UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

MARIANA FERREIRA TONIN

"CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Xanthomonas*"

Este exemplar corresponde à redação fin
da tese defendida pelo(a) candidato (a
MARIANA FERREIRA TONIN
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T614c

Tonin, Mariana Ferreira, 1978-
Caracterização taxonômica de espécies do gênero Xanthomonas / Mariana Ferreira Tonin. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Suzete Aparecida Lanza Destéfano.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Análise de sequências gênicas por multilocus. 2. Hibridização genômica comparativa. 3. Primers específicos. 4. Polimorfismo de fragmento de restrição. I. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Taxonomic characterization of Xanthomonas species
Palavras-chave em Inglês:
Multi locus sequence analysis
Comparative genomic hybridization
Specific primers
Restriction fragment lenght polymorphism
Área de concentração: Genética de Microorganismos
Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular
Banca examinadora:
Suzete Aparecida Lanza Destéfano [Orientador]
Fabiana Fantinatti Garboggini
Júlio Rodrigues Neto
Ivan Paulo Bedendo
Ricardo Harakava
Data da defesa: 06-03-2012
Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 06 de Março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

Assinatura

Dr. Júlio Rodrigues Neto

Assinatura

Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Harakava

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Luis Otávio Saggion Beriam

Assinatura

Profa. Dra. Laura Ottoboni

Assinatura

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

Mahatma Gandhi

Aos meus pais, Fernando e Ana Margarida, meus maiores exemplos de caráter, dedicação e responsabilidade nos estudos e na profissão, de solidariedade e respeito, de fé, esperança e luta nos momentos mais difíceis e, principalmente, de amor incondicional, sendo sempre presentes na vida dos filhos. Simplesmente os melhores pais do mundo ***(in memorian).***

Ao meu marido, Umberto, que está ao meu lado em todos os momentos com seu amor, sua calma, e com seu apoio e incentivo.

Ao meu filho, Bruno, luz, amor e razão da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Susi, por todos estes anos de ensinamentos, amizade, carinho, conselhos, apoio nas horas difíceis e, principalmente, pela confiança que sempre teve em mim e em meu trabalho. Com ela aprendi a adorar o que faço, vibrar com cada resultado e ter a certeza da minha escolha profissional. Desde a iniciação científica, há quase doze anos, construímos além de uma relação profissional, uma grande amizade.

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, curador da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), pelo fornecimento das linhagens utilizadas neste estudo, pelas sugestões, conselhos, amizade e confiança.

À agência financiadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro do projeto e concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava (Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico) pelo sequenciamento das amostras.

Ao Prof. Dr. Fabiano Thompson (UFRJ) pelos *primers* utilizados neste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, que compartilharam experiências pessoais e profissionais, Nice, Rafa, Dê Salô, Bruna, Vivian, Anne, Jaque e Talitha. Também, os amigos que convivem comigo diariamente e dividem vários momentos no trabalho, cafés, almoços, risadas dentro e fora do laboratório e são muito especiais, Dani-Dani, Rê, Lú, Lari, Daysi, Alex, Lucas, Karen, Victor, Soninha, Celeste, Irene, Beriam, Júlio e Susi. Obrigada por torcerem por mim e comemorarem comigo cada conquista.

Às amigas muito especiais, Daniele Bussioli Alves Corrêa, minha "assessora para assuntos científicos e em informática", e Denise Salomão Hernández Chuahy, Dani-Dani e Dê (Ome). Essas meninas com quem eu tenho a sorte de conviver dentro e fora do laboratório, fazem meus dias mais alegres com suas palhaçadas, seguraram minhas mãos em momentos difíceis, dividiram comigo a felicidade do nascimento do meu filho Bruno e são pessoas que, com certeza, estarão ao meu lado sempre.

Às amigas muito especiais, Renata Comparoni e Jaqueline Rebouças Cachatori, Rê e Jaque, que sempre estiveram ao meu lado, torceram por mim, vibraram comigo a

cada conquista e continuam dividindo todos os momentos importantes da minha vida. Obrigada pela amizade e carinho sempre.

Aos professores Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini (CPQBA/DRM – Unicamp), Dr. Júlio Rodrigues Neto (LBV – Instituto Biológico), Dr. Ivan Paulo Bedendo (Departamento de Fitopatologia – ESALQ-USP) e Dr. Ricardo Harakava (Lab. Bioquímica Fitopatológica – Instituto Biológico), pela participação na banca de defesa de Tese.

A minha família, meus queridos tios Nelly, Swami e Leta e minha vózinha Mercedes, por toda preocupação, carinho e amor que sempre tiveram por mim. À tia Nelly, que vibrou intensamente com o doutorado, sempre me incentivou e, embora não esteja presente fisicamente, com certeza está muito feliz por esta conquista.

Aos meus cunhados, Ruy, Natália, Daniela e ao meu sogro Roque, pela torcida, pelo apoio, pelo carinho sempre e por serem pessoas tão especiais. E ao meu sobrinho Guilherme por me alegrar com seu amor, com seu olhar e com seu sorriso lindo.

À minha sogra, Cleuza, por cuidar do Bruno com todo amor, paciência e dedicação, para que eu pudesse ir para o laboratório com tranquilidade. Sem sua grande ajuda, teria sido muito mais difícil concluir este doutorado. Uma pessoa muito especial, obrigada pelo carinho com o Bruno e comigo.

Aos meus irmãos, Carolina e Fernando, minhas almas gêmeas. Junto aos nossos pais sempre formamos uma família feliz e cercada de amor e nos momentos mais difíceis de nossas vidas, a doença e a perda dos nossos pais precocemente, nos unimos ainda mais e nos tornamos um só. Cá e Nando, pela nossa amizade, pela nossa união e, principalmente pelo nosso amor, obrigada! Amo vocês!

Ao meu marido, Umberto, por ser uma pessoa tão especial, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, pelo apoio e incentivo durante o doutorado, e por ser um marido, pai, profissional e ser humano exemplar. Amo você!

Ao meu filho, Bruno, por ficar o dia todo longe da mamãe tão pequeno e entender que ela precisa trabalhar, por me divertir com nossas brincadeiras e, principalmente, por me fazer feliz com seu sorriso e com seu amor. Obrigada por ser este filho maravilhoso, esta criança educada, prestativa, amorosa e por trazer luz e alegria à minha vida e à nossa família. Você é a coisa mais importante da minha vida, “mamãinha” te ama muito!

Aos meus pais, Fernando e Ana Margarida, os melhores pais do mundo, por todo o amor e dedicação aos filhos, por terem sido pais totalmente presentes, pela dedicação e responsabilidade no trabalho nos proporcionando uma ótima qualidade de vida, pelo investimento em nossos estudos que foi fundamental para que eu pudesse ingressar na graduação e pós-graduação da UNICAMP, e pelo exemplo de seres humanos maravilhosos que nos deixaram. Ao meu pai, que assumiu o papel de mãe quando ela nos faltou e cuidou sozinho do neto ainda bebê para que eu pudesse voltar para o laboratório. Obrigada por serem exemplos de tudo o que eu quero ser, tenho muito orgulho de ser filha de vocês e sei que estão espiritualmente presentes em nossas vidas e felizes com mais esta etapa concluída. O nosso amor está cada dia mais vivo, amo vocês!

À Deus, por me dar saúde, determinação e por colocar pessoas tão especiais e iluminadas na minha vida. E também por me dar forças para continuar e superar tantos momentos difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..... **xiv**
LISTA DE FIGURAS ..... **xvi**
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **xix**
RESUMO ..... **xxii**
ABSTRACT ..... **xxv**
INTRODUÇÃO **1**
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**
1. Gênero *Xanthomonas* **7**
1.1. Xanthomonas campestris ***9***
1.2. Xanthomonas translucens **12**
1.3. Xanthomonas cucurbitae e Xanthomonas melonis **13**
2. Análises de Multilocus (MLSA) **15**
3. Gene *rpoB* **18**
4. Gene *rpoA* **21**
5. Gene *atpA* **22**
6. Gene *recA* **23**
7. Região espaçadora 16S-23S DNAr **24**
OBJETIVOS **27**
1. Objetivo Geral **29**
2. Objetivos Específicos **29**
MATERIAL E MÉTODOS **31**
1. Linhagens **33**
2. Reativação de culturas e condições de cultivo **35**
3. Extração de DNA genômico **35**
4. Amplificação por PCR dos diferentes genes **36**
5. Análises de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *rpoB* **39**
6. Análise dos padrões de *fingerprinting* **39**
7. Sequenciamento **39**

8. Análise de Multilocus (MLSA).....40
9. Desenho e síntese de *primers* específicos.....41
10. Níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os *primers* desenvolvidos.....41
11. Hibridização DNA-DNA.....41
11.1. Formato Slot-blotting..... 41
11.2. Marcação não radioativa da sonda..... 42
11.3. Hibridização..... 43
11.4. Detecção..... 43
11.5. Análise dos resultados..... 43
RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
Parte I. Artigo: Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP.....47
Parte II. Caracterização genética de linhagens classificadas como *Xanthomonas* sp. por MLSA e hibridização DNA-DNA.....71
1. Amplificação com o par de *primers* axo1F/axo2R específico para a espécie *Xanthomonas axonopodis*..... 71
2. Hibridização DNA-DNA..... 72
3. Análise de Multilocus (MLSA)..... 75
Parte III. Diferenciação dos patovares da espécie *Xanthomonas campestris,* patogênica às crucíferas, e desenho de *primers* específicos.....87
1. Diferenciação dos patovares de *X. campestris* por PCR-RFLP do gene *rpoB*..... 87
2. Desenvolvimento de *primers* para a espécie *X. campestris*..... 89
2.1. Testes de especificidade e determinação do nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR.....90
Parte IV. Desenvolvimento de *primers* para *X. translucens,* patogênica às gramíneas e cereais..... 94
1. Desenho do par de *primers* trans1F/trans2R..... ...94

1.1. Testes de especificidade e determinação do nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* trans1F/trans2R.....95

Parte V. Desenvolvimento de *primers* para as espécies *X. cucurbitae* e *X. melonis*, patogênicas ao melão..... 98

1. Desenho do par de *primers* mecF/mecR..... 98

1.1. Testes de especificidade e determinação do nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR.....99

CONCLUSÕES..... 103

REFERÊNCIAS 107

APÊNDICES..... 125

APÊNDICE 1 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *atpA* (*Neighbor joining* – Kimura 2).....127

APÊNDICE 2 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *rpoA* (*Neighbor joining* – Kimura 2).....128

APÊNDICE 3 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *rpoB* (*Neighbor joining* – Kimura 2).....129

APÊNDICE 4 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *recA* (*Neighbor joining* – Kimura 2).....130

APÊNDICE 5 - Árvore filogenética construída à partir das sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr (*Neighbor joining* – Kimura 2).....131

APÊNDICE 6 - Árvore filogenética contruída à partir das sequências concatenadas dos genes *recA, rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr (*Neighbor joining* – Kimura 2).....132

APÊNDICE 7 - Árvore filogenética contruída à partir das sequências concatenadas dos genes *atpA, rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr (*Neighbor joining* – Kimura 2).....133

APÊNDICE 8 - Árvore filogenética contruída à partir das sequências concatenadas dos genes *atpA, recA, rpoA* e *rpoB* (*Neighbor joining* - Kimura 2).....134

APÊNDICE 9 - Valores de similaridade (%) das sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr.....135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de *Xanthomonas* utilizadas neste estudo. 33
Tabela 2. Seqüência dos *primers* utilizados neste estudo. 37
Tabela 3. Pares de *primers*, regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos 38
Tabela 4. Valores de homologia (%) obtidos nos experimentos de hibridização DNA-DNA com diferentes linhagens de *Xanthomonas* sp. utilizando-se como sonda *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444T) ou *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163T). 74
Tabela 5. Resultados obtidos nos experimentos com as linhagens de *Xanthomonas* sp. 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões típicas de "V" invertido causadas por X. campestris (Infecção natural). 1
Figura 2. Estria bacteriana causada por X. translucens. 1
Figura 3. Doença causada por X. melonis em estágio avançado (Infecção natural). 1
Figura 4. Amplificação por PCR utilizando-se o par de primers axo1F/axo2R 12
Figura 5. Membranas obtidas nos experimentos de hibridização DNA-DNA 13
Figura 6. Membranas obtidas nos experimentos de hibridização DNA-DNA. 15
Figura 7. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes rpoA, rpoB e região espaçadora 16S-23S DNAr de linhagens do gênero Xanthomonas 17
Figura 8. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes atpA, rpoA, rpoB, recA e região espaçadora 16S-23S DNAr de linhagens do gênero Xanthomonas 78
Figura 9. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene rpoB utilizando-se as enzimas Cfo I; Cfo I/Afa I; Cfo I/Mbo I. 88
Figura 10. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene rpoB utilizando-se a combinação das enzimas Cfo I/Alu I. 88
Figura 11. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers rpoB2F/xcamR. 91
Figura 12. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers rpoB2F/xcamR com diferentes quantidades de DNA da linhagem X.c. pv. campestris 91
Figura 13. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers trans1F/2R.. 96
Figura 14. Produtos de amplificação com o par de primers trans1F/trans2R 96
Figura 15. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers trans1F/trans2R com diferentes quantidades de DNA da linhagem X.t. pv. translucens 97
Figura 16. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers mecF/mecR 99
Figura 17. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers mecF/mecR 100

Figura 18. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers mecF/mecR com diferentes quantidades de DNA da espécie X. cucurbitae 100
Figura 19. Produtos de amplificação utilizando-se o par de primers mecF/mecR com diferentes quantidades de DNA da espécie X. melonis. 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

16S	RNA ribossomal em procariotos
16S-23S	região espaçadora entre os RNAs ribossomais 16S e 23S
atpA	gene codificante da unidade α da ATP sintase
BSA	albumina sérica bovina
ºC	graus Celsius
DGGE	*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAr	ácido desoxirribonucléico ribossomal
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
g	gramas
gyrB	gene estrutural da subunidade B da DNA girase
h	hora
HCl	ácido clorídrico
IBSBF	Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
ICMP	International Collection of Micro-organisms from Plants, New Zealand
LiCl	cloreto de lítio
LMG	*Laboratorium voor Microbiologie,* Belgium
M	molar
MEGA	*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
mg	miligrama
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
MLSA	*Multilocus Sequence Analysis*
MLST	*Multilocus Sequence Typing*
mM	milimolar
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
NA	Nutrient Agar

NaCl	cloreto de sódio
n/a	não avaliada
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom
ng	nanograma
P	linhagem patotipo
pb	pares de base
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
pH	potencial hidrogeniônico
qsp	quantidade suficiente para
recA	gene codificante da recombinase A
RFLP	*Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
RNAr	ácido ribonucléico ribossomal
rpm	rotações por minuto
rpoA	gene codificante da subunidade α da RNA polimerase
rpoB	gene codificante da subunidade β da RNA polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
seg	segundo
T	linhagem Tipo
TAE	Tris - Acetato - EDTA
Taq	*Thermus aquaticus* (enzima DNA polimerase)
TE	Tris - EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris- HCl	Tris (hidroximetil) aminometano – ácido clorídrico
U	Unidade
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

RESUMO

Espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são responsáveis por doenças que podem causar grandes perdas econômicas em diversas culturas. Esses fitopatógenos têm sido objeto de diversos estudos taxonômicos resultando em significativas alterações na classificação em nível inter e infraespecífico. O presente estudo teve por objetivo caracterizar taxonomicamente bactérias do gênero envolvendo: (1) diferenciação e análises filogenéticas de espécies do gênero *Xanthomonas;* (2) esclarecimento da posição taxonômica de linhagens classificadas como *Xanthomonas* sp.; (3) diferenciação de patovares da espécie *X. campestris;* (4) desenvolvimento de *primers* específicos para *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* e *X. melonis.*

O par de *primers* rpoB2F/rpoB3R, desenhado a partir de sequências do gene *rpoB,* foi empregado em experimentos de amplificação utilizando-se DNAs de 26 espécies do gênero *Xanthomonas* e os produtos de amplificação (800 pb) foram digeridos com diversas endonucleases. Os perfis de restrição obtidos com a utilização da enzima *Hae* III permitiram a diferenciação da maioria das espécies, incluindo os patógenos de mesmo hospedeiro como *X. albilineans* e *X. sacchari* (patogênicas à cana-de-açúcar); *X. cucurbitae* e *X. melonis* (patogênicas ao melão); *X. vesicatoria, X. gardneri* e *X. euvesicatoria/X. perforans* (patogênicas ao tomateiro). Ainda, os produtos de amplificação do gene *rpoB* foram seqüenciados e a árvore filogenética construída a partir destas sequências também possibilitou a diferenciação das espécies do gênero, indicando que o gene *rpoB* pode ser considerado um marcador molecular eficiente para o estudo das relações filogenéticas de espécies do gênero *Xanthomonas.*

Os DNAs de linhagens classificadas como *Xanthomonas* sp. também foram analisados por meio de experimentos de amplificação com *primers* específicos para a espécie *X. axonopodis,* de hibridização DNA-DNA, e análise de multilocus utilizando-se sequências dos genes *rpoB, rpoA, atpA, recA* e região espaçadora 16S-23S DNAr. Os resultados mostraram que as linhagens de *X.* sp. pv. *viticola, X.* sp. pv. *betae* e *X.* sp. pv. *paulliniae* pertencem à espécie *X. axonopodis,* entretanto, não foi possível definir a posição taxonômica das linhagens de *X.* sp. pv. *arracaciae, X.* sp. pv. *esculenti* e *X.* sp. pv. *eucalypti,* embora várias ferramentas tenham sido utilizadas. Assim, somente estudos complementares deverão ser conduzidos visando esclarecer a classificação dessas linhagens.

Nesse estudo também foram analisadas as espécies *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* e *X. melonis.* Visando a diferenciação dos patovares da espécie *X. campestris,* os DNAs destas linhagens foram submetidos a experimentos de PCR-RFLP do gene *rpoB* e as digestões duplas utilizando-se *Cfo* I/*Mbo* I. Os resultados permitiram a diferenciação dos patovares *X.c.* pv. *raphani, X.c.* pv. *barbariae, X.c.* pv. *incanae, X.c.* pv. *armoraciae* e *X.c.* pv. *campestris*/ *X.c.* pv. *aberrans.*

Ainda, os dados obtidos nas análises do gene *rpoB* permitiram o desenvolvimento de *primers* específicos para as espécies *X. campestris,* patogênicas às crucíferas (rpoB2F/xcamR) e *X. translucens,* patogênicas à gramíneas e cereais (trans1F/trans2R). Além disso, análises de sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr possibilitaram o desenho do par de *primers* mecF/mecR, específico para *X. cucurbitae* e *X. melonis,* espécies patogênicas ao melão. A especificidade destes *primers* foi confirmada em experimentos de amplificação utilizando-se DNAs de algumas bactérias de diferentes gêneros isoladas de mesma espécie de plantas hospedeiras. O nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os *primers* desenvolvidos foi de 0,1 pg para rpoB/xcam, de 0,01 ng para trans1F/trans2R e de 1 pg para mecF/mecR.

ABSTRACT

Xanthomonas species are responsible for diseases causing economic losses in many crops. These phytopathogens have been subject of several taxonomic studies resulting in significant changes at interespecific or infraspecific level. This study aimed the taxonomic characterization of *Xanthomonas* species including: (1) differentiation and phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species; (2) clarification of taxonomic position of strains classified as *Xanthomonas* sp.; (3) differentiation of the pathovars of *X. campestris;* (4) development of specific *primers* for *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* and *X. melonis.*

The rpoB2F/rpoB3R *primers*, designed from *rpoB* gene sequences, were employed in amplification experiments using DNAs from 26 species of *Xanthomonas* genus and the products (800 bp) were digested with different restriction enzymes. Profiles using *Hae* III allowed to differentiate the most species of the genus, including pathogens the affect the same plant host as *X. albilineans* e *X. sacchari* (pathogenic to sugarcane); *X. cucurbitae* e *X. melonis* (pathogenic to melon); *X. vesicatoria, X. gardneri* and *X. euvesicatoria/X. perforans* (pathogenic to tomato). Amplification products of the *rpoB* gene were sequenced and the phylogenetic tree constructed from these sequences also allowed the differentiation of the *Xanthomonas* species, indicating that the *rpoB* gene can be used as an efficient molecular marker for phylogenetic relationships studies within the *Xanthomonas* genus.

DNA of the strains classified as *Xanthomonas* sp. were also analysed by the amplification experiments using specific *primers* for *X. axonopodis* species, DNA-DNA hybridization and multilocus sequence analysis of the genes *rpoB, rpoA, atpA, recA* and intergenic spacer region 16S-23S rDNA. Results showed that the strains of *X.* sp. pv. *viticola, X.* sp. pv. *betae* and *X.* sp. pv. *paulliniae* belong to *X. axonopodis* species, however, it was not possible to define the taxonomic position of *X.* sp. pv. *arracaciae, X.* sp. pv. *esculenti* and *X.* sp. pv. *eucalypti,* although different approaches have been used. Thus, further studies should be conducted in order to clarify their classification.

In this study *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* and *X. melonis* were also analyzed. In order to differentiate the pathovars of the *X. campestris* specie, the DNAs of these strains were submitted to PCR-RFLP analysis of the *rpoB* gene and the double digestions using *Cfo* I/*Mbo* I allowed the differentiation of the pathovars *X.c.* pv.

raphani, X.c. pv. *barbariae, X.c.* pv. *incanae, X.c.* pv. *armoraciae* and *X.c.* pv. *campestris*/ *X.c.* pv. *aberrans.*

Also, the data obtained in the *rpoB* gene analysis allowed the development of specific *primers* for the species *X. campestris,* pathogenic to crucifers (rpoB2F/xcamR) and *X. translucens,* pathogenic to grasses and cereals (trans1F/trans2R). Furthermore, intergenic spacer 16S-23S rDNA sequences analysis enabled the development of the mecF/mecR *primers*, specific for *X. cucurbitae* and *X. melonis,* both pathogenic to melon. The specificity of these *primers* was confirmed by amplification experiments using DNAs from bacteria belonging to different genera pathogenic to the same plant hosts. Sensitivity level of the PCR technique using the *primers* developed was 0,1 pg for rpoB/xcam, 0,01 ng for trans1F/trans2R and 1 pg for mecF/mecR.

INTRODUÇÃO

O gênero *Xanthomonas* engloba diversas espécies fitopatogênicas que atacam plantas economicamente importantes incluindo arroz, feijão, mandioca, tomate, trigo, citros, ornamentais, entre outros. Esses fitopatógenos têm sido objeto de inúmeros estudos taxonômicos baseados em testes bioquímicos, serológicos, de patogenicidade, utilização de fontes de carbono (BIOLOG), análises de ácidos graxos e perfis de proteínas e também em métodos moleculares incluindo hibridização DNA-DNA, análises do gene 16S RNAr, perfil plasmidial, rep-PCR (*Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o que tem resultado em alterações taxonômicas em nível inter e infraespecífico dentro do gênero.

Várias técnicas baseadas em DNA têm sido empregadas para a caracterização e determinação de relações filogenéticas de diferentes espécies bacterianas. Marcadores moleculares como o gene 16S RNAr e região espaçadora 16S-23S RNAr têm sido amplamente utilizados, entretanto, em alguns casos, o alto grau de similaridade dessas regiões entre diferentes espécies de um mesmo gênero tem provocado a busca de novos marcadores moleculares para um melhor entendimento das relações filogenéticas dentro de um determinado grupo. Devido ao alto nível de similaridade do gene 16S RNAr dentro do gênero *Xanthomonas,* outros marcadores moleculares têm sido utilizados para a diferenciação de espécies desse gênero como a região espaçadora 16S-23S RNAr e os genes *gyrB*, *dnaK, fyuA, gyrB* e *rpoD,* empregados em análises de multilocus. O gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, tem sido empregado como uma ferramenta alternativa para estudos de comunidades microbianas, uma vez que é um gene *housekeeping,* de cópia única no genoma e conservado, porém com domínios de sequências variáveis. Nesse sentido, esse gene foi investigado como marcador molecular para o estudo das relações filogenéticas dentro do gênero *Xanthomonas.*

Em 1995, espécies pertencentes a esse gênero foram submetidas a um estudo que resultou em significativas alterações taxonômicas. Devido a essas alterações, algumas espécies patogênicas a uma ampla gama de hospedeiros foram classificadas como *Xanthomonas* sp., uma vez que não puderam ser alocadas em nenhuma espécie estudada. Neste grupo estão incluídas linhagens de *X.* sp. pv. *viticola* (patogênica a videira), *X.* sp. pv. *eucalypti* (patogênica ao eucalipto), *X.* sp. pv. *paulliniae* (patogênica ao guaranazeiro), *X.* sp. pv. *arracaciae* (patogênica a batata-baroa), *X.* sp. pv. *betae* (patogênica à beterraba) e *X.* sp. pv. *esculenti* (patogênica ao quiabeiro).

Devido aos prejuízos causados por fitopatógenos a correta classificação, identificação e/ou detecção são fundamentais para pesquisas de melhoramento vegetal visando o desenvolvimento de plantas resistentes, para a aplicação de medidas que dificultem a disseminação do patógeno e, consequentemente, permitam um maior controle das doenças e, principalmente, evitar a introdução de doenças em áreas indenes. Além disso, o desenvolvimento de uma ferramenta rápida e confiável de detecção destes fitopatógenos é de extrema importância para que medidas de controle sejam colocadas em prática visando à redução de perdas econômicas.

O presente trabalho teve por objetivo a caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas* envolvendo: (1) diferenciação e análises filogenéticas de espécies do gênero *Xanthomonas;* (2) esclarecimento da posição taxonômica de linhagens classificadas como *Xanthomonas* sp.; (3) diferenciação de patovares da espécie *X. campestris;* (4) desenvolvimento de *primers* específicos para *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* e *X. melonis.*

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

.....

1. Gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* compreende bactérias fitopatogênicas que estão distribuídas mundialmente, são responsáveis por doenças em diversas plantas economicamente importantes e têm sido objeto de vários estudos taxonômicos (BRADBURY, 1984; LEYNS et al., 1984). Estes fitopatógenos afetam aproximadamente 400 hospedeiros incluindo arroz, citros, banana, repolho, tomate, pimentão, feijão (RYAN et al., 2011), causando várias perdas econômicas através de lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecidos e hiperplasias (LEYNS et al., 1984; VAN DEN MOOTER; SWINGS, 1990). Bactérias do gênero *Xanthomonas* também são responsáveis pela produção de goma xantana, um exopolisacarídeo de grande utilização na indústria alimentícia, têxtil, entre outros (PAUL et al., 1986). São bactérias Gram-negativas, com células em forma de bastonetes móveis com flagelo polar, estritamente aeróbias, seu crescimento ocorre em aproximadamente 48 horas e não ocorre em pH abaixo de 4,5 ou em temperaturas de 4 °C ou 37 °C (VAUTERIN et al., 1995). Em sua maioria, as colônias apresentam coloração amarelada devido a presença do pigmento xantomonadina, que é uma característica taxonômica importante uma vez que é exclusiva do gênero (STARR; STEPHENS, 1964).

A primeira descrição de uma bactéria que atualmente seria incluída no gênero *Xanthomonas* foi realizada por Wakker (1883) que classificou como *Bacterium hyacinthi* o patógeno responsável pela doença conhecida por amarelo do jacinto. Posteriormente as bactérias fitopatogênicas foram agrupadas por Winslow e colaboradores (1917) em dois gêneros, *Erwinia* e *Phytomonas.* O gênero *Phytomonas* agrupava basicamente todas as bactérias patogênicas e nos anos 30 Burkholder propôs o desdobramento do gênero em diversos grupos devido a heterogeneidade das espécies. Dowson (1939) propôs a criação de novos gêneros incluindo o gênero *Xanthomonas,* que inicialmente compreendia 19 espécies. Posteriormente Young e colaboradores (1978a, 1978b) sugeriram que as espécies bacterianas deveriam ser agrupadas em nível infra-específico de acordo com sua patogenicidade a hospedeiros específicos estabelecendo-se, assim, o termo patovar. Porém esta classificação nem sempre foi bem definida devido à variação nas interações patógeno-hospedeiro (EGLI; SCHMIDT, 1982).

Após diversos estudos e novas classificações, surgiu a necessidade de uma revisão taxonômica do gênero e uma ampla reclassificação foi proposta por Vauterin e colaboradores (1995). Os autores dividiram o gênero em 20 grupos, que passaram a ser considerados espécies genômicas, sendo *Xanthomonas campestris* designada como espécie tipo do gênero. Esta reclassificação foi proposta com base em estudos de utilização de fontes de carbono (BIOLOG) e hibridização DNA-DNA (VAUTERIN et al., 1995). A técnica de hibridização DNA-DNA consiste em comparar um DNA cromossômico marcado radioativamente, colorimetricamente ou por quimioluminescência (sonda) com outros a serem analisados e observar o grau de homologia entre eles. Se a porcentagem obtida for maior que 70 % entre o DNA analisado e a sonda, considera-se que estes pertencem à mesma espécie genômica (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Esta técnica é laboriosa e de difícil padronização entre laboratórios, porém é um experimento obrigatório para estudos que resultem em alterações taxonômicas como a reclassificação e proposição de novas espécies.

De acordo com a reclassificação proposta por Vauterin e colaboradores (1995) o gênero *Xanthomonas* ficou composto pelas espécies: *Xanthomonas albilineans, Xanthomonas arboricola, Xanthomonas axonopodis, Xanthomonas bromi, Xanthomonas campestris, Xanthomonas cassavae, Xanthomonas codiaei, Xanthomonas cucurbitae, Xanthomonas fragariae, Xanthomonas hortorum, Xanthomonas hyacinthi, Xanthomonas melonis, Xanthomonas oryzae, Xanthomonas pisi, Xanthomonas populi, Xanthomonas sacchari, Xanthomonas theicola, Xanthomonas translucens, Xanthomonas vasicola* e *Xanthomonas vesicatoria.* Também foi criado o grupo *Xanthomonas* sp. compreendendo a 66 antigos patovares de *X. campestris* que não foram alocados em nenhuma das espécies descritas.

Recentemente alguns autores descreveram novas espécies dentro do gênero *Xanthomonas.* Baseado em testes de patogenicidade, utilização de fontes de carbono (BIOLOG) e hibridização DNA-DNA, Trébaol e colaboradores (2000) descreveram uma nova espécie do gênero responsável pela mancha bacteriana da alcachofra denominada *Xanthomonas cynarae.*

Ainda, Jones e colaboradores (2004) reclassificaram como *X. euvesicatoria* e *X. perforans* os patógenos de tomateiro e pimentão classificados anteriormente como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* grupos A e C, respectivamente; e confirmaram a

classificação do patógeno *X. gardneri* como espécie do gênero. Estas proposições foram publicadas na Lista de Validação n° 109 (JONES et al., 2006).

Novas espécies também foram propostas reclassificando outros patovares de *X. axonopodis*: 1. *Xanthomonas citri* que ficou subdividida em *X. citri* subsp. *citri* (sin. *X. axonopodis* pv. *citri*), agente causal do cancro cítrico e *X. citri* subsp. *malvacearum* (sin. *X. axonopodis* pv. *malvacearum*), agente causal da mancha angular do algodoeiro; 2. *Xanthomonas fuscans* que ficou subdividida em *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (sin. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*), responsável pelo crestamento bacteriano do feijoeiro e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (sin. *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*), agente causal da cancrose em limão galego e laranja lima; 3. *Xanthomonas alfalfae* que ficou subdividida em *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* (sin. *X. axonopodis* pv. *alfalfae*) que causa mancha foliar em alfafa e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (*X. axonopodis* pv. *citrumelo*) que causa mancha bacteriana em citros (SHAAD et al., 2005; SHAAD et al., 2006).

Ainda, algumas linhagens classificadas anteriormente como *Pseudomonas syringae* pv. *dysoxyli*, *Xanthomonas* sp. (isoladas de eucalipto e plantas ornamentais), *X. campestris* pv. *laureliae* e *X. campestris* pv. *eucalypti,* patogênicas a uma ampla gama de hospedeiros, em sua maioria plantas ornamentais, foram reclassificadas recentemente por Young e colaboradores (2010) como *Xanthomonas dyei*, proposta como uma nova espécie do gênero dividida em diferentes patovares.

Atualmente o gênero *Xanthomonas* compreende 28 espécies subdivididas em diversos patovares determinados de acordo com o hospedeiro (www.xanthomonas.org).

1.1. *Xanthomonas campestris*

A espécie *Xanthomonas campestris* representava a espécie com taxonomia mais complexa no gênero, sendo subdividida em 143 patovares (VAUTERIN et al., 1990; BRADBURY, 1984). A diferenciação dos patovares de *X. campestris* foi demonstrada através de métodos serológicos (BENEDICT et al., 1990), análise fenotípica e padrões eletroforéticos de proteínas celulares (QHOBELA et al., 1991), perfis de ácidos graxos (VAUTERIN et al., 1992) e proteínas de membrana (OJANEN et al., 1993).

Com base em estudos de hibridização DNA-DNA, Vauterin e colaboradores (1995) reclassificaram a espécie *X. campestris* em apenas seis patovares patogênicos a

crucíferas (couve, couve-flor, repolho, nabo, brócolis, etc): *aberrans*, *armoraciae*, *barbariae*, *campestris*, *incanae* e *raphani.*

Xanthomonas campestris pv. *campestris,* responsável pela podridão negra das crucíferas, invade as folhas através dos hidatódios e estômatos, ou raízes por meio de ferimentos, e, posteriormente invade o sistema vascular da planta através das nervuras, resultando em necrose e murcha, acompanhada de apodrecimento da medula, devido à associação deste patógeno com microrganismos secundários (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR., 1995).

As linhagens isoladas de plantas com sintomas típicos de podridão negra ("V" invertido) nas folhas (Figura 1), geralmente são designadas como pertencentes ao patovar *campestris*, enquanto que àquelas isoladas de manchas foliares, com lesões delimitadas pelas nervuras, não sistêmicas, estão alocadas nos patovares *aberrans, armoraciae* ou *raphani* (ZHAO et. al., 2000). Entretanto linhagens isoladas de podridão negra podem causar mancha foliar quando inoculadas artificialmente em plantas (ZHAO et. al., 2000) e patógenos causadores de mancha foliar podem desenvolver lesões semelhantes à podridão negra (MOFFETT et al., 1976).

Figura 1. Lesões típicas de "V" invertido causadas por *X. campestris* (Infecção natural).

A espécie *Xanthomonas campestris* é frequentemente transmitida pelas sementes e significativas perdas agrícolas podem ocorrer quando há apenas uma semente infectada em um lote de 10.000. Além disso, a probabilidade de disseminação do patógeno aumenta significativamente principalmente na produção de mudas em condições úmidas e de superlotação (WILLIAMS, 1980; ROBERTS et al., 1998).

Alvarez e colaboradores (1994) diferenciaram os patógenos causadores das duas doenças de crucíferas através de testes de patogenicidade, porém não conseguiram

diferenciar os patovares *armoraciae, aberrans* e *campestris* por métodos moleculares e imunológicos.

Fargier e Manceau (2007) efetuaram um estudo com os patovares de *X. campestris* e observaram sintomas de três doenças distintas: podridão negra das crucíferas causada por *X.c.* pv. *campestris,* mancha foliar de crucíferas e solanáceas causada por *X.c.* pv. *raphani* e crestamento bacteriano de crucíferas ornamentais causado por *X.c.* pv. *incanae.* Neste mesmo estudo os autores observaram que as linhagens classificadas como *X.c.* pv. *barbarae* e *X.c.* pv. *armoraciae* não desenvolveram sintomas de doenças quando inoculadas artificialmente em beterraba e rabanete, respectivamente.

Diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas para se investigar a diversidade genética da espécie *X. campestris,* dentre elas eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (VALVERDE et al., 2007), rep-PCR (*Repetitive Sequence-Based PCR)* (ZHAO et al., 2000; TSYGANKOVA et al., 2004; VALVERDE et al., 2007) e AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polymorphism*) (IGNATOV et al., 2007; VALVERDE et al., 2007). Ainda, a detecção e identificação da espécie foram alcançadas pela utilização de sonda de DNA em experimentos de hibridização de colônias realizados por Shih e colaboradores (2000) e por *dot-blot* (PARK et al., 2004). *Primers* específicos a partir de sequências do gene *hrpF* (*hypersensitive response and pathogenicity*) também foram desenvolvidos (PARK et al., 2004; BERG et al., 2005). Berg e colaboradores (2005) desenvolveram *primers* que se mostraram específicos para a espécie *X. campestris* e seus patovares permitindo sua detecção em tecido vegetal lesionado e em lotes de sementes com apenas uma semente infectada artificialmente em 10.000 saudáveis. No estudo efetuado por Park e colaboradores (2004) os autores verificaram que foi possível a detecção do patógeno em um número mínimo de células de 1,3 X 10^4 UFC/mL a partir de uma suspensão de cultura pura da bactéria e também em sementes e em folhas de repolho infectadas naturalmente.

Ainda, análises de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) da espécie *X. campestris* foram efetuados por Fargier e colaboradores (2011) com objetivo de se observar as relações filogenéticas entre os patovares desta espécie. Na árvore filogenética construída a partir das sequências dos genes *dnaK, fyuA, gyrB* e *rpoD,* foram observados alguns agrupamentos heterogêneos, ou seja, compostos por linhagens de diferentes patovares indicando uma alta diversidade genética dentro deste grupo de fitopatógenos.

1.2. *Xanthomonas translucens*

As linhagens de *Xanthomonas* patogênicas a gramíneas e cereais anteriormente classificadas como pertencentes à espécie *X. campestris* foram reclassificadas com base em estudos de hibridização DNA-DNA e utilização de fontes de carbono (BIOLOG) como *X. translucens* dividida nos patovares: *X.t.* pv. *translucens, X.t.* pv. *cerealis, X.t.* pv. *undulosa, X.t.* pv. *hordei, X.t.* pv. *secalis,* patogênicos aos cereais*;* e *X.t.* pv. *arrhenatheri, X.t.* pv. *graminis, X.t.* pv. *phlei,*. *X.t.* pv. *phleipratensis* e *X.t.* pv. *poae,* patogênicos às gramíneas (VAUTERIN et al., 1995).

Os sintomas típicos da doença causada pela espécie *X. translucens* consistem em lesões castanho-claras alongadas que se apresentam com vários centímetros de comprimento nas folhas (Figura 2), sendo que os primeiros sintomas podem ser percebidos com o aparecimento de listras translúcidas, facilmente observadas através da luz incidente (DUVEILLER et al., 1997).

Figura 2. Estria bacteriana causada por *X. translucens*.

Este grupo de fitopatógenos tem sido alvo de diversos estudos devido às perdas econômicas que acarretam em culturas economicamente importantes como capim-cevadinha, cevada, centeio e trigo (BRAGARD et al., 1995). Bragard e Verhoyen (1993) realizaram um estudo empregando testes serológicos com anticorpos monoclonais e policlonais e os resultados revelaram que os patovares *cerealis, hordei, secalis, translucens* e *undulosa* formaram um grupo homogêneo, não podendo ser diferenciados. Esses mesmos resultados foram obtidos em análises de ácidos graxos efetuadas por Stead (1989). Um estudo mais amplo de análises de proteínas, ácidos graxos e hibridização DNA-DNA envolvendo diferentes espécies do gênero

Xanthomonas, além da espécie *X. translucens* e seus patovares, revelou a formação de um grupo separado denominado "*translucens group",* não sendo possível a diferenciação infra-específica (VAUTERIN et al., 1992).

Ainda, a diversidade desta espécie tem sido investigada por meio de RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) de DNA genômico (ALIZADEH et al., 1997), ribotipagem (BRAGARD et al., 1995) e AFLP (BRAGARD et al., 1997).

Com relação à detecção e identificação de *X. translucens,* Maes e colaboradores (1996) desenvolveram um par de *primers* que mostrou-se específico para esta espécie, permitindo, inclusive, a detecção destes patógenos em lotes de sementes.

Em outro estudo, Mitkowski e colaboradores (2005) isolaram o patógeno responsável pela doença que causa graves lesões destruindo grandes áreas em gramados utilizados em campos de golfe nos Estados Unidos e, com base em testes de patogenicidade em *Poa annua*, análises de ácidos graxos e de sequências do gene 16S RNAr, os autores identificaram o patógeno como *X. translucens* pv. *poae*.

Análises dos perfis ARDRA (*Amplified Ribosomal Gene Restriction Analysis*) efetuados por Rademaker e colaboradores (2006) distinguiram e espécie *X. translucens* das outras espécies do gênero e análises dos padrões de *fingerprinting* obtidos através da técnica de rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*- PCR) pemitiram a diferenciação da maioria dos patovares da espécie. Ainda neste estudo, os autores identificaram bactérias isoladas de aspargos ornamentais como pertencentes à espécie *X. translucens* pv. *undulosa* o que representou um fato inédito, uma vez que os patógenos pertencentes a espécie *X. translucens* têm como hospedeiros cereais e gramíneas.

1.3. *Xanthomonas cucurbitae* e *Xanthomonas melonis*

Xanthomonas cucurbitae é o agente causal responsável pela mancha bacteriana das cucurbitáceas (melancia, melão, pepino, moranga, abóbora). Esta doença se caracteriza inicialmente por lesões translúcidas na parte inferior das folhas, que se tornam angulares e circundadas por um halo com o decorrer do tempo, podendo aumentar e coalescer. Nos frutos as lesões são profundas com centro bege e halo marrom escuro podendo causar rompimento da epiderme e conseqüente podridão (EL-HENDAWY, 1999).

A disseminação desse patógeno ocorre através das sementes e no campo a dispersão ocorre através de chuva e vento. O desenvolvimento dos sintomas ocorre geralmente nos períodos de alta temperatura seguidos de chuva ou irrigação da plantação (SADDLER, 2000).

A ocorrência da espécie *X. cucurbitae* foi relatada em abóbora nas Ilhas Reunião (PRUVOST et al., 2008) e em frutos de melão no arquipélago de Seychelles, na África (PRUVOST et al., 2009) através de testes de patogenicidade, AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) utilizando-se os genes *atpD, dnaK* e *gyrB.* Ainda, análises morfológicas, testes bioquímicos, de patogenicidade e análises do gene 16S RNAr confirmaram a identidade de linhagens isoladas de abóbora no Nepal como pertencentes à espécie *X. cucurbitae* (LAMICHHANE et al., 2010).

No Brasil, esta espécie foi observada nos estados do Ceará, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (MARINGONI et al., 1988; MALAVOLTA JR. et al., 2008; VIANA et al., 2010).

Outro patógeno responsável por causar doença em melão, detectado pela primeira vez na região de Presidente Prudente (SP), foi descrito por Rodrigues Neto e colaboradores (1984) como *Xanthomonas campestris* pv. *melonis,* posteriormente reclassificado por Vauterin e colaboradores (1995) como *Xanthomonas melonis.* Essa espécie bacteriana também já foi relatada na Região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (VIANA et al., 2010).

A doença foi denominada barriga d'água e geralmente é detectada pós-colheita dos frutos, uma vez que externamente essa doença não exibe sintomas. *X. melonis* induz sintomas de escurecimento e decomposição da polpa dos frutos de melão (Figura 3), não afetando outras partes da planta e em condições experimentais, não induz sintomas em outras cucurbitáceas como abóbora, melancia, moranga e pepino (RODRIGUES NETO et al., 1984).

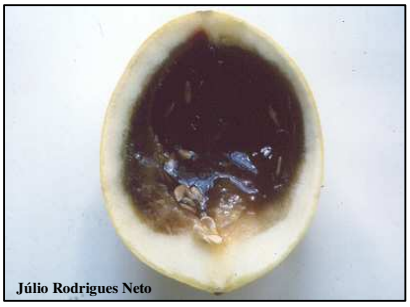


Figura 3. Doença causada por *X. melonis* em estágio avançado (Infecção natural).

Segundo Viana e colaboradores (2000), a recomendação de prevenção da doença seria por meio da utilização de sementes certificadas, obtidas de empresas idôneas e a moderação na utilização da água de irrigação, planejando-se adequadamente a aplicação do volume e da freqüência das irrigações. Ainda, as condições predisponentes para ocorrência dessa doença ainda não estão bem esclarecidas, entretanto, segundo os autores, temperaturas elevadas durante o período da colheita e no armazenamento parecem acelerar o seu desenvolvimento. Também, umidade excessiva, seja por chuvas pesadas ou devido à irrigação abundante, próximo ao período da colheita pode influenciar na disseminação e na posterior infecção de frutos sadios no campo (VIANA et al., 2001).

2. Análises de Multilocus (MLSA)

Uma abordagem alternativa para análises de relação filogenética entre um grupo de linhagens é comparar sequências selecionadas de DNA. A tecnologia principal para a realização deste método, o sequenciamento de DNA, é relativamente rápida, altamente reprodutível e prontamente disponível para qualquer grupo de pesquisa através de centros especializados em seqüenciamento. Além disso, bases de dados de sequências de DNA e programas de computador para análise de sequências também estão facilmente disponíveis. Por estas razões, as análises de sequências de DNA têm assumido um papel cada vez mais importante em recentes estudos taxonômicos (ZEIGLER et al., 2003).

Os genes *housekeeping* (genes constitutivos estruturais ou de regulação celular) estão amplamente distribuídos dentre os genomas bacterianos, geralmente se apresentam em cópia única e têm sido propostos como marcadores filogenéticos

eficientes para identificação e classificação de bactérias (PALYS et al., 1997, 2000; ZEIGLER et al., 2003). O uso de vários destes genes na taxonomia bacteriana tem se mostrado o método mais adequado para análises em nível de gênero e espécie, uma vez que integram as informações de diferentes relógios moleculares em todo cromossomo bacteriano (LERAT et al., 2003; PALYS et al., 1997; STACKEBRANDT et al., 2002; VENTURA et al., 2004; ZEIGLER, 2003).

Nas análises de multilocus (MLSA - *Multilocus Sequence Analysis*) as sequências dos genes *housekeeping* são utilizadas em análises filogenéticas e na construção de matrizes de similaridade, sendo bastante eficientes na separação de espécies (CHRISTENSEN et al. 2007). Esta técnica foi proposta por Maiden e colaboradores (1998) como uma ferramenta molecular alternativa em estudos de sistemática microbiana e consiste no sequenciamento e análise de 5 a 7 genes conservados, geralmente *housekeeping,* espaçados ao longo do genoma bacteriano com pelo menos 100 kilobases (Kb) de distância. Estudos de MLSA têm sido realizados para diferenciação, classificação e identificação de diversos microrganismos. Thompson e colaboradores (2005) efetuaram um estudo com microrganismos do gênero *Vibrio,* encontrados em habitats aquáticos e em associação com eucariotos, utilizando sequências dos genes *rpoA* (subunidade alfa da RNA polimerase)*, recA* (recombinase A)*, pyrH* (uridilato quinase) e 16S RNAr em análises isoladas e MLSA, e verificaram que a análise das sequências dos genes *housekeeping* foram mais discriminatórias do que o observado para o gene 16S RNAr, permitindo a clara diferenciação das famílias *Vibrionaceae, Photobacteriaceae, Enterovibrionaceae* e *Salinivibrionaceae.*

Ainda, análises de multilocus de microrganismos do gênero *Stenotrophomonas,* encontrados no ambiente como organismos de vida livre, em associação com plantas e como patógenos oportunistas, forneceram informações suficientes para a classificação adequada das espécies do gênero e também propiciaram a criação de um banco de dados com base nas sequências concatenadas dos genes *recA*, *rpoA*, *uvrB* (subunidade beta da nuclease de excisão), *atpA* (subunidade alfa da ATP sintase) e 16S RNAr (RAMOS et al., 2011).

Os dados obtidos em análises de MLSA do gênero *Mycobacterium* a partir dos genes *argH* (argininosuccinato liase), *cya* (adenilato ciclase), *glpK* (glicerol quinase), *gnd* (fosfoglutonato desidrogenase), *murC* (UDP-N-acetilmuramato-L-alanina ligase), *pgm* (fosfoglucomutase), *pta* (fosfotransacetilase), e *purH* (proteína bifuncional da biossíntese de purina) permitiram a diferenciação das espécies estreitamente

relacionadas *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium bolletii*, e *Mycobacterium massiliense,* contribuindo com estudos taxonômicos deste gênero de importância clínica associado a uma ampla gama de doenças em humanos (MACHERAS et al., 2011).

Estudos de MLSA também têm sido efetuados com bactérias fitopatogênicas incluindo o gênero *Xanthomonas*. Young e colaboradores (2008) utilizaram sequências concatenadas dos genes *dnaK* (chaperonina), *fyuA* (receptor tonB-dependente), *gyrB* (subunidade beta da DNA girase) e *rpoD* (subunidade sigma da RNA polimerase) das espécies Tipo do gênero *Xanthomonas* e obtiveram topologia similar a obtida na árvore filogenética construída a partir de sequências do gene 16S RNAr. As análises de MLSA diferenciaram claramente a maioria das espécies incluídas no estudo, indicando que esta técnica mostrou-se uma ferramenta eficiente para investigações adicionais da classificação das espécies do gênero *Xanthomonas,* para a confirmação de espécies já determinadas e identificação de linhagens como novas espécies. Baseado nestes resultados foi efetuado um estudo posterior que sugeriu a reclassificação de fitopatógenos patogênicos a uma ampla gama de hospedeiros nativos e introduzidos na Nova Zelândia, em sua maioria, plantas ornamentais. Com base em análises de MLSA os autores observaram que as linhagens classificadas como *Pseudomonas syingae* pv. *dysoxyli*, *Xanthomonas* sp., *X. campestris* pv. *laureliae* e *X. campestris* pv. *eucalypti* constituíram um agrupamento separado das outras espécies Tipo do gênero na árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *dnaK, fyuA, gyrB* e *rpoD*, propondo a reclassificação destas linhagens como pertencentes a uma nova espécie denominada *Xanthomonas dyei* (YOUNG et al., 2010).

Espécies do gênero *Streptomyces,* que constitui outro grupo de fitopatógenos, também foram avaliados pela técnica de MLSA utilizando-se sequências dos genes *atpD* (cadeia beta da ATP sintase), *recA*, *rpoB*, *trpB* (subunidade beta da triptofano sintase) e *gyrB.* Neste estudo foi possível a clara diferenciação das espécies tipo do gênero e identificação de linhagens causadoras da sarna da batata no Brasil, confirmando a eficiência desta técnica para este gênero (CORRÊA, 2011; LABEDA, 2011).

Ainda na área da fitopatologia Frapolli e colaboradores (2007) efetuaram análises de MLSA para investigação das relações genéticas e evolucionárias de linhagens de *Pseudomonas* fluorescentes responsáveis pelo biocontrole de fitopatógenos presentes no solo. Neste estudo as análises individuais e combinadas das sequências dos genes *rrs* (síntese de proteínas), *dsbA* (pontes dissulfeto), *gyrB, rpoD, fdxA*

(ferredoxina), *recA, rpoB, fusA* (fator gama de elongação na síntese protéica), *rpsL* (proteína ribossomal) e *rpsG* (proteína ribossomal) permitiram a diferenciação destas linhagens, contribuindo com estudos filogenéticos deste grupo de microrganismos.

3. Gene *rpoB*

A RNA polimerase é uma enzima fundamental no processo de transcrição e nas vias regulatórias, controlando a expressão gênica em todos os organismos vivos (BORUKOV; NUDLER, 2003). Esta enzima, em bactérias, é responsável pela síntese de RNAm, RNAr e RNAt e é formada por cinco subunidades incluindo a subunidade beta que está relacionada com a maioria de suas funções catalíticas e é codificada pelo gene *rpoB,* um gene *housekeeping* altamente conservado, embora com domínios de sequências variáveis, e de cópia única no genoma (JIN; GROSS, 1989). A importância da utilização deste gene tem sido relatada em análises filogenéticas e de identificação de bactérias, especialmente em estudos de linhagens estreitamente relacionadas (ADÉKAMBI et al., 2008).

Mollet e colaboradores (1997) realizaram estudos com linhagens da família Enterobacteriaceae comparando-se os genes 16S RNAr e *rpoB* e os resultados revelaram maiores níveis de divergência intra e inter-específico com as análises do gene *rpoB* comparado com o gene 16S RNAr.

Análises das sequências do gene *rpoB* (825 pb) de espécies do gênero *Bartonella,* relacionadas com doenças como a endocardite, permitiram a seleção de enzimas de restrição que através de experimentos de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism)* possibilitaram a identificação de 94 microrganismos isolados de amostras clínicas (RENESTO et al., 2001).

Também na área clínica, análises filogenéticas e experimentos de PCR-RFLP do gene *rpoB* (329 pb) permitiram a diferenciação de algumas espécies do gênero *Borrelia.* Além disso, análises das sequências revelaram diferenças que possibilitaram o desenho de *primers* para diferentes espécies deste gênero, indicando que o gene *rpoB* pode ser utilizado como um marcador molecular bastante eficiente para diferenciação e identificação destes patógenos bacterianos que, transmitidos por carrapatos, atingem as articulações e o sistema nervoso causando a doença de Lyme (LEE et al., 2000).

Kim e colaboradores (2001) efetuaram experimentos de PCR-RFLP do gene *rpoB* (342 pb) com espécies de *Mycobacterium* e obtiveram a diferenciação das

linhagens de crescimento rápido e lento utilizando-se a enzima *Hae* III. Também, os perfis gerados com a enzima *Hind* II diferenciaram o complexo *M. tuberculosis* e digestões simultâneas com *Mva* I e *Acc* II possibilitaram a diferenciação de 6 subspécies de *M. kansasii* e de espécies estreitamente relacionadas, indicando que este método é eficaz não só para a diferenciação mas também para a rápida detecção e identificação de micobactérias patogênicas de importância clínica (KIM et al., 2001).

A identificação de 105 linhagens de *Legionella* isoladas de amostras ambientais e clínicas da Coréia e Japão foi possível através da comparação das similaridades entre as sequências e análises filogenéticas do gene *rpoB* (KO et al., 2002). Também, a diferenciação, detecção e identificação de espécies de *Legionella* foi possível utilizando-se a técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB* (KO et al., 2003).

Adékambi e colaboradores (2006b) propuseram a descrição de *Mycobacterium conceptionense,* uma nova espécie do gênero *Mycobacterium* associadas a osteítes pós-traumáticas baseado também em análises filogenéticas do gene *rpoB,* um critério de validação já utilizado para a descrição de novas espécies deste gênero (ADÉKAMBI et al., 2003; ADÉKAMBI et al., 2004; ADÉKAMBI et al., 2006a).

O gene *rpoB* também foi utilizado com sucesso na diferenciação de espécies do gênero *Acinetobacter* e na identificação de isolados de importância clínica pertencentes a este gênero através de análises filogenéticas (GUNDI et al., 2009).

Em outro estudo baseado em sequências dos genes *rpoB* e 16S RNAr foi obtida a diferenciação da maioria das espécies do gênero *Aeromonas,* responsáveis por causar doenças em animais aquáticos e homeotérmicos, incluindo humanos. Ainda, foi possível a identificação de isolados em nível infra-específico, indicando que o gene *rpoB* pode representar um marcador molecular eficiente para a rápida identificação de isolados de amostras clínicas e ambientais (LAMY et al., 2010).

O gene *rpoB* também têm sido usado em estudos de diversidade de amostras ambientais como uma alternativa ao gene 16S RNAr, uma vez que a heterogeneidade entre as múltiplas cópias deste último gene em muitas espécies pode levar a uma interpretação errônea dos resultados. Os efeitos desta heterogeneidade entre as cópias do gene 16S RNAr nas análises de comunidades microbianas foram avaliados em um estudo com isolados bacterianos de algas vermelhas *Delisea pulchra* e da superfície de rochas marinhas realizados por Dahllöf e colaboradores (2000). Comparando-se análises de PCR-DGGE (*Denaturing Gradiente Gel Electrophoresis*) dos genes 16S RNAr e *rpoB* foi observada uma superestimação do número de espécies de laboratório em

amostras ambientais nos experimentos com o gene 16S RNAr enquanto que com o gene *rpoB* obteve-se os resultados esperados, indicando que este gene pode fornecer dados mais confiáveis e pode permitir uma melhor compreensão da diversidade em comunidades microbianas (DAHLLÖF et al., 2000).

Ainda na área ambiental, análises microbianas do solo do Cerrado utilizando-se também a técnica de PCR-DGGE dos genes 16S RNAr e *rpoB,* revelaram melhores resultados com este último gene do que com o gene 16S RNAr devido a sua presença em cópia única no genoma bacteriano, confirmando que o gene *rpoB* pode ser utilizado com eficiência em estudos de diversidade microbiana do solo (PEIXOTO et al., 2002).

Da Mota e colaboradores (2004) efetuaram um estudo do gênero *Paenibacillus* utilizando-se sequências do gene 16S RNAr e *rpoB* e obtiveram uma maior discriminação entre as espécies Tipo com o gene *rpoB*. Também, a análise das sequências deste gene permitiu a identificação de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio isolados da rizosfera de diversos cultivares de milho.

Estudos filogenéticos do gênero *Vibrio* efetuados por Ki e colaboradores (2009) baseados em sequências do gene *rpoB,* permitiram uma maior diferenciação de espécies em comparação com os resultados obtidos com o gene 16S RNAr. Ainda, a partir de sequências do gene *rpoB,* foram desenhados *primers* específicos para o gênero *Vibrio* que possibilitaram detecção deste grupo de microrganismos em amostras de águas costeiras, indicando que este gene foi eficiente na diferenciação de espécies e na detecção de vibrios em amostras ambientais.

Bernèche-D'Amours e colaboradores (2011) efetuaram um estudo com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Frankia* através de análises filogenéticas do gene *rpoB* que revelaram a separação de linhagens estreitamente relacionadas e agrupamentos de acordo com a compatibilidade com a planta hospedeira. Os resultados indicaram que o gene *rpoB* pode ser utilizado como marcador molecular eficiente para a avaliação de relações filogenéticas entre as espécies do gênero e para futuros estudos ecológicos do processo de simbiose.

Na área da fitopatologia, o gene *rpoB* também tem sido utilizado como um marcador molecular bastante eficiente em estudos de diversos organismos. A diferenciação de espécies de *Streptomyces* spp.e de linhagens isoladas da sarna da batata provenientes da Coréia foi obtida utilizando-se sequências do gene *rpoB* (MUN et al., 2007).

Estudos filogenéticos de linhagens dos gêneros *Burkholderia, Ralstonia, Comamonas* e *Brevundimonas* empregando-se os genes *rpoB, gyrB* e *rrs* revelaram que todas as linhagens estreitamente relacionadas puderam ser claramente separadas nas análises efetuadas com as sequências do gene *rpoB,* indicando que este gene representa uma ferramenta eficaz para a identificação de espécies dos gêneros estudados (TAYEB et al., 2008).

Kim e colaboradores (2003) analisaram cinco gêneros de actinomicetos comparando-se as sequências do gene *rpoB* e obtiveram a clara diferenciação dos gêneros *Streptomyces, Micromonospora, Tsukamurella, Amycolaptosis* e *Nocardia*, que ficaram agrupados separadamente. Ainda, foi possível a identificação de actinomicetos isolados do solo como pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora*, indicando que o gene *rpoB* pode ser um marcador molecular eficiente para a diferenciação deste grupo de microrganismos em nível de gênero.

4. Gene *rpoA*

O gene *rpoA* codifica a subunidade alfa da RNA polimerase, subunidade mais caracterizada em *Escherichia coli* e responsável pela montagem da estrutura da RNA polimerase proporcionando suporte para a montagem das subunidades β e β' (ISHIHAMA, 1981). Esta enzima contém determinantes localizados na porção N-terminal responsáveis pela interação proteína-proteína (dimerização) (KIMURA; ISHIHAMA, 1995). A porção C-terminal está envolvida na interação com vários ativadores transcricionais, ligando a proteína a sequências específicas de DNA (RUSSO; SILHAVY; 1992; ROSS et al., 1993).

Estudos filogenéticos baseados apenas em sequências do gene *rpoA* têm sido realizados, porém há um maior número de relatos deste gene em análises combinadas com sequências de outros genes *housekeeping*.

Park e colaboradores (2010) utilizaram sequências do gene *rpoA* (445 pb) de espécies do gênero *Streptococcus* e obtiveram a clara diferenciação das espécies *S. pneumoniae*, *S. mitis* e *S. oralis* que ficaram alocadas em grupos separados na árvore filogenética, o que não foi possível com o gene 16S RNAr. As análises das sequências também revelaram maior diversidade genética em nível infraespecífico (92,3 – 99,3 % de similaridade) em comparação ao gene 16S RNAr (96,8 – 100% de similaridade),

indicando que o gene *rpoA* pode representar um marcador molecular eficiente para a identificação e classificação de espécies do gênero *Streptococcus.*

Naser e colaboradores (2005; 2007) utilizaram as sequências do gene *rpoA* e *pheS* em em estudos dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus.* No estudo do gênero *Enterococcus*, as espécies foram claramente diferenciadas nas análises do gene *rpoA* com valores de similaridade acima de 76%, enquanto que os valores de similaridade obtidos nas análises do gene 16S RNAr foram superiores a 97%, indicando que este gene pode ser utilizado como uma ferramenta confiável para identificação de espécies clínicas e ambientais do gênero *Enterococcus* além de ser um excelente método de detecção de novas espécies (NASER et al., 2005). Os mesmos autores efetuaram um estudo com linhagens do gênero *Lactobacillus* e observaram que as análises simultâneas das sequências dos genes *rpoA* e *pheS* forneceram um sistema de identificação confiável para quase todas as espécies do gênero. O estudo concluiu que as sequências destes genes podem ser utilizadas como um marcador molecular alternativo ao gene 16S RNAr por apresentar alto poder dicriminatório entre as espécies estreitamente relacionadas (NASER et al., 2007).

5. Gene *atpA*

O gene *atpA* é responsável por codificar a unidade alfa da ATP sintase bacteriana, enzima relacionada à síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons (MULLER; GRUBER, 2003). Em organismos com cadeia respiratória, a função primária desta enzima é acoplar a diferença de potencial eletroquímico em todo o interior da membrana com a síntese de ATP a partir de ADP e fosfafo. Em bactérias que não possuem cadeia respiratória, o papel da ATP sintase é criar um gradiente de próton, processo dirigido pela hidrólise de ATP (KASIMOGLU et al., 1996). O gene *atpA* é um gene *housekeeping* de ampla distribuição entre os organismos e é conservado entre bactérias. Estudos baseados em sequências do genoma total e em diferentes loci de vários grupos bacterianos sugerem que o gene *atpA* pode ser um marcador alternativo para análises filogenéticas e identificação (ZEIGLER, 2003).

Análises de sequências do gene *atpA* (1102 pb) revelaram a mesma relação filogenética em comparação com as sequências do gene 16S RNAr, porém foram muito mais discriminatórias para a diferenciação de espécies do gênero *Enterococcus.* Todas as espécies do gênero foram diferenciadas baseado nas sequências do gene *atpA* com no

máximo 92% de similaridade, indicando que este gene pode ser utilizado como uma ferramenta eficiente para identificação e análises filogenéticas de espécies de *Enterococcus* clinicamente importantes (NASER et al., 2005).

Thompson e colaboradores (2007) efetuaram estudos do gênero *Vibrio* com sequências do gene *atpA* (1322 pb) que também revelaram resultados similares aos obtidos nas análises filogenéticas do gene 16S RNAr, porém com o gene *atpA* foi observada uma maior diferenciação entre as espécies com similaridades acima de 80%. Os resultados mostraram claramente que a análise das sequências do gene *atpA* é uma alternativa eficiente para estudos filogenéticos e identificação de vibrios.

6. Gene *recA*

A recombinase A é uma proteína onipresente em eubactérias e está entre as mais conservadas entre organismos bacterianos. É uma proteína multifuncional que está relacionada com recombinação homóloga e mecanismo de reparo do DNA, atuando na ligação de trechos de fita simples, desenrolando a dupla hélice e encontrando regiões de homologia entre cromosomos na recombinação homóloga (KREUTZER et al., 1994). A recombinase A é codificada pelo gene *recA* que, devido à sua ampla distribuição entre os organismos e por ser um gene *housekeeping,* tem sido relatado como um marcador molecular potencial para desvendar relações filogenéticas entre níveis taxonômicos como famílias, classes e filos (EISEN, 1995; ZEIGLER, 2003).

Payne e colaboradores (2005) efetuaram um estudo com a gene *recA* do gênero *Burkholderia,* que englobou espécies de importância ecológica, biotecnológica e patogênica. A partir de análises filogenéticas deste gene foi possível a diferenciação de espécies do gênero, incluindo a discriminação do complexo *B. cepacia*, confirmando a eficiência deste gene como ferramenta molecular para identificação de espécies de *Burkholderia.*

Thompson e colaboradores (2004) efetuaram um estudo utilizando-se sequências do gene *recA* da família *Vibrionaceae* e os resultados revelaram similaridades de no máximo 84% entre os gêneros *Vibrio* e *Photobacterium,* e nas análises com linhagens da família *Vibrionaceae* foram observados valores de similaridade entre 83% e 99%, indicando que este gene apresentou poder discriminatório muito maior do que o observado com o gene 16S RNAr (similaridades superiores a 98%).

Com o objetivo de se avaliar o gene *recA* como uma ferramenta para identificação de linhagens do gênero *Streptococcus*, Zbinden e colaboradores (2011) efetuaram análises das sequências deste gene (313 pb) que permitiram a diferenciação de membros do grupo *S. mitis.* Neste mesmo estudo foram identificados seis nucleotídeos específicos para a espécie *S. pneumoniae* e os autores concluíram que a análise das sequências do gene *recA* pode ser implementada como uma técnica em diagnósticos de rotina em laboratórios.

7. Região espaçadora 16S-23S DNAr

Os genes do operon ribossômico (DNAr) codificam os RNAs ribossomais 16S, 23S e 5S que constituem o ribossomo, uma organela de função essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos (WOESE, 1987; GÜRTLER; STANISICH, 1996). O operon DNAr contém, geralmente, o gene 16S, uma região espaçadora, o gene 23S, uma segunda região espaçadora e o gene 5S, no sentido 5' para 3'. (GÜRTLER; STANISICH, 1996).

Análises da região espaçadora 16S-23S DNAr têm sido efetuadas para diferenciação de espécies bacterianas de diversos grupos taxonômicos. Estudos da região espaçadora 16S-23S DNAr permitiram a diferenciação de linhagens de *Staphylococcus aureus* através da técnica de PCR, revelando polimorfismo nesta região para estes microrganismos (DUBEY et al., 2009).

Mora e colaboradores (2003) efetuaram um estudo com as espécies do gênero *Streptococcus* baseado em sequências da região espaçadora 16-23S DNAr e obtiveram a clara diferenciação de todas as espécies.

Em estudo realizado por Magray e colaboradores (2011) foram analisadas sequências do gene 16S RNAr e região espaçadora 16S-23S RNAr que permitiram a identificação de um isolado bacteriano de amostras de água como pertencente a espécie *Escherichia coli,* o que é de grande importância uma vez que este patógeno caracteriza contaminação fecal.

Ainda, análises comparativas de sequências do gene 16S RNAr e região espaçadora 16S-23S RNAr também foram efetuadas para confirmação da identidade de linhagens probióticas do gênero *Lactobacillus* previamente identificadas por testes bioquímicos. Os resultados mostraram que algumas espécies foram erroneamente identificadas pelos testes bioquímicos e foram reclassificadas através das análises das

sequências do gene 16S RNAr e região espaçadora 16S-23S RNAr, indicando que estes marcadores moleculares podem ser utilizados para uma rápida e confiável identificação destes microrganismos (CHIN et al, 2011).

Na área da fitopatologia estudos filogenéticos também têm sido realizados baseados em sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr incluindo microrganismos de grande importância econômica. Através da técnica de PCR-RFLP desta região, foi possível a diferenciação em nível infra-específico de *Pseudomonas syringae,* indicando grande variabilidade destas sequências neste grupo de fitopatógenos (MANCEAU; HORVAIS, 1997).

Ainda, Kong e colaboradores (2005) realizaram estudos filogenéticos com linhagens pertencentes aos patovares de *P. savastanoi* e *P. syringae* utilizando-se sequências da região espaçadora 16S-23S RNAr. Neste mesmo estudo os resultados das análises das sequências permitiram a identificação de nucleotídeos específicos que possibilitaram a diferenciação de *P. syringae* pv. *tagetis* e *P. syringae* pv. *helianthi* dos outros patovares analisados e também foi observada uma baixa diversidade genética entre linhagens de *P. syringae* pv. *tagetis.*

A região espaçadora 16S-23S RNAr também tem sido utilizada em diversos estudos do gênero *Xanthomonas.* Honeycutt e colaboradores (1995) desenvolveram um par de *primers* que detectou variações no tamanho das sequências desta região em algumas espécies do gênero *Xanthomonas* incluindo *X. albilineans,* indicando que este marcador molecular pode ser utilizado para o diagnóstico destas espécies.

Em outro estudo baseado na região espaçadora 16S-23S RNAr, Maes e colaboradores (1996) desenvolveram um par de *primers* que mostrou-se específico para os patovares da espécie *Xanthomonas campestris* que causam doenças em brássicas, podendo ser utilizado para a detecção destes fitopatógenos em sementes e assim, auxiliar no controle da doença.

Análises filogenéticas das sequências desta região com espécies do gênero *Xanthomonas*, revelaram topologia similar a obtida com as sequências do 16S DNAr, além de apresentar maior diversidade genética (16,2 %) quando comparado ao gene 16S RNAr (1,8 %), (GONÇALVES; ROSATO, 2002).

Destéfano e Rodrigues Neto (2002) efetuaram um estudo com as linhagens de *Xanthomonas* patogênicas aos citros utilizando-se a técnica de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S RNAr e obtiveram a clara diferenciação da espécie *X. citri* (sin. *X. axonopodis* pv. *citri*), agente causal do cancro cítrico, das espécies *X. fuscans* subsp.

aurantifolii (sin. *X. axonopodis* pv. *aurantifollii*) e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (sin. *X. axonopodis* pv. *citrumelo*). Os resultados obtidos foram de grande importância uma vez que as espécies *X. citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* causam sintomas bastante semelhantes e a correta identificação destes patógenos é fundamental para que sejam executadas medidas de controle adequadas.

Outro estudo utilizando-se a técnica de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S RNAr foi realizado por Destéfano e colaboradores (2003) tendo como objetivo a diferenciação das espécies do gênero *Xanthomonas* patogênicas a cana de açúcar. Os autores obtiveram a diferenciação das espécies *X. axonopodis* pv. *vasculorum* (sin. *X. campestris* pv. *vasculorum* Tipo A), *X. vasicola* pv. *vasculorum* (sin. *X. campestris* pv. *vasculorum* Tipo B), *X. albilineans* e *X. sacchari* e também a classificação de linhagens das espécies *X. campestris* pv. indeterminado e *Xanthomonas* sp. como pertencentes às espécies *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e *Xanthomonas sacchari* respectivamente. Estes resultados confirmaram que a técnica de PCR-RFLP da região 16S-23S RNAr pode ser utilizada como um método simples, rápido e confiável para o diagnóstico de linhagens do gênero *Xanthomonas* associadas a doenças de cana de açúcar.

