel de agarose 1.2% com tampão TAE 0,5X (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA), durante 10 h a 12,5 V por cm. Produtos de amplificação foram corados com brometo de etídio e foto-documentados com o equipamento EDAS (Kodak). Os produtos do Box, Eric e Rep -PCR foram identificados como caracteres discretos (presença ou ausência de banda). Coeficiente de similaridade entre isolados foi calculado com o uso do programa MVSP.

Consistência dos padrões de DNA obtidos por rep-PCR.

De acordo com estudos prévios (Louws et al., 1994), tanto a reação de PCR como as análises dos perfis de bandas por eletroforese em gel de agarose, foram repetidos três vezes, com o objetivo de considerar apenas as bandas persistentes.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os iniciadores desenhados para amplificar os elementos repetitivos BOX, ERIC e REP permitiram a amplificação do DNA genômico de 10 isolados da bactéria da FEV, 17 isolados tipos de espécies de *Xanthomonas* descritas por Vauterin et al. (1995), *Xanthomonas cynerae* (Trebaol et al., 2000) e *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* e *X. vasicola* pv. *vasculorum* que são patogênicas à cana-de-açúcar. Os fragmentos genômicos bacterianos amplificados por BOX-, ERIC- e REP-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose, resultando em perfis complexos com múltiplas bandas de distintas intensidades (Figura 4). Com os resultados obtidos na eletroforese foram construídas as

matrizes binárias de ausência (zero) e presença (1) de bandas, as quais foram analisadas pelo software MVSP para cálculo das matrizes de similaridade e construção dos dendrogramas. A Tabela 2, 3 e 4 e Figura 5, 6 e 7 apresentam, respectivamente, as matrizes de similaridade e os dendrogramas obtidos com os valores gerados por BOX-, ERIC- e REP-PCR e combinando-se os três elementos repetitivos gerando matriz e o dendrograma rep-PCR (ver Tabela 5 e Figura 8).

Os 10 isolados de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha, apresentaram um padrão de bandas único, independentemente, do elemento repetitivo analisado, demonstrando que a estrutura genômica deste patógeno é homogênea. Esta homogeneidade facilita a realização de testes para “screening” de genótipos de cana-de-açúcar para resistência à falsa estria vermelha. Não existe a necessidade de se utilizar vários isolados ou realizar testes em diferentes locais para considerar a variabilidade do patógeno, pois esta não existe. Estes resultados estão em acordo com análises prévias de fragmentos de restrição de DNA genômico em gel após eletroforese de campo pulsado (PFGE), onde sete isolados da bactéria da FEV apresentaram 96% de similaridade genética (Giglioti & Matsuoka, 2000). Também refletem o perfil único de bandas obtidas em uma análise mais detalhada com os elementos repetitivos BOX, ERIC e REP, envolvendo 161 isolados da bactéria da FEV (Marchiori et al., submetido), indicando que a população deste patógeno tem uma estrutura genética homogênea, mesmo sendo isolado de diferentes genótipos, anos e localidades. Em termos de patogenicidade, os isolados também parecem ter a mesma agressividade. Todos foram virulentos e, portanto, capazes de causar a FEV no cultivar RB855113, mesmo sendo originários de diferentes cultivares de cana-de-açúcar.

Os elementos REP, ERIC, e BOX têm um potencial para formar estruturas “stem-loop” e podem desempenhar um importante papel na organização do genoma bacteriano

(Louws et al., 1994). Como a organização de um genoma é moldada pela seleção, estes autores lançaram a hipótese de que a distribuição dos elementos REP, ERIC e BOX no genoma bacteriano pode ser indicativa de sua estrutura e evolução. Essa informação, aliada ao conhecimento da natureza clonal e da dinâmica de populações de bactérias patogênicas (Denny et al., 1998; Leach et al., 1990) e à homogeneidade genética de isolados da bactéria da FEV, pode se concluir que todos os isolados de *X. sp.* obtidos de diferentes locais, cultivares e anos, no Brasil, podem ser parte de um único pool. A bactéria da FEV foi isolada pela primeira vez em 1988 (Carvalho, 1991) e a doença foi descrita somente em 1995 (Giglioti et al., 1996ab), embora ela estava provavelmente presente no Brasil, antes dessas datas, induzindo sintomas que eram erroneamente creditados a uma outra doença da cana-de-açúcar chamada estria vermelha (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) (Giglioti & Matsuoka, 2000). Tanto a bactéria com a doença ainda não foram relatadas em nenhum outro país. Estes fatores sugerem que o pool único da bactéria da FEV originou-se provavelmente de uma variação em alguma bactéria não virulenta que podia estar colonizando os tecidos da cana-de-açúcar, sem indução de sintomas, ou de outra espécie ou patovar relativamente próximo. Esta homogeneidade da população da bactéria da FEV pode também sugerir que se trata de um evento relativamente recente, em termos evolucionários. Estas são questões ainda sem resposta.

Os perfis eletroforéticos gerados por ERIC, REP e BOX-PCR para a bactéria causal da FEV não pareceram com nenhum daqueles obtidos para *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. bromi*, *X. axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. oryzae*, *X. vasicola*, *X. vasicola* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *holcicola*, *X. pisi*, *X. melonis*, *X. vesicatoria*, *X. campestri*, *X. translucens*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. albilineans* e *X. cynerae*. Um perfil único foi obtido para cada espécie ou

patovar, permitindo a identificação de cada isolado de *Xanthomonas* analisado pelo presente estudo. A bactéria da FEV foi também facilmente diferenciada das xanthomonads já isoladas da cana-de-açúcar *X. sacchari*, *X. vasculorum* pv. *vasicola*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *holcicola* e *X. albilineans*.

De acordo com a Tabela 2, o maior índice de similaridade de Jaccard entre *Xanthomonas* sp. e qualquer outra xanthomonad foi de 0,5 para *X. vesicatoria*, considerando os resultados gerados por BOX-PCR,. No caso de ERIC-PCR e REP-PCR, *X. sacchari* e *X. oryzae* foram as mais similares, com coeficientes iguais a 0,625 e 0,583, respectivamente. Combinando linearmente os dados obtidos com os três elementos repetitivos BOX, ERIC e REP, a bactéria da FEV e *X. albilineans* foram as mais similares, com coeficiente de similaridade de Jaccard igual a 0,306.

Considerado os dados combinados dos elementos BOX, ERIC e REP, a maior similaridade entre duas espécies distintas de *Xanthomonas* foi entre *X. cassavae* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, com valor igual a 0,438. Este valor é ainda superior à maior similaridade entre a bactéria da falsa estria vermelha e qualquer outra xanthomonads já descrita (0,306), sugerindo ser este um patógeno único, ainda não descrito.

Os dendrogramas construídos através da análise de UPGMA e apresentados nas Figuras 5, 6, 7 e 8 representam os resultados obtidos com os dados gerados por BOX-, ERIC- e REP-PCR e pela combinação dos dados gerados pelos três elementos repetitivos. Os quatro dendrogramas agruparam os isolados de *Xanthomonas* sp., agente causal da FEV, num grupo isolado e distante de todas as outras xanthomonads já descritas. Cada espécie de *Xanthomonas* também foi colocada em um ramo único nos quatro dendrogramas gerados, com exceção de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum* que permaneceram distantes uma da outra. No entanto, os três representantes de *X. vasicola*,

isolado tipo, *X. vasicola* pv. *vasculorum* e *X. vasicola* pv. *holcicola* foram agrupados conjuntamente.

O fato de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum* serem alocadas em grupos diferentes (Figura 1) pode ser explicado pela variabilidade dentro dessa espécie. Vauterin et al. (1995) identificaram o menor valor de homologia de hibridação de DNA-DNA, com valor igual a 77% entre diferentes isolados e patovares de *X. axonopodis*. A análise do perfil genômico obtido pela combinação linear dos resultados gerados por BOX-, ERIC- e REP-PCR de 37 patovares desta espécie também indicou heterogeneidade, sendo os patovares distribuídos em seis clusters genéticos distintos (Rademaker, 2000). Porém, não se pode deixar de citar que os valores de similaridade entre perfis genômicos, por representarem indiretamente medidas de homologias na seqüência de DNA, dependentes de condições experimentais específicas e de métodos de análises adotados.

Tanto ERIC-, REP- ou BOX-PCR pode ser utilizada como um método bastante eficiente para identificação de xanthomonads e para determinar sua disseminação intra e inter países. Considerando as *Xanthomonas* já isoladas da cana-de-açúcar, a importância dessa diferenciação rápida, relativamente simples e precisa é ainda maior. Não existem diferenças marcantes em características culturais, bioquímicas, fisiológicas e sorológicas entre esses patógenos e os sintomas das doenças por eles causadas são muitas vezes insuficientes para um diagnóstico preciso. A utilidade de rep-PCR para identificação de espécies, patovares e “strains” de bactérias fitopatogênicas é amplamente descrita na literatura (Bruijn et al., 1996), incluindo várias xanthomonads de diferentes plantas hospedeiras e os patógenos da cana-de-açúcar *Xanthomonas albilineans* (Lopes et al., 1998) e *X. axonopodis* pv. *vasculorum* (Saumtally, 1996), agentes causais da escaldadura das folhas e da gomose, respectivamente. O poder de diagnóstico é atribuído ao fato de que

rep-PCR utiliza iniciadores derivados de seqüências de DNA consenso de elementos repetitivos altamente conservados em bactérias gram negativas, permitindo a discriminação entre espécies e entre patovares dentro de uma mesma espécie (Louws et al., 1994).

Independentemente se a espécie mais próxima da bactéria da FEV é *X. vesicatoria*, *X. sacchari*, *X. oryzae* ou *X. albilineans* (Tabela 5), considerando os resultados gerados por BOX-, ERIC-, REP-PCR ou combinando os resultados dos três métodos, respectivamente, os coeficientes de similaridade de Jaccard são muito mais baixos que o “limite de espécie” obtido por Rademaker et al. (2000). Valores de similaridade excedendo 0,7 e 0.5 para BOX- e rep-PCR, respectivamente, são correlacionados com valores de homologia de DNA-DNA excedendo o limite de espécie que é 70%. Portanto, a bactéria da FEV não se parece com nenhuma outra bactéria já descrita e nomeada, sendo impossível determinar sua posição taxonômica com base apenas em resultados gerados por elementos repetitivos.

Tabela 2. Matriz similariedade elemento BOX-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1.X. fragaria	1																							
2.X. hortorum	0,1	1																						
3.X. arboricola	0,1	0,2	1																					
4.X. cassavae	0,1	0,2	0,3	1																				
5.X. codiae	0,2	0,1	0,4	0,1	1																			
6.X. bromi	0,1	0,2	0,7	0,2	0,6	1																		
7.X. a pv. axonopodia	0,5	0,1	0,1	0,3	0,4	0,3	1																	
8.X. a pv. vasculorum	0,3	0,1	0,5	0,2	0,8	0,4	0,3	1																
9.X. oryzae	0,4	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	1															
10.X. vasicola	0,2	0,1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,5	0,3	1														
11.X. v . pv. holcicola	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,4	0,8	1													
12.X. v . pv. vasculorum	0,2	0,1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,5	0,3	1,0	0,8	1												
13.X. pisi	0,4	0,3	0,4	0,1	0,4	0,3	0,2	0,5	0,1	0,3	0,2	0,3	1											
14.X. melonis	0,4	0,5	0,4	0,1	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,6	0,4	0,4	1										
15.X. vesicatoria	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	1									
16.X. campestri	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1								
17.X. translucens	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,0	1							
18.X. hyacinthi	0,3	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	0,8	1						
19.X. sacchari	0,0	0,2	0,3	0,0	0,4	0,7	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2	1					
20.X. albilineans	0,2	0,1	0,2	0,6	0,4	0,1	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	1				
21.X. cynerae	0,3	0,2	0,7	0,2	0,3	0,5	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,4	0,0	0,2	0,2	0,3	0,1	1			
22.X. sp (LAF 58)	0,4	0	0	0,1	0,3	0,0	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,5	0,0	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	1		
23.X. sp (LAF 62)	0,4	0	0	0,1	0,3	0,0	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,5	0,0	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	1	1	

Tabela 3. Matriz similaridade elemento ERIC-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1.X. fragaria	1																						
2.X. hortorum	0,3	1																					
3.X. arboricola	0,4	0,6	1																				
4.X. cassavae	0,3	0,6	0,4	1																			
5.X. codiae	0,5	0,5	0,5	0,7	1																		
6.X. bromi	0,3	0,3	0,4	0,5	0,6	1																	
7.X. a pv. axonopodia	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2	1																
8.X. a pv. vasculorum	0,3	0,3	0,4	0,7	0,6	0,4	0,5	1															
9.X. oryzae	0,4	0,7	0,6	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	1														
10.X. vasicola	0,3	0,8	0,6	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,7	1													
11.X. v . pv. holcicola	0,2	0,8	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,8	1												
12.X. v . pv. vasculorum	0,3	0,8	0,6	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,7	1,0	0,8	1											
13.X. pisi	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	1										
14.X. melonis	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	1,0	1									
15.X. vesicatoria	0,2	0,5	0,4	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1	1								
16.X. campestri	0,2	0,4	0,2	0,5	0,3	0,1	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,5	1							
17.X. translucens	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,3	0,4	1						
18.X. hyacinthi	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,1	0,2	0,4	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	1					
19.X. sacchari	0,2	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,6	0,3	0,4	0,2	1				
20.X. albilineans	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	1			
21.X. cynerae	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	0,5	1		
22.X. sp (LAF 58)	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,6	0,5	0,5	1	
23.X. sp (LAF 62)	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	0,2	0,6	0,5	0,5	1,0	1

Tabela 4. Matriz similaridade elemento REP-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1.X. fragaria	1																						
2.X. hortorum	0,1	1																					
3.X. arboricola	0,3	0,1	1																				
4.X. cassavae	0,2	0,1	0,3	1																			
5.X. codiae	0,3	0,1	0,2	0,3	1																		
6.X. bromi	0,2	0,0	0,2	0,3	0,2	1																	
7.X. a pv. axonopodia	0,4	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	1																
8.X. a pv. vasculorum	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3	0,1	1															
9.X. oryzae	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	1														
10.X. vasicola	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	1													
11.X. v . pv. holcicola	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	1												
12.X. v . pv. vasculorum	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,4	0,1	0,4	0,8	1											
13.X. pisi	0,4	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	1										
14.X. melonis	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	1									
15.X. vesicatoria	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	1								
16.X. campestri	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	1							
17.X. translucens	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,4	0,1	0,2	0,5	0,5	0,1	0,1	0,2	0,1	1						
18.X. hyacinthi	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	1					
19.X. sacchari	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,7	0,1	0,3	0,2	1				
20.X. albilineans	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	1			
21.X. cynerae	0,2	0,1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,4	1		
22.X. sp (LAF 58)	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,6	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	1	
23.X. sp (LAF 62)	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,6	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	1,0	1

Tabela 5. Matriz similaridade elemento rep-PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1.X. fragaria	1																							
2.X. hortorum	0,2	1																						
3.X. arboricola	0,3	0,3	1																					
4.X. cassavae	0,2	0,2	0,4	1																				
5.X. codiae	0,3	0,2	0,3	0,4	1																			
6.X. bromi	0,2	0,1	0,3	0,3	0,4	1																		
7.X. a pv. axonopodia	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	1																	
8.X. a pv. vasculorum	0,2	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	1																
9.X. oryzae	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	1															
10.X. vasicola	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	1														
11.X. v . pv. holcicola	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,6	1													
12.X. v . pv. vasculorum	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,7	0,8	1												
13.X. pisi	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	1											
14.X. melonis	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	1										
15.X. vesicatoria	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	1									
16.X. campestri	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	1								
17.X. translucens	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	1							
18.X. hyacinthi	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	1						
19.X. sacchari	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,5	0,2	0,3	0,2	1					
20.X. albilineans	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	1				
21.X. cynerae	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	1			
22.X. sp (LAF 58)	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	1		
23.X. sp (LAF 62)	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	1	1	

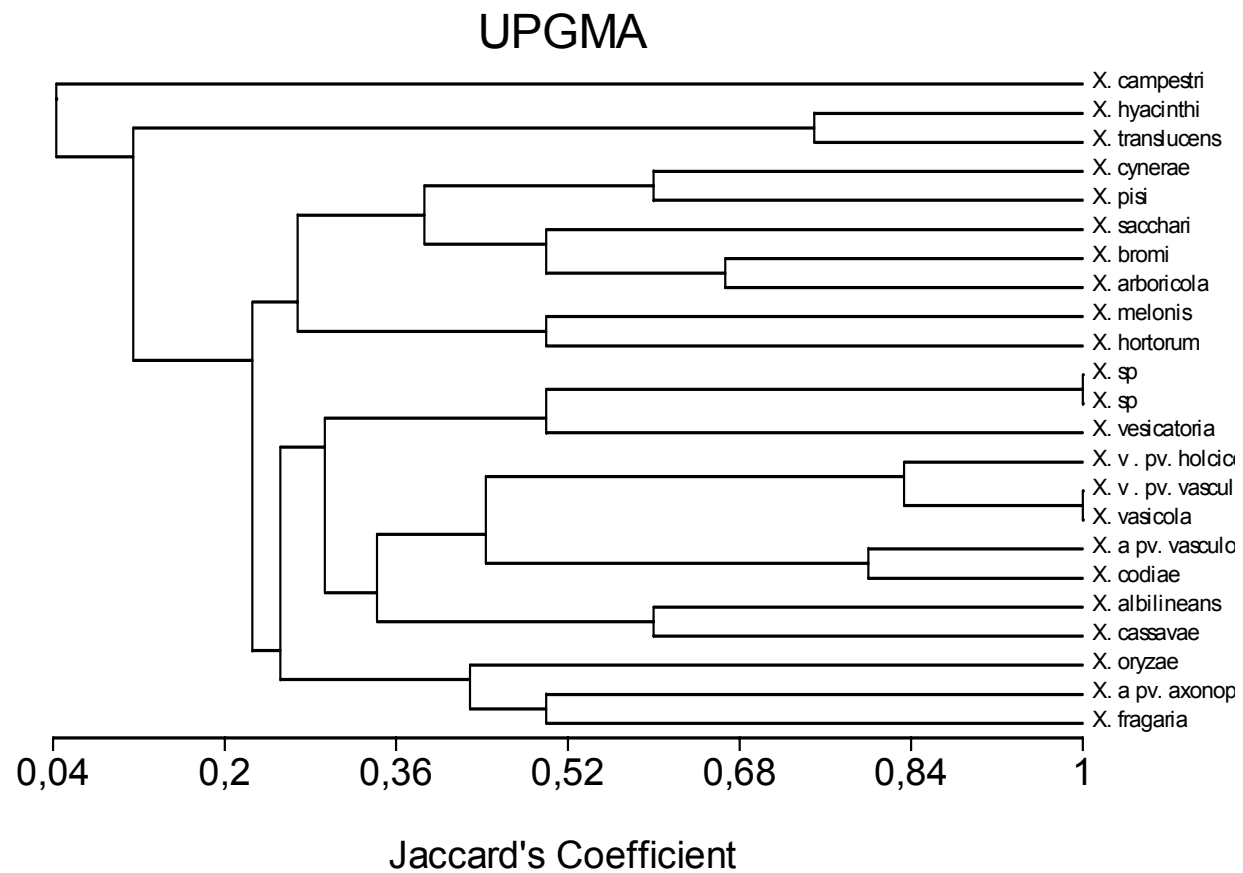


Figura 5. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo BOX-PCR.

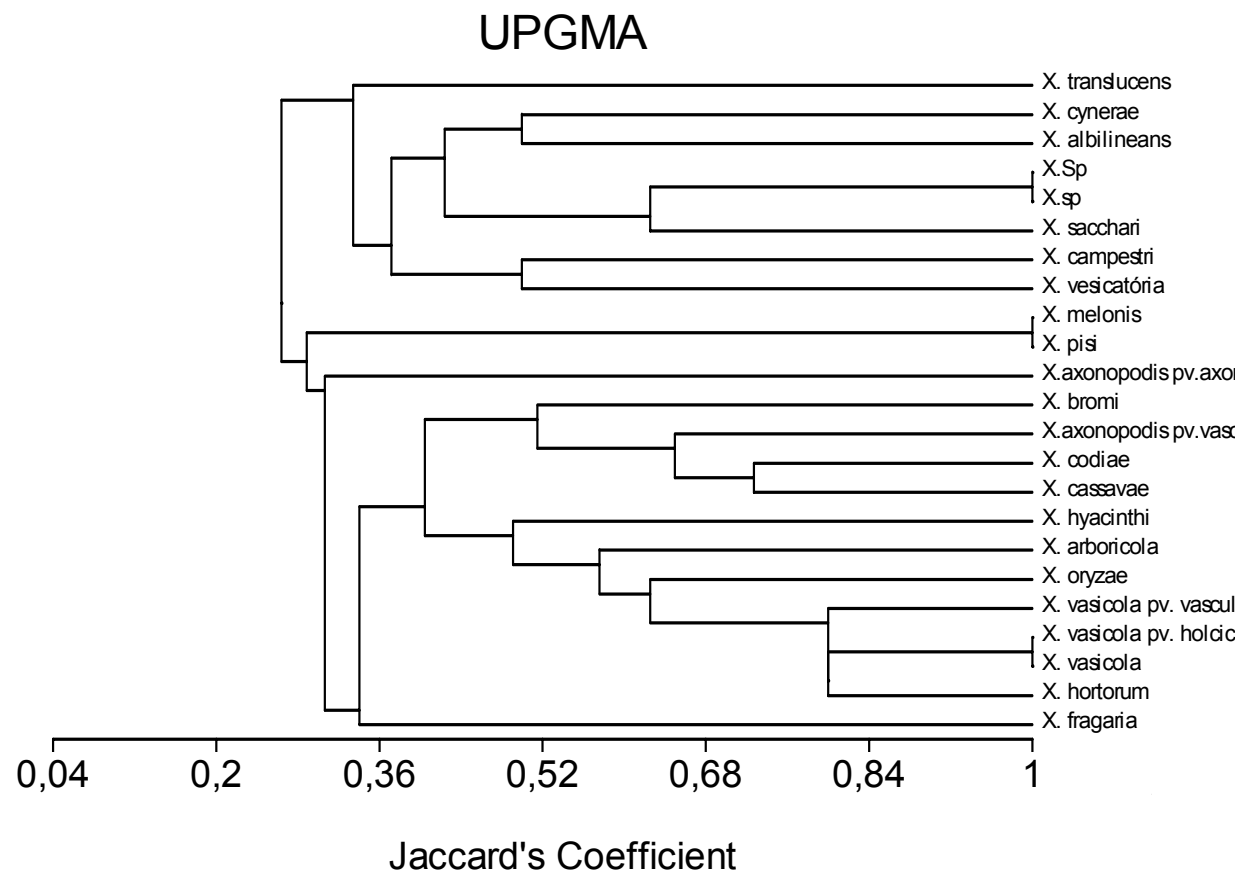


Figura 6. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo ERIC-PCR.