Os resultados obtidos nestes estudos do gênero *Xanthomonas* contribuíram para que esta região fosse incluída nas análises de MLSA, pois embora não seja um gene *housekeeping*, geralmente utilizado nestas análises, apresenta uma variabilidade genética capaz de diferenciar as espécies deste gênero.

OBJETIVOS

.....

1. Objetivo Geral

Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas*

2. Objetivos específicos

- Diferenciação das espécies Tipo do gênero *Xanthomonas* por PCR-RFLP e análise filogenética do gene *rpoB*;
- Esclarecimento da posição taxonômica das linhagens de *X.* sp. pv. *viticola* (sin. *X.c.* pv. *viticola*), *X.* sp. pv. *betae* (sin. *X.c.* pv. *betae*), *X.* sp. pv. *paulliniae* (sin. *X.c.* pv. *paulliniae*), *X.* sp. pv. *arracaciae* (sin. *X.c.* pv. *arracaciae*), *X.* sp. pv. *esculenti* (sin. *X.c.* pv. *esculenti*) e *X.* sp. pv. *eucalypti* (sin. *X.c.* pv. *eucalypti*) por meio da técnica de MLSA e hibridização DNA-DNA;
- Diferenciação dos patovares da espécie *Xanthomonas campestris*;
- Desenvolvimento de *primers* para as espécies *Xanthomonas campestris, Xanthomonas translucens, Xanthomonas cucurbitae* e *Xanthomonas melonis*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens

As linhagens de *Xanthomonas* utilizadas neste estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, SP, e estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de *Xanthomonas* utilizadas neste estudo.

Linhagem	**IBSBF**	**Outras coleções**	**Hospedeiro**	**Procedência**
Acidovorax avenae subsp. *citrulli*	1851^{T}	LMG 5376^{T}	*Citrullus lanatus*	EUA
Bacillus licheniformis	955		*Cucumis melo*	Brasil
Pantoea agglomerans	1417^{T}	LMG 2565^{T}	cereais	Canadá
Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum*	863^{T}	LMG 2404^{T}	*Solanum tuberosum*	Dinamarca
Pectobacterium atrosepticum	1819^{T}	LMG 2386^{T}	*Solanum tuberosum*	Reino Unido
Pseudomonas cichorii	1784^{T}	LMG 2162^{T}	*Cichorium endivia*	Alemanha
Pseudomonas fuscovaginae	975^{T}	LMG 2158^{T}	*Oryza sativa*	Japão
Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*	1258^{P}	LMG 5070^{P}	*Cucumis sativus*	EUA
Pseudomonas syringae pv. *maculicola*	1121^{P}	LMG 5071^{P}	*Brassica oleracea* var. *botrytis*	Nova Zelândia
Pseudomonas syringae pv. *syringae*	281^{T}	ICMP 3023^{T}	*Syringa vulgaris*	Reino Unido
X. albilineans	1374^{T}	ICMP 196^{T}	*Saccharum officinarum*	Ilhas Fiji
X. arboricola pv. *juglandis*	1375^{T}	ICMP 35^{T}	*Juglans regia*	Nova Zelândia
X. axonopodis pv. *axonopodis*	1444^{T}	LMG 538^{T}	*Axonopus scoparicus*	Colômbia
X. axonopodis pv. *mangiferaindicae*	873	NCPPB 3110	*Mangifera indica*	Brasil
	1230		*Mangifera indica*	Brasil
X. axonopodis pv. *vitians*	1709^{P}	ICMP 336^{P}	*Lactuca* sp.	EUA
X. bromi	1567^{T}	LMG 947^{T}	*Bromus carinatus*	França
X. campestris pv. *campestris*	1163^{T}	ICMP 13^{T}	*Brassica oleracea* var. *gemmifera*	Inglaterra
X. campestris pv. *aberrans*	885^{P}	ICMP 4805^{P}	*Brassica oleracea*	Austrália
X. campestris pv. *armoraciae*	1102^{P}	ICMP 7^{P}	*Iberis* sp.	Tanzânia
X. campestris pv. *barbariae*	773^{P}	LMG 547^{P}	*Barbarea vulgaris*	EUA

X. campestris pv. *raphani*	884[P]	ICMP 1404[P]	*Raphanus sativus*	EUA
X. cassavae	270[T]	LMG 673[T]	*Manihot esculenta*	Malawi
X. citri subsp. *citri* (sin. *X. axonopodis* pv. *citri*)	1412[P]	ICMP 24[P]	*Citrus limon*	Nova Zelândia
X. codiae	1389[T]	LMG 8678[T]	*Codiaeum variegatum* var. *pictum*	EUA
X. cucurbitae	268[T]	LMG 690[T]	*Cucurbita maxima*	Nova Zelândia
X. fragariae	1371[T]	ICMP 5715[T]	*Fragaria hib.*	EUA
X. hortorum pv. *hederae*	1391[P]	LMG 733[P]	*Hedera helix*	EUA
X. hyacinthi	1390[T]	LMG 739[T]	*Hyacinthus orientalis*	Holanda
X. melonis	68[T]	LMG 8670[T]	*Cucumis melo*	Brasil
X. oryzae pv. *oryzae*	1732[T]	ICMP 3125[T]	*Oryza sativa*	Índia
X. pisi	1356[T]	LMG 847[T]	*Pisum sativum*	Japão
X. sacchari	1313[T]	LMG 471[T]	*Saccharum officinarum*	Guadeloupe
X. sp. pv. *arracaciae*	358[P]	NCPPB 2436[P]	*Arracacia xanthorrhiza*	Brasil
X. sp. pv. *betae*	857[P]	ICMP 8917[P]	*Beta vulgaris*	Brasil
X. sp. pv. *esculenti*	849[P]	ICMP 5729[P]	*Abelmoschus esculentus*	Brasil
X. sp. pv. *eucalypti*	1738[P]	ICMP 5382[P]	*Eucalyptus maculata* var. *citriodora*	Austrália
X. sp. pv. *paulliniae*	828[P]	ICMP 8919[P]	*Paullinia cupana* var. *sorbilis*	Brasil
X. sp. pv. *viticola*	1967[P]	ICMP 3867[P]	*Vitis* sp.	Índia
	1370		*Vitis vinifera*	Brasil
	1926		*Vitis vinifera*	Brasil
X. sp. pv. *vitiscarnosae*	2036[P]	ICMP 90[P]	*Vitis carnosa*	Índia
X. sp. pv. *vitistrifoliae*	1968[P]	ICMP 5761[P]	*Vitis trifolia*	Índia
X. theicola	1565[T]	LMG 8684[T]	*Camellia sinensis*	Japão
X. translucens pv. *arrhenatheri*	1344[P]	ICMP 7727[P]	*Arrhenatherum elatius*	Suíça
X. translucens pv. *cerealis*	580[P]	ICMP 1409[P]	*Bromus inermis*	EUA
X. translucens pv. *graminis*	688[P]	ICMP 5733[P]	*Dactylis glomerata*	Suíça
X. translucens pv. *hordei*	686[P]	ICMP 5735[P]	*Hordeum vulgare*	Índia
X. translucens pv. *phlei*	1340[P]	ICMP 7725[P]	*Phleum pratense*	Noruega
X. translucens pv. *phleipratensis*	692[P]	ICMP 5744[P]	*Phleum pratense*	EUA

X. translucens pv. *poae*	1339[P]	ICMP 7726[P]	*Poa trivialis*	Suíça
X. translucens pv. *secalis*	827[P]	ICMP 5749[P]	*Secale cereale*	Canadá
X. translucens pv. *translucens*	581[T]	ICMP 5752[T]	*Hordeum vulgare*	EUA
X. translucens pv. *undulosa*	579[P]	ICMP 5755[P]	*Triticum turgidum*	Canadá
X. vasicola pv. *holcicola*	865[P]	LMG 736[P]	*Sorghum bicolor*	Nova Zelândia
X. vesicatoria	1338[T]	LMG 911[T]	*Lycopersicon esculentum*	Nova Zelândia

[T] = linhagem tipo; [P] = linhagem referência do patovar; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil); LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Belgium); ICMP (International Collection of Micro-organisms from Plants, New Zealand); NCPPB (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom).

2. Reativação de culturas e condições de cultivo

As linhagens de *Xanthomonas* preservadas por liofilização foram reativadas de acordo com as instruções do Curador da Coleção IBSBF e cultivadas em meio NA (Extrato de carne 3,0 g; Peptona 5,0 g; Cloreto de Sódio 5,0 g e Ágar 15 g, q.s.p. 1000 mL), exceto as linhagens pertencentes às espécies *X. albilineans* e *X. fragariae* que foram cultivadas em meio YSG (Extrato de Levedura 5,0 g; Glucose 5,0 g; Fosfato de Amônia Monobásico 0,5 g; Fosfato de Potássio Dibásico Anidro 0,2 g; Ágar 18 g, q.s.p. 1000 mL). As culturas foram incubadas a 28^{o}C por 48 horas.

3. Extração de DNA genômico

As culturas de *Xanthomonas* spp. foram submetidas à extração de DNA de acordo com a metodologia descrita por Pitcher e colaboradores (1989).

Cerca de 100 mg de biomassa de bactéria foram transferidas para 5 mL de meio líquido e incubadas a 28^{o}C por 12 a 16 horas, sob agitação constante de 150 rpm. A cultura líquida foi submetida à centrifugação, as células foram suspensas em 100 µL de solução de TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA) contendo 2 mg/mL de lisozima, homogeneizadas com a utilização de vortex e incubadas a 37 °C por uma hora. Após esse período foram adicionados 500 µL de solução de tiocianato de guanidina 5 M e a mistura foi agitada brevemente. Em seguida, adicionou-se 250 µL de acetato de amônio 7,5 M misturando-se por inversão e incubando-se as amostras no gelo por dez minutos.

Adicionou-se, posteriormente, 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e após agitação manual vigorosa, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 0,54 volume de isopropanol (cerca de 450 µL) a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos e o sedimento foi lavado três vezes com etanol 70%, aplicando-se pulsos curtos de centrifugação. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois suspendido em 200 µL de tampão TE pH 8,0. Adicionou-se 2 µL de RNAse (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C por uma hora. Posteriormente, adicionou-se 40 µL de LiCl 4 M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), cerca de 240 µL. Após centrifugação de 10 min a 12000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, cerca de 400 µL, e os sedimentos lavados duas vezes com etanol 70%. Após secar em temperatura ambiente o DNA foi suspendido em 20 a 50 µL de água milli-Q e estocado a 20 °C negativos.

A pureza e quantificação do DNA das amostras foram realizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação Alpha Innotech 2200.

4. Amplificação por PCR dos diferentes genes

Nesse estudo foram analisados diversos genes e utilizados diferentes pares de *primers* e suas sequências estão listadas na Tabela 2. Os experimentos de amplificação foram realizados preparando-se reações de 25 µL, contendo 200 ng de DNA cromossômico, 1X tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e 1X BSA (*Bovine Serum Albumine*) (10 mg/mL). As concentrações dos reagentes e os programas de amplificação foram padronizados para as linhagens de *Xanthomonas* através de experimentos de gradiente de temperatura e testes com variações nas quantidades dos reagentes utilizados nas reações (Tabela 3). As regiões amplificadas e os tamanhos dos fragmentos obtidos variaram de acordo com os pares de *primers* utilizados (Tabela 3).

Os *primers* correspondentes ao gene *rpoB* e os pares de *primers* específicos para as espécies *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* e *X. melonis* foram desenvolvidos neste estudo.

Para a análise de multilocus foram amplificadas partes dos genes *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *rpoA* (subunidade alfa da RNA polimerase), *atpA* (unidade alfa da ATP sintase), *recA* (recombinase A) e região espaçadora 16S-23S DNAr. Os *primers* correspondentes aos genes *rpoA, atpA* e *recA* foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fabiano Thompson da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os *primers* pHR e p322-anti, correspondentes à região espaçadora 16S-23S DNAr, estão descritos na literatura (MASSOL-DEYA et al., 1995; HONEYCUTT et al., 1995).

Os experimentos foram realizados em termociclador MyCycler, Bio-Rad. Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% a 2% de acordo com o tamanho do produto de amplificação. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

Tabela 2. Seqüências dos *primers* utilizados neste estudo.

Código	**Sequência do *primer* (5' → 3')***	**n^0. nucleot.**
xcamR	CGTTGCGGCGTCGATCT	17
atpA3F	CGCATCCTBGARGTKCCG	18
atpA7R	GCRCGCTCSAGCARRCG	17
pHR	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	20
p322anti	GGTTCTTTTCACCTTTCCCTC	21
recA5F	GGYGAGATGGGMGAYCAG	18
recA7R	TTKCCYTGSCCGATSCGCTC	20
rpoA1F	TCGAWGGBBTDCAGGAAGA	19
rpoA3R	GGCGGCCARTTVTCSAR	17
rpoB2F	TCAAGGAGCGTCTGTCGAT	19
rpoB3R	TCTGCCTCGTTGACCTTGA	19
trans1F	CACGATTCTAAGAGCCGC	18
trans2R	GCCGCGCTTGGCGTTC	16
mecF	TGGGAGAGCACCTGCTTTG	19
mecR	GCCACCAACGCGAACATA	18
axo1F	ACAGGCTCCACCATTTGA	18
axo2R	CCTCAACGACACGTTTAGATAG	22

B (C/G/T); **D** (A/G/T); **H** (A/C/T); **K** (G/T); **M** (A/C); **N** (G/A/C/T); **R** (A/G); **S** (C/G); **V** (A/C/G); **W** (A/T); **Y** (C/T)

Tabela 3. Pares de *primers*, regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos

Pares de *primers*	Região amplificada	pb	primers (µM)	dNTPs (mM)	Taq DNA pol (U/reação)	Programas de Amplificação
rpoB2F/rpoB3R	parte do gene *rpoB*	800	0,4	0,2	2,0	94 °C/2 min; 35X (94 °C/30 s, 63 °C/30 s, 72 °C/1 min); 72° C/5 min
rpoA1F/rpoA3R	parte do gene *rpoA*	700	0,5	0,2	3,0	94 °C/2 min; 35X (94 °C/30 s, 58 °C/30 s, 72 °C/1 min); 72 °C/5min
atpA3F/atpA7R	parte do gene *atpA*	600	0,5	0,2	4,0	94 °C/2 min; 35X (94 °C/30 s, 61 °C/30 s, 72 °C/1 min); 72 °C/5 min
recA5F/recA7R	parte do gene *recA*	400	0,5	0,2	2,0	94 °C/2 min; 35X (94 °C/30 s, 65 °C/30 s, 72 °C/1 min); 72 °C/5 min
pHR/p322anti	região espaçadora 16S-23S DNAr	1000	0,4	0,2	2,0	95 °C/2 min; 30X (94 °C/1 min, 60 °C/1 min, 72 °C/3 min); 72 °C/5 min
rpoB2F/xcamR	região do gene *rpoB* específica para *X. campestris*	700	0,4	0,2	2,0	94 °C/2 min; 35X (94 °C/30 s, 63 °C/30 s, 72 °C/1 min), 72 °C/5 min
trans1F/trans2R	região do gene *rpoB* específica para *X. translucens*	300	0,4	0,2	2,0	94 °C/5 min; 35X (94 °C/30 s, 65 °C/30 s, 72 °C/1 min), 72 °C/5 min
mecF/mecR	parte da região espaçadora 16S-23S DNAr específica para *X. cucurbitae* e *X. melonis*	300 (*X.cucurbitae*) 350 (*X. melonis*)	0,4	0,2	2,0	95 °C/2 min; 30X (94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/3 min), 72 °C/5 min
axo1F/axo2R	região específica para *X. axonopodis*	200	0,4	0,2	2,0	95 °C/2 min; 30X (94 °C/1 min, 67 °C/1 min, 72 °C/3 min); 72 °C/5 min

5. Análises de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *rpoB*

O gene *rpoB* foi avaliado como marcador molecular para a diferenciação das espécies Tipo do gênero *Xanthomonas* e posteriormente diferenciação dos patovares da espécie *X. campestris* (Tabela 1). Para as amplificações foi utilizado o par de *primers* rpoB2F/rpoB3R e os produtos de amplificação desse gene (800 pb) foram submetidos à digestões com as enzimas de restrição *Afa* I, *Alu* I, *Cfo* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hsp* 92 II, *Mbo* I e *Taq* I (Fermentas). Nas reações foram utilizados 5 µL do produto gerado pela amplificação, em reações de 15 µL contendo 5 U da enzima por reação. As condições de temperatura foram empregadas de acordo com as instruções do fabricante (Fermentas). A observação do perfil de restrição foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 4%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

6. Análise dos padrões de *fingerprinting*

Os perfis obtidos por PCR-RFLP do gene *rpoB* das espécies Tipo de *Xanthomonas* foram analisados através do sistema binário (bandas presentes, 1 ou ausentes, 0 para cada linhagem). Os fragmentos abaixo de 100 pb não foram considerados nas análises. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o programa de similaridade para dados qualitativos (SIMQUAL), com o coeficiente de Jaccard (S_J). Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o algorítmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) por meio do programa NTSYS-PC (Rohlf, 1992). As análises de agrupamento foram baseadas nos perfis de restrição gerados. Os perfis de restrição obtidos foram confirmados utilizando-se o programa insilico.ehu.es (Bikandi *et al*., 2004).

7. Sequenciamento

Os produtos de amplificação correspondentes às partes dos genes *rpoB, rpoA, atpA*, *recA* e região espaçadora 16S-23S DNAr das linhagens de *Xanthomonas* foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com

as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento. Após as purificações, os DNAs foram quantificados em gel de agarose 1%.

As reações para sequenciamento foram efetuadas utilizando-se o kit *Big Dye* (Applied Biosystems) e empregando-se os mesmos *primers* da amplificação por PCR (Tabela 2). As purificações das reações foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante do kit. As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no seqüenciador automático, marca Applied Biosystems-Hitachi, modelo ABI Prism 3700 DNA Analyzer. O sequenciamento foi efetuado no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP, em colaboração do Prof. Dr. Ricardo Harakava.

8. Análise de Multilocus (MLSA)

Nas análises de multilocus foram utilizadas seqüências dos genes *rpoB, rpoA, atpA*, *recA* e região espaçadora 16S-23S DNAr das linhagens de *Xanthomonas*, assim como a seqüência dos mesmos genes de *Stenotrophomonas malthophilia* K279a, utilizada como grupo externo, disponível na base de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) sob número de acesso NC_010943.1. As seqüências foram editadas e alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). Posteriormente foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para prover suporte aos ramos das árvores filogenéticas obtidas, estimando a sua consistência interna. A partir dos dados de alinhamento também foram construídas matrizes de similaridade das seqüências para as análises com o gene *rpoB* e para as análises de multilocus utilizando-se as sequências concatenadas dos genes *rpoB, rpoA* e região espaçadora 16S-23S DNAr. As matrizes foram construídas utilizando-se o parâmetro Kimura 2 de correção (KIMURA, 1980) por meio do programa MEGA 5.

9. Desenho e síntese de *primers* específicos

As sequências obtidas foram alinhadas e os *primers* específicos foram desenhados a partir de diferenças observadas na sequências do gene *rpoB* (*primers* específicos para *X. campestris* e *X. translucens*) e região espaçadora 16S-23S DNAr (*primers* para *X. cucurbitae* e *X. melonis*); e a síntese dos *primers* foi efetuada pela empresa Invitrogen. Posteriormente, a especificidade de cada conjunto de *primers* foi confirmada em experimentos utilizando-se DNAs de bactérias pertencentes a outros gêneros e patogênicas às mesmas plantas hospedeiras. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

10. Níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os *primers* desenvolvidos

O grau de sensibilidade da técnica de PCR empregando-se os *primers* desenhados foi determinado por meio de testes utilizando-se diluições seriadas do DNA genômico das linhagens de *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T), *X.t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^T), *X. cucurbitae* (IBSBF 268^T)/ *X. melonis* (IBSBF 68^T) nos experimentos de amplificação utilizando-se os pares de *primers* rpoB2F/xcamR, trans1F/trans2R e mecF/mecR, respectivamente. As quantidades de DNA variaram de 200 ng a 0,01 pg. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e fotografado em sistema digital Alpha Innotech 2200.

11. Hibridização DNA-DNA

Os experimentos de hibridização DNA-DNA foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves e colaboradores (2000).

11.1. Formato Slot-blotting

Os DNAs a serem transferidos para as membranas de nitrocelulose, cerca de 200 ng, foram fervidos em tampão TE (1M pH 8) por 10 minutos para desnaturação e passados imediatamente para o gelo. Posteriormente, adicionou-se 1 volume de SSC 20X (citrato de

sódio 0,3 M; NaCl 3 M) às amostras desnaturadas que permaneceram no gelo. A membrana de nitrocelulose foi lavada em SSC 10X e colocada no sistema de *Slot-blotting*. Um volume de 0,5 mL de SSC 10X foi aplicado em cada canaleta do *slot* para lavagem. Após a lavagem, 200 ng das amostras de DNA foram aplicadas e transferidas para a membrana por meio de bomba de vácuo. As canaletas 1A e 1B foram utilizadas como controle, contendo o DNA da linhagem utilizada como sonda. Depois de todo o volume das amostras ter passado pela membrana, foram adicionados 0,5 mL de tampão SSC 10X para lavagem das canaletas e ao final, a bomba ficou ligada por mais 5 minutos para secagem da mesma. A membrana foi retirada e colocada sobre papel de filtro umedecido com solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por 20 minutos. Posteriormente, a membrana foi transferida para papel de filtro umedecido com solução de neutralização (NaOH 20 mM; acetato de amônio 1 M) por 10 minutos, colocada sobre papel de filtro e queimada por 2 horas à 80 ºC em forno de hibridização. Foram preparadas três membranas para a hibridização DNA-DNA (repetições) e uma membrana para a hibridização utilizando-se como sonda o gene 16S RNAr.

11.2. Marcação não radioativa da sonda

Foi utilizado o Kit de marcação não radioativa DIG (DIG DNA Labeling and Detection Kit – Roche). O DNA a ser marcado (cerca de 500 ng) foi diluído para um volume total de 15 µL e desnaturado por aquecimento por 10 minutos em água fervente e posterior passagem para o gelo. Para o controle da reação de marcação utilizou-se 5 µL do DNA-controle (tubo 2) contido no kit. Às amostras no gelo a serem marcadas, adicionou-se 2 µL de hexanucleotídeos (tubo 5), 2 µL da mistura de dNTPs (tubo 6) e 1 µL da enzima Klenow (tubo 7). Incubou-se a 37 ºC por aproximadamente 18 horas. Adicionou-se então, 2 µL de EDTA 0,2 M, pH 8,0 para parar a reação. O DNA marcado foi precipitado adicionando-se 2,5 µL de cloreto de lítio (LiCl) 4 M e 75 µL de etanol absoluto gelado (20 ºC negativos); e mantido por 30 minutos a 70 ºC negativos. Posteriormente, centrifugou-se por 15 minutos e o sedimento foi lavado com 50 µL de etanol 70% gelado. O DNA marcado foi seco brevemente sob vácuo e dissolvido em 50 µL de tampão TE.

11.3. Hibridização

Foi adicionado aproximadamente 0,2 mL de solução de pré-hibridização (SSC 5X; N-laurilsarcosina 0,1%; SDS 0,02%; formamida 50%, agente bloqueador 2%) para cada cm^2 de membrana. A membrana foi embebida em solução SSC 6X até completa hidratação e transferida para uma garrafa de hibridização. Adicionou-se a solução de hibridização e incubou-se por 4 horas sob leve agitação a 68 ºC (pré-hibridização). Após este período, a sonda foi desnaturada em banho-maria fervente por 5 minutos, e transferida imediatamente para o gelo. Nova solução de hibridização foi adicionada às garrafas contendo as membranas a serem hibridizadas. Em seguida, adicionou-se a sonda e incubou-se durante a noite a 68 ºC, sob leve agitação. Após hibridização, as membranas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em SSC 2X e SDS 0,1% à temperatura ambiente, num volume suficiente para cobrí-las. Em seguida foram realizadas duas lavagens de 15 minutos em SSC 0,1X e SDS 0,1% a 68 ºC sob constante agitação.

11.4. Detecção

Depois das lavagens, as membranas foram incubadas por 5 minutos em tampão de ácido maleico (ácido maleico 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M). Em seguida foram incubadas por 30 minutos em 100 mL de solução bloqueadora 1%. O anticorpo conjugado anti-DIG-AP foi diluído para 75 Um/ml (1:10000) em solução bloqueadora e adicionado às membranas e incubado por 30 minutos, sob baixa rotação. Após este período, foram efetuadas duas lavagens de 15 minutos com 100 mL de tampão de ácido maleico. As membranas foram então equilibradas por 5 minutos em 50 mL de tampão de detecção (Tris-HCL 10 mM pH 9,5; NaCl 0,1 M; $MgCl_2$ 10 mM). O substrato quimioluminescente CSPD foi diluído (1:100) em 10 ml do tampão de detecção e adicionado às membranas. Após incubação de 5 minutos as membranas foram colocadas em sacos plásticos, seladas e expostas a filmes de raio-X por aproximadamente 10 minutos.

11.5. Análise dos resultados

Após a revelação, os filmes foram digitalizados (*scanner*) e a leitura dos sinais de hibridização foi realizada com a utilização do programa Kodak Digital Science 1D Image

Analysis Software (DC120). Nas análises, a membrana hibridizada com o gene 16S RNAr (similaridade deste gene é de aproximadamente 100% no gênero *Xanthomonas*) foi utilizada para a normalização das quantidades de DNA, uma vez que o cálculo das concentrações de DNAs a serem transferidos para as membranas foi baseado em comparação visual com o DNA do fago lambda. O sinal correspondente ao controle da sonda foi considerado como controle positivo da hibridização (100% de homologia). Por exemplo, se a leitura da banda para a linhagem utilizada como sonda (controle) foi 18,66 de intensidade, valor fornecido pelo programa de leitura, assumiu-se que ela continha 200 ng de DNA hibridizado, ou seja, 100% de hibridização DNA-DNA. Todas as outras leituras foram normalizadas com este controle, sendo que a porcentagem de homologia foi determinada por regra de três, a partir dos valores de intensidade gerados pelo programa. Para valores de homologia acima de 70% considera-se que as linhagens pertencem a mesma espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I. Artigo: Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP

Mariana Ferreira-Tonin[1], Júlio Rodrigues-Neto[1], Ricardo Harakava[2], Suzete Aparecida Lanza Destéfano[1,*]

[1]*Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Instituto Biológico, Campinas, SP, Brazil*

[2]*Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brazil*

* Corresponding author. tel/fax: + 55 19 3253-2112.

e-mail adress: suzete@biologico.sp.gov.br (S.A.L. Destéfano)

mailing adress: Instituto Biológico, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Rod. Heitor Penteado Km 3, CEP: 13092-543, Campinas, SP, Brazil

running title: Analysis of *rpoB* gene in *Xanthomonas*

Subject category: Evolution, Phylogeny and Biodiversity

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the *rpoB* sequences determined in this study are GU074401 - GU074403; HM469984 - HM470000; JF409701- JF409706.

Paper in press: **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) - impact: 1.930 (2010) – Accepted 03 October 2011. doi:10.1099/ijs.0.028977-0**

IJSEM International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP

Mariana Ferreira-Tonin, Júlio Rodrigues-Neto, Ricardo Harakava and Suzete Aparecida Lanza Destéfano[1]

Author Affiliations

[1] E-mail: suzete@biologico.sp.gov.br

Received 6 October 2010.
Accepted 3 October 2011.

Abstract

The *rpoB* gene was evaluated as an alternative molecular marker for the differentiation of *Xanthomonas* species and to better understand of the phylogenetic relationship within the genus. PCR-RFLP experiments using Hae III allowed differentiating *Xanthomonas* species, mainly those that affect the same plant host such as *X. albilineans* and *X. sacchari*, pathogenic to sugarcane; *X. cucurbitae* and *X. melonis*, which cause disease in melon; and *X. gardneri*, *X. vesicatoria* and *X. euvesicatoria*/*X. perforans*, pathogenic to tomato. Phylogenetic relationship within the genus *Xanthomonas* were also examined by comparing partial *rpoB* gene sequences (612 nucleotides) and the *Xanthomonas* species were separated in two main groups: Group I, well-supported by bootstrap values of 99%, comprised *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. alfalfae*, *X. citri*, *X. dyei*, *X.*

This Article

Published online ahead of print October 7, 2011, doi: 10.1099/ijs.0.028977-0
IJSEM October 2011 ijs.0.028977-0

» Abstract
Full Text (PDF)

Classifications
Evolution, Phylogeny and Biodiversity

Services
Email this article to a colleague
Alert me when this article is cited
Alert me if a correction is posted
Similar articles in this journal
Similar articles in PubMed
Download to citation manager
© Get Permissions

Citing Articles
Google Scholar
PubMed

This Month's Issue

February 2012, 62 (2)

Alert me to new issues of IJSEM

ABOUT IJSEM
EDITORIAL BOARD & STAFF
SUBMIT A MANUSCRIPT
INFORMATION FOR AUTHORS
INFORMATION FOR REVIEWERS
PERMISSIONS AND REPRINTS
SUBSCRIPTIONS
ADVERTISING
ALERTS & FEEDS
FEEDBACK

Abstract

The *rpoB* gene was evaluated as an alternative molecular marker for the differentiation of *Xanthomonas* species and to better understand of the phylogenetic relationship within the genus. PCR-RFLP experiments using *Hae* III allowed differentiating *Xanthomonas* species, mainly those that affect the same plant host such as *X. albilineans* and *X. sacchari*, pathogenic to sugarcane; *X. cucurbitae* and *X. melonis,* which cause disease in melon; and *X. gardneri, X. vesicatoria* and *X. euvesicatoria/X. perforans*, pathogenic to tomato. Phylogenetic relationship within the genus *Xanthomonas* were also examined by comparing partial *rpoB* gene sequences (612 nucleotides) and the *Xanthomonas* species were separated in two main groups: Group I, well-supported by bootstrap values of 99%, comprised *X. euvesicatoria, X. perforans, X. alfalfae, X. citri, X. dyei, X. axonopodis, X. oryzae, X. hortorum, X. bromi, X. vasicola, X. cynarae, X. gardneri, X. campestris, X. fragariae, X. arboricola, X. cassavae, X. cucurbitae, X. pisi, X. vesicatoria, X. codiaei* and *X. melonis.* Group II, well-supported by bootstrap values of 99%, comprised *X. albilineans, X. sacchari, X. theicola, X. translucens* and *X. hyacinthi.* The similarity values observed among the species with the *rpoB* gene sequences in this study ranged from 87.8% to 99.7%. Some species that showed 100 % of similarity values in the PCR-RFLP analysis were not grouped in the phylogenetic analysis, suggesting that the differences observed in the sequences analysis of *rpoB* gene are not in the restriction sites recognized by the restriction enzymes. The results of PCR-RFLP of *rpoB* gene indicate that this technique can be used for diagnosis and identification of some closely related species within the genus, representing a rapid and inexpensive tool that can be easily standardized between laboratories. Also, the results obtained in phylogenetic analysis suggest that the *rpoB* gene can be used as an alternative molecular marker for the genetic relatedness in *Xanthomonas* genus.

Introduction

The genus *Xanthomonas* comprises a great number of bacterial species with different physiological and pathological characteristics responsible for diseases in many economically important crops, including rice, beans, cassava, tomato, wheat, citrus, crucifers and many others. *Xanthomonas* species have been subjected to several taxonomic

studies using biochemical tests (Van Den Mooter & Swings, 1990), pathogenicity tests on host range (Berthier *et al.*, 1993), SDS-PAGE (Vauterin *et al.,* 1991) and analysis of fatty acids (Yang *et al.*, 1993). However, such techniques are time-consuming as they require days or weeks of manipulative procedures for their evaluation.

Molecular studies have also been performed, including DNA-DNA hybridization (DDH) (Vauterin *et al.,* 1992; Vauterin *et al.,* 1995), analysis of the sequences of 16S rDNA (Moore *et al.,* 1997), PCR-RFLP analysis of *rpfB* and *atpD* genes (Simões *et al.,* 2007), analyzis of the sequences of the intergenic spacer region 16S-23S rDNA (Gonçalves & Rosato, 2002), the *gyrB* gene (Parkinson *et al.,* 2009), comparison of the profiles of repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) (Rademaker *et al.,* 2005) and multilocus sequence analysis (MLSA) (Young *et al.,* 2008; Young *et al.,* 2010) and these techniques have shown significant results for the differentiation of species of *Xanthomonas*.

The *rpoB* gene has been used as another molecular marker for identification, differentiation and phylogenetic analysis of several species of bacteria. This gene is a highly conserved housekeeping gene with a single copy in the genome and encoding the beta subunit of RNA polymerase, responsible for the most catalytic functions of the enzyme (Jin & Gross, 1989). Since 1997, numerous studies have been developed using the *rpoB* gene, mainly in the clinical (Adékambi *et al.,* 2008) and environmental areas (Dahllöf *et al.,* 2000; da Mota *et al.,* 2005). Recently, studies of the *rpoB* gene in *Streptomyces* (Mun *et al.,* 2007), *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, and *Breviundimonas* (Tayeb *et al.,* 2008) revealed significant results in the identification of species of these genera, suggesting that this gene can be a powerful tool to study different microorganisms.

In this study, partial sequences of the *rpoB* gene from 26 species of *Xanthomonas* were determined to infer the phylogenetic relationship within the genus. Also, the usefulness of *rpoB* gene as a molecular marker for the differentiation of the *Xanthomonas* species was evaluated.

Materials and methods

Bacterial strains

The type and pathovar reference strains of *Xanthomonas* used in this work were obtained from the Phytobacteria Culture Collection of Instituto Biológico (IBSBF), São Paulo, Brazil (Table 1) and were grown in Nutrient Broth (0.3% ; Bacto Beef Extract; 0.5% Bacto Peptone; 0.5% NaCl) or Nutrient Agar (NA), except for the *X. albilineans*, which were cultivated in YSG (0.05% $NH_4H_2PO_4$; 0.05% K_2HPO_4; 0.02% $MgSO_4.7H_2O$; 0.5% Yeast Extract; 0.5% Glucose; 1.5% Agar) at 28 °C for 48 hours. For DNA preparation, the strains were grown in 5 mL of the appropriate medium for 28 °C/16-18 hours/150 rpm

Table 1. Strains used in this study and GenBank accession numbers of *rpoB* gene sequences

Strain	IBSBF	Other Collections	Host	Origin	Genbank accession n°
X. albilineans	1374T	ICMP 196T	*Saccharum officinarum*	Fiji Island	HM469984
X. arboricola pv. *juglandis*	1375P	ICMP 35P	*Juglans regia*	New Zealand	HM469985
X. alfalfae (syn. *X. axonopodis* pv. *alfalfae*)	2730P	ICMP 5718P	*Medicago sativa*	Sudan	JF409701
X. axonopodis pv. *axonopodis*	1444T	LMG 538T	*Axonopus scoparius*	Colombia	GU074403
X. bromi	1567T	LMG 947T	*Bromus carinatus*	France	HM469986
X. campestris pv. *campestris*	1163T	ICMP 13T	*Brassica oleracea* var.*gemmifera*	UK	GU074401
X. cassavae	270T	LMG 673T	*Manihot esculenta*	Malawi	HM469987
X. citri subsp. *citri* (syn. *X. axonopodis* pv. *citri*)	1412P	ICMP 24P	*Citrus limon*	New Zealand	GU074402
X. codiaei	1389T	LMG 8678T	*Codiaeum variegatum* var. *pictum*	USA	HM469988
X. cucurbitae	268T	LMG 690T	*Cucurbita maxima*	New Zealand	HM469989
X. cynarae	1532T	ICMP 16775T	*Cynara scolymus*	France	JF409702
X. dyei pv. *dysoxyli*	2935P	ICMP 545 P	*Dysoxylum spectabile*	New Zealand	JF409706
X. euvesicatoria	2363T	ICMP 109T	*Capsicum annuum*	USA	JF409703
X. fragariae	1371T	ICMP 5715T	*Fragaria hib.*	USA	HM469990
X. gardneri	2373T	ATCC 19865T	*Solanum lycopersicum*	Yugoslavia	JF409705
X. hortorum pv. *hederae*	1391P	LMG 733P	*Hedera helix*	USA	HM469991
X. hyacinthi	1390T	LMG 739T	*Hyacinthus orientalis*	Netherlands	HM469992
X. melonis	68T	LMG 8670T	*Cucumis melo*	Brazil	HM469993
X. oryzae pv. *oryzae*	1732P	ICMP 3125P	*Oryza sativa*	India	HM469994
X. pisi	1356T	LMG 847T	*Pisum sativum*	Japan	HM469995
X. perforans	2370T	ICMP 16690T	*Solanum lycopersicum*	Brazil	JF409704
X. sacchari	1313T	LMG 471T	*Saccharum officinarum*	Guadeloupe	HM469996
X. theicola	1565T	LMG 8684T	*Camellia sinensis*	Japan	HM469997
X. translucens pv. *translucens*	581P	ICMP 5752P	*Hordeum vulgare*	USA	HM469998
X. vasicola pv. *holcicola*	865P	LMG 736P	*Sorghum bicolor*	New Zealand	HM469999
X. vesicatoria	1338T	LMG 911T	*Solanum lycopersicum*	New Zealand	HM470000

[T] = Type strain [P] = Pathovar reference strain; IBSBF (Phytobacteria Culture Collection of Instituto Biológico, Brazil); ATCC (American Type Culture Collection, USA); ICMP (International Collection of Micro-organisms from Plants, New Zealand); LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Belgium).