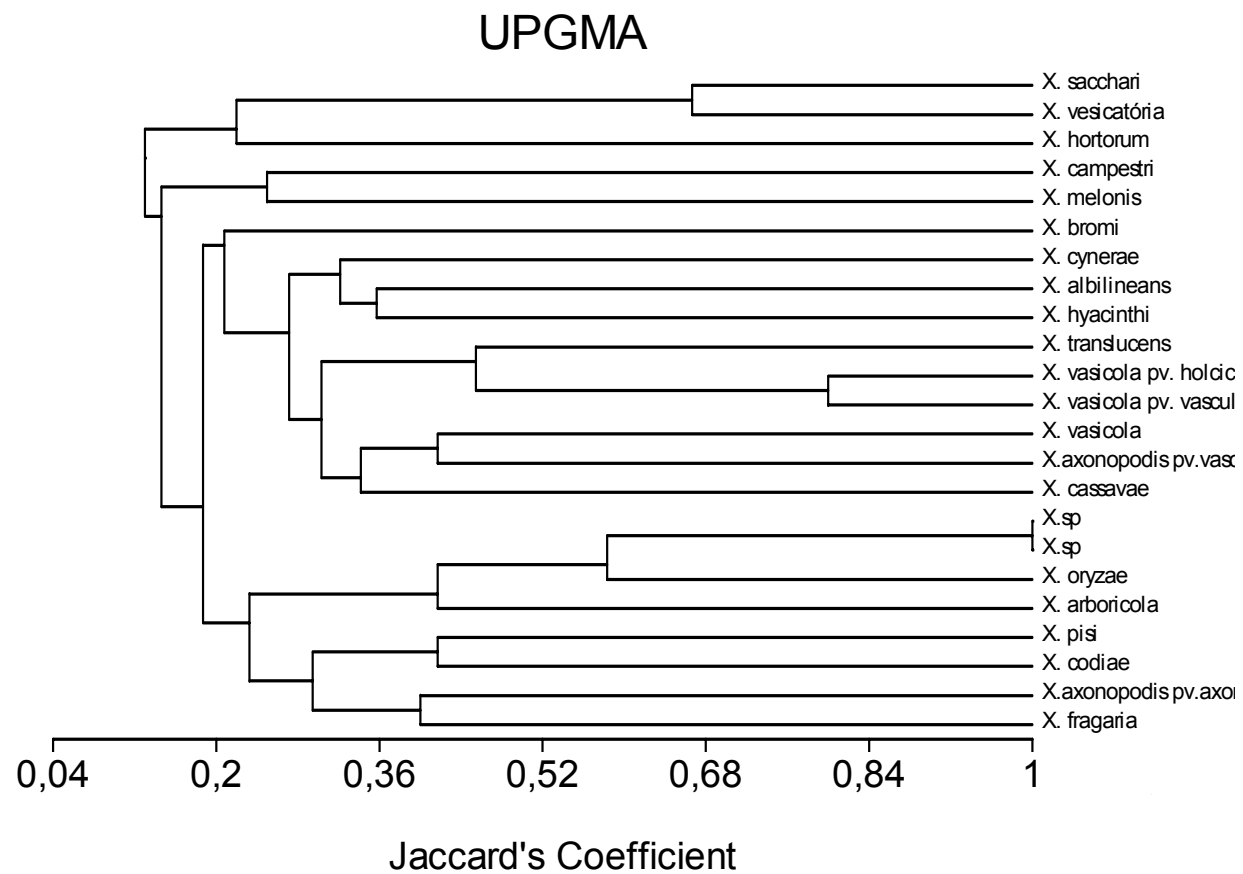


Figura 7. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo REP-PCR.

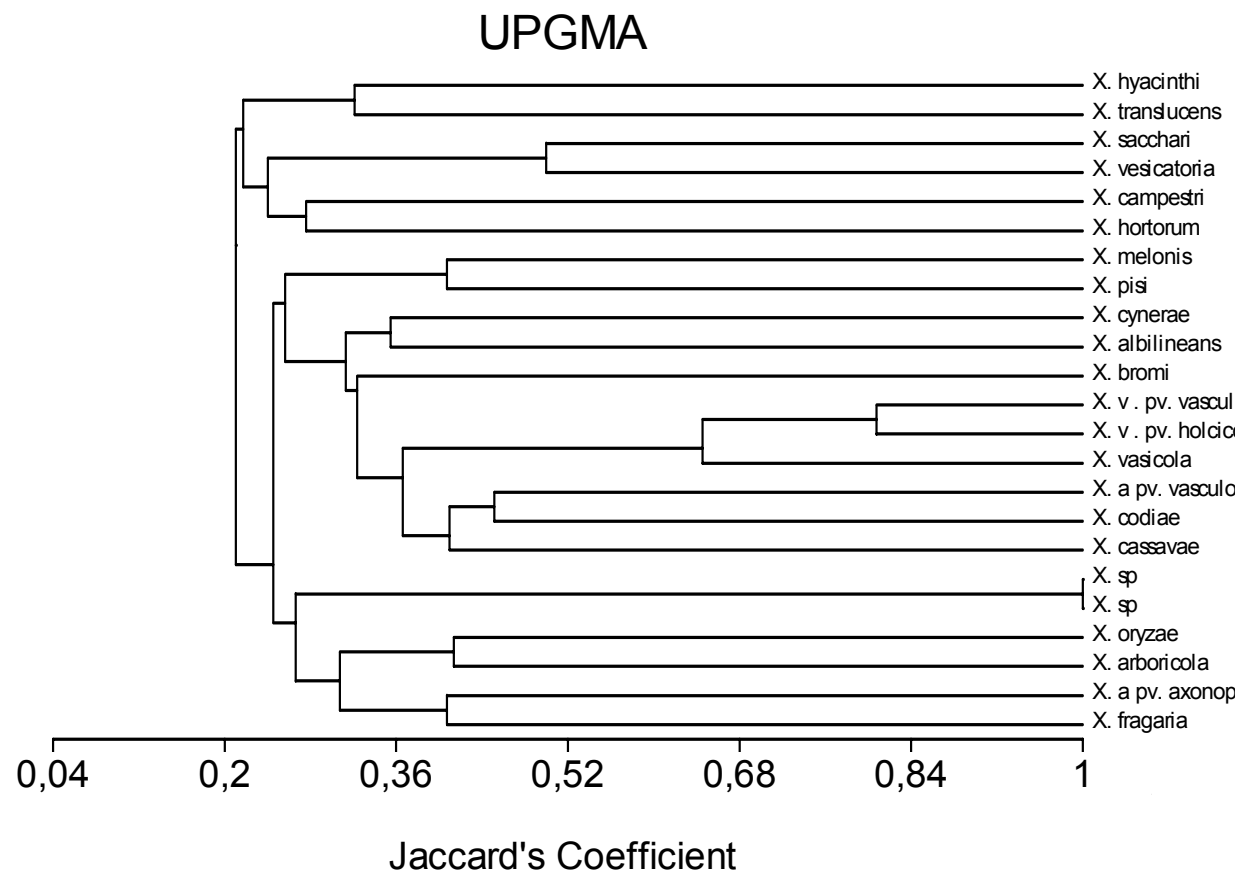
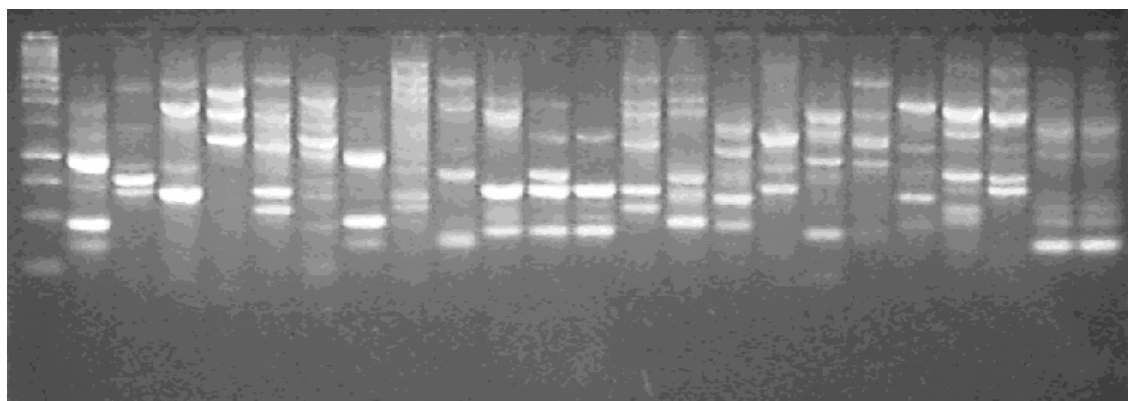
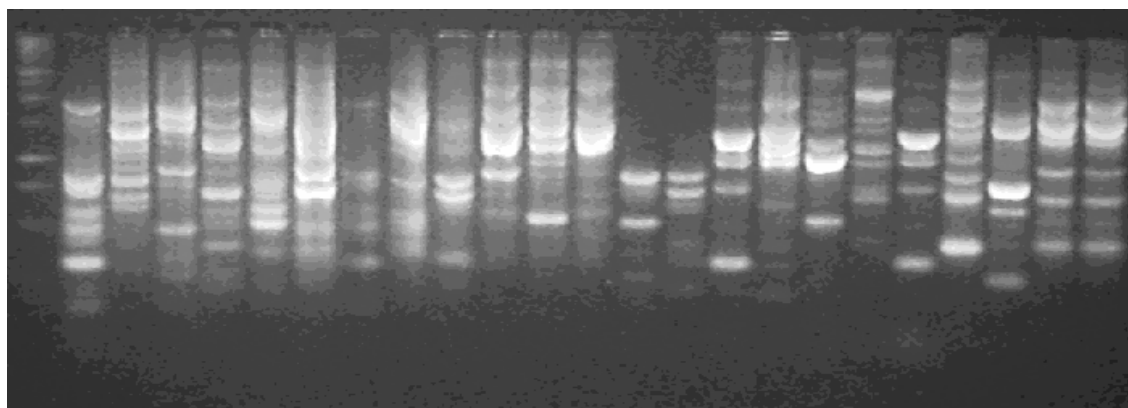


Figura 8. Dendrograma gerado através do elemento repetitivo rep-PCR

(A)BOX M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



(B)ERIC M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



(C)REP M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

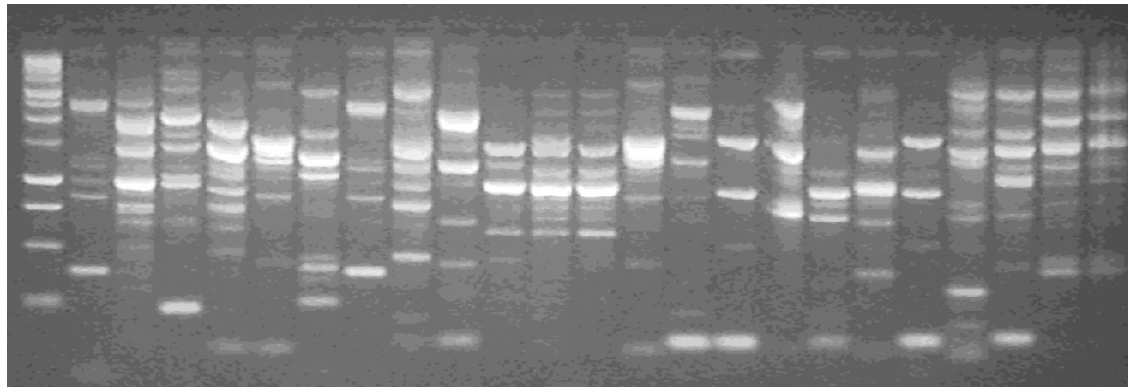


Figura 4. Perfil gerado por PCR com iniciadores complementares aos elementos repetitivos, BOX-, ERIC- e REP-PCR, para os isolados representantes do gênero *Xanthomonas*. Amostras: M 1Kb 1, *X. fragaria* 2, *X. hortorum* 3, *X. arboricola* 4, *X. cassavae* 5, *X. codiae* 6, *X. bromi* 7, *X. axonopodis* pv. *axonopodis* 8, *X. axonopodis* pv. *vasculorum* 9, *X. oryzae* 10, *X. vasicola* 11, *X. vasicola* pv. *vasculorum* 12, *X. vasicola* pv. *Holcicola* 13, *X. pisi* 14, *X. melonis* 15, *X. vesicatoria* 16, *X. campestris* 17, *X. translucens* 18, *X. hyacinthi* 19, *X. sacchari* 20, *X. albilineans* 21 e *X.sp* 22(LAF62 e 58).

7. DIAGNOSE ESPECÍFICA DE *XANTHOMONAS SP.* (FALSA ESTRIA VERMELHA DA CANA-DE-AÇÚCAR) COM PRIMERS IDENTIFICADOS POR REP-PCR

7.1. INTRODUÇÃO

Xanthomonas sp. é o agente causal de uma doença de cana-de-açúcar recentemente descrita chamada falsa estria vermelha (FEV)(Giglioti et al, 1999). A doença foi primeira observada em dezembro 1995, durante inspeção na estação experimental Valparaíso do programa de melhoramento de cana-de-açúcar da Universidade Federal de São Carlos (Valparaiso-SP, Brasil). A bactéria esta agora distribuída por todo centro sul do Brasil, mas não há relato em nenhum outro país. Esta doença é favorecida pela alta umidade e solo fértil cujo são comuns em campos de cana-de-açúcar em áreas baixas e em vales de rios. Isto sugere que bactéria provavelmente e dispersa por meio aéreos, e a infecção ocorre principalmente através de pequenas lesões causadas por contato da beira das folhas. As lesões são caracterizadas pela presença de estrias marrom paralela para o meio da folha. As estrias podem estender da base da folha, em genótipos altamente suscetíveis de cana-de-açúcar, pode alcançar a bainha da folha. Área da folha funcional reduzida pode ser reduzida no campo com genótipos suscetíveis. A frequência alta (22-33%) de genótipos que são moderadamente ou altamente suscetíveis a FEV tem sido modificado em estágio intermediário pela seleção em programas melhoramento no Brasil. Uso de cultivares resistentes é o meio muito eficiente de controle, fazendo necessário teste de rotina para procura dos genótipos de cana-de-açúcar resistente a FEV. Não existe características e diferenças significantes culturais, bioquímica e fisiológica entre a bactéria FEV e *X.*

axonopodis pv. *vasculorum* e *X. c.* pv. *Campestri* (Giglioti et al, 2004). Contudo, perfil obtido por gel eletroforese de campo pulsado de sete isolados de FEV não se assemelhou com nenhum haplotipo já identificado entre *Xanthomonas* de cana-de-açúcar e outras *Poaceae*. Este estudo além disso indicou homogeneidade genética populacional da FEV cujo foi posteriormente confirmado por B-E-R análise. Um estudo polifásico comparando a bactéria FEV com todas as espécies de *Xanthomonas* recentemente descritas (Vauterin et al., 1995), é necessário para determinar precisamente se ela é uma nova espécie *xanthomonas* ou pelo menos um novo patovar de uma espécie conhecida.

Diagnose da FEV esta correntemente baseada em sintomas visual, isolamento do patógeno da folha infectada de cana-de-açúcar, meio seletivo, e métodos sorológicos, incluindo dot-blot. Contudo por causa da similaridade entre os sintomas visuais induzidos por *X. a.* pv. *vasculorum* e *X. v.* pv. *vasculorum*, ambos associados com doença gomose, *X. v.* pv. *holcicola* (bactéria estria da folha em sorgo), *Ac. avenae* sub. *avenae* (estria vermelha) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (estria mancha colorida) em folha cana-de-açúcar, FEV pode ser equivocadamente ser confundida com qualquer uma dessas doenças. A identificação por dot-blot é também difícil, considerando o fenômeno de reação cruzada. Bactéria FEV foi sorologicamente diferenciada de outras *Xanthomonas* já isoladas de cana-de-açúcar somente quando suspensão células 10^6 UFC e título anti-soro 1/ 80000 foram usados. Métodos teste DNA, baseado reação polimerase em cadeia, são crescentemente popular para detecção sensível e específica de bactérias fitopatogênicas incluindo *X. albilineans* (Davis et al, 1980; Pan et al, 1997 e Pan et al , 1999) e *Lefsonia xyli* subsp. *Xyli* (Davis et al, 1980; Fegan et al, 1998 e Pan et al , 1998, agente causal da doença folha escaldadura e raquitismo em cana-de-açúcar, respectivamente. PCR pode ser mais específico se o desenho primers é baseado genes relacionados patogenicidade. Contudo,

excelente resultado tem sido obtido de outras regiões conservadas no genoma. O comprimento da seqüência regiões espaçadoras intergênicas transcrito (ITS) revelado por PCR foi usado para detectar, identificar, e diferenciar espécies bactérias. A região espaçadora 16-23S tem sido também usada como iniciadores (Gürtler et al, 1996). Recentemente, seqüências DNA repetitivas, cujo são presentes em todos procariontes testados por dados (Versalovic et al, 1991 e 1994), têm sido amplamente aplicados para identificação da impressão digital genômica (Louws et al , 1994) de espécies ou patovares, incluindo *Xanthomonas* fitopatogênicas (Gonçalves et al, 2000; Mc Donald et al, 2001; Opgenorth et al, 1996 e Pooler et al, 1996). Seqüências DNA repetitivos extragênica ou ERIC- e BOX- estão distribuídos por todo o genoma bacteriano e estão sendo usadas com local de primers específicos para métodos PCR baseado impressões digitais (Versalovic et al, 1991). Neste trabalho, nos relatamos o uso do método REP-PCR para gerar única impressão digital da *Xanthomonas* sp, cujo foi ponto inicial para o desenho de iniciadores e desenvolvimento de um protocolo PCR para identificação e detecção em suspensões de células, culturas puras, e exsudatos de folhas infectadas de cana-de-açúcar.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

Raças bacterianas, condições de crescimento e extração DNA.

Raças bactérias utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela1. Dez isolados de *X. sp*, agente causal da falsa estria vermelha de cana-de-açúcar, raças e representantes de 19 espécies de *Xanthomonas* (Vauterin et al, 1995), *X. cynerae* (Trebaol et al, 2000), e outras

cinco xanthomonads isoladas de cana-de-açúcar foram obtidas da coleção bactéria do Instituto Biológico, Seção de fitopatologia e bacteriologia, Campinas, SP, Brasil, Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR, Brasil, e Departamento de Biotecnologia Vegetal, Araras, SP, Brasil. Previamente a este estudo, as identificações de todos isolados foram confirmadas pelo sistema “Microplacas Biolog GN”. DNA genômico total foi extraído de 1.5 ml de suspensão bacteriana crescida durante a noite em meio “nutrient broth”, como descrito por Ausubel et al. Concentrações DNA foram estimadas por comparação com padrão conhecido corado com brometo de etídio em gel de agarose e quantificado em espectrofotometro.

Teste patogenicidade.

Teste de patogenicidade foi feito para confirmar o isolado BRA58 e BRA62 de *Xanthomonas* sp. são capazes de causar a doença na cana-de-açúcar chamada falsa estrias vermelhas. Suspensão bactéria foi ajustada para 10^8 UFC/ ml de cada isolado e foi inoculado por injeção no ápice (5-1cm acima da ponta do crescimento apical) em uma planta com idade de três meses da variedade suscetível RB 855513 crescidas em campo comercial. Avaliação dos sintomas foi feita após um mês.

Amplificação DNA por REP-PCR e eletroforese.

PCR foi feito com 25 µl volume contendo 1X buffer PCR, 2.5mM MgCl₂, 0.4mM dNTP, 0.8 µM de cada iniciador, 100ng de DNA, e 2U de Taq. Sequências dos iniciadores correspondente para REP (REP1R-1[5'-IIICGICGICATCIGGC-3']) e REP2-I [5'-

ICGICTTATCIGGCCTAC-3’]) foram sintetizados pela Promega. Amplificação DNA foi feita em um termociclador AB-970 com ciclo inicial de 7min a 95°C seguidos de 35 ciclos, 1min a 94°C, 1min a 40°C, e 4 min a 65°C com uma extensão final de 15 min a 65°C. Uma alíquota de 10µl de cada produto de PCR foi eletroforado em gel de agarose 1.5% em tampão 0.5X buffer TAE por 10h a 5V/ cm. Produtos amplificados foram corados com brometo de etídio e foram fotografados. Todas reações foram repetidas pelo menos três vezes. Impressões digitais de diferentes raças foram comparadas visualmente.

Purificação DNA, clonagem e seqüenciamento.

Bandas REP-PCR presentes somente na bactéria da FEV foram purificadas do gel de agarose com kit GFX PCR. O produto de PCR purificado do REP-PCR foi clonado em pGem-T conforme as instruções do fabricante. Extração do plasmídio foi feita usando o método de lise alcalina (Sambrook et al, 1989). Concentrações do DNA foram determinadas em espectrofotômetro. Cinco clones foram seqüenciados com químico Big Dye no Centro de Ciências Agrárias, na Universidade Federal de São Carlos.

Análise seqüência DNA assistida por computador e desenho de primer.

Alinhamento das seqüências foram feitas usando software BioEdit version 5.09 (Tom Hall, Dep Microbiologia, Norte Carolina, USA) para obter seqüência final para cada fragmento selecionado. Seqüência gerada foi usada para procurar seqüências identidade no banco mundial, usando o programa BLASTN do NCBI (Altschul et al, 1990). Iniciadores

específicos para *X. sp* foram desenhados usando software Laser Gene (Cia Laser Gene, USA).

Condições de PCR para amplificação específica de *X. sp*.

Mix da reação foi feito em gelo com iniciadores manufaturados por Invitrogen, PCR foi feito com volume de 50µl contendo 1X buffer, 1.5mm MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.25 pmol de cada oligonucleotídeo, e 1U de Taq polimerase. O termo ciclador GeneAmp 9700 foi ajustado para 30 ciclos de 94°C por 1min, 60°C por 1min, e 72°C por 2min. Produtos de PCR foram analisados em gel de agarose corado com 1% de brometo de etídio, e fotografado com Kodak EDAS(Eastman Kodac, Nova Haven, CT, USA).

Estudo de hibridização por Southern blot.

Para determinar a presença do fragmento DNA por PCR estava presente em outras xanthomonads, o produto de PCR foi usado para hibridizar como sonda contra DNA total extraído de todas raças. A região 16S rDNA da bactéria da falsa estria vermelha foi usada como sonda controle para confirmar a presença do DNA genômico de todos isolados na membrana performado na hibridização. Amplificação de PCR de 1.5kb da região 16S rDNA foi feito conforme protocolo descrito por Hauben et al 1997.

Para hibridizações de “Southern Blot”, amostras contando 200ng do DNA genômica de cada isolado foram eletroforados em gel de agarose 1% a 5V/ cm por 30min. Transferência “southern” sobre membrana nylon carregado positivamente foi feita de acordo com protocolos padrões. As sondas foram marcadas e detectadas com “DIG DNA

labelling” e “kit detection” de acordo com instruções manufactureras. Condições de lavagens e hibridização foram de 65°C e 68°C, respectivamente.

Especificidade e sensibilidade do protocolo de PCR.

A especificidade dos iniciadores FRS1 e FRS2 foram testados contra todos isolados de bactérias listadas no Anexo 10.1, incluindo dez isolados não identificados de bactérias saprofitas e patógeno de cana-de-açúcar *L. xyli* subsp. *xyli*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* e *Herbairilum rubrisubalbicans*.