DNA extraction and PCR conditions

The DNA extraction was performed according to Pitcher *et al.* (1989). The *primers* corresponding to *rpoB* gene, rpoB 2F [5' TCA AGG AGC GTC TGT CGA T 3'] and rpoB 3R [5' TCT GCC TCG TTG ACC TTG A 3'], were designed from xanthomonad alignments of *rpoB* sequences available from GenBank of *X. campestris* pv. *campestris* (accession number NC_010688.1)*, X. oryzae* pv. *oryzae* (accession number NC_006834.1) and *X. axonopodis* pv. *citri* (accession number NC_003919.1). The amplifications were performed using 200 ng of genomic DNA in 25 μL reaction solutions containing 2.0 u *Taq* polymerase (Invitrogen), 1 X *Taq* buffer, 200 μM dNTPs mixture, 1,5 mM $MgCl_2$ and 0.4 μM of each *primer*. The cycling conditions were: an initial denaturation step at 94 ^{o}C for 2 min; followed by 35 cycles of 94 ^{o}C for 30 sec, 63 °C for 30 sec and 72 ^{o}C for 1 min; and a final extension at 72 ^{o}C for 5 min in a termocycler (Geneamp PCR System 9700; Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Conn). The amplified region (795 pb) corresponded to positions 1508 to 2303 of a total with 4152 nucleotides (nt).

Restriction fragment analysis

The PCR products were restricted with either A*fa* I*, Alu* I*, Cfo* I, *Dde* I*, Hae* III*, Hinf* I, *Hpa* II, *Hsp92* II, *Mbo* I and *Taq* I under conditions specified by the manufacturer (Fermentas). The restriction fragments were separated by eletrophoresis in 4% agarose gels in 1 X TAE buffer (40 mM Tris-acetate/ 1 mM EDTA). The gels were stained with 0.1 μg mL^{-1} of ethidium bromide and then visualized and photographed under UV light using a digital system (Alpha Innotech 2200). The restriction patterns were confirmed using the software insilico.ehu.es (Bikandi *et al*., 2004). Dendrogram was constructed using fragments higher than 100 bp, scored for the presence or absence, using Jaccard (J) coefficient and UPGMA algorithm from the NTSYS-PC program (Rohlf, 1992).

***rpoB* gene sequencing**

For the *rpoB* gene analysis, the PCR products corresponding to part of *rpoB* gene were purified using the *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) under conditions specified by the manufacturer and the sequencing reactions were done with an ABI Prism Big Dye terminator cycle-sequencing kit (Applied Biosystems) using the

primers rpoB 2F/3R. The sequences were read with an ABI 377 automatic sequencer (Perkin Elmer).

Phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were aligned through Clustal W algorithm using the BioEdit program (Hall, 1999) and both ends of alignment were trimmed to 612 nt corresponding to positions 1609 to 2220 of *rpoB* gene (4152 nt) of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (GenBank accession number NC_006834.1, gene: *rpoB*, locus-tag: XOO3591) obtained from GenBank.. Topology of the phylogenetic tree constructed with nucleotide sequences was assessed by the neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) methods with 1000 bootstrap replications and similarity matrix was constructed using evolutionary distances obtained by the p-distance method. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (GenBank accession number NC_010943.1) was used as outgroup.

***rpoB* amino acid alignments**

The *rpoB* partial sequences (612 nt) were alignmed with *rpoB* gene sequences from *X. campestris* pv. *campestris* (accession number NC_010688.1), *X. oryzae* pv. *oryzae* (accession number NC_006834.1) and *X. axonopodis* pv. *citri* (accession number NC_003919.1) obtained from GenBank, translated to amino acids by using the BioEdit program (Hall, 1999) and the similarity matrix was constructed based in these sequences using evolutionary distances obtained by the p-distance method using MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Accession numbers

The *rpoB* sequences used in this study were deposited in GenBank databases and are listed in Table 1.

Results and Discussion

PCR-RFLP of the *rpoB* gene

The 795 bp fragment corresponding to part of *rpoB* gene was amplified from all 26 type strains of *Xanthomonas* analyzed by PCR using the *primers* rpoB2F/3R. Amplification products were digested with restriction enzymes *Afa* I*, Alu* I*, Cfo* I, *Dde* I*, Hae* III*, Hinf* I, *Hpa* II, *Hsp 92* II, *Mbo* I and *Taq* I. The most of enzymes used revealed no significant differences within the genus *Xanthomonas* with similar restriction profiles. *Hae* III digestion proved to be more efficient in the species differentiation as observed for *X. albilineans, X. axonopodis, X. bromi, X. codiaei, X. cucurbitae, X. fragariae, X. sacchari* and *X. theicola* (Fig. 2, lines 1, 4, 5, 9, 10, 13, 19 and 20). Some species showed the same profile and were separated in groups: *X. alfalfae, X. citri, X. dyei* and *X. vasicola* (Fig. 1, lines 2, 8, 12 and 22)*; X. arboricola, X. cynarae* and *X. gardneri* (Fig. 1, lines 3, 11 and 24); *X. campestris* and *X. oryzae* (Fig. 1, lines 6 and 17); *X. cassavae* and *X. melonis* (Fig. 1, lines 7 and 16); *X. hortorum* and *X. pisi* (Fig. 1, lines 14 and 18); *X. hyacinthi* and *X. translucens* (Fig. 1, lines 15 and 21); *X. euvesicatoria* and *X. perforans* (Fig. 1, lines 25 and 26). In addition, the digestions with *Cfo* I or *Hpa* II also revealed differences between species (data not shown), and the restriction profiles generated by *Hae* III, *Hpa* II and *Cfo* I were used to construct a similarity dendrogram. The strains were separated in two clusters: Cluster I, was formed by *X. albilineans* and *X. melonis* which showed similarity of 27 % between them and 19.4 % with the other species. Cluster II was divided in two subgroups: subgroup I composed by species *X. alfalfae, X. dyei, X. citri, X. vasicola, X. euvesicatoria, X. perforans, X. bromi, X. oryzae, X. axonopodis* and *X. campestris;* and subgroup II comprising *X. arboricola, X. cynarae, X. gardneri, X. hortorum, X. codiaei, X. pisi, X. fragariae, X. cucurbitae, X. vesicatoria, X. cassavae, X. hyacinthi, X. translucens, X. sacchari* and *X. theicola.* Some species presented similarity values of 100 % such as *X. alfalfae* and *X. dyei; X. euvesicatoria* and *X. perforans*; *X. arboricola, X. cynarae* and *X. gardneri* (Fig. 2).

The PCR-RFLP technique was also used by Simões *et al.* (2007) using the *rpfB* and *atpD* genes in order to investigate the variability of different species of *Xanthomonas* and the results indicated that these genes could be powerful to differentiate the bacterial species

within the genus. In our study, species that affect the same plant host were clearly differentiated such as *X. albilineans* and *X. sacchari*, pathogenic to sugarcane; *X. cucurbitae* and *X. melonis,* which cause disease in melon; and *X. gardneri, X. vesicatoria* and *X. euvesicatoria/X. perforans* that affect tomato. Therefore, the technique of PCR-RFLP of *rpoB* gene can be used as an efficient, rapid and inexpensive tool in diagnostic tests for identification and differentiation of *Xanthomonas* species, mainly in import and export process of plant material or seeds lots, and it can be easily standardized between laboratories.

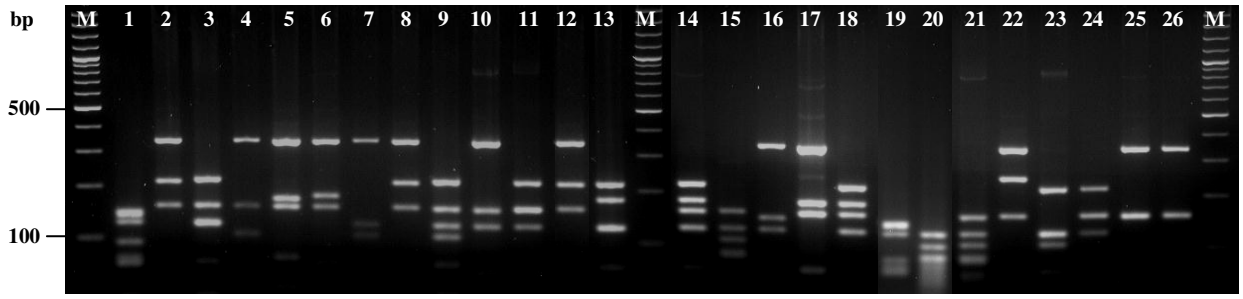


Fig. 1: PCR-RFLP profiles of the *rpoB* gene of the *Xanthomonas* species obtained after digestion with the restriction enzyme *Hae* III. M, molecular maker 100pb (Fermentas). 1 *X. albilineans*, 2 *X. alfalfae,* 3 *X. arboricola,* 4 *X. axonopodis*, 5 *X. bromi,* 6 *X. campestris,* 7 *X. cassavae*, 8 *X. citri,* 9 *X. codiae*, 10 *X. cucurbitae*, 11 *X. cynarae,* 12 *X. dyei,* 13 *X. fragariae*, 14 *X. hortorum,* 15 *X. hyacinthi* 16 *X. melonis,* 17 *X. oryzae,* 18 *X. pisi,* 19 *X. sacchari,* 20 *X. theicola,* 21 *X. translucens*, 22 *X. vasicola,* 23 *X. vesicatoria,* 24 *X. gardneri,* 25 *X. euvesicatoria,* 26 *X. perforans.*

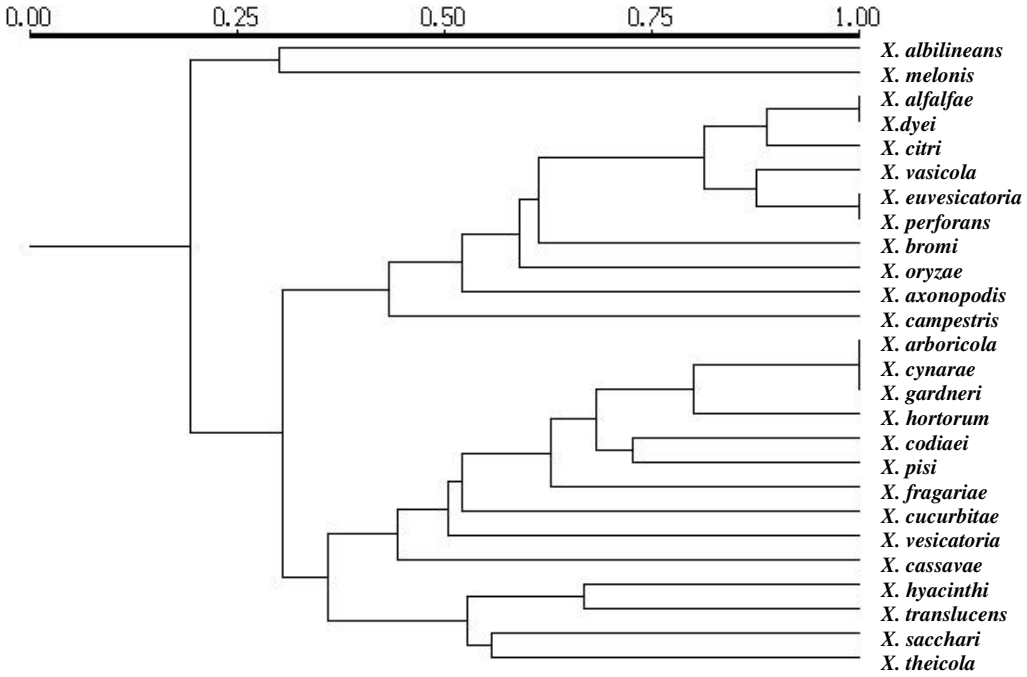


Fig. 2: Dendrogram obtained for *Xanthomonas* species based on the PCR-RFLP profile of the *rpoB* gene using the enzymes *Hae* III, *Hpa* II and *Cfo* I.

***Xanthomonas rpoB* gene phylogeny**

The sequences of part of the *rpoB* gene with 612 bp of all *Xanthomonas* species were aligned, edited and *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (GenBank accession number NC_010943.1) was used as outgroup. In the phylogenetic tree, constructed using the neighbor-joining method, the *Xanthomonas* species were separated in two main groups: Group I, supported by bootstrap values of 99%, comprised *X. euvesicatoria, X. perforans, X. alfalfae, X. citri, X. dyei, X. axonopodis, X. oryzae, X. hortorum, X. bromi, X. vasicola, X. cynarae, X. gardneri, X. campestris, X. fragariae, X. arboricola, X. cassavae, X. cucurbitae, X. pisi, X. vesicatoria, X. codiaei* and *X. melonis*; Group II, also supported by bootstrap values of 99%, comprised *X. albilineans, X. sacchari, X. theicola, X. translucens* and *X. hyacinthi* (Fig. 3). MP and ML trees produced essentially the same structure in the NJ tree, except for *X. arboricola* which did not grouped with *X. campestris* and *X. fragariae.* (Suppl. Figs. S1 and S2). Identical main clusters were also observed in 16S rRNA gene and ITS region (16S-23S rDNA intergenic spacer) analysis (Hauben *et al.*, 1997; Gonçalves & Rosato, 2002); and MLSA studies using *dnaK, fyuA, gyrB* and *rpoD* genes (Young *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2010) (Fig. 3). Grouping as *X. translucens* and *X. hyacinthi*; *X. euvesicatoria, X. perforans* and *X. alfalfae*; *X. cassavae* and *X. cucurbitae*; *X. pisi* and *X. vesicatoria; X. cynarae* and *X. gardneri* were also observed in MLSA studies (Young *et al.*, 2008) and *gyrB* gene analysis (Parkinson *et al.,* 2009; Ryan *et al*, 2011). Clustering of *X. euvesicatoria, X. perforans* and *X. alfalfae* was also observed in *dnaK* and *gyrB* phylogenetic studies (Ah-You *et al.,* 2009). Moreover, similar groups comprising *X. vasicola, X. oryzae, X. citri, X. axonopodis, X. perforans, X. euvesicatoria* and *X. alfalfae* were obtained in phylogenetic analysis performed with other conserved house-keeping including *dnaK, fyuA, gyrB* and *rpoD* genes based on concatenation of all genes or single genes analysis (Young *et al.,* 2008). Data presented here suggested that *rpoB* gene sequence analysis represents a simple and reliable method for the differentiation of most *Xanthomonas* species.

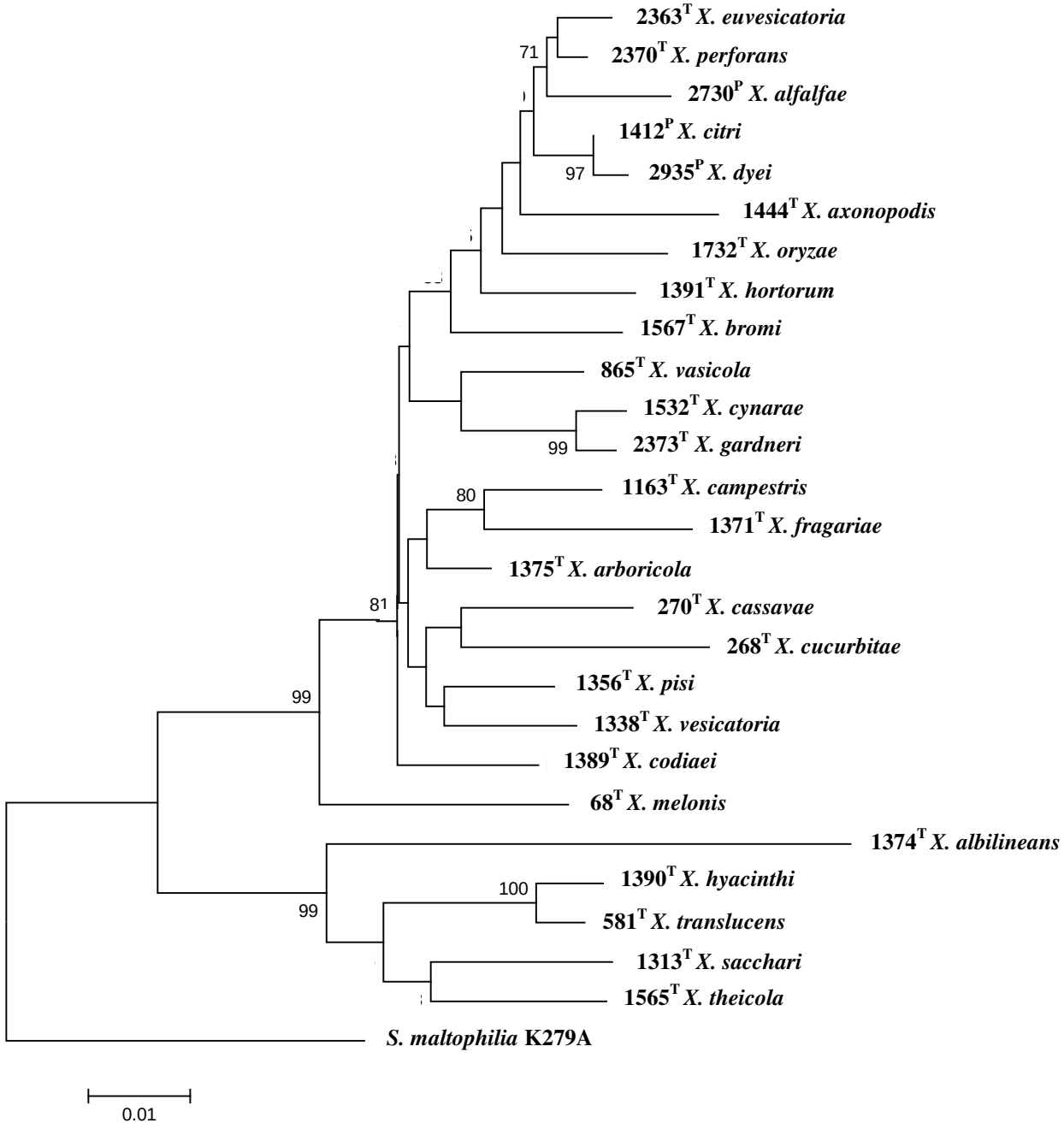


Fig. 3: Neighbor-Joining tree based on *rpoB* gene sequences. Numbers on branches indicate the percentage of the number of times that the node was supported by 1000 replicates of bootstrap analysis. Bar indicates number of substituitions per site. *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (GenBank NC_010943.1) was used as outgroup strain.

Comparing the phylogenetic tree based on the NJ algorithm with similarity dendrogram (Fig. 2) constructed using combined data sets of PCR-RFLP, it was observed that some species groups were identical, e.g. *X. alfalfae, X. dyei, X. citri, X. euvesicatoria* and *X. perforans*; *X. cynarae* and *X. gardneri*; *X. hyacinthi* and *X. translucens*; *X. sacchari* and *X. theicola.* Different groups were also observed but it was expected since the PCR-RFLP analysis was based on restriction profiles while the phylogenetic analysis was carried out based on nucleotide sequences.

The similarity values obtained ranged from 87.8% to 99.7% among the strains; the lowest value was observed between *X. albilineans* and *X. cucurbitae*; *X. albilineans* and *X. vesicatoria*, while the highest value was observed between *X. citri* and *X. dyei* (Suppl. Table S1).

The deduced amino acid sequences of 26 reference strains were aligned and the results showed that these sequences were more conserved than the nucleotide sequences. Sequence similarity was found to range from 90.8% to 100% (Suppl. Table S2). Variations were observed for 28 of the 204 amino acids of the RNA polymerase β subunit of *Xanthomonas* spp. and 21 species presented variation of 11 amino acids.

The sequencing of the *rpoB* gene has enabled the clarification of the taxonomic and phylogenetic relationships among different species including *Bartonella* spp. (Renesto *et al.,* 2000 ; Renesto *et al.,* 2001) , *Borrelia* spp. (Lee *et al.*, 2000), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Kwon *et al.*, 2001), *Legionella pneumophila* (Ko *et al.*, 2002 ; Ko *et al.*, 2003), *Staphylococcus* spp. (Drancourt & Raoult, 2002), non-pathogenic and clinical *Bacillus* spp. (Blackwood *et al.*, 2004), strains from environmental samples (Dahllöf *et al.*, 2000; da Mota *et al.*, 2005), *Pseudomonas* (Tayeb *et al.*, 2005), *Streptomyces* (Mun *et al.*, 2007) and *Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas* and related organisms (Tayeb *et al.*, 2008). Also, the *rpoB* gene might enable species reclassification and the detection of new organisms, including the uncultured ones present in bacterial communities (Adékambi *et al.*, 2008).

Adékambi *et al.* (2008) compared published values for DNA-DNA Hybrydization (DDH) with sequence similarity values of *rpoB* gene sequences retrieved from GenBank of 230 bacterial species representative of 45 genera and concluded that *rpoB* gene sequence

comparison may be used as a preliminary indication of species and genus delineation, including as-yet-uncultivated, non-sequenced organisms. In a study of phylogenetic relationships within the genus *Pseudomonas,* by comparing partial *rpoB* gene sequences (about 1000 nucleotides), it was found that the phylogenetic resolution of the *rpoB* tree was approximately three times higher than that of the 16 rDNA tree (Tayeb *et al.*, 2005) ie, the use of *rpoB* gene has allowed better separation of closely related species when compared with data from 16S rRNA gene.

Our data indicated that the *rpoB* gene was a suitable and efficient molecular marker for the distinction of the *Xanthomonas* species and can be used as an alternative molecular tool for phylogenetic relationships of *Xanthomonas* genus.

Acknowledgements

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the fellowship to Mariana Ferreira-Tonin.

REFERENCES

Adékambi, T., Shinnic, T. M., Raoult, D., Drancourt, M. (2008). Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1807-1814.

Ah-You, N, Gagnevin, L., Grimont, P.A., Brisse S., Nesme X., Chiroleu F., Bui Thi Ngoc L., Jouen E., Lefeuvre P., Vernière C., Pruvost O. (2009). Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 306-318.

Berthier, Y., Verdier, V., Guesdon J., Chevrier, D., Denis, J., Decoux, G., Lemattre, M. (1993). Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Appl Environ Microbiol* **59**, 851-859.

Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., Garaizar, J. (2004). *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **20 (5)**, 798-9. URL <http://insilico.ehu.es/restriction>.

Blackwood, K. S., Turenne, C. Y., Harmsen, D., Kabani, A. M. (2004). Reassessment of sequence-based targets for identification of B*acillus* species. *J Clin Microbiol* **42**, 1626-1630.

Dahllöf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S. (2000). *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16s rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environm Microbiol* **66**, 3376-3380.

Drancourt, M., Raoult, D. (2002). *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* **40**, 1333-1338.

Gonçalves, E. R., Rosato, Y. B. (2002). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 355-361.

Hall, T. A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.

Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J., Moore, E. R. B. (1997). Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 328-335.

Jin, D. J., Gross, C. A. (1989). Three *rpoBC* mutations that suppress the termination defects of *rho* mutants also affect the functions of *nusA* mutants. *Mol Gen Genet* **216**, 269-275.

Ko, K. S., Lee, H. K., Park, M.-Y., Lee, K.-H., Yun, Y.-J., Woo, S.-Y., Miyamoto, H., Kook, Y.-H. (2002). Application of RNA polymerase β-subunit gene (*rpo*B*)* sequences for the molecular differentiation of L*egionella* species. *J Clin Microbiol* **40**, 2653-2658.

Ko, K. S., Hong, S.-K., Lee, K.-H., Lee, H.-K., Park, M.-Y., Miyamoto, H., Kook, Y.-H. (2003). Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Microbiol Methods* **54**, 325-337.

Kwon, H.-J., Park, K.-Y., Kim, S.-J., Yoo, H.-S. (2001). Application of nucleotide sequence of RNA polymerase β-subunit gene (*rpoB*) to molecular differentiation of serovars of S*almonella enterica* subsp. e*nterica*. *Vet Microbiol* **82**, 121-129.

Lee, S.-H., Kim, B.-J., Kim, J.-H., Park, K.-H., Kim, S.-J., Kook, Y.-H. (2000). Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences. *J Clin Microbiol* **38**, 2557-2562.

Moore, E. R. B., Krüger, A. S., Hauben, L., Seal, S. E., Daniels, M. J., De Baere, R., De Wachter, R., Timmis, K. N., Swings, J. (1997). 16s rRNA gene sequence analysis and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia.* *Fems Microbiol Lett* **151**, 145-53.

da Mota, F. F., Gomes, E. A., Paiva, E., Seldin, L. (2005). Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. *Fems Microbiol Ecol* **53**, 317-328.

Mun, H. S., Oh, E. J., Kim, H. J., Lee, K. H., Koh, Y. H, Kim, C. J., Hyun, J. W., Kim, B. J. (2007). Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. *Syst Appl Microbiol* **30**, 401-407.

Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 264-274.

Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* **8**, 151-156.

Rademaker, J. L. W., **Louws, F. J.**, **Schultz**, **M. H.**, **Rossbach, U.**, **Vauterin, L.**, **Swings, J.**, **de Bruijn, F. J. (2005).** A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopatol* **95**, 1098-1111.

Renesto, P., Gautheret, D., Drancourt, M., Raoult, D. (2000). Determination of the *rpoB* gene sequences of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* for phylogenic analysis. *Res Microbiol* **151**, 831-836.

Rohlf, F. J. (1992). NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.70 New York Exeter Publ, NY.

Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V., Raoult, D. (2001). Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* **39**, 430-437.

Ryan R.P., Vorhölter F-J., Potnis N., Jones J.B., Van Sluys M-A., Bogdanove, A.J., Dow J.M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiol* **9***,* 344-355.

Simões, T. H. N, Gonçalves, E. R., Rosato, Y. B., Mehta, A. (2007). Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpfB* and *atpD* genes. *Fems Microbiol Lett* **271**, 33-**39**

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution (submitted).

Tayeb, L. A., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P. A. D. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol* **156**, 763-773.

Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., Grimont, P. A. D. (2008). Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Res Microbiol* **159**, 169-177.

Van Den Mooter, M., Swings, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features from 266 *Xanthomonas* and related strains and an improved taxonomy of the genus *Xanthomonas. Int J Syst Bacteriol* **40**, 348-369.

Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K. (1991). Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J Gen Microbiol* **137**, 1677-1687.

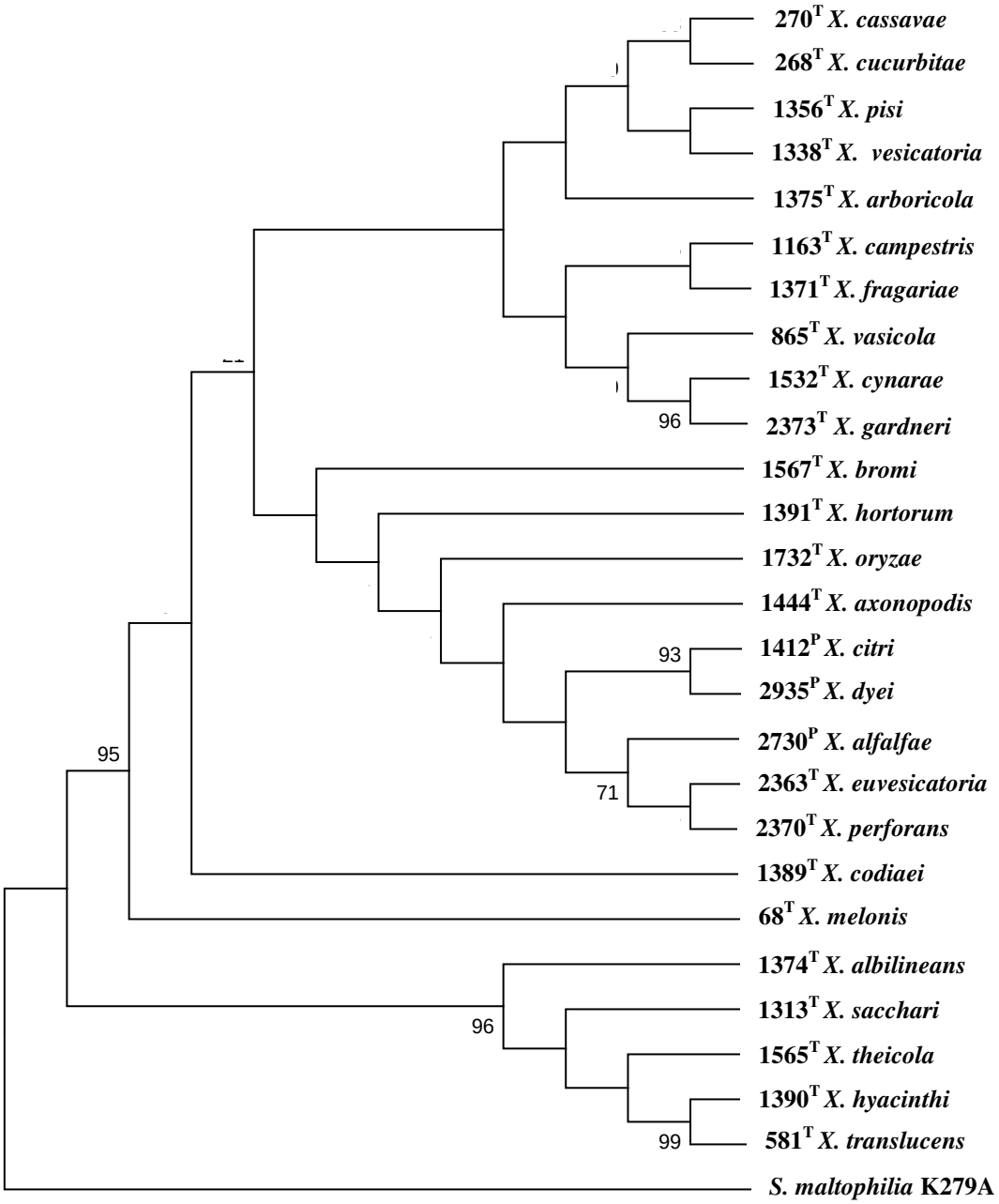
Vauterin, L., Yang, P., Hoste, B., Pot, B., Swings, J., Kersters, K. (1992). Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. *J Gen Microbiol* **138**, 1467-1477.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 472-489.

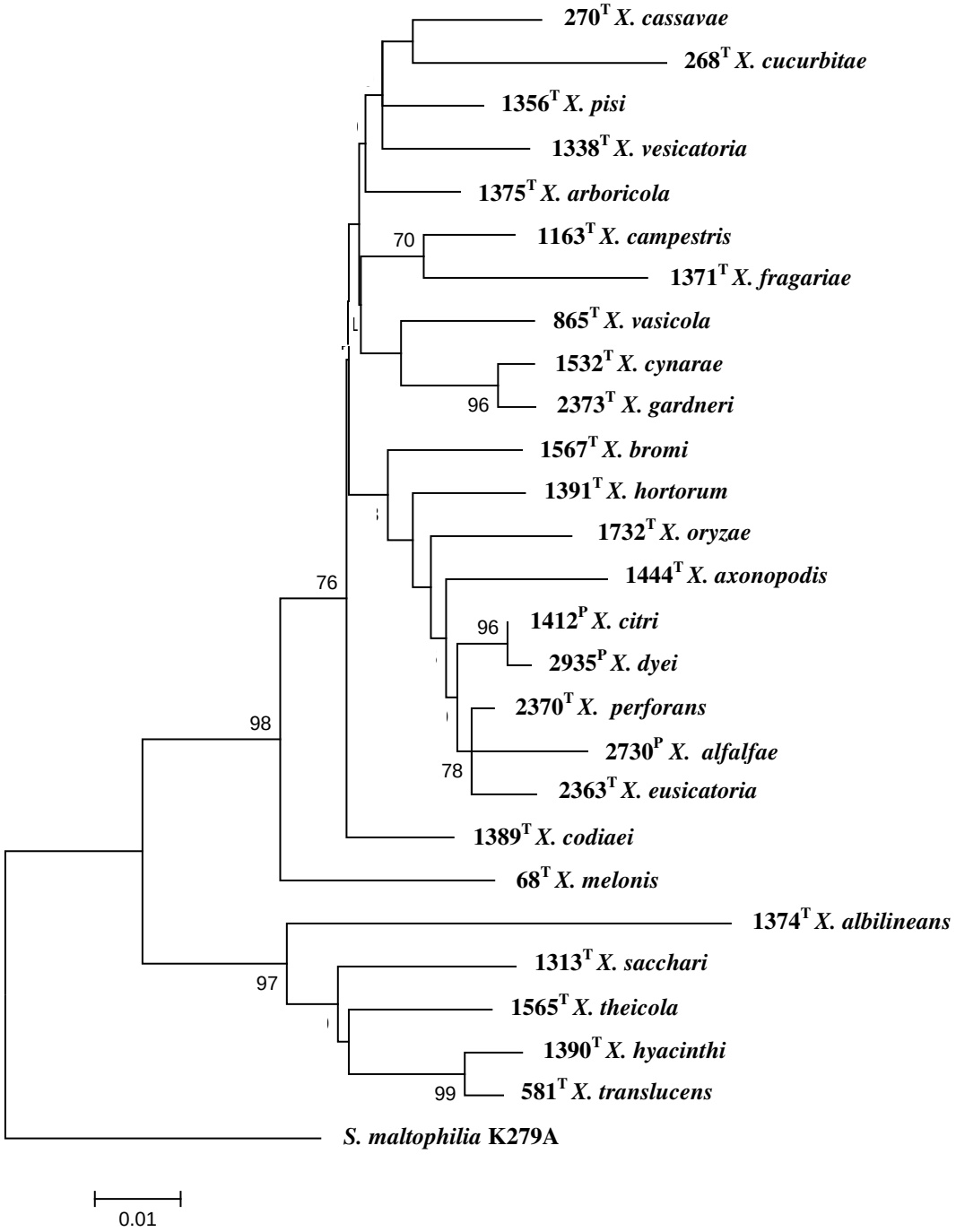
Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., Kersters, K. (1993). Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* **16**, 47-71.

Young, J. M., Park, D.-C., Shearman, H. M., Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 366-377.

Young, J. M., Wilkie, J. P., Park, D. C., Watson, D. R. W. (2010). New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov. Plant Pathol 59, 270-281.



Supplementary Fig. S1: Maximum Parsimony (MP) tree based on *rpoB* gene sequences. Numbers on branches indicate the percentage of the number of times that the node was supported by 1000 replicates of bootstrap analysis. *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (GenBank NC_010943.1) was used as outgroup strain.



Supplementary Fig. S2: Maximum Likelihood (ML) tree based on *rpoB* gene sequences. Numbers on branches indicate the percentage of the number of times that the node was supported by 1000 replicates of bootstrap analysis. Bar indicates number of substituitions per site *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (GenBank NC_010943.1) was used as outgroup strain.

Supplementary Table S1. Similarity matrix (%) of *rpoB* gene sequences in *Xanthomonas.*

Strains	**1374^{T}**	**1375^{T}**	**1444^{T}**	**1412^{P}**	**1567^{T}**	**1163^{T}**	**270^{T}**	**1389^{T}**	**268^{T}**	**1371^{T}**	**1391^{P}**	**1390^{T}**	**68^{T}**
1374^{T} *X. albilineans*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1375^{T} *X. arboricola*	90.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1444^{T} *X.axonopodis*	88	95.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1412^{P} *X. citri*	88.8	96.8	97.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1567^{T} *X. bromi*	88.6	96.1	96.7	96.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1163^{T} *X. campestris*	89.3	97.2	94.6	96	96	-	-	-	-	-	-	-	-
270^{T} *X. cassavae*	88.4	96.1	94.6	95.6	96	95.6	-	-	-	-	-	-	-
1389^{T} *X. codiaei*	89.5	97.3	95.6	97	96.1	97	96.7	-	-	-	-	-	-
268^{T} *X. cucurbitae*	87.8	96	93.7	94.7	95.3	94.2	95.6	94	-	-	-	-	-
1371^{T} *X. fragariae*	88	96.1	93.7	95.1	94	96.5	94.2	95.6	93.3	-	-	-	-
1391^{P} *X. hortorum*	89.2	96.3	96.2	97.5	96.5	95.6	95.1	96.1	94.2	94.6	-	-	-
1390^{T} *X. hyacinthi*	91.9	92	90.3	91.4	90.8	90.9	90.7	91.2	90.5	89.7	91.1	-	-
68^{T} *X. melonis*	89.4	95.1	93.9	94.9	94.6	94.9	95.3	95.8	93.3	93.5	94.4	91.4	-
1732^{T} *X. oryzae*	88.4	96.1	96.5	97.5	96.1	95.1	95.3	95.6	94	94.6	96.7	90.8	94
1356^{T} *X. pisi*	88.6	97.2	94.9	96.3	96	97	97	97	95.4	95.4	96.3	91.8	94.6
1313^{T} *X. sacchari*	92.8	92.2	89.7	91.4	90.8	91.2	90.5	92.1	89.5	89.9	91.4	95.3	91.8
1565^{T} *X. theicola*	92	91.8	89.5	91.4	90.1	90.7	90.9	91.8	88.9	89.3	91.1	95.8	91.1
581^{T} *X. translucens*	91.7	92.2	90.1	91.6	90.7	91.4	91.2	91.4	90.7	90.3	91.3	98.8	91.6
865^{P} *X. vasicola*	88.4	96.8	94.9	96.7	96.5	96.1	94.9	96.3	94.2	95.1	95.8	90.7	94.4
1338^{T} *X. vesicatoria*	87.8	97.5	94.8	96.1	96.5	96.7	96.3	97	95.1	95.4	95.6	90.5	94.2
2730^{P} *X. alfalfae*	88.4	95.8	96.3	98	95.8	95.1	94.9	96	94	94	96.5	91	94.2
1532^{T} *X. cynarae*	88.4	96.8	94.6	95.6	96.3	96.1	95.6	96.1	94.7	94.6	95.1	91.4	94.6
2363^{T} *X. euvesicatoria*	89	96.3	96.8	98.5	96.3	95.8	95.5	96.5	94.9	94.4	97	91.8	94.4
2370^{T} *X. perforans*	88.8	96.5	97.3	99	97.2	95.8	95.6	96.7	95.1	94.8	97.5	91.8	94.9
2373^{T} *X. gardneri*	88.4	96.5	94.9	95.6	96.3	96.1	96.3	96.8	94.7	94.6	95.1	91.4	95.3
2935^{P} *X. dyei*	88.4	96.5	97.3	99.7	96.5	95.6	95.3	96.6	94.4	94.8	97.2	91	94.6
S. maltophilia	87.7	91.2	89.7	90.5	90.1	91.3	90.9	91.6	89.9	89.6	90	90.3	91.1

Supplementary Table S1. Continued.

Strains	1732^{T}	1356^{T}	1313^{T}	1565^{T}	581^{T}	865^{P}	1338^{T}	2730^{P}	1532^{T}	2363^{T}	2370^{T}	2373^{T}	2935^{P}
1374^{T} *X. albilineans*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1375^{T} *X. arboricola*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1444^{T} *X. axonopodis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1412^{P} *X. citri*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1567^{T} *X. bromi*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1163^{T} *X. campestris*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
270^{T} *X. cassavae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1389^{T} *X. codiaei*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
268^{T} *X. cucurbitae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1371^{T} *X. fragariae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1391^{P} *X. hortorum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1390^{T} *X. hyacinthi*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68^{T} *X. melonis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1732^{T} *X. oryzae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1356^{T} *X. pisi*	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1313^{T} *X. sacchari*	90.5	91.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1565^{T} *X. theicola*	90.5	92	96.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
581^{T} *X. translucens*	91	92.3	95.4	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
865^{P} *X. vasicola*	95.8	96.3	90.5	90.1	90.9	-	-	-	-	-	-	-	-
1338^{T} *X. vesicatoria*	95.3	97.3	91	91.1	91.1	96.3	-	-	-	-	-	-	-
2730^{P} *X. alfalfae*	96.6	95.6	91	90.7	91.2	95.6	95.1	-	-	-	-	-	-
1532^{T} *X. cynarae*	95.3	96.3	90.5	90.7	91.2	97	95.6	95.3	-	-	-	-	-
2363^{T} *X. euvesicatoria*	97.2	96.7	91.1	91.4	92	96.2	95.6	98.2	95.8	-	-	-	-
2370^{T} *X. perforans*	97.5	96.7	91.1	91.4	92	96.7	96.1	98.3	96	99.2	-	-	-
2373^{T} *X. gardneri*	95.3	96.7	90.5	91.1	91.2	96.7	95.6	94.9	99	95.8	96	-	-
2935^{P} *X. dyei*	97.2	96	91	91	91.2	96.3	95.8	97.8	95.3	98.2	98.7	95.3	-
S. maltophilia	89.3	92	91.3	90.7	90.7	89.6	90.5	89.9	89.8	90.7	90.7	90.5	90.1

Supplementary Table S2. Similarity matrix (%) of *rpoB* aminoacid acid sequences in *Xanthomonas*

Strains	**1374^{T}**	**1375^{T}**	**1444^{T}**	**1412^{P}**	**1567^{T}**	**1163^{T}**	**270^{T}**	**1389^{T}**	**268^{T}**	**1371^{T}**	**1391^{P}**	**1390^{T}**	**68^{T}**
1374^{T} *X. albilineans*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1375^{T} *X. arboricola*	94,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1444^{T} *X. axonopodis*	93,9	99,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1412^{P} *X. citri*	93,9	99,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1567^{T} *X. bromi*	94,5	100	99,5	99,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1163^{T} *X. campestris*	94,5	100	99,5	99,5	100	-	-	-	-	-	-	-	-
270^{T} *X. cassavae*	94,5	100	99,5	99,5	100	100	-	-	-	-	-	-	-
1389^{T} *X. codiaei*	94,5	100	99,5	99,5	100	100	100	-	-	-	-	-	-
268^{T} *X. cucurbitae*	93,9	99,5	99	99	99,5	99,5	99,5	99,5	-	-	-	-	-
1371^{T} *X. fragariae*	93,9	99,5	99	99	99,5	99,5	99,5	99,5	99	-	-	-	-
1391^{P} *X. hortorum*	93,9	99,5	99	99	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	-	-	-
1390^{T} *X. hyacinthi*	97,5	93,9	93,4	93,4	93,9	93,9	93,9	93,9	93,4	93,4	93,4	-	-
68^{T} *X. melonis*	93,9	99	98,5	98,5	99	99	99	99	98,5	98,5	98,5	93,9	-
1732^{T} *X. oryzae*	93,9	99,5	100	100	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	93,4	98,5
1356^{T} *X. pisi*	94,5	100	99,5	99,5	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	93,9	99
1313^{T} *X. sacchari*	97,5	92,9	92,4	92,4	92,9	92,9	92,9	92,9	92,4	92,4	92,4	98	92,9
1565^{T} *X. theicola*	98	93,4	92,9	92,9	93,4	93,4	93,4	93,4	92,9	92,9	92,9	98,5	93,4
581^{T} *X. translucens*	97,5	93,9	93,4	93,4	93,9	93,9	93,9	93,9	93,4	93,9	93,4	99	93,9
865^{P} *X. vasicola*	93,9	99,5	100	100	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	93,4	98,5
1338^{T} *X. vesicatoria*	94,5	100	99,5	99,5	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	93,9	99
2730^{P} *X. alfalfae*	90,8	96,5	97	97	96,5	96,5	96,5	96,5	96	96	96	90,2	95,5
1532^{T} *X. cynarae*	93,4	99	98,5	98,5	99	99	99	99	98,5	98,5	98,5	92,9	98
2363^{T} *X. euvesicatoria*	93,9	99,5	100	100	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	93,4	98,5
2370^{T} *X. perforans*	93,9	99,5	100	100	99,5	99,5	99,5	99,5	99	99	99	93,4	98,5
2373^{T} *X. gardneri*	94,5	100	99,5	99,5	100	100	100	100	99,5	99,5	99,5	93,9	99
2935^{P} *X. dyei*	93,4	99	99,5	99,5	99	99	99	99	98,5	98,5	98,5	92,9	98
S. maltophilia	95	95,5	95	95	95,5	95,5	95,5	95,5	95	95	95	95	96,5

.

Supplementary Table S2. Continued

Strains	1732^{T}	1356^{T}	1313^{T}	1565^{T}	581^{T}	865^{P}	1338^{T}	2730^{P}	1532^{T}	2363^{T}	2370^{T}	2373^{T}	2935^{P}
1374^{T} *X. albilineans*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1375^{T} *X. Arboricola*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1444^{T} *X. Axonopodis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1412^{P} *X. Citri*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-1567^{T} *X. bromi*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1163^{T} *X. Campestris*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
270^{T} *X. Cassavae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1389^{T} *X. Codiaei*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
268^{T} *X. cucurbitae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1371^{T} *X. fragariae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1391^{P} *X. hortorum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1390^{T} *X. hyacinthi*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68^{T} *X. melonis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1732^{T} *X. Oryzae*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1356^{T} *X. pisi*	99,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1313^{T} *X. sacchari*	92,4	92,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1565^{T} *X. theicola*	92,9	93,4	98,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
581^{T} *X. Translucens*	93,4	93,9	98	98,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
865^{P} *X. vasicola*	100	99,5	92,4	92,9	93,4	-	-	-	-	-	-	-	-
1338^{T} *X. vesicatoria*	99,5	100	92,9	93,4	93,9	99,5	-	-	-	-	-	-	-
2730^{P} *X. alfalfae*	97	96,5	90,2	89,7	90,2	97	96,5	-	-	-	-	-	-
1532^{T} *X. cynarae*	98,5	99	92,9	92,4	92,9	98,5	99	96,5	-	-	-	-	-
2363^{T} *X. euvesicatoria*	100	99,5	92,4	92,9	93,4	100	99,5	97	98,5	-	-	-	-
2370^{T} *X. perforans*	100	99,5	92,4	92,9	93,4	100	99,5	97	98,5	100	-	-	-
2373^{T} *X. gardneri*	99,5	100	92,9	93,4	93,9	99,5	100	96,5	99	99,5	99,5	-	-
2935^{P} *X. dyei*	99,5	99	91,8	92,4	92,9	99,5	99	97	98	99,5	99,5	99	-
S. maltophilia	95	95,5	95	95,5	95	95	95,5	91,8	94,5	95	95	95,5	94,5

Parte II. Caracterização genética de linhagens classificadas como *Xanthomonas* sp. por MLSA e hibridização DNA-DNA

As linhagens classificadas como *X.* sp. pv. *eucalypti* (IBSBF 1738^{P}), *X.* sp. pv. *paulliniae* (IBSBF 828^{P}), *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}), *X.* sp. pv. *betae* (IBSBF 857^{P}), *X.* sp. pv. *esculenti* (IBSBF 849^{P}) e *X.* sp. pv. *viticola* (IBSBF 1967^{P}) (Tabela 1) foram investigadas por meio de análises de multilocus, hibridização DNA-DNA e amplificação com *primers* específicos com o objetivo de se verificar se pertencem à espécie *X. axonopodis, X. campestris* ou à alguma outra espécie do gênero *Xanthomonas.*

1. Amplificação com o par de *primers* axo1F/axo2R específico para a espécie *Xanthomonas axonopodis*

O par de *primers* axo1F/axo2R (Tabela 2), específico para a espécie *X. axonopodis* e desenvolvido a partir de análises de sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr foi empregado em experimentos de amplificação utilizando-se DNAs das linhagens de *Xanthomonas* sp. a serem analisadas. Nestes experimentos foram utililizados como controles positivos DNAs da linhagem Tipo da espécie, de *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}), e dos patovares *X.a.* pv. *vitians* (IBSBF1709^{P}) e *X.a.* pv. *mangiferaindicae* (IBSBF 873 e 1230). Como controle negativo foi utilizado o DNA da linhagem Tipo de *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}).

O sinal positivo de amplificação com fragmento de aproximadamente 200 pb foi observado para os DNAs das linhagens controle e ainda para *X.* sp. pv. *paulliniae* (IBSBF 828^{P}), *X.* sp. pv. *betae* (IBSBF 857^{P}) e *X.* sp. pv. *viticola* (IBSBF 1967^{P}) indicando que pertencem à espécie *X. axonopodis.* Por outro lado, os DNAs das linhagens de *X.* sp. pv. *eucalypti* (IBSBF 1738^{P}), *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}) e *X.* sp. pv. *esculenti* (IBSBF 849^{P}) não apresentaram produto de amplificação sugerindo que estas linhagens não pertencem à espécie *X. axonopodis* (Figura 4).

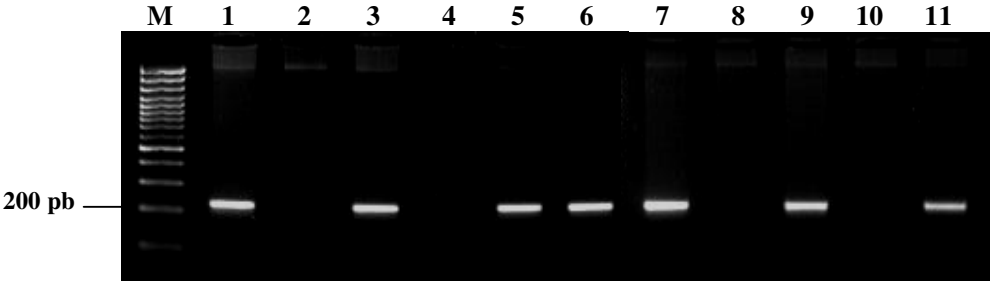


Figura 4. Amplificação por PCR utilizando-se o par de *primers* axo1F/axo2R. (**M**) marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}); (**2**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**3**) *X.a.* pv. *vitians* (IBSBF 1709^{P}); (**4**) *X.* sp. pv. *eucalypti* (IBSBF 1738^{P}); (**5**) *X.a.* pv. *mangiferaindicae* (IBSBF 873); (**6**) *X.a.* pv. *mangiferaindicae* (IBSBF 1230); (**7**) *X.* sp. pv. *paulliniae* (IBSBF 828^{P}); (**8**) *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}); (**9**) *X.* sp. pv. *betae* (IBSBF 857^{P}); (**10**) *X.* sp. pv. *esculenti* (IBSBF 849^{P}); (**11**) *X.* sp. pv. *viticola* (IBSBF 1967^{P}).

2. Hibridização DNA-DNA

Para confirmação dos resultados obtidos nos experimentos de amplificação com os *primers* específicos para *X. axonopodis,* foram realizados experimentos de hibridização DNA-DNA utilizando-se como sonda a linhagem *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}). Nesse experimento, foram transferidos para as membranas os DNAs das linhagens *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}), *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}), *X.* sp. pv. *viticola* (IBSBF 1967^{P}, 1370 e 1926), *X.* sp. pv. *vitistrifoliae* (IBSBF 1968^{P}), *X.* sp. pv. *vitiscarnosae* (IBSBF 2036^{P}), *X.a.* pv. *vitians* (IBSBF 1709^{T}), *X.* sp. pv.*eucalypti* (IBSBF 1738^{P}), *X.a.* pv. *mangiferaindicae* (IBSBF 873 e 1230), *X.* sp. pv. *paulliniae* (IBSBF 828^{P}), *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}), *X.* sp. pv. *betae* (IBSBF 857^{P}) e *X.* sp. pv. *esculenti* (IBSBF 849^{P}) e os resultados revelaram valores de homologia superiores a 73% entre *X. axonopodis* e as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae, X.* sp. pv. *viticola* e outros patógenos de videira (*X.* sp. pv. *vitistrifoliae* e *X.* sp. pv. *vitiscarnosae*) e valores inferiores a 65% com as linhagens de *X.c.* pv. *campestris, X.* sp. *pv. arracaciae, X.* sp. pv. *esculenti* e *X.* sp. pv. *eucalypti* (Figura 5, Tabela 4). Esses resultados corroboraram com os resultados obtidos nos experimentos de amplificação com os *primers* específicos para a espécie *X. axonopodis* confirmando que as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* pertencem a esta espécie.

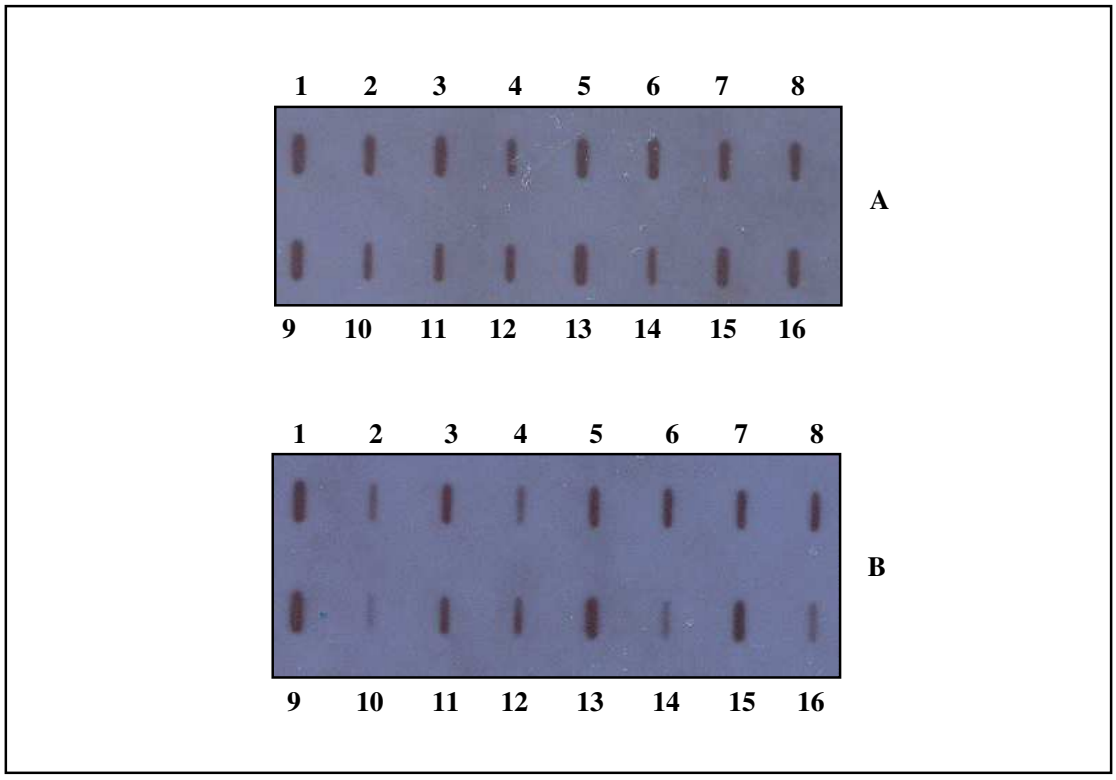


Figura 5. Membranas obtidas nos experimentos de hibridização DNA-DNA. (**A**) DNAs hibridizados com o gene 16S RNAr da espécie *X.a.* pv. *axonopodis*; (**B**) DNAs hibridizados com o DNA genômico de *X.a.* pv. *axonopodis*. (**1**) *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}); (**2**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); *X.* sp. pv. *viticola* (**3**) IBSBF 1967^{P}, (**4**) IBSBF 1370 e (**5**) IBSBF 1926; (**6**) *X.* sp. pv. *vitistrifoliae* (IBSBF 1968^{P}); (**7**) *X.* sp. pv. *vitiscarnosae* (IBSBF 2036^{P}); (**8**) *X.a.* pv. *vitians* (IBSBF 1709^{T}); (**9**) *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}); (**10**) *X.* sp. pv.*eucalipti* (IBSBF 1738^{P}); *X.* sp. pv. *mangiferaindicae* (**11**) IBSBF 873, (**12**) IBSBF 1230; (**13**) *X.* sp. pv. *paulliniae* (IBSBF 828^{P}); (**14**) *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}); (**15**) *X.* sp. pv. *betae* (IBSBF 857^{P}); (**16**) *X.* sp. pv. *esculenti* (IBSBF 849^{P}).

Tabela 4. Valores de homologia (%) obtidos nos experimentos de hibridização DNA-DNA com diferentes linhagens de *Xanthomonas* sp. utilizando-se como sonda *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}) ou *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}).

Linhagens	**Homologia (%)**	
	X.a.* pv. *axonopodis	***X.c.* pv. *campestris***
1444^{T} *X.a.* pv. *axonopodis*	100	59
1163^{T} *X.c.* pv. *campestris*	57	100
1709^{P} *X.a.* pv. *vitians*	81	48
358^{P} *X.* sp. pv. *arracaciae*	58	43
857^{P} *X.* sp. pv. *betae*	73	36
849^{P} *X.* sp. pv. *esculenti*	64	39
1738^{P} *X.* sp. pv. *eucalypti*	65	44
873 *X.a.* pv. *mangiferaeindicae*	80	35
1230 *X.a.* pv. *mangiferaeindicae*	79	40
828^{P} *X.* sp. pv. *pauliniae*	77	41
1967^{P} *X.* sp. pv. *viticola*	80	54
1370 *X.* sp. pv. *viticola*	76	55
1926 *X.* sp. pv. *viticola*	84	53
2036^{P} *X.* sp. pv. *vitiscarnosae*	81	59
1968^{P} *X.* sp. pv. *vitistrifoliae*	85	62

Os resultados de hibridização revelaram que *X.* sp. pv. *eucalypti* (IBSBF 1738^{P}), *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}) e *X.* sp. pv. *esculenti* (IBSBF 849^{P}) não pertencem à espécie *X. axonopodis.* Assim, foram realizados novos experimentos de hibridização DNA-DNA utilizando-se o DNA da espécie *X. campestris* como sonda, uma vez que essas linhagens estavam alocadas na espécie *X. campestris* antes da reclassificação do gênero proposta por Vauterin e colaboradores (1995). Nesses testes foram transferidos para as membranas os mesmos DNAs empregados nos experimentos em que o DNA da linhagem de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}) foi utilizada como sonda e os resultados revelaram que todas as linhagens apresentaram valores de homologia inferiores a 62%, exceto o controle positivo *X.c.* pv. *campestris* IBSBF 1163^{T} (100% de homologia) (Figura 6, Tabela 4), indicando que essas linhagens também não pertencem à espécie *X. campestris.*

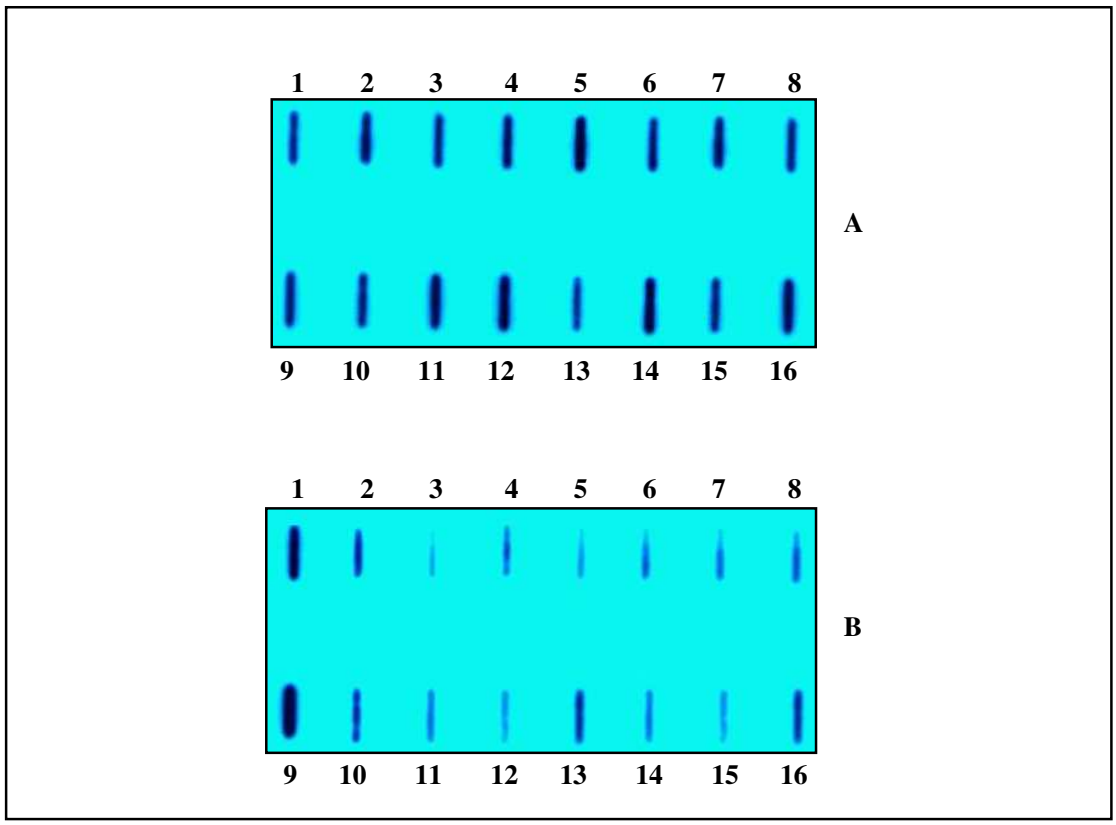


Figura 6. Membranas obtidas nos experimentos de hibridização DNA-DNA. (**A**) DNAs hibridizados com o gene 16S RNAr da espécie *X.c.* pv. *campestris*; (**B**) DNAs hibridizados com o DNA genômico de *X.c.* pv. *campestris*. (**1**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**2**) *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}); *X.* sp. pv. *viticola* (**3**) IBSBF 1967^{P}, (**4**) IBSBF 1370 e (**5**) IBSBF 1926; (**6**) *X.* sp. pv. *vitistrifoliae* (IBSBF 1968^{P}); (**7**) *X.* sp. pv. *vitiscarnosae* (IBSBF 2036^{P}); (**8**) *X.a.* pv. *vitians* (IBSBF 1709^{T}); (**9**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**10**) *X.* sp. pv.*eucalypti* (IBSBF 1738^{P}); *X.* sp. pv. *mangiferaindicae* (**11**) IBSBF 873, (**12**) IBSBF 1230; (**13**) *X.* sp. pv. *paulliniae* (IBSBF 828^{P}); (**14**) *X.* sp. pv. *arracaciae* (IBSBF 358^{P}); (**15**) *X.* sp. pv. *betae* (IBSBF 857^{P}); (**16**) *X.* sp. *pv. esculenti* (IBSBF 849^{P}).

3. Análise de Multilocus (MLSA)

A posição taxonômica das linhagens de *Xanthomonas* sp. também foi investigada por meio de análise de multilocus. Os DNAs das espécies Tipo do gênero e das linhagens classificadas como *Xanthomonas* sp. foram submetidos a amplificações com os pares de *primers* atpA3F/atpA7R, rpoA1F/rpoA3R, rpoB2F/rpoB3R, recA5F/recA7R e pHR/p322anti (Tabela 2) correspondentes a parte dos genes *atpA*, *rpoA*, *rpoB*, *recA* e à região espaçadora 16S-23S DNAr, respectivamente. A linhagem de *X.* sp. pv. *viticola* (IBSBF 1967^{P}) não apresentou produto de amplificação para o gene *atpA* e as linhagens de *X. arboricola* pv. *juglandis* (IBSBF 1375^{P}) e *X.* sp. pv.

esculenti (IBSBF 849^{P}) não apresentaram produto de amplificação para o gene *recA,* embora diversas condições de amplificação tenham sido testadas.

Os produtos de amplificação obtidos foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

As análises individuais das sequências de parte dos genes *atpA, rpoA*, *rpoB*, *recA* e região espaçadora 16S-23S DNAr resultaram em árvores filogenéticas com topologia semelhante (Apêndices 1, 2, 3, 4 e 5). As linhagens de *X.* sp. pv. *viticola*, *X.* sp. pv. *betae* e *X.* sp. pv. *paulliniae* ficaram agrupadas com as linhagens da espécie *X. axonopodis* em todas as árvores filogenéticas exceto nas análises do gene *rpoA*, em que apenas a linhagem de *X.* sp. pv. *viticola* ficou agrupada com esta espécie. As linhagens de *X.* sp. pv. *betae* e *X.* sp. pv. *paulliniae* constituíram um grupo isolado das demais espécies testadas. As linhagens de *X.* sp. pv.*eucalypti*, *X.* sp. pv. *arracaciae* e *X.* sp. pv. *esculenti* agruparam com espécies diferentes dependendo do gene analisado. Em análises individuais a diferença de poucos nucleotídeos pode resultar em agrupamentos diferentes, portanto uma análise completa foi realizada utilizando-se as sequências concatenadas dos diversos genes estudados.

Como a linhagem de *X.* sp. pv. *viticola* não apresentou produto de amplificação para o gene *atpA* e as linhagens de *X. arboricola* pv. *juglandis* e *X.* sp. pv. *esculenti* não apresentaram produto de amplificação para o gene *recA,* inicialmente foi construída uma árvore filogenética utilizando-se as sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr (1727 nt com gaps) para que todas as linhagens pudessem ser analisadas. Os resultados revelaram a formação de dois agrupamentos principais obtidos em 100% das repetições de *bootstrap*: o primeiro ficou composto por todas as linhagens testadas exceto *X. albilineans , X. sacchari, X. theicola, X. hyacinthi* e *X. translucens* que constituíram o segundo agrupamento (Figura 7). Estas análises também revelaram que as linhagens de *X.* sp. pv. *viticola*, *X.* sp. pv. *betae* e *X.* sp. pv. *paulliniae* ficaram agrupadas com a espécie *X. axonopodis* em 80% das repetições de *bootstrap.* Os altos valores de *bootstrap* indicaram a confiabilidade dos agrupamentos obtidos. As linhagens de *X.* sp. pv. *esculenti* e *X.* sp. pv. *eucalypti* ficaram agrupadas com a espécie *X. vesicatoria* em 63% e 29% das repetições, respectivamente; e a linhagem de *X.* sp. pv. *arracaciae* ficou agrupada com a espécie *X. arboricola* em 95% das repetições (Figura 7).

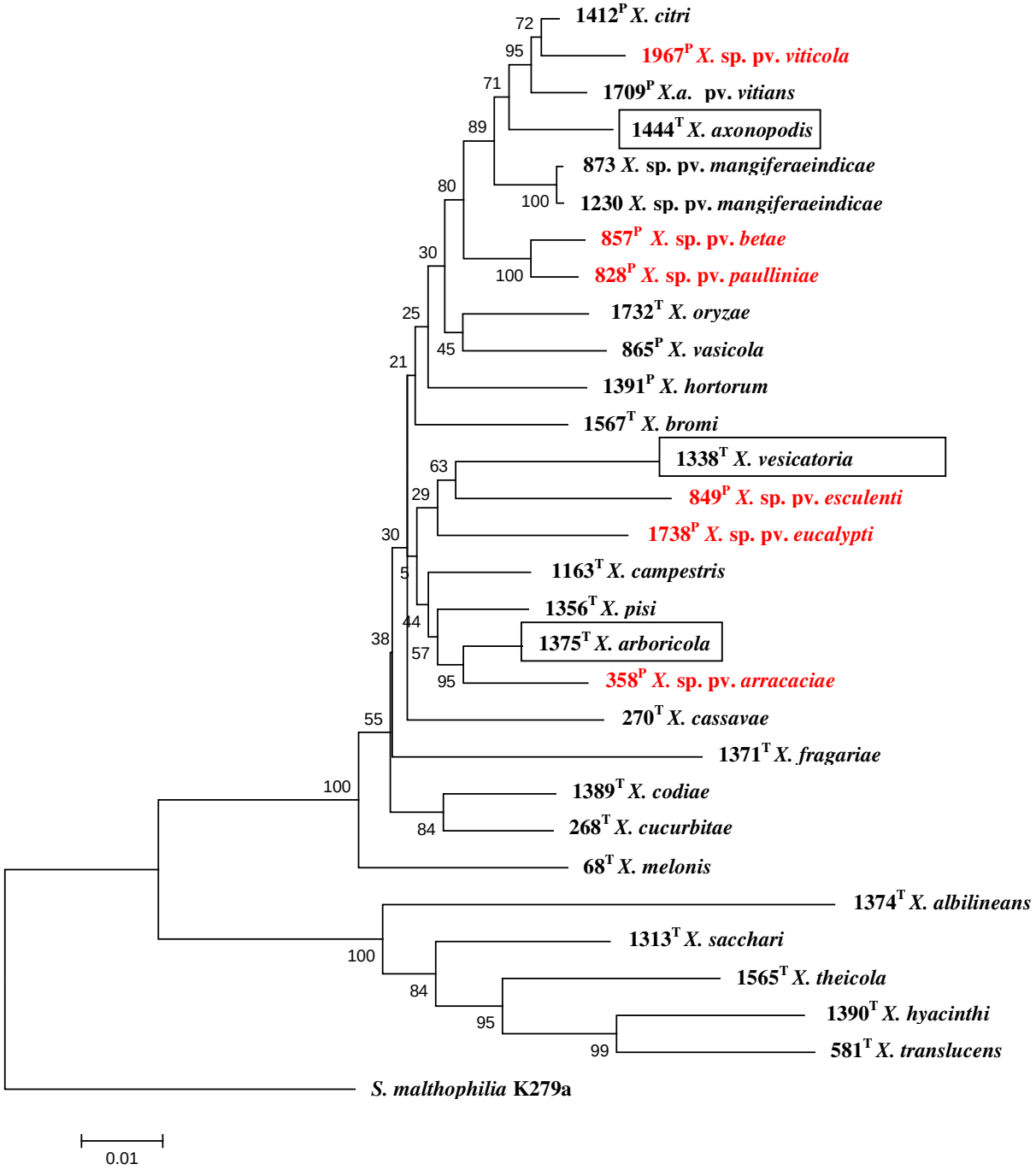


Figura 7. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr de linhagens do gênero *Xanthomonas*, utilizando-se o método Neighbor-joining. A sequência de *Stenotrophomonas malthophilia* K279a foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 1% de diferença nas sequências.