Para determinar a sensibilidade da detecção do PCR em suspensão de culturas puras, raças *X. sp* BRA58 foi crescida em NB, suspensão de células foi ajustada para 10⁹ UFC/ml, foram lavados duas vezes em água estéril, re-suspendido em 100µl de água e as células foram rompidas a 100°C por 10min. A suspensão foi diluída oito vezes, em diluição em série de dez. Alíquotas de 1.5µl de cada diluição foram plaqueadas em meio sólido NA para contar UFC. Diluição em série de dez do DNA genômico de *X. sp* (BRA58) de 250ng para 25 pg foram utilizados para detectar a sensibilidade do PCR e nível DNA.

Amostras de folhas mostravam sintomas FEV foram coletados de cana-de-açúcar do campo crescidas da variedade suscetível RB855113. Uma folha assintomática foi usada como controle. Exsudatos foram preparados por meio soquetes 0.5 cm² do tecido da folha duas horas a temperatura ambiente e centrifugado em tubos de 1ml em água estéril. Os tecidos de folhas foram removidos da microcentrifuga e o exsudato foi centrifugado a 3.400x g. O “pellet” foi lavado varias vezes e re-suspendido em 30 µl. Uma alíquota de 1.5µl foi usada na reação de PCR.

7.3. RESULTADOS

Teste patogenicidade.

A cultivar RB855113 de cana-de-açúcar apresentou características sintomas descritas pela falsa estria vermelha quando inoculado com dois isolados de *Xanthomonas* sp. Um mês após inoculação estrias com mistura de vermelhada e cor amarela e transparente quando vista contra luz do sol pode ser facilmente observada nas folhas inoculadas dos isolados BRA58 e BRA62 de *X.sp* (Figura 9).



Figura 9: Teste de patogenicidade do isolado BRA58, *Xanthomonas* sp (FEV), inoculado em cana-de-açúcar da variedade suscetível RB855113.

Perfil REP-PCR.

Os iniciadores do REP-PCR foram usados para amplificar DNA das raças representantes cada um das seis diferentes *Xanthomonas* isoladas de cana-de-açúcar. Análise individual combinada REP-PCR revelou considerável diversidade genética entre as diferentes espécies e patovares. Contudo, similaridade previa resultados perfil único REP-PCR foi obtido para cada espécie e patovar, incluindo BRA58 e BRA62 representantes da

bactéria falsa estria vermelha. Dois produtos REP-PCR, XSPFRS1 e XSPFRS2, em torno de 350bp para 450 bp, aparentemente único para *Xanthomonas* sp. foram selecionados com base no tamanho de suas ampliações e intensidade (Figura 10).

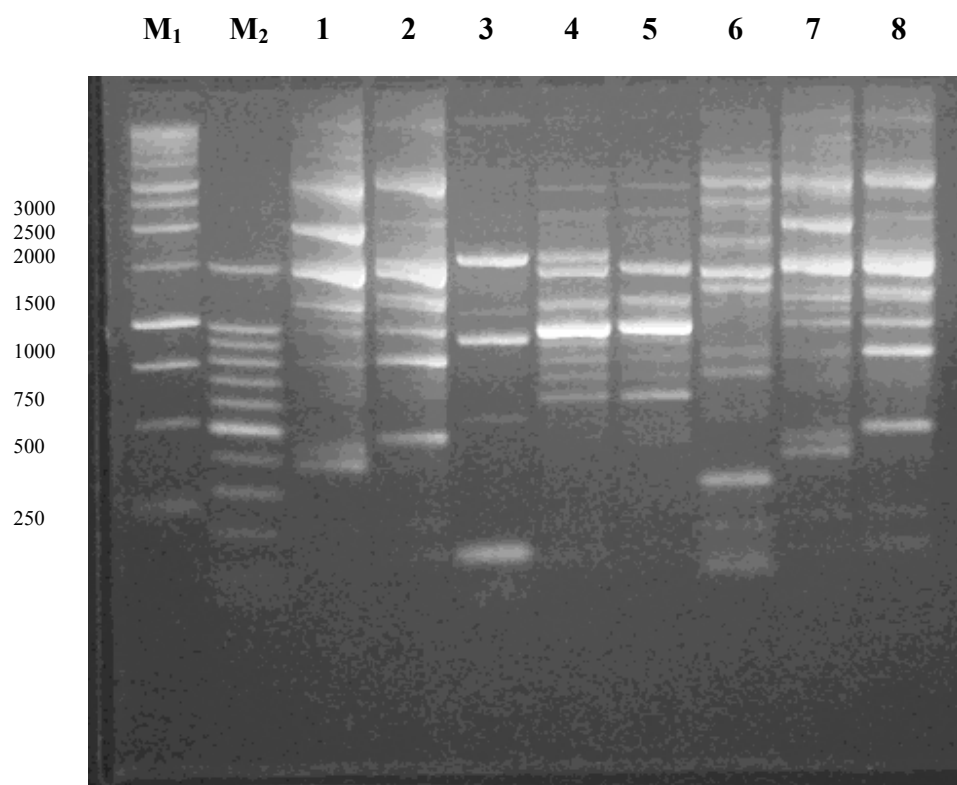


Figura 10. Perfil gerado por PCR com iniciadores complementares ao elemento repetitivo REP-, para os isolados representantes de seis *Xanthomonas* já isoladas de cana-de-açúcar. Amostras: M1, 1-Kb ladder marcador M2, 100-bp ladder marcador; 1 e 7, *X. sp* BRA 62; 2 e 8, *X. axonopodis* pv. *vasculorum* MUS 53; 3, *X. sacchari* GLP 17; 4, *X. vasicola* pv. *vasculorum* ZIM 97; 5, *X. vasicola* pv. *holcicola* REU 63; e 6, *X. albilineans* GLP 55.

Clonagem e seqüenciamento dos produtos REP-PCR.

O produtos REP-PCR XSPFRS1 e XSPFRS2 foram sucessivamente purificados do gel com “Kit GFX PCR”, clonados no vetor pGem-T e eficientemente transformados em *E.*

coli DH5 α , de acordo com instruções manufaturadas e como descrito por Sambrook et al. Cinco clones foram selecionados e a extração do plasmídeo foi preparada como descrito. Os clones e produtos REP-PCR foram sucessivamente seqüenciados no ABI 3100.

Análise seqüência DNA assistida por computador e desenho de primer.

Seqüências foram obtidas por ambos fragmentos DNA selecionados. O número total de bases para produto REP-PCR seqüenciado XSPFRS1 foi 446 com conteúdo GC 61.2%. Para produto REP-PCR seqüenciado XSPFRS2, o número total de bases foi 360 com conteúdo GC de 59.4%. Resultados blast revelaram uma homologia de 96% entre seqüência XSPFRS1 e a região 164-439 do gene “XAC3306” (hipotética proteína) de *X. a pv. citri*, e portanto não foi usado para desenho do iniciador (Figura 11). A seqüências consensos XSPFRS2 não encontrou nenhuma similaridade com outras seqüências depositadas no NCBI e foi utilizada como base para desenho dois primers PCR 24 nucleotídeo específico para *X. sp* agente causal da falsa estria vermelha de cana-de-açúcar (Figura 12).

			10	20	30	40	50	60	70	
									
XSPFRS1-01	1		GCTNCGGCAGTTGGTCCGCGACCGCAGATGGAGTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
XSPFRS1-02	1		GCTGCGGCAGTTGGTCCGCGACCGCAGATGGANTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
XSPFRS1-03	1		GCTGCGGCAGTTGNTCCGCGACCGCAGATGGAGTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
XSPFRS1-04	1		GCTGCGGCAGTTGGTCCGCGACCGCAGATGGAGTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
XSPFRS1-05	1		GCTGCGGCAGTTGGTCCGCGACCGCAGATGGAGTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
Consensus	1		GCTGCGGCAGTTGGTCCGCGACCGCAGATGGAGTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
X.a.pv.cit	1		GCTGCGGCAGTTGGTCCGCGACCGCAGTTGGAGTGCATTATGGGAATGGTCAGCGAATTC AAGCAATTCCG							
				80	90	100	110	120	130	140
									
XSPFRS1-01	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATCGGTGCGGCGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
XSPFRS1-02	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATCGGTGCGGCGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
XSPFRS1-03	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATCGGTGCGGCGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
XSPFRS1-04	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATCGGTGCGGCGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
XSPFRS1-05	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATCGGTGCGGCGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
Consensus	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATCGGTGCGGCGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
X.a.pv.cit	71		CAATGCGCGCAATGTTCATCGACCTGGCGGTGGTGTGGTTCATTGGTGGCGGTTCCGGCAAGATCGTCAC							
				150	160	170	180	190	200	210
									
XSPFRS1-01	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGACCGGTTAGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
XSPFRS1-02	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGACCGGTTAGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
XSPFRS1-03	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGACCGGTTAGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
XSPFRS1-04	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGACCGGTTAGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
XSPFRS1-05	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGACCGGTTAGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
Consensus	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGACCGGTTAGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
X.a.pv.cit	141		CGCGCTGGTGGAGAAAATCATCATGCCGCCGATCGGTTGGGCCATCGGCAATGTGGATTTTTCCGCGCCTG							
				220	230	240	250	260	270	280
									
XSPFRS1-01	211		GCGTGGGTACTCACGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
XSPFRS1-02	211		GCGTGGGTACTCACGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
XSPFRS1-03	211		GCGTGGGTACTCACGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
XSPFRS1-04	211		GCGTGGGTACTCACGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
XSPFRS1-05	211		GCGTGGGTACTCACGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
Consensus	211		GCGTGGGTACTCACGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
X.a.pv.cit	211		GCGTGGGTGCTCAAGCCGCCGCGGTGGATGCCACCGGCAAGGAGATCCCAGCCGTTGCCATTGGCTACG							
				290	300	310	320	330	340	350
									
XSPFRS1-01	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCGATCTTCTGGTTGTCAAGCTGAT							
XSPFRS1-02	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCGATCTTCTGGTTGTCAAGCTGAT							
XSPFRS1-03	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCGATCTTCTGGTTGTCAAGCTGAT							
XSPFRS1-04	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCGATCTTCTGGTTGTCAAGCTGAT							
XSPFRS1-05	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCGATCTTCTGGTTGTCAAGCTGAT							
Consensus	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCGATCTTCTGGTTGTCAAGCTGAT							
X.a.pv.cit	281		GCGATTTTCATCAACACCGTCGTCAGTTCCTGATCATCGCCTTCGCAATCTTCTGGTTGTCAAGTTGAT							
				360	370	380	390	400	410	420
									
XSPFRS1-01	351		CAACCGCCTCACCCATCGCAAGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGG							
XSPFRS1-02	351		CAACCGCCTCACCCATCGCAAGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGG							
XSPFRS1-03	351		CAACCGCCTCACCCATCGCAAGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGG							
XSPFRS1-04	351		CAACCGCCTCACCCATCGCAAGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGG							
XSPFRS1-05	351		CAACCGCCTCACCCATCGCAAGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGG							
Consensus	351		CAACCGCCTCACCCATCGCAAGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGGCCCGATGCCGCCGCCAGATAGG							
X.a.pv.cit	351		CAACCGGTGACCCATCGCAAGCC 374							
				430	440					
									
XSPFRS1-01	421		NNCGATGCCGCCGCCCAATATCACC							
XSPFRS1-02	421		CCCGATGCCGCCGCCCAATATCACC							
XSPFRS1-03	421		NCCGATGCCGCCGCCCAATATCACC							
XSPFRS1-04	421		CCCGATGCCGCCGCCCAATATCACC							
XSPFRS1-05	421		CCCGATGCCGCCGCCCAATATCACC							
Consensus	421		CCCGATGCCGCCGCCCAATATCACC							

Figura 11. Alinhamento das seqüências XSPFRS1 com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Hibridização Southern Blot.

O produto de 302 bp gerado pelos iniciadores FRS1e FRS2 foi utilizado como sonda para testar especificidade para ser usado com todas raças *Xanthomonas* listadas na Anexo 10.1 e técnica de hibridização DNA-DNA (Hames et al, 1995). A sonda 16s DNA de *X.sp* BRA58 foram hibridizadas contra o DNA de todas *Xanthomonas* fixadas na membrana, indicando a presença de DNA para normalização da hibridização DNA. Entretanto, a presença do produto PCR 302 bp dos dois isolados de *X.sp* BRA58 e BRA62 confirmaram suas especificidade pela bactéria falsa estria vermelha (Figura 13).



Figura 13. Hibridização com sonda 16S (A) e com fragmento gerado com iniciadores FRS1/FRS2 (302bp), *X. sp* (B). Amostras: 1, *X. codiae*; 2, *X. oryzae pv. oryzae*; 3, *X. pisi*; 4, *X. translucens*; 5, *X. campestri*; 6, *X. cynerae*; 7 e 8 *X. sp*; 9, *X. arboricola*; 10, *X. cucurbitae*; 11, *X. hortorum*; 12, *X. sacchari*; 13, *X. vasicola pv. holcicola*; 14, *X. axonopodis pv. vasculorum*; 15, *X. vasicola pv. vasculorum*; 16, *X. albilineans*; 17, *X. vasicola*; 18, *X. melonis*; 19, *X. cassavae*; 20, *X. fragaria*; 21, *X. axonopodis pv. axonopodis*; 22, *X. vesicatoria*; 23, *X. bromi* e 24, *X. theicola*.

Sensibilidade e especificidade de PCR.

Foi possível detectar *X.sp* em suspensão de culturas puras utilizadas desenvolvimento protocolo PCR. O limite de detecção foi de 10^5 UFC/ml. Baseado em diluições em série, 25µl da reação PCR contendo aproximadamente 150 células de bactérias (Figura 14). Quanto ao DNA genômico de *X.sp* foi usado como amostra, o nível de detecção do PCR foi 25pg (Figura 15A). Os iniciadores FRS1 e FRS2 não amplificaram nenhum fragmento de DNA em nenhuma outra *Xanthomonas* listada na Anexo 10.1 (Figura 15 B).

Xanthomonas sp. foi detectada em todos exsudatos obtidos de folhas sintomáticas, mas não em folhas assintomática.

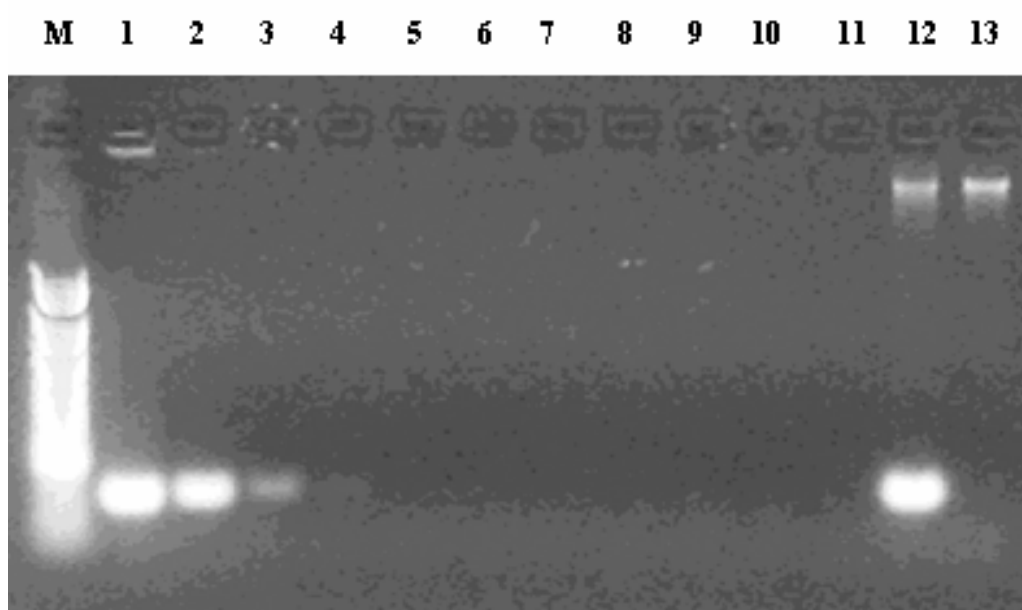


Figura 14. Amplificação do fragmento de DNA 303bp com PCR de colônia, em diluição em série, utilizando a *Xanthomonas sp* (BRA62). Amostras: M-1 kb ladder marcador; 1, 10^7 ; 2, 10^6 ; 3, 10^5 ; 4, 10^4 ; 5, 10^3 ; 6, 10^2 ; 7, 10^1 ; 8, 10^0 ; 9, 10 e 11, H₂O; 12, controle positivo DNA (*X. sp*, BRA62); e 13, controle negativo (*X.axonopodis pv. vasculorum*, MUS53).

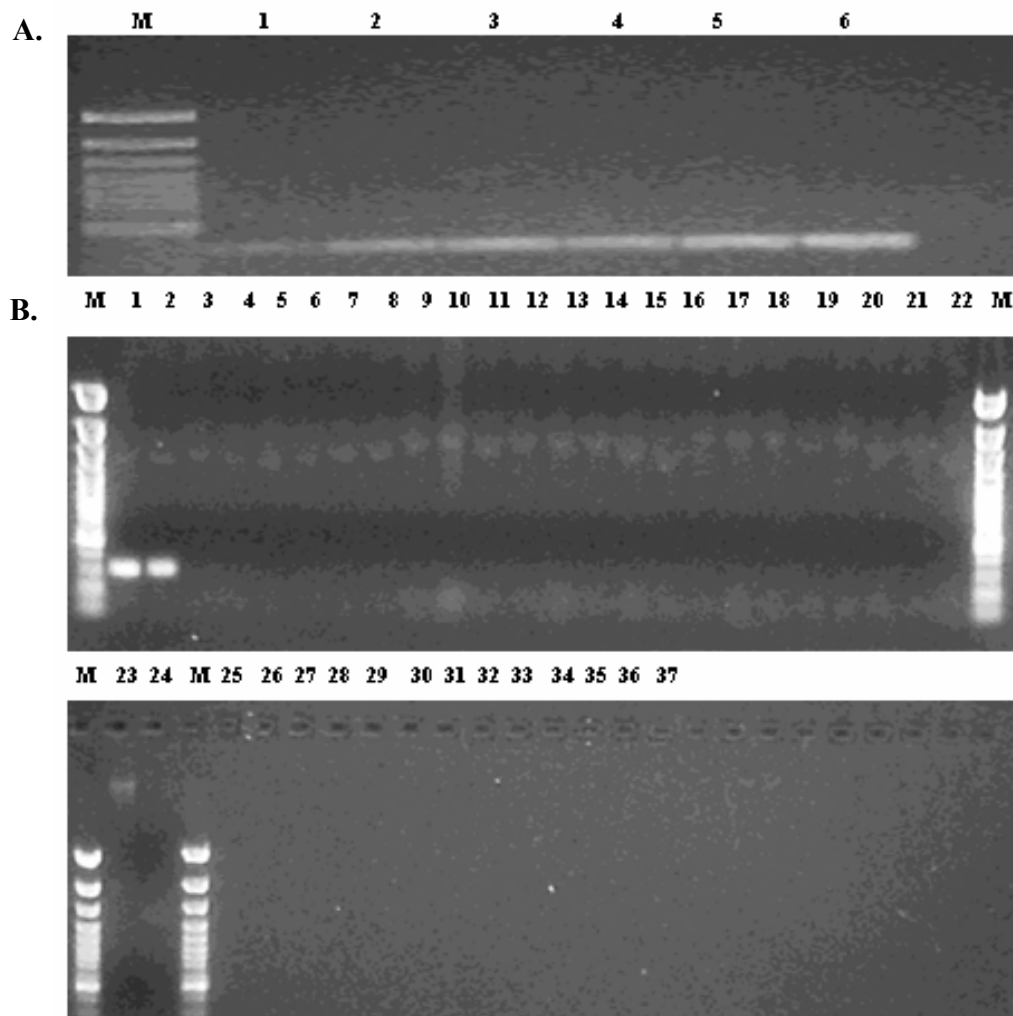


Figura 15. (A) Limite de detecção para uma quantidade variável de DNA de *Xanthomonas* sp. usando FRS1 e FRS2 específico para *Xanthomonas* sp. Amostras; M, 1 kb ladder; 1- 2, 25pg/ ul; 3- 4, 25ng/ ul; 5-6, 250 ng/ ul DNA. (B) Amplificação de DNA genômico de Xanthomonads com FRS1 e FRS2. Amostras: M; 1-Kb ladder marcador; 1, *X. sp* (BRA58); 2, *X. sp* (BRA62); 3, *X. codiae*; 4, *X. oryzae* pv. *oryzae* ; 5, *X. pisi*; 6, *X. translucens*; 7, *X. campestris*; 8, *X. cynerae*; 9, *X. arboricola* ; 10, *X. cucurbitae*; 11, *X. hortorum*; 12, *X. sacchari*; 13, *X. vasicola* pv. *vasculorum*; 14, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*; 15, *X. vasicola* pv. *holcicola*; 16, *X. albilineans*; 17, *X. vasicola*; 16, *X. melonis*; 18, *X. cassavae*; 19, *X. fragaria*; 20, *X. hyacinthi*; 21, *X. axonopodis* pv. *axonopodis*; 22, *X. vesicatória*; 23, *X. bromi* ; and 24, *X. theicola*. Lane:25-34, saprophytes; 35, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; 36, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*; and 37, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

DISCUSSÃO.

Impressão genômica usando primers franqueadores do elemento REP é realizável, sensível, e um método fácil para diferenciar a bactéria falsa estria vermelha de outras xanthomonads patogênicas a cana-de-açúcar. Nos temos demonstrado que *X.sp* tem população homogênea capaz de uma fácil identificação por REP, ERIC, ou BOX elementos. O Rep-PCR utiliza primers derivados de seqüências consenso de elemento DNA altamente repetitivo de bactérias gram negativas e talvez tenha sido utilizado em discriminação entre espécies e entre patovares dentro de uma única espécie. Os dados apresentados aqui também confirmam a utilização do REP-PCR como ferramenta para identificação de fragmentos DNA específicos para uma espécie ou patovar, conforme suportado por Clark et al, 1998; que Rep-PCR pode ser o ponto inicial para detectar um patógeno específico. O produto selecionado REP-PCR de 302bp identificado aqui não estava presente em nenhuma outra *Xanthomonas* listada no Anexo 10.1. A informação das seqüências do fragmento deste DNA provido e base para desenho de iniciadores específicos para *X. sp*. Um das formas usadas para ser mais específica e se basear em genes relacionados a patogenicidade. Todavia o produto de 360 bp não tinha similaridade com nenhuma seqüência do NCBI, e não e conhecido sobre sua função, e foi baseado para o desenho de iniciador específico para detecção da bactéria falsa estria vermelha.

Esse protocolo de PCR pode ser usado para detectar *Xanthomonas* sp em suspensão de células, culturas puras e exsudatos de folhas sintomáticas. Iniciadores usados neste estudo não amplificaram nenhum das duas xanthomonads presentemente isolado de cana-de-açúcar e de nenhuma outra espécie de *Xanthomonas* listado na tabela 1. O limite de detecção de *X.sp* foi aproximadamente 10^5 UFC/ml e 25 pg de DNA purificado.