Outra árvore filogenética foi construída a partir das sequências concatenadas de todos os genes utilizados neste estudo: *atpA*, *rpoA*, *rpoB*, *recA* e região espaçadora 16S-23S DNAr (2525 nt). Nessa análise as linhagens de *X.* sp. pv. *viticola, X. arboricola* pv.

juglandis e *X.* sp. pv. *esculenti* não foram incluídas, uma vez que não apresentaram produto de amplificação para os genes *atpA* e *recA*. Os resultados revelaram os mesmos agrupamentos principais obtidos nas análises com três genes e confirmaram que as linhagens de *X.* sp. pv. *betae* e *X.* sp. pv. *paulliniae* pertencem a espécie *X. axonopodis,* pois agruparam com esta espécie em 99% das repetições de *bootstrap.* A linhagem de *X.* sp. pv. *arracaciae* agrupou com a espécie *X. hortorum* e a linhagem de *X.* sp. pv. *eucalypti* agrupou com a espécie *X. pisi* em 28% e 27% das repetições, respectivamente (Figura 8).

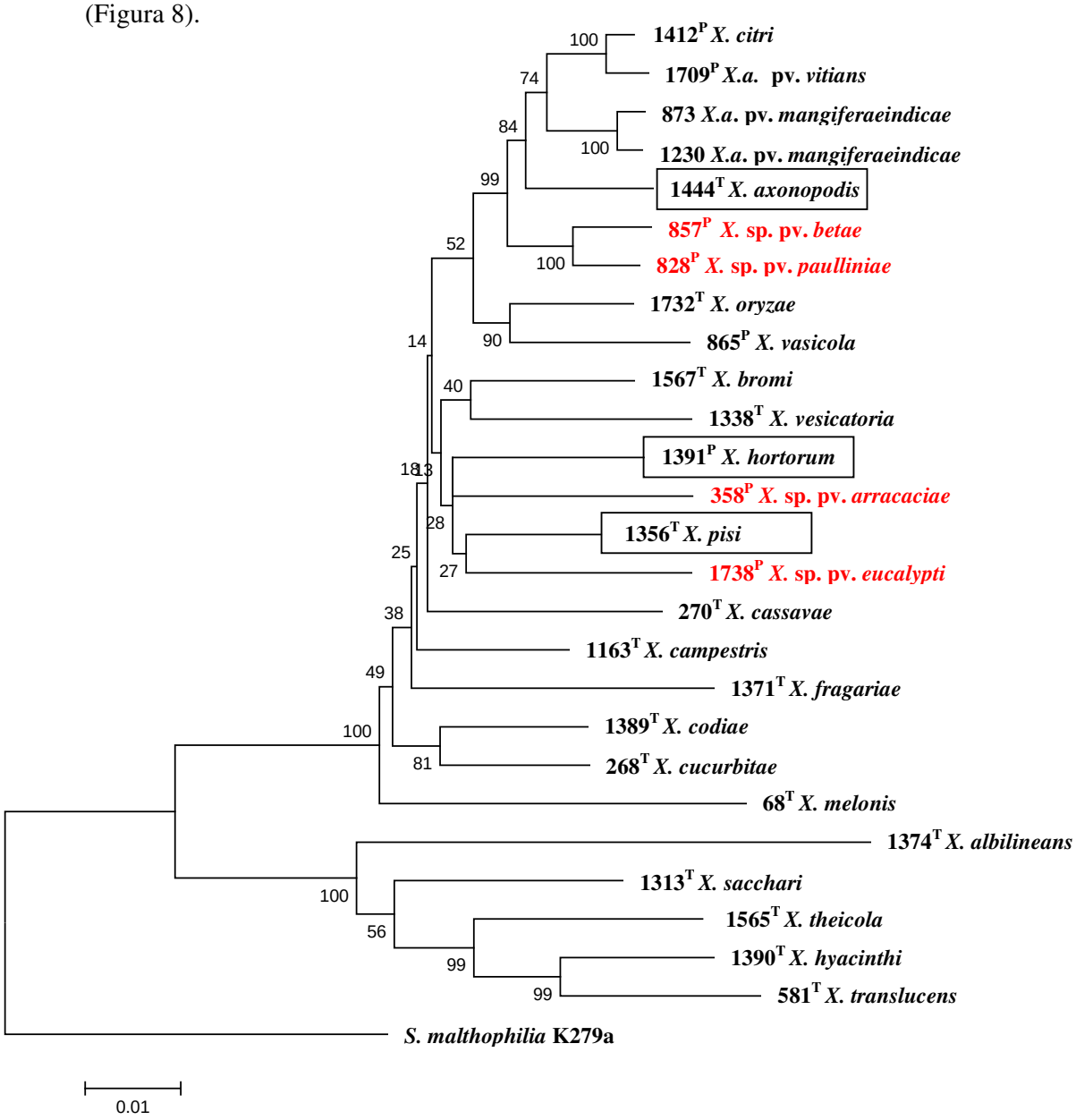


Figura 8. Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *atpA, rpoA, rpoB, recA* e região espaçadora 16S-23S DNAr de linhagens do gênero *Xanthomonas*, utilizando-se o método Neighbor-joining. A sequência de *Stenotrophomonas malthophilia* K279a foi utilizada como grupo externo. Os números em cada um dos ramos são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 1% de diferença nas sequências.

Ainda, foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se sequências de diferentes combinações de quatro dos genes estudados. Novamente, em todas as análises as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* agruparam com a espécie *X. axonopodis*. Por outro lado, as linhagens de *X.* sp. pv. *eucalypti*, *X.* sp. pv. *arracaciae* e *X.* sp. pv. *esculenti* agruparam com diferentes espécies dependendo da combinação analisada (Apêndices 6, 7 e 8).

As sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr foram utilizadas na construção de uma matriz de similaridade. Dentre as espécies Tipo do gênero *Xanthomonas,* o menor valor de similaridade observado foi de 84,7%, entre *X. fragariae* e *X. albilineans,* e o maior valor de similaridade observado foi de 98,1%, entre *X. axonopodis* e *X. citri.* Analisando-se as linhagens de *Xanthomonas* sp., as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* apresentaram os maiores índices de similaridade (acima de 96,6%) com os patovares da espécie *X. axonopodis* e com a espécie *X. citri.* Por outro lado, a linhagem de *X.* sp. pv. *eucalypti* apresentou maior índice de similaridade com *X. pisi* (96,3%); *X.* sp. pv. *esculenti* com *X. campestris* (95,3%) e *X.* sp. pv. *arracaciae* apresentou maior índice de similaridade com *X. arboricola* (97,7%) (Apêndice 9).

Os resultados obtidos nos experimentos de amplificação com os *primers* para a espécie *X. axonopodis,* os experimentos de hibridização DNA-DNA e as análises de multilocus confirmaram que as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* pertencem à espécie *X. axonopodis.* Por outro lado, não foi possível se determinar a posição taxonômica de *X.* sp. pv. *eucalypti*, *X.* sp. pv. *arracaciae* e *X.* sp. pv. *esculenti*, apenas foi possível concluir que essas linhagens não pertencem às espécies *X. axonopodis* ou *X. campestris.* Os resultados obtidos nos diversos experimentos estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos nos experimentos com as linhagens de *Xanthomonas* sp.

Linhagens	**Hibridização DNA-DNA**	**Amplificação com *primer* específico *X. axonopodis***	**Árvore filogen. (*rpoA*, *rpoB* e região espaçadora)**	**Árvore filogen. (*atpA*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e região espaçadora)**	**Árvore filogen. (*recA*, *rpoA*, *rpoB* e região espaçadora)**	**Árvore filogen. (*atpA*, *rpoA*, *rpoB* e região espaçadora)**	**Árvore filogen. (*atpA*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*)**	**Classificação**
X. sp. pv. a*rracaciae*	≠ Xaa /Xcc	-	*X. arboricola*	*X. hortorum*	separada das outras espécies	*X. arboricola*	*X. hortorum, X. pisi*	Não conclusiva
X. sp. pv. *betae*	Xaa	+	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	*X. axonopodis*
X. sp. pv. e*sculenti*	≠ Xaa /Xcc	-	*X. vesicatoria*	n/a	n/a	*X. vesicatoria*	n/a	Não conclusiva
X. sp. pv. *eucalypti*	≠ Xaa /Xcc	-	*X. vesicatoria*	*X. pisi*	*X. vesicatoria*	*X. hortorum, X. pisi, X. arboricola,* Xcc	*X. pisi*	Não conclusiva
X. sp. pv. *paulliniae*	Xaa	+	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	*X. axonopodis*
X. sp. pv. *viticola*	Xaa	+	Xaa	n/a	Xaa	n/a	n/a	*X. axonopodis*

Xaa (*X. axonopodis* pv. *axonopodis*); Xcc (*X. campestris* pv. *campestris*)
n/a (não avaliada – DNA não apresentou sinal de amplificação para um dos genes analisados)

Em 1995, Vauterin e colaboradores propuseram uma grande reclassificação do gênero *Xanthomonas* por meio de estudos de utilização de fontes de carbono (BIOLOG) e experimentos de hibridização DNA-DNA envolvendo 183 linhagens. Nesse estudo, os autores dividiram o gênero em 20 espécies genômicas, entretanto algumas espécies não foram investigadas e ficaram classificadas como *Xanthomonas* sp., subdivididas em diversos patovares. No presente estudo, a técnica de hibridização DNA-DNA foi utilizada como ferramenta para o esclarecimento da posição taxonômica de algumas dessas linhagens como *X.* sp. pv. *arracaciae* (patogênica à batata-baroa), *X.* sp. pv. *betae* (patogênica à beterraba), *X.* sp. pv. *esculenti* (patogênica ao quiabeiro), *X.* sp. pv. *eucalypti* (patogênica ao eucalipto), *X.* sp. pv. *paulliniae* (patogênica ao guaranazeiro) e *X.* sp. pv. *viticola* (patogênica à videira). O comitê para a reavaliação da definição de espécies em bacteriologia recomenda que, para a proposição de novas espécies por meio de técnicas ou métodos genômicos, os autores devem demonstrar que, haja em grau suficiente de concordância entre os métodos empregados e a técnica de hibridização DNA-DNA. Além disso, esse comitê incentiva o desenvolvimento e a utilização de novos métodos que complementem ou substituam os experimentos de hibridização DNA-DNA e considera como métodos promissores o seqüenciamento de genes *housekeeping* e as técnicas de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), rep-PCR e PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) (STACKEBRANDT et al., 2002).

A técnica de hibridização DNA-DNA tem sido utilizada para a descrição de novas espécies bacterianas incluindo recentes proposições de novas espécies dentro do gênero *Xanthomonas* como *X. cynarae* (TRÉBAOL et al., 2000), *X. euvesicatoria, X. perforans* e *X. gardneri* (JONES et al., 2004), *X. citri, X. fuscans* e *X. alfalfae,* divididas em diversas subespécies (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

Devido ao fato de que esta técnica é laboriosa, de difícil padronização, e com possibilidade de erros experimentais, esta tem sido gradativamente substituída por análises de multilocus em estudos taxonômicos e filogenéticos de diversos microorganismos da área clínica, ambiental e fitopatologia. A partir do estudo pioneiro efetuado por Maiden e colaboradores (1998), análises de multilocus têm sido amplamente aplicadas na identificação de linhagens bacterianas e para alocá-las em suas posições taxonômicas

apropriadas, inclusive na investigação de diversos fitopatógenos (HWANG et al., 2005; SCALLY et al., 2005). Além disso, de acordo com Young e colaboradores (2008), essas análises representam um método simples e rápido para alocar linhagens às espécies do gênero *Xanthomonas* refletindo as relações baseadas em experimentos de hibridização DNA-DNA.

No presente estudo esta técnica também foi empregada com o intuito de se esclarecer a posição taxonômica de linhagens de *Xanthomonas* classificadas como *Xanthomonas* sp. Vinte e nove linhagens do gênero *Xanthomonas* foram submetidas inicialmente a análises individuais dos genes *atpA, recA, rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr e as árvores filogenéticas construídas apresentaram, em geral, topologia semelhante, embora alguns agrupamentos tenham se mostrado diferentes, fato que não impede a sua utilização para a identificação de isolados dentro de uma determinada espécie. Vários fatores são responsáveis por diferentes topologias resultantes das análises com genes *housekeeping* como, por exemplo, as diferentes taxas de evolução devido a diferentes forças de seleção sobre vários genes e o tamanho das sequências parciais que são comparadas (CHRISTENSEN et al., 2007). Segundo Naser e colaboradores (2007), o fato de diferentes genes poderem resultar em árvores filogenéticas com topologias diferentes, aliado à variação do poder discriminatório dos genes investigados, leva à necessidade de análises simultâneas de vários genes *housekeeping* para que essas análises se tornem mais consistentes. Assim, as sequências dos genes envolvidos no presente estudo foram utilizadas em análises de multilocus utilizando-se diferentes combinações. Em todas as análises realizadas as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* agruparam com a espécie *X. axonopodis* e seus patovares (exceto nas análises que incluíram o gene *atpA* em que a linhagem de *X.* sp. pv. *viticola* não foi incluída, uma vez que seu DNA não apresentou produto de amplificação para este gene). Nas diversas combinações efetuadas, alguns agrupamentos ficaram compostos por espécies diferentes como, por exemplo, o agrupamento de *X.* sp. pv. *arracaciae, X. arboricola* e *X. pisi* observado nas análises utilizando-se os genes *atpA, rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr, e o agrupamento de *X.* sp. pv. *arracaciae, X. hortorum, X. pisi* e *X.* sp. pv. *eucalypti* com os genes *atpA, recA, rpoA* e *rpoB.* Os resultados obtidos nas análises de multilocus

confirmaram os dados obtidos nos experimentos de hibridização DNA-DNA de que *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* pertencem à espécie *X. axonopodis.*

A correta classificação de um patógeno é fundamental para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético visando resistência às doenças, implementação de medidas de controle objetivando a redução de perdas econômicas e controle de introdução de pragas quarentenárias como é o caso de *X.* sp. pv. *viticola.* Este patógeno, responsável pelo cancro bacteriano da videira, é regulamentado no Brasil como praga quarentenária presente (A2) que engloba espécies de importância econômica potencial, já presentes no país, porém de ocorrência em apenas algumas regiões e com programa oficial de controle (TRINDADE, 2007). A ocorrência de *X.* sp. pv. *viticola* foi inicialmente observada na região do submédio do Vale São Francisco, em Petrolina-PE e Juazeiro-BA, tendo sido posteriormente relatada nos Estados de Ceará, Piauí e Roraima (MALAVOLTA JR., et al., 2008), e, detectada no Estado de São Paulo na região de Tupi Paulista em 2010 RODRIGUES NETO et al., 2011), sendo que este foco foi erradicado imediatamente após a sua detecção. Nesse sentido, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) exige a certificação de material propagativo (Instrução Normativa n° 9 de 20/04/2006) para garantir a ausência da bactéria, evitando assim, sua disseminação para as demais regiões produtoras, principalmente, do Sudeste e Sul do Brasil (TRINDADE, 2007). A proposição de que *X.* sp. pv. *viticola* pertence à espécie *X. axonopodis* fica reforçada pelos resultados obtidos em estudo de comparação genômica efetuado por Takita e colaboradores (2006).

A alocação do patógeno de videira na espécie *X. axonopodis* poderá contribuir de forma significativa em estudos futuros de desenvolvimento de novos métodos de detecção e identificação desta praga quarentenária.

A partir dos dados obtidos neste estudo, a posição taxonômica de *X.* sp. pv. *arracaciae, X.* sp. pv. *esculenti* e *X.* sp. pv. *eucalypti* permanece indeterminada. Nas análises de multilocus, dependendo dos genes analisados, a linhagem de *X.* sp. pv. *arracaciae* agrupou com a espécies *X. hortorum* (nas análises utilizando-se os genes *atpA, recA, rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr e nas análises utilizando-se os genes *atpA, recA, rpoA* e *rpoB*) ou com *X. arboricola* (genes *rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr ou genes *atpA, rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr) ou com *X. pisi*

(genes *atpA, recA, rpoA* e *rpoB*). Esta linhagem é patogênica à batata-baroa (*Arracacia xanthorrhiza)* pertencente à família Apiaceae (sin. Umbeliferae), mesma família botânica da cenoura (*Daucus carota*), planta hospedeira do patógeno *X. hortorum* pv. *carotae.* Devido à relação entre este dois hospedeiros e aos resultados obtidos nas análises de multilocus utilizando-se as sequências concatenadas dos genes *atpA, recA, rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr, e também nas análises utilizando-se os genes *atpA, recA, rpoA* e *rpoB,* em que a linhagem de *X.* sp. pv. *arracaciae* agrupou com a espécie *X. hortorum,* esta linhagem, provavelmente, deva ser um patovar desta espécie. Entretanto, apenas uma análise de multilocus mais ampla utilizando-se outros genes e/ou experimentos de hibridização DNA-DNA, utilizando-se a espécie *X. hortorum* como sonda, poderão confirmar esta hipótese.

No caso da linhagem de *X.* sp. pv. *esculenti,* como o DNA não apresentou produto de amplificação para o gene *recA* foram construídas árvores filogenéticas utlizando-se as sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr e também utilizando-se as sequências dos genes *atpA, rpoA rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr. Nas duas análises a linhagem de *X.* sp. pv. *esculenti,* agrupou com a espécie *X. vesicatoria.* Entretanto, os hospedeiros destes patógenos são quiabeiro e tomateiro respectivamente, hospedeiros sem nenhuma relação botânica. Assim, somente uma análise mais ampla envolvendo um maior número de genes poderá contribuir para o esclarecimento da posição taxonômica essa espécie. Também, experimentos de hibridização DNA-DNA utilizando-se a espécie *X. vesicatoria* como sonda poderiam elucidar a hipótese de que *X.* sp. pv. *esculenti* pertence mesmo à essa espécie.

Embora no presente estudo também não tenha sido possível alocar *X.* sp. pv. *eucalypti* em nenhuma das espécies do gênero *Xanthomonas,* recentemente, Young e colaboradores (2010) propuseram, baseado em análises de multilocus utilizando-se sequências dos genes *dnaK, fyuA, gyrB* e *rpoD,* que esta linhagem patogênica ao eucalipto pertence à espécie *X. dyei* pv. *eucalypti.* Os autores propuseram que estas linhagens pertencem à uma nova espécie, *X. dyei,* uma vez que na árvores filogenéticas, formaram um agrupamento separado das demais espécies do gênero *Xanthomonas.*

Ainda, cabe ressaltar que alguns agrupamentos observados nas árvores filogenéticas resultantes das diversas combinações de genes foram observados em outros estudos

filogenéticos do gênero *Xanthomonas.* Os dois agrupamentos principais obtidos nas análises efetuadas com as diversas combinações de genes também foram observados em estudos utilizando-se sequências do gene 16S RNAr das diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* (HAUBEN et al, 1997). Também, Gonçalves e Rosato (2002) obtiveram os mesmos agrupamentos em estudo das relações filogenéticas de 17 espécies do gênero baseado em análises da região espaçadora 16S-23S DNAr. Nas análises de multilocus utilizando-se as sequências dos genes *dnaK, fyuA, gyrB* e *rpoD* das diferentes espécies de *Xanthomonas* também foram obtidos os mesmos agrupamentos principais (YOUNG et al., 2008; YOUNG et al., 2010). Ainda, os agrupamentos de *X. translucens*, *X. hyacinthi* e *X. theicola* também foram observados nos estudos citados acima e também em análises filogenéticas do gene *gyrB* efetuadas recentemente por Parkinson e colaboradores (2009) e em análises deste mesmo gene realizado por Ryan e colaboradores (2011) em estudo da complexidade genômica das espécies do gênero *Xanthomonas.* Portanto, as análises de multilocus efetuadas no presente estudo, forneceram contribuição significativa para estudos taxonômicos e filogenéticos do gênero *Xanthomonas.*

Um fato interessante do nosso estudo é que nas análises filogenéticas *X. citri* sempre ficou agrupada com a espécie *X. axonopodis* e seus patovares. Além disso, na matriz de similaridade construída a partir das sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr, o maior valor observado foi entre *X. axonopodis* e *X. citri* (98,1%). Também, essa matriz revelou que as linhagens de *X.* sp. pv. *viticola, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *betae,* confirmadas no presente estudo como *X. axonopodis,* apresentaram altos valores de similaridade com a espécie *X. citri* (98,6%, 97,4% e 97,3%, respectivamente). Em estudos realizados anteriormente (dados não apresentados), a linhagem Tipo de *X. citri* apresentou sinal positivo de amplificação em experimentos utilizando-se *primers* específicos para a espécie *X. axonopodis*, concordando com os dados de análises filogenéticas. O patógeno causador do cancro cítrico, *X. citri* subsp. *citri,* foi reclassificado por Schaad e colaboradores (2005; 2006) como uma nova espécie por meio de taxonomia polifásica, incluindo experimentos de hibridização DNA-DNA, que revelaram homologia inferior a 24 % com a espécie *X. axonopodis,* e análises de sequências da região espaçadora intergênica (ITS) em que *X. citri* apresentou 98,3 % de similaridade com a referida espécie. Porém, nesse estudo os autores não incluíram outros patovares da

espécie *X. axonopodis* para comparação dos valores de similaridade entre eles dentro da espécie. No presente estudo, outros patovares da espécie *X. axonopodis* (*X.a.* pv. *vitians* e *X.a.* pv. *mangiferaindicae*) foram incluídos nas análises de sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr e a matriz de similaridade revelou os seguintes valores: 96,4 % entre *X.a.* pv. *vitians* e *X.a.* pv. *axonopodis* e 96,7% entre *X.a.* pv. *mangiferaindicae* e *X.a.* pv. *axonopodis*, todas pertencentes à espécie *X. axonopodis.* Também, foram observados valores de 99,3% entre *X. citri* e *X. axonopodis;* 97,1% entre *X.a.* pv. *vitians* e *X. citri*; 97,5% entre *X.a.* pv. *mangiferaindicae* e *X. citri.* Ainda, na matriz de similaridade construída à partir de sequências dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr, as linhagens de *X.a.* pv. *mangiferaindicae* e *X.a.* pv. *vitians* apresentaram valores de similaridade de 97,3% e 97,7%, respectivamente com a espécie Tipo *X.a.* pv. *axonopodis.* Quando comparadas com a espécie *X. citri,* as linhagens de *X.a.* pv. *mangiferaindicae* e *X.a.* pv. *vitians* apresentaram valores de similaridade de 98,5% e 98,9%, respectivamente. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, aliado ao fato de que *X. citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2005) anteriormente estava classificada como *X. axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995), sugerimos que a posição taxonômica desse patógeno seja revista. Nosso questionamento fica reforçado pelo fato de que Young e colaboradores (2008) propuseram que todas as espécies que apresentarem valores de similaridade entre sequências de genes *housekeeping* superiores a 96% devem ser consideradas membros de uma mesma espécie.

A confirmação de que as linhagens de *X.* sp. pv. *viticola, X.* sp. pv. *betae* e *X.* sp. pv. *paulliniae* pertencem à espécie *X. axonopodis* através de experimentos de amplificação com *primers* para esta espécie, hibridização DNA-DNA e análise de multilocus, representaram uma contribuição significativa nos estudos de taxonomia do gênero.

Parte III. Diferenciação dos patovares da espécie *Xanthomonas campestris,* patogênica às crucíferas, e desenho de *primers* específicos

1. Diferenciação dos patovares de *X. campestris* por PCR-RFLP do gene *rpoB*

Com o objetivo de se diferenciar os seis patovares da espécie *X. campestris,* as linhagens de *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}), *X.c.* pv. *aberrans* (IBSBF 885^{P}), *X.c.* pv. *armoraciae* (IBSBF 1102^{P}), *X.c.* pv. *barbariae* (IBSBF 773^{P}), *X.c.* pv. *incanae* (IBSBF 2903^{P}) e *X.c.* pv. *raphani* (IBSBF 1590^{P}) foram submetidas inicialmente à amplificação com o par de *primers* rpoB2F/3R (Tabela 2). Os DNAs de todas as linhagens testadas apresentaram sinal positivo de amplificação com fragmento de aproximadamente 800 pb, correspondentes à parte do gene *rpoB.* Os produtos foram submetidos a experimentos de restrição enzimática (PCR-RFLP) utilizando-se as endonucleases *Afa* I, *Alu* I, *Cfo* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hsp* 92 II, *Mbo* I e *Taq* I.

Quando submetidos à digestão com *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hsp92* II e *Taq* I, os DNAs de todas as linhagens apresentaram o mesmo perfil de restrição. Nas digestões com *Afa* I, apenas *X.c.* pv. *barbarae* apresentou perfil distinto das demais linhagens, sendo que estas se mostraram idênticas entre si. Com a utilização das enzimas *Hpa* II e *Mbo* I, apenas o DNA da linhagem de *X.c.* pv. *raphani* pode ser diferenciado. As digestões com a enzima *Cfo* I revelaram perfis idênticos entre *X.c.* pv. *aberrans/ X.c.* pv. *campestris* e entre *X.c.* pv. *barbarae/ X.c.* pv. *raphani*. As linhagens de *X.c.* pv. *incanae* e *X.c*. pv. *armoraciae* apresentaram perfis distintos entre si e das demais linhagens testadas (Figura 9).

As enzimas que apresentaram os melhores resultados foram utilizadas em digestões duplas nas seguintes combinações: *Cfo* I/*Afa* I; *Cfo* I/*Mbo* I ; *Cfo* I/*Alu* I. Nas digestões utilizando-se as combinações *Cfo* I/*Afa* I e *Cfo* I/*Mbo* I as linhagens de *X.c.* pv. *raphani*, *X.c.* pv. *barbariae* e *X.c.* pv *armoraciae* puderam ser claramente diferenciadas dos patovares *X.c.* pv. *campestris, X.c.* pv. *aberrans* e *X.c.* pv. *incanae*, que apresentaram o mesmo perfil de restrição entre si (Figura 9).

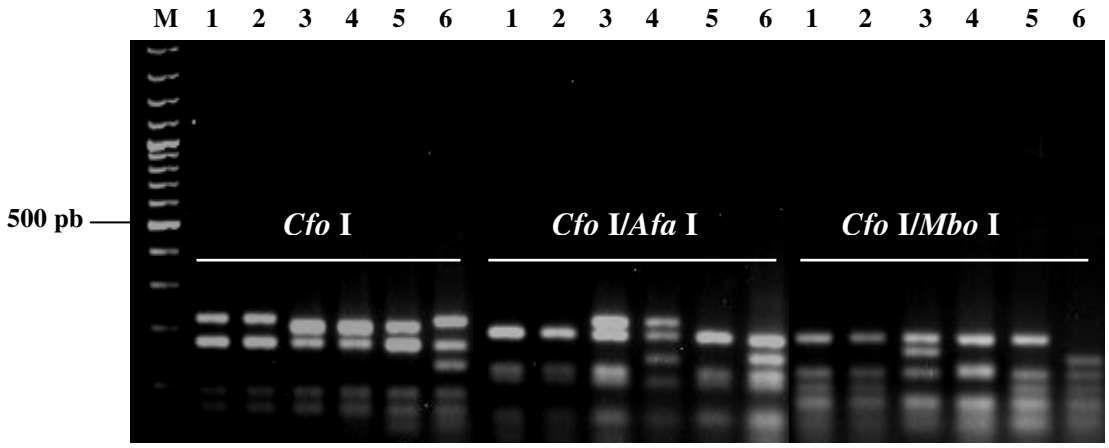


Figura 9. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene *rpoB* utilizando-se as enzimas *Cfo* I; *Cfo* I/*Afa* I; *Cfo* I/*Mbo* I. **(M)** Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (**1**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**2**) *X.c.* pv. *aberrans* (IBSBF 885^{P}); (**3**) *X.c.* pv. *raphani* (IBSBF 884^{P}); (**4**) *X.c.* pv. *barbarae* (IBSBF 773^{P}); (**5**) *X.c.* pv. *incanae* (IBSBF 2903^{P}); (**6**) *X.c.* pv. *armoraciae* (IBSBF 1102^{P}).

As digestões duplas de *Cfo* I/*Alu* I revelaram os melhores resultados uma vez que todos os patovares da espécie *X. campestris* puderam ser diferenciados (Figura 10, canaletas 3, 4, 5 e 6) exceto *X.c.* pv. *campestris* e *X.c.* pv. *aberrans* (Figura 10, canaletas 1 e 2) que em todos os experimentos apresentaram perfis de resrição idênticos.

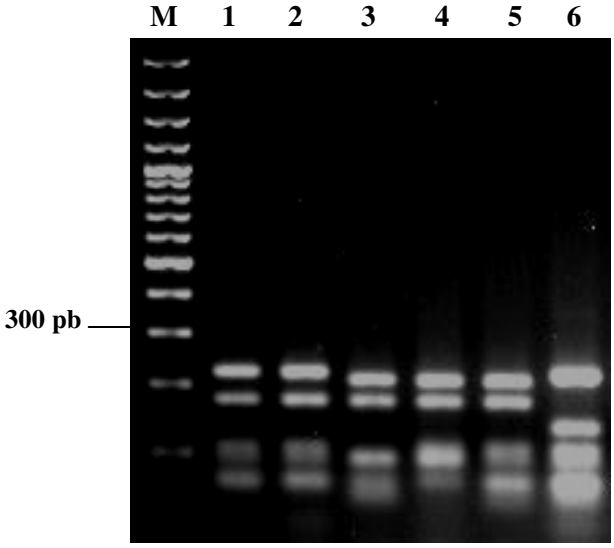


Figura 10. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes a parte do gene *rpoB* utilizando-se a combinação das enzimas *Cfo* I/*Alu* I. **(M)** Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (**1**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**2**) *X.c.* pv. *aberrans* (IBSBF 885^{P}); (**3**) *X.c.* pv. *raphani* (IBSBF 884^{P}); (**4**) *X.c.* pv. *barbarae* (IBSBF 773^{P}); (**5**) *X.c.* pv. *incanae* (IBSBF 2903^{P}); (**6**) *X.c.* pv. *armoraciae* (IBSBF 1102^{P}).

A técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB* foi empregada em análises fitossanitárias no Laboratório de Bacteriologia Vegetal - Instituto Biológico, Campinas, SP, a partir de materiais vegetais de repolho e couve-flor apresentando sintomas de mancha foliar bacteriana (Junho/2007; Julho/2010, provenientes de inúmeras regões do país). Bactérias com características morfológicas de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas* foram isoladas das lesões e submetidas à extração de DNA genômico para os experimentos de PCR-RFLP. Além dos DNAs das bactérias isoladas, foram incluídos os DNAs dos seis patovares da espécie *X. campestris*, *X.c*. pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}), *X.c.* pv. *aberrans* (IBSBF 885^{P}), *X.c.* pv. *armoraciae* (IBSBF 1102^{P}), *X.c*. pv. *barbariae* (IBSBF 773^{P}), *X.c.* pv. *incanae* (IBSBF 2903^{P}) e *X.c.* pv. *raphani* (IBSBF 1590^{P}) e os resultados obtidos nas digestões utilizando se as enzimas *Cfo* I, *Cfo* I/*Afa* I, *Cfo* I/*Mbo* I e *Cfo* I/Afa I possibilitaram a identificação das bactérias isoladas como *X.c.* pv. *armoraciae.*

A técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB* desenvolvida neste estudo se constitui na primeira descrição de metodologia capaz de efetuar a diferenciação dos patovares de *X. campestris*, sendo este o primeiro relato do patovar *X.c.* pv. *armoraciae* no Brasil.

2. Desenvolvimento de *primers* para a espécie *X. campestris*

Diante dos resultados obtidos nos experimentos de PCR-RFLP do gene *rpoB*, foi avaliada a possibilidade de se desenvolver *primers* específicos para cada patovar da espécie *X. campestris.* Com esse objetivo, os DNAs dos seis patovares de *X. campestris, X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}), *X.c.* pv. *aberrans* (IBSBF 885^{P}), *X.c.* pv. *armoraciae* (IBSBF 1102^{P}), *X.c.* pv. *barbariae* (IBSBF 773^{P}), *X.c.* pv. *incanae* (IBSBF 2903^{P}) e *X.c.* pv. *raphani* (IBSBF 1590^{P}), foram submetidos à amplificação com o par de *primers* rpoB2F/3R (Tabela 2). Posteriormente, os produtos de amplificação foram purificados, sequenciados e comparando-se as sequências de parte do gene *rpoB* dos seis patovares de *X. campestris* não foram observadas diferenças em nível infra-específico que permitissem o desenho de *primers* específicos para cada patovar. Ainda visando o desenho de *primers* para os diferentes patovares de *X. campestris*, os DNAs destas linhagens também foram submetidos à amplificação com pares de *primers* correspondentes a partes dos genes *atpA, recA* e *rpoA* (Tabela 2). Os produtos de amplificação foram purificados, seqüenciados e a

análise das sequências também não revelou diferenças que permitissem o desenvolvimento de *primers* em nível infraespecífico.

Diante disso, as sequências de parte do gene *rpoB* dos seis patovares da espécie *X. campestris* foram comparadas com sequências de outras espécies Tipo do gênero *Xanthomonas* obtidas neste estudo e, então, diferenças em nível interespecífico foram observadas, o que permitiu o desenho de um *primer* reverso, denominado xcamR (Tabela 2). Devido à impossibilidade do desenho de *primer* no sentido "*forward*", o *primer* rpoB2F foi utilizado nos experimentos de amplificação. A linhagem de *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}) foi utilizada nos experimentos para se determinar as melhores condições de amplificação do par de *primers* rpoB2F/xcam que resultaram na amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb (Tabela 3).

2.1. Testes de especificidade e determinação do nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR

Testes de especificidade foram efetuados utilizando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR incluindo-se além dos seis patovares da espécie *X. campestris,* outros microorganismos patogênicos às crucíferas dentre eles *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF 863^{T})*, Pectobacterium atrosepticum* (IBSBF 1819^{T})*, Pseudomonas cichorii* (IBSBF 1784^{T}) e *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (IBSBF 1121^{P}) (Tabela 1). Os resultados revelaram que apenas os DNAs correspondentes aos patovares da espécie *X. campestris* apresentaram amplificação do fragmento específico de aproximadamente 700 pb, confirmando que, dentre os patógenos de crucíferas, o par de *primers* rpoB2F/xcamR mostrou-se específico para a espécie *X. campestris* (Figura 11).

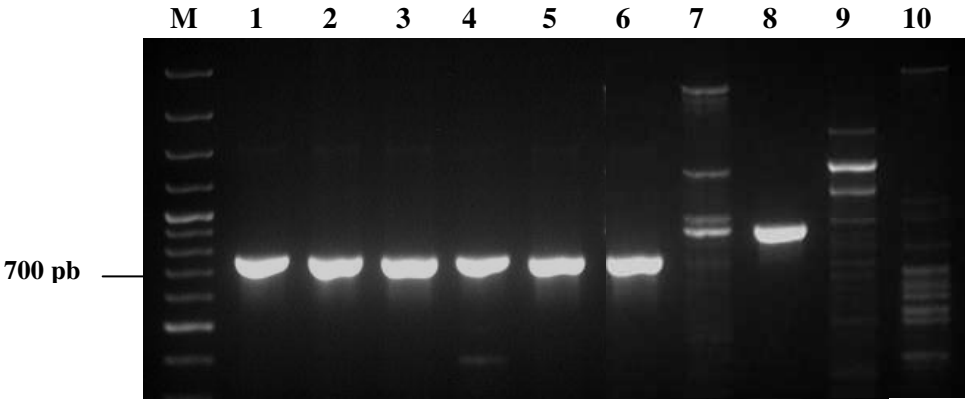


Figura 11. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR. (**M**) marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**2**) *X.c.* pv. *aberrans* (IBSBF 885^{P}); (**3**) *X.c.* pv. *raphani* (BSBF 884^{P}); (**4**) *X.c.* pv. *barbarae* (IBSBF 773^{P}); (**5**) *X.c.* pv. *armoraciae* (IBSBF 1102^{P}); (**6**) *X.c.* pv. *incanae* (IBSBF 2903^{P}); (**7**) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF 863^{T}); (**8**) *Pectobacterium atrosepticum* (IBSBF 1819^{T}); (**9**) *Pseudomonas cichorii* (IBSBF 1784^{T}); (**10**) *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (IBSBF 1121^{P}).