Sensibilidade da detecção do PCR para espécies bacterias e dramaticamente aumentada pela concentração da bactéria, sendo que o alto título da bactéria falsa estria vermelha em folhas sintomáticas de cana-de-açúcar obtidas aqui foi suficiente para rápida diagnose. Anteriormente, a diagnose da falsa estria vermelha era baseada somente na distinção sintomas e procedimentos sorológicos da *X. sp* em tecidos de cana-de-açúcar ou culturas puras. Por esta razão, os oligonucleotídeos e protocolos de PCR providos neste estudo podem ser utilizados como ferramenta no auxílio de estudos epidemiológicos, detecção da bactéria em outros países, e serviços de quarentenas.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Através do sequenciamento e análise da região 16S do DNA ribossomal das diferentes espécies xanthomonads foi confirmada a inclusão da bactéria da FEV no gênero *Xanthomonas*. O menor valor de homologia foi de 96,7% com *Xanthomonas albilineas*. Pela técnica de hibridação DNA-DNA, a bactéria da FEV foi classificada como *X. axonopodis* (grupo 9) conforme descrito por Vauterin et al., 1995. A *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e o isolado tipo de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* foram às bactérias mais próximas com homologia de 88,91% e 81,22%, respectivamente.

Além da bactéria da FEV, a cana-de-açúcar é então hospedeira de pelo menos outras cinco diferentes xanthomonads: *Xanthomonas sacchari*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *holcicola* e *X. albilineas*. Portanto, com a classificação do agente causal da FEV como *Xanthomonas axonopodis*, dois patógenos do grupo 9 terão sido descritos como patógenos da cana-de-açúcar.

Xanthomonas sacchari foi isolada de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de escaldadura das folhas em Guadalupe e inicialmente identificada como *X. albilineas* mas reclassificada por Vauterin et al. (1995). Nunca foram capazes de induzir sintomas nem mesmo em cana-de-açúcar e, portanto, tem sua patogenicidade desconhecida.

X. axonopodis pv. *vasculorum* é o agente causal da gomose tipo A, outra importante doença da cana-de-açúcar. Apesar da gomose ser uma doença tipicamente da cana-de-açúcar (Lopes et al, 1998), espécies de gêneros bastante distantes como as palmeiras *Dictyosperma album*, *Roystonea regia*, e *Areca catechu*, as gramíneas *Tripsacum laxum*, o bambu *Thysanolaena máxima* e *Zea mays* são incluídos como hospedeiros alternativos.

Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* incluem isolados de *X. campestris* pv. *vasculorum* tipo B, os quais também estão envolvidos com a gomose da cana-de-açúcar. Contudo, essa reclassificação não foi aceita pelo “Sub-Committee on Taxonomy of Plant Pathogenic Bactéria, pois ainda não foram apresentadas características de especialização fitopatogênica que justifique a separação.

X. vasicola pv. *holcicola* é agente causal da estria foliar bacteriana de *Sorghum bicolor* (“bacterial leaf streak”), uma das doenças mais prevalentes desta cultura, sendo também isolada de *Holcus* spp. A partir de cana-de-açúcar, a bactéria foi isolada em 1987, nas Ilhas Reunião, a partir de tecidos foliares com estrias vermelhas. Inicialmente, suspeitou-se que a bactéria isolada fosse um strain particular de *X. campestris* pv. *vasculorum*, o agente causal da gomose. No entanto, a bactéria foi identificada como *X. campestris* pv. *holcicola*, com base em aspectos culturais, reações fisiológicas e patogênicas, perfil de ácidos graxos e padrão de polimorfismo no tamanho de fragmentos de DNA genômico obtidos por cortes com enzimas de restrição - RFLP .

X. albilineans, apesar de ser mais facilmente encontrada em seus hospedeiros alternativos, é restrita às gramíneas, incluindo o milho e outras espécies dos gêneros *Brachiaria*, *Imperata*, *Panicum*, *Pennisetum* e *Rottboellia* como hospedeiras naturais da bactéria. Em particular, a bactéria pode sobreviver em *Imperata cylindrica* por um longo período de tempo e, portanto, esta espécie pode ser uma constante fonte de inóculo para novas infecções de *X. albilineans*. No geral, quando essas gramíneas estão doentes, elas exibem apenas finas estrias foliares ou o mais característico sintoma da escaldadura das folhas que é a “linha branca de pincel” (“white pencil-line”).

Os coeficientes de similaridade de Jaccard obtidos com os resultados gerados pelos produtos de PCR dos elementos repetitivos BOX, ERIC e REP indicaram um padrão

único para os 10 isolados da bactéria da FEV, indicando que a estrutura genômica deste patógeno é homogênea. Os perfis eletroforéticos gerados por ERIC, REP e BOX-PCR para a bactéria causal da FEV não pareceram com nenhum daqueles obtidos para qualquer outro isolado tipo representando das espécies descritas do gênero *Xanthomonas*, ou xanthomonads já isoladas da cana-de-açúcar. Considerando *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, agente causal da gomose tipo B, e isolado tipo de *X. axonopodis* pv. *axonopodis*, os coeficientes de similaridades foram de apenas 0,25 e 0,24, respectivamente, sugerindo ser a bactéria da FEV um patógeno único, ainda não descrito.

Os sintomas induzidos pela bactéria da FEV, agora *Xanthomonas axonopodis*, no campo, são caracterizados pela presença de finas estrias (1 mm) paralelas à nervura central das folhas de cana-de-açúcar. Frequentemente, as estrias têm uma mistura de cores vermelhas e amarelas, estendendo progressivamente da ponta para o meio e base das folhas. Quando vistas contra a luz solar, as estrias ficam parcialmente translúcidas e as mesclas amareladas ficam mais evidentes. Em genótipos altamente suscetíveis, as estrias frequentemente ficam coalescentes e a cor avermelhada fica predominante. Já a *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, agente causal da gomose tipo B, causa estrias foliares de coloração amarela a laranja manchadas com pontuações avermelhadas (Saumtally & Dookun, 2000). Estas estrias aumentam de largura e tamanho, ficam necróticas e adquirem coloração cinza. Folhas também apresentam estrias cloróticas (albinas) que podem ser atingir a folha toda. Os colmos apresentam exsudato de goma, característico da gomose, cujo sintoma jamais foi observado em plantas com FEV. Estudos de inoculação cruzada reproduziram os sintomas da FEV na variedade RB855113, mas não na R397; no caso da gomose, foi verificado o oposto: sintomas induzidos na R397 e não na RB855113 (Marini et al., 2003).

Com base nas normas citadas acima, o resultado obtido nos ensaios do presente estudo e na bibliografia consultada, define-se a posição taxonômica da bactéria da falsa estria vermelha da cana-de-açúcar como sendo o novo patovar *Xanthomonas axonopodis* pv. *rubrilineans*. De acordo com os padrões internacionais para nomeação de patovares de bactérias fitopatogênicas, a classificação de um taxon como um patovar não exclui reconhecimento de diferenças bioquímicas, sorológicas ou qualquer outra característica não patogênica entre aquele ou outro patovar da mesma espécie ou subespécie. Contudo, a definição de um patovar implica que outras diferenças são consideradas ter menor significância taxonomia em comparação com diferenças em patogenicidade. O termo patovar é usado para referir um strain ou grupo de strains com as mesmas características, diferenciadas ao nível intrasubespecífico de outros strains da mesma espécie ou subespécie com base em distintiva patogenicidade a uma ou mais plantas hospedeiras. Os patovares são usualmente distinguidos em termos de comprovadas diferenças em gama de hospedeiro. No entanto, claras diferenças em sintomatologia na mesma espécie de planta podem garantir designações de diferentes patovares.

Por fim, sequenciando-se uma banda específica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *rubrilineans* gerada por PCR com iniciadores para amplificar o elemento repetitivo REP, foi possível desenhar primers específicos para este patógeno e otimizar um protocolo para detecção de pelo menos 10^5 UFC/ml de extrato de folhas com sintomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA I.M.G. Bacterial diseases of sugarcane in Brazil. *In: Current Trends in Sugarcane Pathology*. G.P. RAO *et al.* (Eds), p. 73-84. New Delhi, International Books & Periodicals Supply Service, 1994.

ALMEIDA I.M.G., CARVALHO M.L.V., RODRIGUES NETO J. Nova doença bacteriana em cana-de-açúcar ocorrendo nos estados de São Paulo e Paraná. **Summa Phytopathologica** **15**:19 (abstract), 1989.

ALTSCHUL, S. F. , W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, AND D. J. LIPMAN. The oligonucleotide probe database. **Appl. Environ. Microbiol.** **62**: 3557-3559, 1990.

AUSUBEL, F. M. et al. eds. **Curr. Prot. Mol. Biol. J.**, New York : Wiley and Sons, 1994.

BENNEDICT, A. A. A., ALVAREZ, M., & POLLARD, L. W. Pathovar specific antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargoni*. **Appl. Environ. Microbiol.** **56**:572-574, 1990.

BIRREN, B. et al. **Genome analysis**: a laboratory manual. Cambridge: Cold Spring Harbor Laboratory, 1997.

CARVALHO M.L.V. Ocorrência e caracterização de *Xanthomonas campestris* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) nos estados de São Paulo e Paraná. Piracicaba, ESALQ/USP. 76p. (Tese de Mestrado), 1991.

CCA/UFSCar. **Relatório anual 1996 do programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar**, Araras SP, 91p., 1997.

CCA/UFSCar. **Relatório anual 1997 do programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar**, Araras SP, 42p., 1998.

CLARK, C. A . , C. CHEN, N. WARD-REINEY, AND G. S. PETTIS. Diversity within streptomyces ipomoeae based on inhibitory interactions, rep-PCR, and plasmid profiles. **Phytopathology.** **88 (11)**: 1179-1186, 1998.

COMSTOCK, J. C., & IREY, M. Detection of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. **Plant Disease**, **76**:1033-1035, 1992.

DAVIS, M J., ROTT, P., & ASTUA-MONGE, G. Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. In: Offered papers abstracts, Vol. 3, 7th **International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, 9-16 August 1998**. Abstract 3.3.4. Edunburgh, International Society of Plant Pathology, 1998.

DAVIS, M. J. , A. G. .JR, GELLASPIE, R. W. HARRIN, AND R. H. LAWSON. Ratoon stunting disease of sucarcane: isollation of the causal bacterium. **Science**. **210**: 1365-1377, 1980.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenmic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and their soil bacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DENNY, T.P., GILMOUR, M.N. AND SELANDER, R.K. Genetic dyversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. **J. Gen. Microbiol.** **134**: 1949-1960, 1998.

DOOLITTLE, W. F. Phylogenetic classification and the universal tree. **Science**, Washington, v. 284, p. 2128, 1999.

DURUSIN, M. D., IBRAHIM, A. AND GRIFFITHS, M. W. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using a digoxigenin labelled probe targenting the *yst* gene. **J. Appl. Microbiology**, **84**: 285-292, 1998.

DYE, D. W., AND LELLIOTT, R. A. Genus II. *Xanthomonas*. p. 243-249 in: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8 th ed. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.

EGEL, D. S., GRAHAM, J. H. & STALL, R. E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* causing diseases of citrus. **Applied and Environmental Microbiology**, **57**: 2724-2730, 1991.

EZAKI, T.; HASHIMOTO, Y.; YABUUCHI, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Reading, v. 39, n. 3, p. 224-229, 1989.

FEGAN, M. , B. J. CROFT, D. S. TEAKLE, A . C. HAYWARD, AND G. R. SMITH. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assays. **Plant Pathology**. **47**: 495-504, 1998.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, San Diego, v. 132, p. 6-13, 1983.

GABRIEL, D. W. et al. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. **Mol. Plant- Microbe Interact.**, St Paul, v.1, p. 59-65, 1988.

GABRIEL, D. W. et al. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **Int. J. Syst Bacteriol.**, Reading, **39**, p. 14-22, 1989.

GABRIEL, D. W., AND FUYTER, R. RFLP analysis and gene tagging for bacterial identification and taxonomy, p. 51-66. In S. J. Gurr, M. J. c Pherson, and D. J. Bowles (ed), **Molecular plant pathology: a practical approach**, vol I. IRL Press, New York, 1992.

GIGLIOTI E.A., ALMEIDA I.M.G., CLERC F., ROTT P., CHATENET M., BERIAM L.O., CARVALHO M.L.V., MASUDA Y., MATSUOKA S. False Red Stripe: A new disease of sugarcane in Brazil. **Proceedings 23th International Society of Sugar Cane Technologists**, New Delhi, India (Abstract), 1999.

GIGLIOTI E.A., BERIAM L.O.S., ALMEIDA I.M.G., MASUDA Y., MATSUOKA S. Diferenciação epidemiológica das doenças causadas por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* e *Xanthomonas campestris* em cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, **21** (Suplemento):335, 1996a.

GIGLIOTI E.A., MASUDA Y., MATSUOKA S. Ocorrência de Estrias Vermelhas em cana-de-açúcar: Perfilamento, resistência parcial de variedades e exigência em condições ambientais restringem os danos. **STAB**, Piracicaba, **16**(3):10, 1998.

GIGLIOTI E.A., MASUDA Y., MATSUOKA S., MENESES L.L., MARCHETTI L.B.L. Implicações da ocorrência das bactérias *Xanthomonas campestris* e *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* em cana-de-açúcar. **Anais Do 6º Congresso Nacional da Stab**, Maceió, p.294-301, 1996b.

GIGLIOTI, E. A. & MATSUOKA S. False red stripe. In ROTT, P.; BAILEY A.; COMSTOCK, J. C.; CROFT, B. J.; SAUMTALLY, A. S. (eds). **A guide to sugarcane diseases**. p. 27-31, 2000.

GIGLIOTI, E. A., I. M. G. ALMEIDA, F. CLERC, P. ROTT, M. CHATERTENET, L. A. . BERIAM, M. L. V. CARVALHO, Y. MASUDA AND S. MATSUOKA. False red stripe in Brazil; Epidemiology and causal agent. In: G. P. Rao et al (ed.). **Sugarcane Pathology III:**

Bacterial and Nematode Diseases., Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, p. 119-126. In press. 2004.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v. 50, p. 811-821, 2000.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiol.**, Reading, v. 142, p. 3-16, 1996.

HAMES, B. D., AND S. J. HIGGINS. In Hybridization strategy. (ed C. Kessler), pp.1-29. **Gene Probe 2.** Ed IRL Press. 1995.

HAMES, B. D., AND S. J. HIGGINS. In Non radioactive labelling and detection of nucleic acid probes (ed C. Kessler), pp.93-144. **Gene Probe 1.** Ed IRL Press. 1995.

HAUBEN, L. et al. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **Int J. Syst. Bacteriol., Reading**, v. 47, n.2, p. 328-335, 1997.

HULTON, C.S. J., HIGGINS, C.F., AND SHARP, P.M. ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and others enterobacteria. **Mol. Microbiol.** 5:825-834, 1991.

KRAWIEC, S, AND RILEY, M. Organization of the bacterial chromosome. **Microbiol. Rev**, 54: 502-539, 1990.

KRAWIEC, S. Minireview. Concept of a bacterial species. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 35: 217-220, 1985.

LAZO, G. R., ROFFEY, R. AND GABRIEL, D. W. Restriction fragment length polymorphisms distinguish pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 37: 214-221, 1987.

LEACH, J. E., WHITE, F.F., RHOADS, M.L. AND LEUNG, H. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** **3**: 238-246, 1990.

LEITE, R. P., MINSAVAGE, G. V., BONAS, U., & STALL, R. E. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**(4):1068-1077, 1994.

LOPES, S.A. *Xanthomonas albilineans* : **detection, identification and infectivity titration in sugarcane**. Dissertation for PhD in Plant health. Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State university, 90p., 1996.

LOPES, S.A., DAMANN, K.E., GRELEN, L.B. Comparison of methods for identification of the sugarcane pathogens *Xanthomonas albilineans*. **Summa Phytopathologica**, **24**:114-119, 1998.

LOUWS, F. J., FULBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T., de BRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**: 2286-2295. 1994.

LOUWS, F. J., FULBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T., de BRUIJN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology.** **85**:528-536. 1995.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotes genomes. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 4525-4529, 1992.

MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., ANDREW, P., PHRUDHOMME, M., ALLOING, G., HAKENBECK, R., MORRISON, D. A., BOULNOIS, G. J., & CLAVERY, J. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, **20 (13)**: 3479-3483, 1992.

MCDONALD, J. G., AND E. WONG. Use of a monoclonal antibody and genomic fingerprinting by repetitive-sequence-based polymerase chain reaction to identify *Xanthomonas populi* pathovars. **Can. J. Plant. Pathol.** **23**: 47-51, 2001.

OPGENORTH, D. C., C. D. SMART, F. J. LOUWS, F. J. BRUIJN, AND B. C. KIRKPATRICK. Identification of *Xanthomonas fragariae* Field Isolates by rep-PCR Genomic Fingerprinting. **Plant Disease**. **80 (8)**: 868-872, 1996.

PAIN, Y. B., GRISHAM, M. P., BURNER, D. M., LEGENDRE, B. L., & WEI, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald. **Plant Disease**, **83**:218-222, 1999.

PAN, Y. B., M. P., GRISHAM, AND D. M. BURNER. A Polymerase Chain Reaction Protocol for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Plant Disease**. **81 (2)**: 189-194, 1997.

PAN, Y. B., M. P., GRISHAM, D. M. BURNER, B. L. LEGENDRE, AND Q. WEI. Development of Polymerase Chain Reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the Causal Bacterium of Sugarcane Leaf Scald Disease. **Plant Disease**. **83(3)**: 218-222, 1999.

PAN, Y. B., M. P., GRISHAM, D. M. BURNER, K. E. DAMANN, AND Q. WEI. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**. **82**: 285-290, 1998.

PÉROS, J.P.; GIRARD, J.C.; LOMBARD, H.; JANSE, J.D.; BERTHIER, Y. Variability of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from sugarcane and other gramineae in Reunion Island. Characterization of a different xanthomonads. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.142, p.177-188, 1994.

POOLER, M. R., RITCHIE, D. F. HARTUNG, J. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v. 62, p. 3121-3127, 1996.

RADEMAKER, J. L. W., HOSTE, B., LOUWS, F. J., KERSTERS, K., SWINGS, J. VAUTERN, L., VAUTERIN, P. AND F. J. DE BRUIJN. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **50**: 665-677, 2000.

RODRIGUES NETO J., MALAVOLTA JR. V.A., VICTOR O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica** **12** (1,2):16, 1986.

ROUMAGNAC, P., GAGNEVIN, L. GARDAN, L. SUTRA, L. MANCEAU, C. DICKSTIN, E. R. JONES, J. B. ROTT, P. AND PRUVOST. Polyphasic characterization of *Xanthomonas* isolated from onion, garlic and wilsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **O. I J S E M.** 2003.

SAETTLER, A. W., SCHAAD, N. W., & ROTH, D. A. (ed.). **Detection of bacteria in seed and other planting material.** American Phytopathological Society, St. Paul. Minn., 1989.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFER, S. SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., AND ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, **293**: 487-490, 1988.

SAKTHIVEL, N., MORTENSEN, C. N., MATHUR, S. B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **56**: 435-441, 2001.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2.ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAUMTALLY, S. Genetic variability in *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* (Cobb) Dye, causal agent of gumming disease of sugarcane. **PhD thesis**. University of Reading, UK, 191p, 1996.

SCHAAD, N. W. (ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. American Phytopathological Society, St. Paul. Minn., 1988.

STERN, M. J., AMES, G. F. L., SMITH, N. H., ROBINSON, E. C., & HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, **37**:1015-1026, 1984.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Ac. Res.**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TREBAOL, G., L. GARDAN, C. MANCEAU, J. L. TANGURY, Y. TIRILLY, AND S. BOUREY. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacterial bract spot of artichoke(*Cynara scolymus* L.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** **50(4)**: 1471-1478, 2000.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 60, p. 407-438, 1996.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., & SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **45**:472-489, 1995.

VAUTERIN, L., YANG, P., HOSTE, B., VANCANNEYT, M., CIVERS, E. L., SWINGS, J., & KERSTERS, K. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains by SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis, and DNA-DNA hybridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **41**:535-542, 1991.

VAUTERIN, L., YANG, P., SWINGS, J. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 77-82, 1997.

VERA CRUZ, C. M., ARDALES, E. Y., SKINNER, D. Z., TALAG, J., NELSON, R. J., LOUWS, F. J., LEUNG, H., MEW, T. W., LEACH, J. E. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. **Phytopathology** **86**: 1352 – 1359. 1996.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. ,AND LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids res.** **19**: 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJIN, F. J., AND LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods mol. Cell. Biol.**, **5**:25-40, 1994.

WILBRINK, G.. De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding. **Arch.Suikerind. Ned. Indie**, **28**:1399-1525, 1920.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, **51**: 221-271, 1987.

ANEXOS

Anexo 10.1. Lista das *Xanthomonas* utilizadas nos experimento com respectivo local do isolado obtido

LAF	Bactérias	Nº Origem	Local
013	<i>X. codiae</i>	1389	I.B
015	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	1392	I.B
016	<i>X. pisi</i>	1356	I.B
022	<i>X. translucens</i>	2054	CFBP -França
034	<i>X. campestri</i>	2350	I.B
044	<i>X. cynerae</i>	4188	CFBP -França
058	<i>X.sp</i>	BRA 58	UBASA
062	<i>X.sp</i>	BRA 62	CCA
102	<i>X. arboricola</i>	2528	CFBP-França
103	<i>X. cucurbitae</i>	2542	CFBP- França
105	<i>X. hortorum</i>	4925	CFBP -França
106	<i>X. sacchari</i>	GLP18	CFBP-França
107	<i>X. vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>	ZIM97	CFBP -França
108	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>Vasculorum</i>	MUS53	CFBP- França
109	<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	REU63	CFBP -França
115	<i>X. albilineans</i>	BRA49	CFBP-França
117	<i>X. vasicola</i>	LMG736	CFBP-França
501	<i>X.melonis</i>	12818	IAPAR
503	<i>X. câs savae</i>	12801	IAPAR
517	<i>X. fragaria</i>	12816	IAPAR
519	<i>X. hyacinthi</i>	12817	IAPAR
523	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	12798	IAPAR
524	<i>X. vesicatoria</i>	9785	IAPAR
527	<i>X. bromi</i>	12837	IAPAR
528	<i>X. theicola</i>	12838	IAPAR

Anexo 10.2. Número de acesso das seqüências gene 16S rDNA na biblioteca dados EMBL conforme Hauben et al., 1997.

TAXON	Número de acesso EMBL
<i>X. codiae</i>	Y10765
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	X95921
<i>X. pisi</i>	Y10758
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	X99299
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	X95917
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Y10757
<i>X. cucurbitae</i>	Y10760
<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	Y10759
<i>X. sacchari</i>	Y10766
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	X95919
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	Y10755
<i>X. albilineans</i>	X95918
<i>X. melonis</i>	Y10756
<i>X. cassavae</i>	Y10762
<i>X. fragaria</i>	X95920
<i>X. hyacinthi</i>	Y10754
<i>X. vesicatoria</i>	Y10761
<i>X. bromi</i>	Y10764
<i>X. theicola</i>	Y10763
<i>X. populi</i>	X95922