Posteriormente foram efetuados testes para se determinar o nível de sensibilidade da técnica de PCR empregando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR em reações com diferentes quantidades de DNA de *X.c.* pv. *campestris* que variaram de 200 ng a 0,001 pg, sendo que foi possível a observação do fragmento esperado de 700 pb em quantidade equivalente a 0,1 pg de DNA genômico (Figura 12).

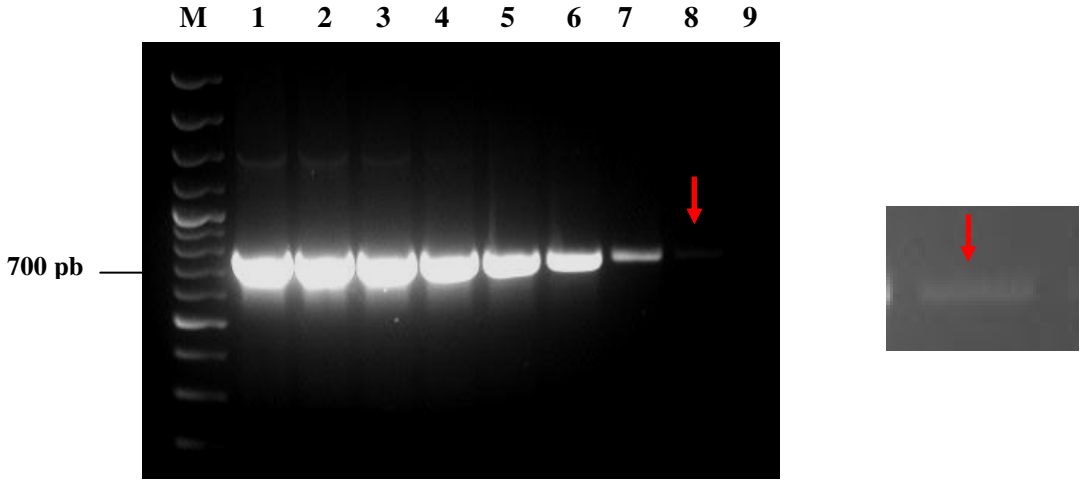


Figura 12. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR com diferentes quantidades de DNA da linhagem *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}). **(M)** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) 200 ng; (**2**) 100 ng; (**3**) 10 ng; (**4**) 1 ng; (**5**) 0,1 ng; (**6**) 0,01 ng; (**7**) 1 pg; (**8**) 0,1 pg; (**9**) 0,01 pg. No detalhe foto ampliada da canaleta 8 contendo 0,1 pg.

Neste estudo, a análise de PCR-RFLP do gene *rpoB* também foi utilizada como ferramenta para diferenciação dos patovares de *X. campestris*.

A diferenciação de espécies bacterianas através desta técnica tem sido relatada na literatura, como no estudo realizado por al Dahouk e colaboradores (2005) utilizando-se diferentes genes (*omp2, omp25, omp31, dnaK, ery* e *rpsL*) em análises de espécies do gênero *Brucella*. Ainda, análises de PCR-RFLP dos genes *rpfB* e *atpD* foram efetuadas por Simões e colaboradores (2007) para investigar a variabilidade entre as diferentes espécies de *Xanthomonas* e os autores confirmaram a eficiência desta técnica para a diferenciação das espécies do gênero. Ainda dentro do gênero *Xanthomonas*, experimentos de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr possibilitaram a diferenciação de espécies patogênicas à cana-de-açúcar (DESTÉFANO et al., 2003) e também a diferenciação de *X. citri* subsp. *citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*, patógenos de citros (DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2002). No presente estudo, a técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB* mostrou-se eficiente na diferenciação da maioria das espécies do gênero *Xanthomonas* tendo sido considerada uma ferramenta molecular que otimizará o processo de identificação e diagnóstico de espécies estreitamente relacionadas como por exemplo *X. gardneri*, *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria/X. perforans*, patógenos de tomateiro (Resultados - Parte I – artigo científico). Esta mesma técnica também foi empregada para a diferenciação dos seis patovares da espécie *X. campestris*, patogênica a crucíferas. Os perfis de restrição obtidos nas digestões utilizando-se as enzimas *Cfo* I/*Alu* I permitiram a diferenciação dos patovares *X.c*. pv. *raphani*, *X.c.* pv. *barbariae*, *X.c*. pv *armoraciae*, *X.c.* pv. *incanae* e *X.c.* pv. *campestris*/*X.c*. pv. *aberrans*, sendo que esses dois últimos patovares apresentaram perfis idênticos entre si. A não diferenciação dos patovares *X.c.* pv. *campestris* e *X.c*. pv. *aberrans* confirmam a proposição sugerida em estudo baseado em testes de patogenicidade de que o patovar de *X.c.* pv. *aberrans* seja incluído no patovar *X.c*. pv. *campestris* (VICENTE et al., 2001). Ainda, Fargier e Manceau (2007) também propuseram que *X.c*. pv. *aberrans* deve ser renomeada como *X.c.* pv. *campestris* por meio de ensaios de patogenicidade efetuados com 47 linhagens pertencentes à espécie *X. campestris*. Análises de multilocus utilizando-se os genes *dnaK*, *fyuA, gyrB* e *rpoD* de 42 linhagens pertencentes aos diferentes patovares da espécie *X. campestris* revelaram uma alta relação filogenética entre *X.c*. pv. *campestris* e *X.c.* pv. *aberrans*, não sendo possível a diferenciação desses dois patovares. Por outro lado,

embora Alvarez e colaboradores (1994) tenham considerado *X.c.* pv. *raphani* e *X.c.* pv. *armoraciae* como o mesmo patógeno e Vicente e colaboradores (2001) tenham proposto que o patovar *X.c.* pv. *raphani* deveria ser alocado dentro do patovar *X.c.* pv. *campestris*, nos nossos experimentos esses patovares puderam ser claramente diferenciados, indicando que esses patovares devem ser melhor investigados.

Ainda, a técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB* pode ser empregada na identificação de bactérias isoladas de material vegetal de repolho e couve-flor, se constitui na primeira descrição de metodologia capaz de efetuar a diferenciação dos patovares de *X. campestris,* e, também, confirmou o primeiro relato do patovar *X.c.* pv. *armoraciae* no Brasil. Estes resultados poderão contribuir de forma significativa em estudos envolvendo os patógenos pertencentes a essa espécie e esta técnica também poderá ser utilizada para o esclarecimento da ocorrência ou não de diferentes patovares de *X. campestris* no Brasil.

As análises de PCR-RFLP representam uma técnica rápida, de baixo custo e facilmente reprodutível, e pode auxiliar a comunidade científica em futuros estudos epidemiológicos, taxonômicos e de identificação de linhagens de *Xanthomonas* em nível inter e infraespecífico.

Outra ferramenta molecular que tem sido bastante utilizada para identificação e detecção de microrganismos é o desenho de *primers* específicos baseado em diferenças observadas nas sequências de diversos genes. O desenvolvimento de *primers* específicos tem se mostrado de grande importância para a detecção de bactérias fitopatogênicas (LORETI; GALLELLI, 2001). No presente estudo, analisando-se as sequências do gene *rpoB* das espécies Tipo do gênero *Xanthomonas* e dos diferentes patovares da espécie *X. campestris* foi possível o desenho do *primer* reverso xacmR que associado ao *primer* rpoB2F em experimentos de amplificação, mostrou-se específico para a espécie *X. campestris,* uma vez que as diferenças observadas nas sequências do gene *rpoB* não foram suficientes para o desenvolvimento de *primers* em nível infraespecífico. Resultados semelhantes foram obtidos por Berg e colaboradores (2005) que descreveram *primers* para a detecção da espécie *X. campestris* em sementes, porém também não conseguiram a diferenciação em nível de patovar. Os testes de especificidade do par de *primers* rpoB2F/xcamR revelaram que, dentre os outros gêneros patogênicos às crucíferas, apenas o DNA dos patovares *X. campestris* apresentou produto de amplificação de aproximadamente

700 pb, indicando que esta metodologia pode ser futuramente utilizada em análises de sanidade em sementes.

Os experimentos de nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* rpoB2F/xcamR, revelaram capacidade de detecção a partir de 0,1 pg de DNA genômico de *X. campestris.* Variações nos níveis de detecção têm sido verificadas dependendo da espécie bacteriana estudada. Pan e colaboradores (1999) desenvolveram *primers* específicos para *X. albilineans* com sensibilidade de 1,25 pg de DNA genômico; Balani (2009) alcançou limite de detecção de 1 ng para *primers* específicos para *X. citri* subsp. *malvacearum*. Também, *primers* desenvolvidos para *Pseudomonas corrugata* apresentaram nível de detecção de 20 pg (CATARA et al., 2000) e *primers* específicos para *Pseudomonas avellanae,* desenhados à partir do gene *hrpW,* 20 pg de DNA genômico (LORETI; GALLELLI, 2001). Assim, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o par de *primers* mostrou-se específico e altamente sensível podendo ser indicado na detecção e identificação de linhagens pertencentes à espécie *X. campestris.*

Parte IV. Desenvolvimento de *primers* para *X. translucens,* patogênica às gramíneas e cereais

1. Desenho do par de *primers* trans1F/trans2R

DNAs dos diferentes patovares da espécie *X. translucens*, *X.t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^{T}), *X.t.* pv. *cerealis* (IBSBF 580^{P}), *X.t.* pv. *undulosa* (IBSBF 579^{P}), *X.t.* pv. *hordei* (IBSBF 686^{P}), *X.t.* pv. *secalis* (IBSBF 827^{P}), *X.t.* pv. *arrhenatheri* (IBSBF 1344^{P}), *X.t.* pv. *graminis* (IBSBF 688^{P}), *X.t.* pv. *phlei* (IBSBF 1340^{P}), *X.t.* pv. *phleipratensis* (IBSBF 692^{P}) e *X.t.* pv. *poae* (IBSBF 1339^{P}), foram submetidos à amplificação com o par de *primers* rpoB2F/3R (Tabela 2), correspondente a parte do gene *rpoB*, com o objetivo de se desenvolver *primers* para os patovares de *X. translucens* de ocorrência no Brasil (*cerealis, secalis, translucens* e *undulosa*). Os produtos de amplificação foram purificados, sequenciados, mas as sequências não apresentaram diferenças suficientes que permitissem o desenho de *primers* em nível infraespecífico tendo sido observadas variações de poucos nucleotídeos. Os DNAs foram submetidos a amplificações com *primers* correspondentes a

parte dos genes *atpA, recA* e *rpoA* e as sequências também se mostraram muito semelhantes, impossibilitando o desenho de *primers* para os diferentes patovares.

Diante deste resultado, sequências de parte do gene *rpoB* dos patovares de *X. translucens* foram comparadas com sequências do mesmo gene de outras espécies Tipo do gênero e as diferenças observadas possibilitaram o desenho do par de *primers* trans1F/trans2R (Tabela 2), específico para a espécie *X. translucens*.

1.1. Testes de especificidade e determinação do nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* trans1F/trans2R

Após a determinação das melhores condições de amplificação com o par de *primers* trans1F/trans2R (Tabela 3) foram realizados testes de especificidade utilizando-se DNAs das espécies Tipo do gênero *Xanthomonas* (Figura 13), patovares da espécie *X. translucens* e, ainda, outros patógenos de gramíneas e cereais como *Pseudomonas fuscovaginae* (IBSBF 975T) e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (IBSBF 281^T) (Figura 14). Os resultados mostraram sinal positivo de amplificação do fragmento específico de aproximadamente 300 pb para os DNAs correspondentes aos patovares de *X. translucens* e à espécie *X. hyacinthi* (Figuras 13 e 14).

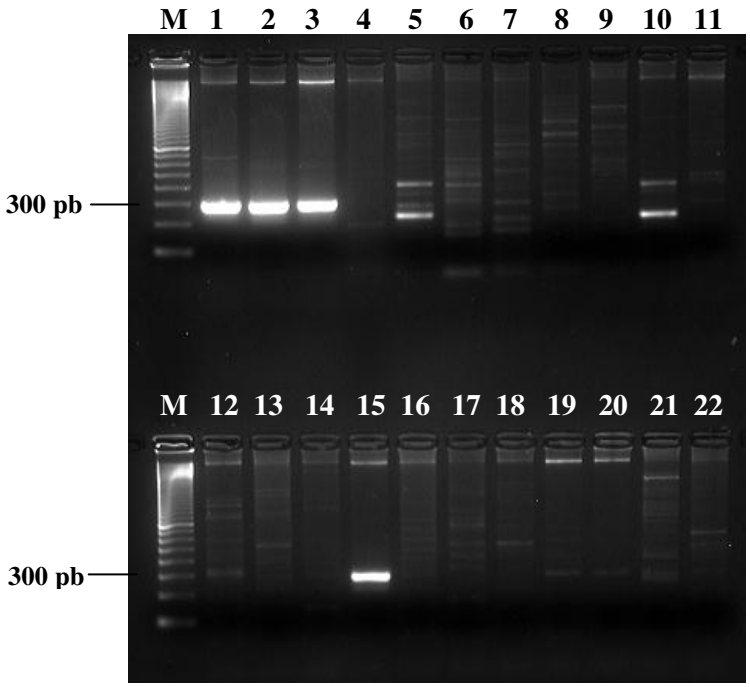


Figura 13. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* trans1F/2R. (**M**) marcador de peso molecular de 100pb (Amersham Biosciences); (**1**) *X.t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^{T}); (**2**) *X.t.* pv. *undulosa* (IBSBF 579^{P}); (**3**) *X.t.* pv. *cerealis* (IBSBF 580^{P}); (**4**) *X.c.* pv. *campestris* (IBSBF 1163^{T}); (**5**) *X.citri.* subsp. *citri* (IBSBF 1412^{P}); (**6**) *X .albilineans* (IBSBF 1374^{T}); (**7**) *X. arboricola* pv. *juglandis* (IBSBF 1375^{T}); (**8**) *X.a.* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^{T}); (**9**) *X. bromi* (IBSBF 1567^{T}); (**10**) *X. cassavae* (IBSBF 270^{P}); (**11**) *X. codiae* (IBSBF 1389^{T}); (**12**) *X. cucurbitae* (IBSBF 268^{T}); (**13**) *X. fragariae* (IBSBF 1371^{T}); (**14**) *X. hortorum* pv. *hederae* (IBSBF 1391^{P}); (**15**) *X. hyacinthi* (IBSBF 1390^{P}); (**16**) *X. melonis* (IBSBF 68^{T}); (**17**) *X.o.* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^{T}); (**18**) *X. pisi* (IBSBF 1356^{T}); (**19**) *X. sacchari* (IBSBF 1313^{T}); (**20**) *X. theicola* (IBSBF 1565^{T}); (**21**) *X. vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^{T}); (**22**) *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}).

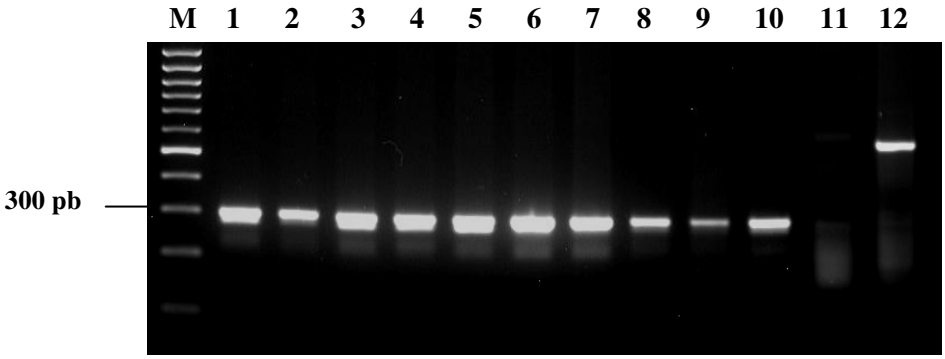


Figura 14. Produtos de amplificação com o par de *primers* trans1F/trans2R. (**M**) marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). (**1**) *X.t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^{T}); (**2**) *X.t.* pv. *cerealis* (IBSBF 580^{P}); (**3**) *X.t.* pv. *undulosa* (IBSBF 579^{P}); (**4**) *X.t.* pv. *hordei* (IBSBF 686^{P}); (**5**) *X.t.* pv. *secalis* (IBSBF 827^{P}); (**6**) *X.t.* pv. *arrhenatheri* (IBSBF 1344^{P}); (**7**) *X.t.* pv. *graminis* (IBSBF 688^{P}); (**8**) *X.t.* pv. *phlei* (IBSBF 1340^{P}); (**9**) *X.t.* pv. *phleipratensis* (IBSBF 692^{P}); (**10**) *X.t.* pv. *poae* (IBSBF 1339^{P}); (**11**) *Pseudomonas fuscovaginae* (IBSBF 975^{T}); (**12**) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (IBSBF 281^{T}).

Ainda, foram realizados experimentos de determinação da sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* trans1F/trans2R em reações contendo DNA da linhagem de *X.t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^{T}) em quantidades que variaram de 200 ng a 1 pg. Os resultados revelaram que foi possível a observação do fragmento esperado de 300 pb em quantidade equivalente a 0,01 ng de DNA genômico (Figura 15).

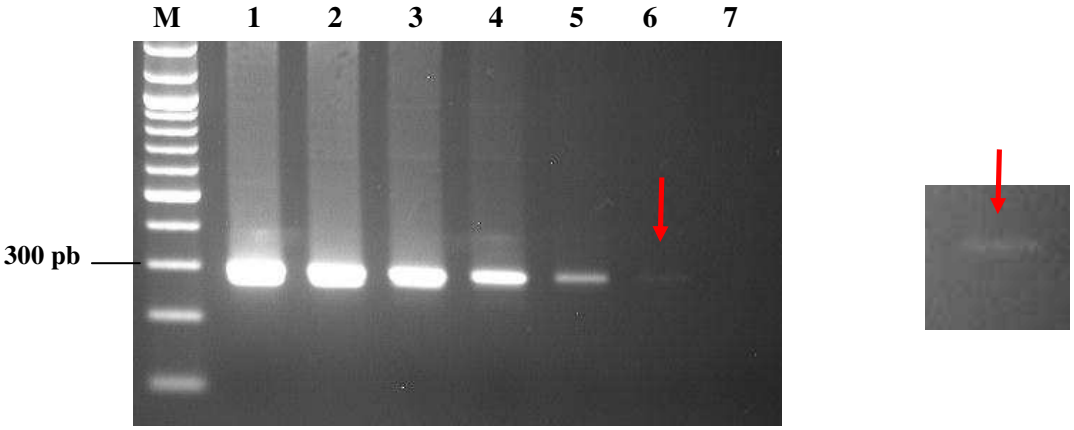


Figura 15. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* trans1F/trans2R com diferentes quantidades de DNA da linhagem *X.t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^{T}). **(M)** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) 200 ng; (**2**) 100 ng; (**3**) 10 ng; (**4**) 1 ng; (**5**) 0,1 ng; (**6**) 0,01 ng; (**7**) 1 pg. No detalhe foto ampliada da canaleta 6 contendo 0,01 ng.

Linhagens pertencentes à espécie *X. translucens* têm sido objeto de diversos estudos taxonômicos, uma vez que a identificação e classificação dos patovares dessa espécie, patogênica às gramíneas e cereais, é confusa (RADEMAKER et al., 2006). Em testes serológicos utilizando-se anticorpos monoclonais e policlonais, os patovares *cerealis, hordei, secalis, translucens* e *undulosa* não puderam ser diferenciados, uma vez que formaram um grupo homogêneo (BRAGARD: VERHOYEN, 1993). Esses mesmos resultados foram obtidos em análises de ácidos graxos efetuadas por Stead (1989). Além disso, análises das sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr revelaram que os patovares da espécie *X. translucens* possuem uma alta similaridade, indicando que estes patógenos são estreitamente relacionados (MAES et al., 1996). Ainda, estudos moleculares utilizando-se a técnica de rep-PCR possibilitaram a diferenciação dos patovares *arrhenatheri, graminis, phlei, phleipratensis, poae* e *cerealis* (RADEMAKER et al., 2006).

No presente estudo, não foi possível o desenho de *primers* em nível infraespecífico

devido à alta similaridade entre as sequências dos diferentes genes analisados, entretanto, foi possível o desenho do par de *primers* trans1F/trans2R, que mostrou-se específico para a espécie *X. translucens*, inclusive quando outras espécies de *Xanthomonas* patogênicas às gramíneas e cereais como *X. albilineans* (IBSBF 1374^{T}), *X.a.* pv. *vasculorum* (IBSBF 695^{P}), *X.o.* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^{T}), *X. vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^{P}) foram testadas. Ainda, nos testes de especificidade efetuados com este par de *primers*, embora o DNA da espécie *X. hyacinthi* também tenha apresentado produto de amplificação, esse resultado não foi considerado significativo, uma vez que esta espécie é patogênica a ornamentais, especificamente ao jacinto. *Primers* específicos para a detecção da espécie *X. translucens* em sementes de trigo foram desenhados a partir de análises da região espaçadora 16S-23S DNAr por Maes e colaboradores (1996) e nesse estudo os autores concluíram que a alta similaridade entre as sequências inviabilizou o desenvolvimento de *primers* em nível infraespecífico. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo com o par de *primers* trans1F/trans2R, que apresentou sinal positivo de amplificação para todos os patovares da espécie *X. translucens.* Também, esse par de *primers* mostrou nível de sensibilidade de 0,01 ng de DNA genômico, considerado muito bom quando comparado com dados de literatura (ver Parte II – item 2.1).

Parte V. Desenvolvimento de *primers* para as espécies *X. cucurbitae* e *X. melonis*, patogênicas ao melão

1. Desenho do par de *primers* mecF/mecR

Os DNAs das espécies *X. cucurbitae* e *X. melonis* foram submetidos a amplificação com o par de *primers* pHR/p322 anti (Tabela 2) correspondentes à região espaçadora 16S-23S DNAr, com o objetivo de se desenvolver *primers* específicos para cada um desses patógenos. Os produtos de amplificação foram sequenciados e a análise das sequências revelou diferenças que possibilitaram o desenho do par de *primers* mecF/mecR que, após a padronização das condições, resultou na amplificação de um fragmento de 300 pb para o DNA de *X. cucurbitae* (IBSBF 268^{T}) e 350 pb para o DNA de *X. melonis* (IBSBF 68^{T}) (Figura 16).

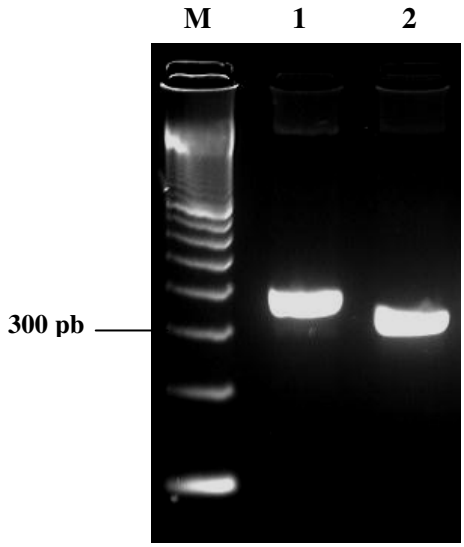


Figura 16. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR. (**M**) marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) *X. melonis* (IBSBF 68^{T}); (**2**) *X. cucurbitae* (IBSBF 268^{T}).

1.1. Testes de especificidade e determinação do nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR

Posteriormente foram realizados testes de especificidade deste par de *primers* utilizando-se DNAs de outros patógenos de melão: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (IBSBF 1851^{T}), *Bacillus licheniformis* (IBSBF 955), *Pantoea agglomerans* (IBSBF 1417^{T}), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF 863^{T}), *Pseudomonas cichorii* (IBSBF 1784^{T}) e *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (IBSBF 1258^{P}). Os resultados revelaram que apenas os DNAs das espécies *X cucurbitae* e *X. melonis* apresentaram os produtos de amplificação esperados, confirmando a especificidade deste par de *primers* e possibilitando, inclusive, a diferenciação dessas duas espécies (Figura 17).

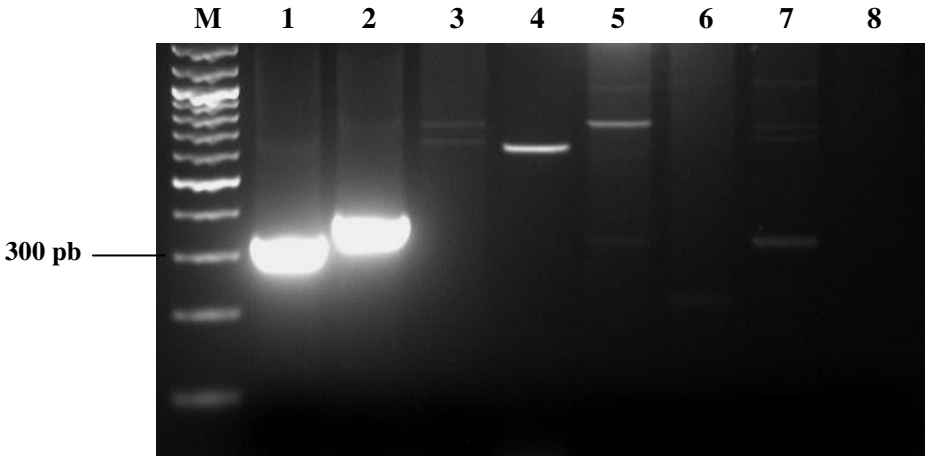


Figura 17. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR. (**M**) marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). (**1**) *X. cucurbitae* (IBSBF 268^{T}); (**2**) *X. melonis* (IBSBF 68^{T}); (**3**) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (IBSBF 1851^{T}); (**4**) *Bacillus licheniformis* (IBSBF 955); (**5**) *Pantoea agglomerans* (IBSBF 1417^{T}); (**6**) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (IBSBF 863^{T}); (**7**) *Pseudomonas cichorii* (IBSBF 1784^{T}); (**8**) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (IBSBF 1258^{P}).

Ainda, foram realizados experimentos de determinação da sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR em reações contendo DNA das linhagens de *X. melonis* (IBSBF 68^{T}) e *X. cucurbitae* (IBSBF 268^{T}) em quantidades que variaram de 100 ng a 1 pg. Os resultados revelaram que foi possível a observação do fragmento esperado de 300 pb para o DNA de *X. cucurbitae* e 350 pb para o DNA de *X. melonis* (Figura 18 e 19).

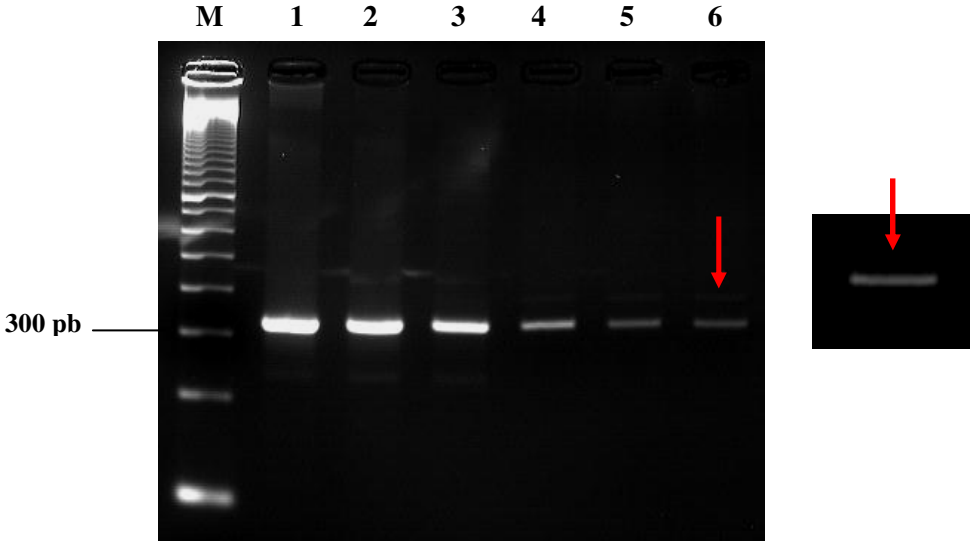


Figura 18. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR com diferentes quantidades de DNA da espécie *X. cucurbitae* (IBSBF 268^{T}). **(M)** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) 100 ng; (**2**) 10 ng; (**3**) 1 ng; (**4**) 0,1 ng; (**5**) 0,01 ng; (**6**) 1 pg. No detalhe foto ampliada da canaleta 6 contendo 1 pg.

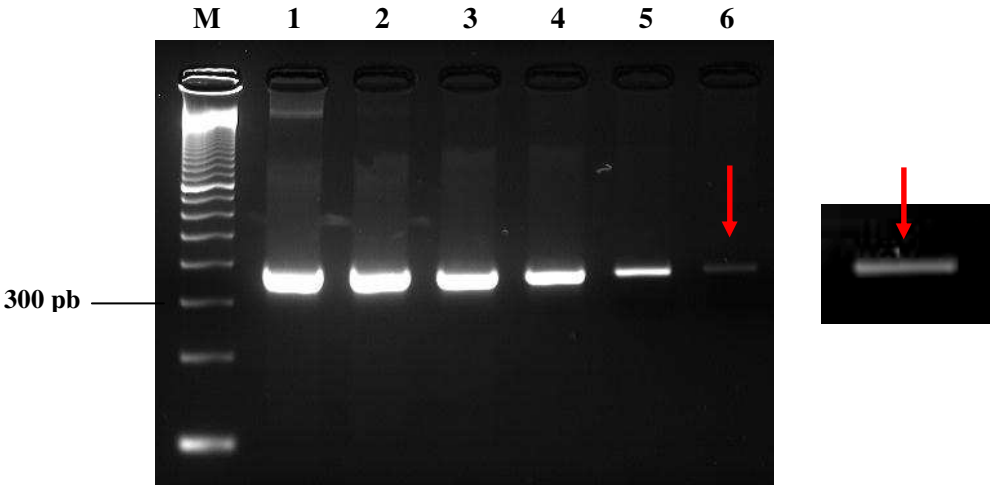


Figura 19. Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR com diferentes quantidades de DNA da espécie *X. melonis* (IBSBF 68^{T}). **(M)** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); (**1**) 100 ng; (**2**) 10 ng; (**3**) 1 ng; (**4**) 0,1 ng; (**5**) 0,01 ng; (**6**) 1 pg. No detalhe foto ampliada da canaleta 6 contendo 1 pg.

A família das cucurbitáceas possui grande número de espécies, é taxonomicamente bem definida e envolve várias culturas agrícolas como pepino, abóbora, melancia e melão (LOVIC; HOPKINS, 2003). Dentre as culturas da família Cucurbitaceae, o melão (*Cucumis melo*) está entre as mais cultivadas no mundo (RENNER et al., 2007) sendo que, no Brasil, o cultivo se estabeleceu na década de 60 principalmente nos estados de São Paulo e Rio Grande do Norte, tendo se expandido também para a região nordeste no início dos anos 80, portanto, o país tornou-se um dos maiores produtores da América do Sul (http://www.hortibrasil.org.br/classificacao/melao/melao.html).

Diversas espécies bacterianas como *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli, Bacillus licheniformis, Pantoea agglomerans, Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans, X cucurbitae* e *X. melonis* são responsáveis por doenças em cucurbitáceas, sendo que *X. melonis* foi descrita no Brasil por Rodrigues Neto e colaboradores (1984). Há relatos da ocorrência desta bactéria apenas no Brasil nos Estados da Região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, incluindo Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, São Paulo e Distrito Federal (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

Uma vez que a transmissão de *X. melonis* se dá principalmente por meio de sementes contaminadas, a identificação e detecção desse fitopatógeno é fundamental para

se evitar a sua introdução em outras regiões e/ou países. No presente estudo o par de *primers* mecF/mecR, desenvolvido à partir de diferenças observadas nas sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr, foi empregado em experimentos de amplificação utilizando-se DNAs das espécies *X. cucurbitae* e *X. melonis* e também de outros patógenos de melão, os quais resultaram em amplificação de fragmentos específicos de diferentes tamanhos para as duas espécies do gênero *Xanthomonas* (300 pb para *X. cucurbitae* e 350 pb para *X. melonis*). Estes resultados indicaram que este par de *primers* poderá permitir a detecção simultânea dessas duas espécies bacterianas em um único experimento de amplificação. Além disso, experimentos para determinação da sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* mecF/mecR revelaram sinal positivo de amplificação à partir de 1 pg de DNA genômico de *X. cucurbitae* e *X. translucens.*

O desenvolvimento de ferramentas moleculares para a detecção de patógenos de cucurbitáceas foi relatado para a espécie *A. avenae* subsp. *citrulli.* Randhawa e colaboradores (2001) obtiveram a detecção desta bactéria em sementes de melão e melancia por meio de Bio-PCR. Também, Walcott e colaboradores (2000) utilizaram a técnica de IMS-PCR (*Immunomagneic Separation and Polymerase Chain Reaction*) que possibilitou a detecção da espécie *A. avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melancia. Experimentos de PCR-multiplex foram efetuados por Fessehaie e colaboradores (2009) para detecção simultânea de *A. avenae* subsp. *citrulli* e *Didymalla bryoniae*, fungo patogênico a melão e abóbora, à partir de sementes. Devido à ausência de relatos de ferramentas moleculares para a identificação e detecção das espécies de *X. cucurbitae* e *X. melonis,* os resultados obtidos no presente estudo forneceram uma significativa contribuição nos estudos destes patógenos, uma vez que o par de *primers* mecF/mecR mostrou-se específico e altamente sensível quando comparado com dados de sensibilidade da técnica relatados na literatura (ver Parte II – Item 2.1). Ainda, uma vez que os frutos de melão contaminados por *X. melonis* não apresentam sintomas externos, os *primers* desenvolvidos poderão ser úteis em amostragens de frutos destinados para os mercados interno e para exportação, garantindo, inclusive, que a espécie *X. melonis*, de ocorrência restrita no Brasil, não seja introduzida em outros países produtores e importadores deste fruto.

CONCLUSÕES

- O gene *rpoB* mostrou-se um marcador molecular bastante eficiente para diferenciação de espécies do gênero *Xanthomonas* através da técnica de PCR-RFLP e análises filogenéticas;
- experimentos de amplificação com *primers* específicos para *X. axonopodis,* análise de multilocus utilizando-se os genes *atpA, recA, rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr; e experimentos de hibridização DNA-DNA permitiram concluir que as linhagens de *X.* sp. pv. *betae, X.* sp. pv. *paulliniae* e *X.* sp. pv. *viticola* pertencem à espécie *X. axonopodis*; e que *X.* sp. pv. *eucalypti, X.* sp. pv. *arracaciae* e *X.* sp. pv. *esculenti* não pertencem à essa espécie e tão pouco à *X. campestris*;
- os experimentos de PCR-RFLP do gene *rpoB* permitiram a diferenciação dos patovares *X.c.* pv. *armoraciae, X.c.* pv. *barbariae, X.c.* pv. *incanae, X.c.* pv. *raphani* e *X.c.* pv. *campestris*/*X.c.* pv. *aberrans*;
- as análises das sequências do gene *rpoB* revelaram diferenças que permitiram o desenho do par de *primers* rpoB2F/xcamR, específico para a espécie *X. campestris* com capacidade de detecção a partir de 0,1 pg de DNA genômico; e trans1F/trans2R, específico para a *X. translucens* e com limite de detecção a partir de 10 pg de DNA genômico;
- análises das sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr permitiram o desenho do par de *primers* mecF/mecR, específico para as espécies *X. cucurbitae* (300 pb) e *X. melonis* (350 pb) com limite de detecção a partir de 1 pg de DNA genômico;
- as análises de multilocus dos genes *atpA, recA, rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr efetuadas nesse estudo contribuirão para estudos taxonômicos e filogenéticos de espécies do gênero *Xanthomonas*;
- os *primers* desenvolvidos para *X. campestris, X. translucens, X. cucurbitae* e *X. melonis* mostraram-se específicos e sensíveis e futuramente poderão ser utilizados na identificação e detecção destes fitopatógenos, principalmente nos processos de importação e/ou exportação de lotes de sementes e material vegetal.

REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T., COLSON, P.; DRANCOURT, M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 41, p 5699-5708, 2003.

ADÉKAMBI, T. ; REYNAUD-GAUBERT, M. ; GREUB, G. ; GEVAUDAN, M. J. ; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Amoebal co-culture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 42, p.5493-5501, 2004.

ADÉKAMBI, T.; BERGER, P.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of M*ycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 133–143, 2006a.

ADÉKAMBI, T.; STEIN, A.; CARVAJAL, J.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 44, p. 1268-1273, 2006b.

ADÉKAMBI, T.; SHINNIC, T. M.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 58, p. 1807-1814, 2008.

AL DAHOUK, S.; TOMASO, H.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHOLZ, H. C.; NEUBAUER, H. Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Crit. Rev. Microbiology**, v. 31, p. 191-196, 2005.

ALIZADEH, A.; ARLAT, N. SARRAFI, A.; BOUCHER, C. A. ; BARRAULT, G. Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses of Iranian Strains of *Xanthomonas campestris* from cereals and grasses. **Plant Disease**, v. 81, p. 31-35, 1997.

ALVAREZ, A. M.; BENEDICT A. A.; MIZUMOTO C. Y. HUNTER J. E.; GABRIEL D. W. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. **Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 1449-1457, 1994.

BALANI, D. M. Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 62p., 2009.

BENEDICT, A.A.; ALVAREZ, A. M.; POLLARD, L. W. Pathovar-specific antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* detected with monoclonal antibodies. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 56, p. 572-574, 1990.

BERNECHE-D'AMOURS, A.; GHINET, M. G. ; BEAUDIN, J.; BRZEZINSKI, R.; ROY, S. Sequence analysis of *rpoB* and *rpoD* gene fragments reveals the phylogenetic diversity of actinobacteria of genus *Frankia*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, p. 244-249, 2011.

BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D.L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. **Plant Pathology**, v. 54, p. 426-427, 2005.

BIKANDI, J., SAN MILLÁN, R., REMENTERIA, A., GARAIZAR, J**.** *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **v.**20, p. 798-799., 2004 disponível em: http://insilico.ehu.es/restriction.

BORUKOV, S.; NUDLER, E. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 93-100, 2003.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas* Dowson 1939. *In:* KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** v. I. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland. 1984.

BRAGARD, C.; SINGER, E.; ALIZADEH, A.; VAUTERIN, L.; MARAITE, H. SWINGS, J. *Xanthomonas translucens* from small grains : diversity nd phytopathological relevance. **Phytopathology**, v. 87, p. 1111-1117, 1997.

BRAGARD, C.; VERDIER, V.; MARAITE, H. Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic for small grains. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 61, p. 1010-1026, 1995.

BRAGARD, C.; VERHOYEN, M. Monoclonal antibodies specific for *Xanthomonas campestris* strains pathogenic to wheat and other small grains, in comparison with polyclonal antisera. **Journal of Phytopathology,** v. 139, p. 217-228, 1993.

CATARA, V.; DAWN, A.; CIRVILLERI, G.; VIVIAN, A. Specific oligonucleotide *primers* for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugate* by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. **European Journal of Plant Pathology** , Dordrechet, v.106, p. 753-762, 2000.

CHIN, M. L.; CHIN, C. S.; WONG, C. M. V. L.; ABDULLAH, N.; YIN, W H. Sequence analysis of 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region for differentiation of probiotics *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. **Annals of Microbiology,** v. 58, p. 133-140, 2011.

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H.-J.; FREDERIKSEN, W. C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and

subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 166-178, 2007.

CORRÊA, D. B. A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas. 2011. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000788896

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S**.** *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16s rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 66, p. 3376-3380, 2000.

DA MOTA, F.F., GOMES, E.A., PAIVA, E., ROSADO, A.S. AND SELDIN, L. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology,** v. 39, p. 34-40, 2004.

DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES NETO, J. Rapid differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants by PCR-RFLP of the 16S-23S rDNA spacer region. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 167-172, 2002.

DESTÉFANO, S. A. L.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; FERREIRA, M.; BALANI, D. M. Differentiation of *Xanthomonas* species pathogenic to sugarcane by PCR-RFLP analysis. **European Journal of Plant Pathology,** v. 109, p. 283-288, 2003.

DOWSON, W. J. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. **Hyg. Abt. 2,** v. 100, p. 177-193,1939.

DUBEY, A.; GHORUI, S. K.; KASHYAP, S. K. Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains based on 16S-23S ribosomal RNA intergenic space polymorphism. **Indian Journal of Biotechnology,** v. 8, p. 276-279, 2009.

DUVEILLER, E.; BRAGARD, C.; MARAITE, H. Bacterial leaf streak and black chaff caused by *Xanthomonas translucens.* In: DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKY, L.; RUDOLPH, K. (Eds). **The Bacterial Diseases of Wheat**: **Concepts and Methods of Disease Management,** CIMMYT, Mexico, p.25-47 , 1997.

EGLI, T., AND SCHMIDT, D. Pathogenic variation among the casual agents of bacterial wilt of forage grasses. **Phytopathology Z**., v. 104, p. 138-150, 1982.

EISEN, J. A. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, p. 1105-1123, 1995.

EL-HENDAWY, H. H. Water stress in cucumber cotyledons infected with *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae.* **Folia Microbiologica**, v. 44, p. 530-534, 1999.

FARGIER E.; MANCEAU C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. camp*estris pv. *campestris*. **Plant Pathology,** v. 56, p. 805-818. 2007.

FARGIER, E.; FISCHER-LE SAUX, M. ; MANCEAU, C. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 156-165, 2011.

FESSEHAIE, K. S.; LING, K. S.; WECHTER, W. P.; KEINATH, A. P. WALCOTT, R. R. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time Polymerase Chain Reaction. **Phytopathology**, v. 99, p. 666-678, 2009.

FRAPOLLI, M.; DÉFAGO, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1939-1955, 2007.

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**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.50, p. 811-821, 2000.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 355-361, 2002.

GUNDI, V. A. K. B.; DIJKSHOORN, D.; BURIGNAT, S.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. **Microbiology,** v. 155, p. 2333-2341, 2009.

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

HAUBEN, L., VAUTERIN, L., SWINGS, J., MOORE, E. R. B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 47, p. 328-335, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HONEYCUT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLEELAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic for *Xanthomonas albilineans.* **Microbiology,** v. 141, p. 3229-3239, 1995.

HWANG , M. S. H.; MORGAN, R. L.; SARKAR, S. F.; WANG, P. W.; GUTTMAN D. S. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5182-5191, 2005.

IGNATOV, A.; SECHLER, A.; SCHUENZEL, E. L.; AGARKOVA, I.; OLIVER, B.; VIDAVER, A. K.; SCHAAD, N. W. Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in central coastal California. P**hyhtopathology**, 97: 803-812, 2007.

ISHIHAMA, A. Subunit assembly in *Escherichia coli* RNA polymerase. **Advances in Biophysics,** v. 14, p. 1-35, 1981.

JIN, D. J.; GROSS, C. A. Three rpoBC mutations that suppress the termination defects of rho mutants also affect the functions of nusA mutants. **Molecular and General Genetics**, v. 216, p. 269-275, 1989.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 755-762, 2004.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. In. Validation List n° 109, List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 925-927, 2006.

KASIMOGLU, E.; PARK, S. J.; MALEK, J.; TSENG, C. P.; GUNSALUS, R. P. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atpIBEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5563-5567, 1996.

KI, J.-S.; ZHANG, R.; ZHANG, W.; HUANG, Y.-L. ; QIAN, P.-Y. Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 679-691, 2009.

KIM, B.-J.; KOH, Y.-H.; CHUN, J.; KIM.; C.-J.; LEE, S.-H.; CHO, M.; HYUN, J.-W.; LEE, K.-H.; CHA, C.-Y.; KOOK, Y.-H. Differentiation of *Actinomicete* genera based on partial *rpoB* gene sequences. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 13, p. 846-852, 2003.

KIM, B.-J.; KEUN-HWA LEE, K.-H., PARK, B.-N.; KIM, S.-J.; BAI, G.-H.; KIM, S.-J.; KOOK, Y.-H. Differentiation of mycobacterial species by PCR-Restriction Analysis of DNA (342 Base Pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology,** v. 39, p. 2102-2109, 2001.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KIMURA, M.; ISHIHAMA, A. Functional map of the α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: insertion analysis of the amino-terminal assembly domain. **Journal of Molecular Biology***,* v. 248, p. 756–767, 1995.

KO, K. S.; LEE, H. K.; PARK, M.-Y.; LEE, K.-H.; YUN, Y-J.; WOO, S.-Y.; MIYAMOTO, H.; KOOK, Y. H. Application of RNA polymerase β-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2653-2658, 2002.

KO, K. S.; HONG, S.-K.; LEE, K.-H.; LEE, H. K.; PARK, M.-Y.; MIYAMOTO, H.; KOOK, Y. H. Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene. **Journal of Microbiological Methods,** v. 54, p. 325-337, 2003.

KONG, H.; BLACKWOOD, C.; BUYER, J. S.; GULYA JR, T. J.; LYDON, J. The genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on the 16S–23S rDNA intergenic spacer regions. **Biological Control**, v. 32, p. 356-362, 2005.

KREUTZER, R. D.; YEMMA, J. J.; GROGL, M.; TESH, R.B.; MARTIN, T. I. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite Leishmania (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, p. 301-307, 1994.

LABEDA, D. P. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus Streptomyces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2525-2531, 2011.

LAMICHHANE, J. R.; VARVARO, L.; BALESTRA, G.M. Bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas cucurbitae* reported on pumpkin in Nepal. **New Disease Reports**. v. 22, p. 20, 2010.

LAMY, B.; LAURENT, F.; KODJO, A. Validation of a partial *rpoB* gene sequence as a tool for phylogenetic identification of aeromonads isolated from environmental sources. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 217-228, 2010.

LEE, H. J.; PARK, H. J.; CHO, S. N.; BAI, G. H.; KIM, S. J. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2966-2971, 2000.

LERAT, E.; DAUBIN, V.; MORAN, N. A. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the gamma-proteobacteria. **PLOS Biol**. 1: E19, 2003.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.G.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas.* **The Botanical Review,** v. 40, p. 308-356, 1984.

LORETI, S.; GALLELLI, A. Rapid and especifc detection of virulent *Pseudomonas avellanae strains* by PCR amplification. **European Journal of Plant Pathology**, Dordechet, v. 108, p. 237-244, 2001.

LOVIC, B. R.; HOPKINS, D. L. Production steps to reduce seed contamination by pathogens of cucurbits. **Hort Technology**, v. 13, p. 50-54, 2003.

MACHERAS, E. ; ROUX, A.-L.; BASTIAN, S.; LEÃO, S. C. ; PALACI, M.; SIVADON-TARDY, V.; GUTIERREZ, C.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S.; PFYFFER, G. BODMER, T.; CAMBAU, E.; GAILLARD, J.-L.; HEYM, B. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (Sensu Lato) strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 491-499, 2011.

MAES, M.; GARBEVA, P.; KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, v. 86, p.63-69. 1996.

MAGRAY, M. S. U. D.; KUMAR, A.; RAWAT, A. K.; SRIVASTAVA, S. Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. **Bioinformation**, v. 6, p. 370-371, 2011.

MAIDEN, M. J. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M. SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MALAVOLTA JR, V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J., ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopatologica**, v. 34, p. 9-88, 2008.

MANCEAU, C.; HORVAIS, A. Assessment of genetic diversity among strains of Pseudomonas syringae by PCR-Restriction Fragment Lengh Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 498-505, 1997.

MARINGONI, A. C.; LEITE JR, R. P.; KOMORI, N. Nova doença bacteriana do pepino (*Cucumis sativus* L.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Bryan) Dye, no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 14, p. 225-230, 1988.

MASSOL-DEYA, A. A., ODELSON, D. A., HICKEY, R. F., TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *In:* AKKERMANS, 1995.

MITKOWSKI, N. A.; BROWNING, M.; BASU, C.; JORDAN, K.; JACKSON, N. Pathogenicity of *Xanthomonas translucens* from annual bluegrass on golf course putting greens. **Plant Disease**, v.89, p.469-473, 2005.

MOFFETT, M. L.; TRIMBOLI, D.; BONNER, I. A. A bacterial leaf spot disease of several *Brassica* varieties. **Australian Plant Pathology**, v. 5, p. 30-32. 1976.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology,** v. 26, p. 1005–1011, 1997.

MORA, D.; RICCI, G.; GUGLIELMETTI, S.; DAFFONCHIO, D.; FORTINA, M. G. 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. **Microbiology**, v. 149, p. 807–813, 2003.

MULLER, V.; GRUBER, G. ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 60, v. 474-494, 2003.

MUN, H. S.; OH, E. J.; KIM, H. J.; LEE, K. H.; KOH, Y. H; KIM, C. J.; HYUN, J. W.; KIM, B. J. Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 401-407, 2007.

NASER, S. M.; DAWYNDT, P.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 57, p. 2777-2789, 2007.

NASER, S.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; THOMPSON, C. C.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology** ,v. 43, p. 2224-2230, 2005.

NASER, S. M.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, v. 151, p. 2141-2150, 2005.

OJANEN, T.; HELANDER, I. M., HAAHTELA, K.; KORHONEN, T. K.; LAAKSO, T. Outer membrane proteins and lipopolysaccharides in pathovars of *Xanthomonas campestris.* **Applied and Environmental Microbiology,** v. 59, p. 4143-4151, 1993.

PALYS, T.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 47, p.1145-1156, 1997.

PALYS, T.; BERGER, E.; MITRICA, I.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two

Bacillus species. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 50, p. 1021-1028, 2000.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L.; WEI, Q. Development of polymerase chain reaction *primers* highly specific for *Xanthomonas albineans,* the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease,** v.83, p. 218-222, 1999.

PARK, H. K..; YOON, J. W.; SHIN, J. W.; KIM, J. Y.; KIM, W. *rpoA* is a useful gene for identification and classification of *Streptococcus pneumoniae* from the closely related viridans group streptococci. **FEMS Microbiology Letter**, v. 305, p. 58-64, 2010.

PARK, Y. J.; LEE, B M.; HO-HAHN, J.; LEE, G. B.; PARK, D. S. Sensitive and specific detection of *X. campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific *primers* based on *hrpF* gene squences. **Microbiological Reseach**, v. 19, p. 419-423, 2004.

PAUL, F.;MORIN, A.; MONSAN, P. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 4, p. 245-259, 1986.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T. ; WEIGHTMAN, A. J.; HEFIN JONES, T.; ESHWAR MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* gene-based identification approach for the Entire *Burkholderia* genus. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3917-3927, 2005.

PEIXOTO, R. S.; COUTINHO, H. L. C.; RUMJANEK, N. G.; MACRAE, A.; ROSADO, A. S. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 316-320, 2002.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

PRUVOST, O.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; AH-YOU, N.; JOUEN, E.; BOYER, C. First report of *Xanthomonas cucurbitae* causing bacterial leaf spot of pumpkin on Réunion Island. **Plant Disease**, v. 92, p 1591, 2008.

PRUVOST, O.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; A.H-YOU, N.; JOUEN, E.; BOYER, C. First report of *Xanthomonas cucurbitae* causing bacterial leaf spot of watermelon in the Seychelles**. Plant Disease**, v. 93, p. 671, 2009.

QHOBELA, M.; LEACH, J. E., CLAFLIN, L. E.; PEARSON, D. L. Characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* by PAGE of membrane proteins and by REA and RFLP analysis of genomic DNA. **Plant Disease**, v. 75, p. 32-36, 1991.

RADEMAKER, J. L. W.; NORMAN, D. J.; FORSTER, R. L.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; DE BRUIJN, F. J. Classification and identification of *Xanthomonas translucens*

isolates, including those pathogenic to ornamental asparagus. **Phytopathology**, v. 96, p. 876-884, 2006.

RAMOS, P. L.; MOREIRA-FILHO, C.A.; VAN TRAPPEN, S.; SWINGS, J.; DE VOS, P.; BARBOSA, H. R.; THOMPSON, C. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; THOMPSON, F. L. An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 394-399, 2011.

RANDAWA, P. S.; PANNU, S. S.; SCHAAD, N. W. Improved bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. **APS/MSA/SON/ Joint Meeting**, p. 25-29, 2001.

RENESTO, P.; GOUVERNET, J. ; DRANCOURT, M.; ROUX, V.; RAOULT, D. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 39, p. 430-437, 2001.

RENNER, S. S.; HANNO SCHAEFER, H.; KOCYAN, A. Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*), **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 58, 2007.

ROBERTS, P. D.; HODGE, N. C.; BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, R. E.; BERGER, R. D.; CHASE, A. R. Relatedness of Strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 64, p. 3961-3965, 1998.

RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES, L. M. R.; PELLOSO, D. S.; OLIVEIRA JR., L. C. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 42-44, 2011.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas**. Informe Agropecuário**, v. 17, p. 56-59, 1995.

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; OLIVEIRA, A. R. Podridão bacteriana dos frutos de melão (*Cucumis melo* L.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* pv. nov. **Summa Phytopathologica**, v. 10, p. 217-233, 1984.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.70 **New York Exeter Publ**, NY, 1992.

ROSS, W.; GOSINK, K. K.; SALOMON, J.; IGARASHI, K.; ZOU, C.; ISHIHAMA, A.; SEVERINOV, K.; GOURSE, R.L. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. **Science,** v. 262, p. 1407-1413, 1993.

RUSSO, F. D.; SILHAVY, T. J. Alpha: the Cinderella subunit of RNA polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p.14515-14518, 1992.

RYAN R.P.; VORHÖLTER, F-J.; POTNIS, N.; JONES, J.B.; VAN SLUYS, M-A.; BOGDANOVE, A.J.; DOW, J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology***,* v 9*,* p. 344-355, 2011.

SADDLER, G. S. *Xanthomonas cucurbitae* [Descriptions of Fungi and Bacteria]. In: IMI **Descriptions of Fungi and Bacteria**, v. 146, p. 1454, 2000.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCALLY, M.; SCHUENZEL, E. L.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xyllela fastidiosa* and relative contribuitions of recombination and point mutation to clonal diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8491-8499, 2005.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp.nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp.*citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones,1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and ‘‘var. fuscans’’ of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology,** v. 28, p. 494-518, 2005.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology,** v. 29, p. 690-695, 2006.

SHIH, H.-D.; LIN, Y.-C.; HUANG, H.-C.; TZENG, K.-C.; HSU, S.-T. A DNA probe for identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris,* the causal organism of black rot of crucifers in Taiwan. **Bot. Bull Acad. Sin**., v. 41, p. 113-120, 2000.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLÓ -MORA, R.; SWINGS, J.; TRÜPER, H. G.; VAUTERIN, L; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in

bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology** , v. 44, p. 846-849, 1994.

STARR, M. P.; STEPHENS, W. L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas.* **Journal of Bacteriology,** v. 87, p. 293-302, 1964.

STEAD, D. E. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereal and grasses by fatty acid profiling**. Bull. OEPP/EPPO Bull**, v. 19, p. 57-68, 1989.

TAKITA, M. A.; BORGES, K. M.; REIS, M. S.; DESTEFANO, S. A. L. to a taxonomic rec; MACHADO, M. A. . Analysis of genomic sequences of Xanthomonas campestris pv. viticola gives support lassification. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2006, águas de Lindóia. XXXV Reunião Anual - Programa. São Paulo : Sociedade **Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq**, p. 56-56, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular **Biology and Evolution** (submitted), 2011.

TAYEB, L. A.; AGERON, E.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 763-773, 2005.

THOMPSON, F. L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C. C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C. B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of Multilocus Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 71, p. 5107-5115, 2005.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 54, p. 919-924, 2004.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE, A. C. P.; JEAN SWINGS, J. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2480-2484, 2007.

TRÉBAOL, G. ; GARDAN, L. ; MANCEAU, C. ; TANGUY, J-L ; TIRILLY, Y.; BOURY, S. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 50, p. 1471-1478, 2000.

TRINDADE, L. C. Diagnose molecular do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola.* A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de linhagens de *Streptomyces* associadas à sarna da batata de diferentes regiões produtoras do Brasil. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade de Brasília. 2007. Disponível em: http://ged1.capes.gov.br/CapesProcessos/premio2008/969641-ARQ/969641_5.PDF

TSYGANKOVA, S. V.; IGNATOV, A. N.; BOULYGINA, E S.; KUZNETSOV, B. B.; KOROTKOV, E.V. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 845-853, 2004.

VALVERDE, A.; HUBERT, T.; STOLOV, A.; DAGAR, A.; KOPELOWITZ, J.; BURDMAN, S. Assessement of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. **Plant Pathology**, v.56, p. 17-25, 2007.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.

VAN DEN MOOTER, M.; SWINGS, J. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 40, p. 348-369, 1990.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MEW, T. W.; SCHROTH, M. N.; PALLERONI, N. J.; HILDEBRAND, D. C.; STEAD, D. E.; CIVEROLO, E. L.; HAYWARD, A. C.; MARAITE, H.; STALL, R. E.; VIDAVER, A. K.; BRADBURY, J. F. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas.* **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 40, p. 312-316, 1990.

VAUTERIN, L.; YANG, P.; HOSTE, B.; POT, B.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. **Journal of General Microbiology,** v. 138, p. 1467-1477, 1992.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas* **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 45, p. 472-489, 1995.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; VAN SINDEREN, D.; FITZGERALD, G. F.; ZINK, R. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp (atpBEFHAGDC*) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 70, p. 3110–3121, 2004.

VIANA, F. M. P.; ANJOS, R. M.; HOLANDA, V. O.; CARDOSO, J. E. Ocorrência de *Xanthomonas cucurbitae* em Meloeiro no Ceará. **Embrapa on line**, ISSN 1679-6535, 2010.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; LOPES, C. A. Surto de mancha aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte: recomendações preliminares de controle. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, Comunicado Técnico 50, 2000.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A . dos; FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na região Nordeste. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2001. 22 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 12).

VICENTE, J. G.; CONWAY, J.; ROBERTS, S. J.; TAYLOR, J. D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. **Phytopathology**, v. 91, p. 492-499, 2001.

WAKKER, J., H. Vorlanfige Mitteilungen uber Hyacinthenkrankheiten. **Botanisches Zentralblatt,** v. 14, p. 315-31, 1883.

WALCOTT, R. R., GITAITIS, R. D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using Immunomagnetic Separation and the Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, v. 84, p. 470-474, 2000.

WAYNE, L. G.; BRENNER, R. R.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MURRAY, R. G. E., STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÚPER, H. G. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.

WILLIAMS, P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifes. **Plant Disease**, v.64, p. 736-742, 1980.

WINSLOW, C. E. A.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R. E.; KRUMWIEDE Jr., C.; ROGERS, L. A.; SMITH, G. H. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the commites of the Soc. Am. Bacteriologist, on characterization and classification of bacterial types. **Journal of Bacteriology**, v. 2, p. 506-566, 1917.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews,** v. 51, p. 221-271, 1987.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research,** v. 21, p. 153-177, 1978a.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. The use of the term "patovar" in the classification of plant pathogenic bacteria. **In: IV**

International Conference Plant Pathological Bacteria, Angers, Inst. Nat. De la Rech. Agronomique, p. 359-363, 1978b.

YOUNG, J. M., PARK, D.-C., SHEARMAN, H. M., FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 366-377, 2008.

YOUNG, J. M.; WILKIE, J. P.; PARK, D. C.; WATSON, D. R. W. New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov**. Plant Pathology**, v. 59, p. 270-281, 2010.

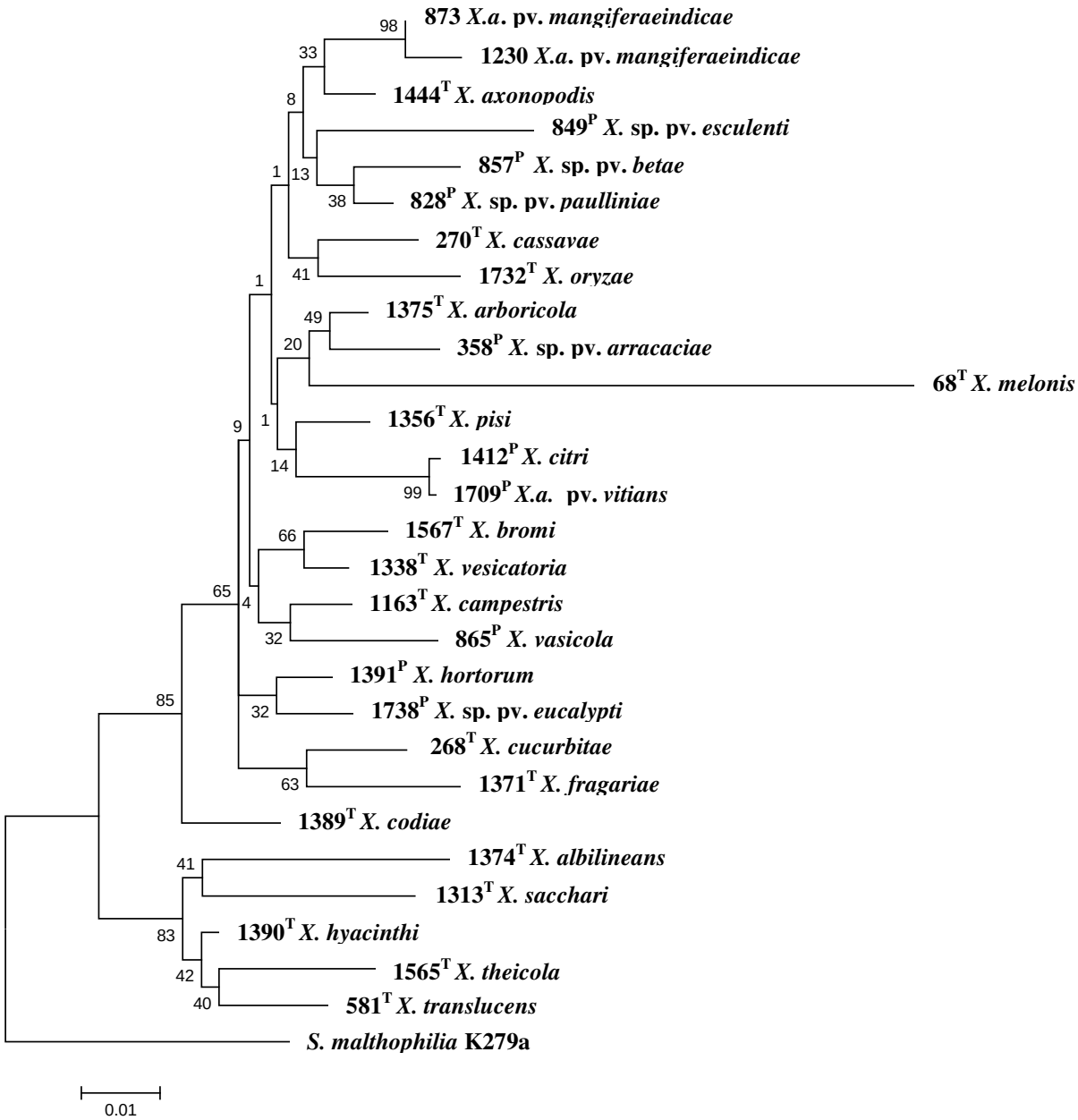
ZBINDEN, A.; KÖHLER, N.; BLOEMBERG, G. V. *recA*-based PCR assay for accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other viridans streptococci. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 49, p. 523-527, 2011.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 53, p. 1893–1900, 2003.

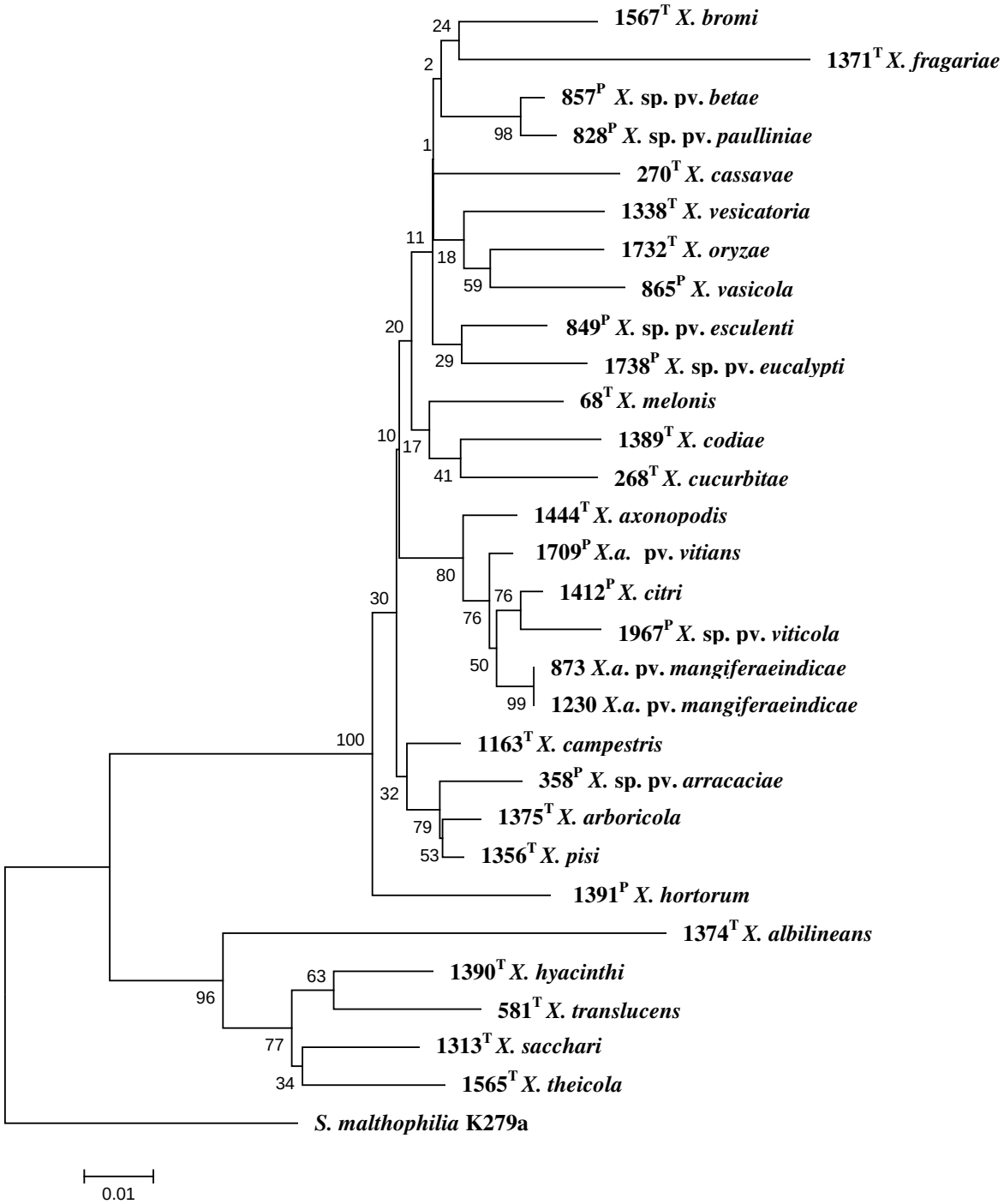
ZHAO, Y.; DAMICONE, J. P.; DEMEZAS, D. H.; BENDER, C. L. Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Plant Disease**, v. 84, p.1008-1014, 2000.

APÊNDICES

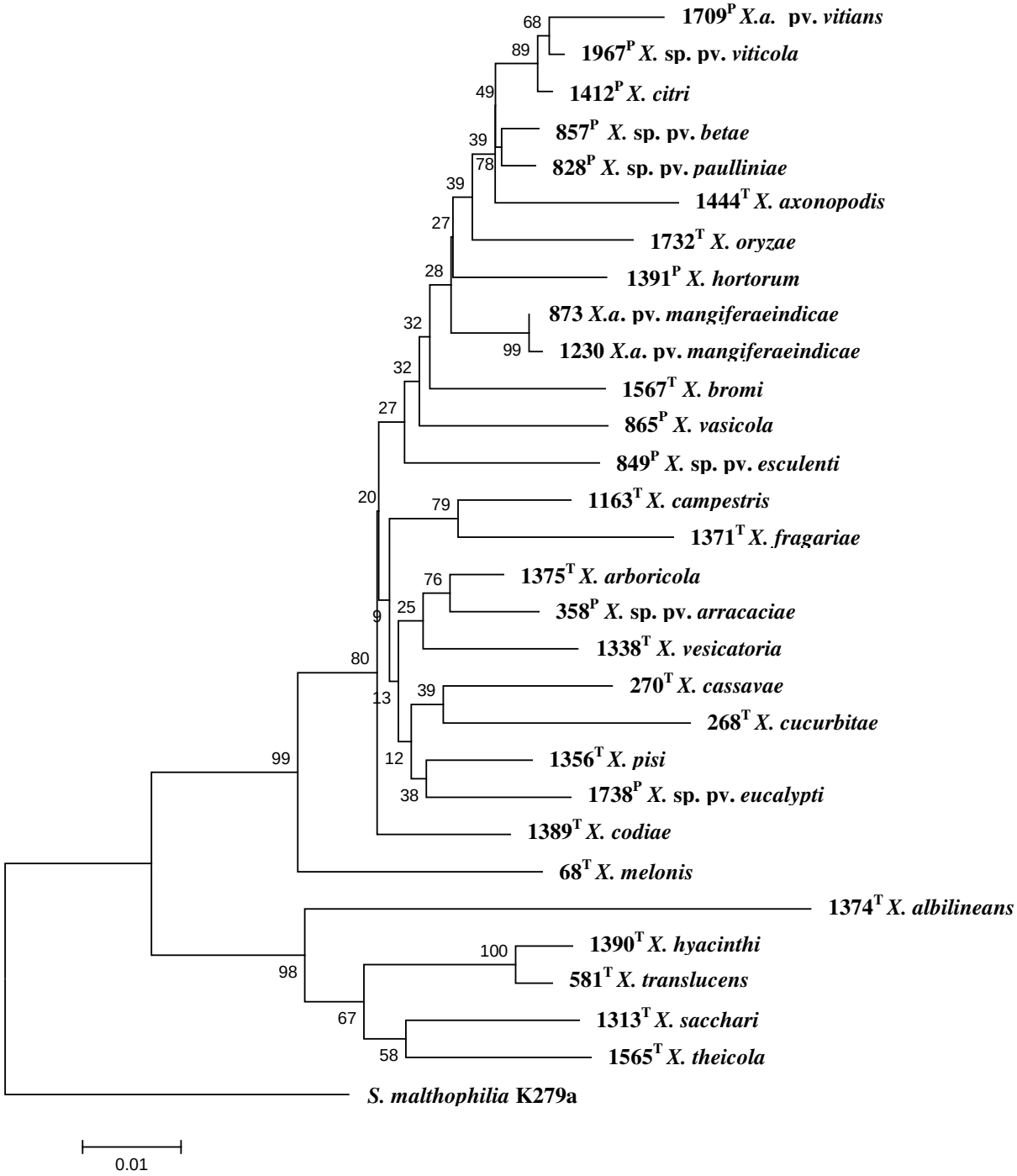
APÊNDICE 1 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *atpA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



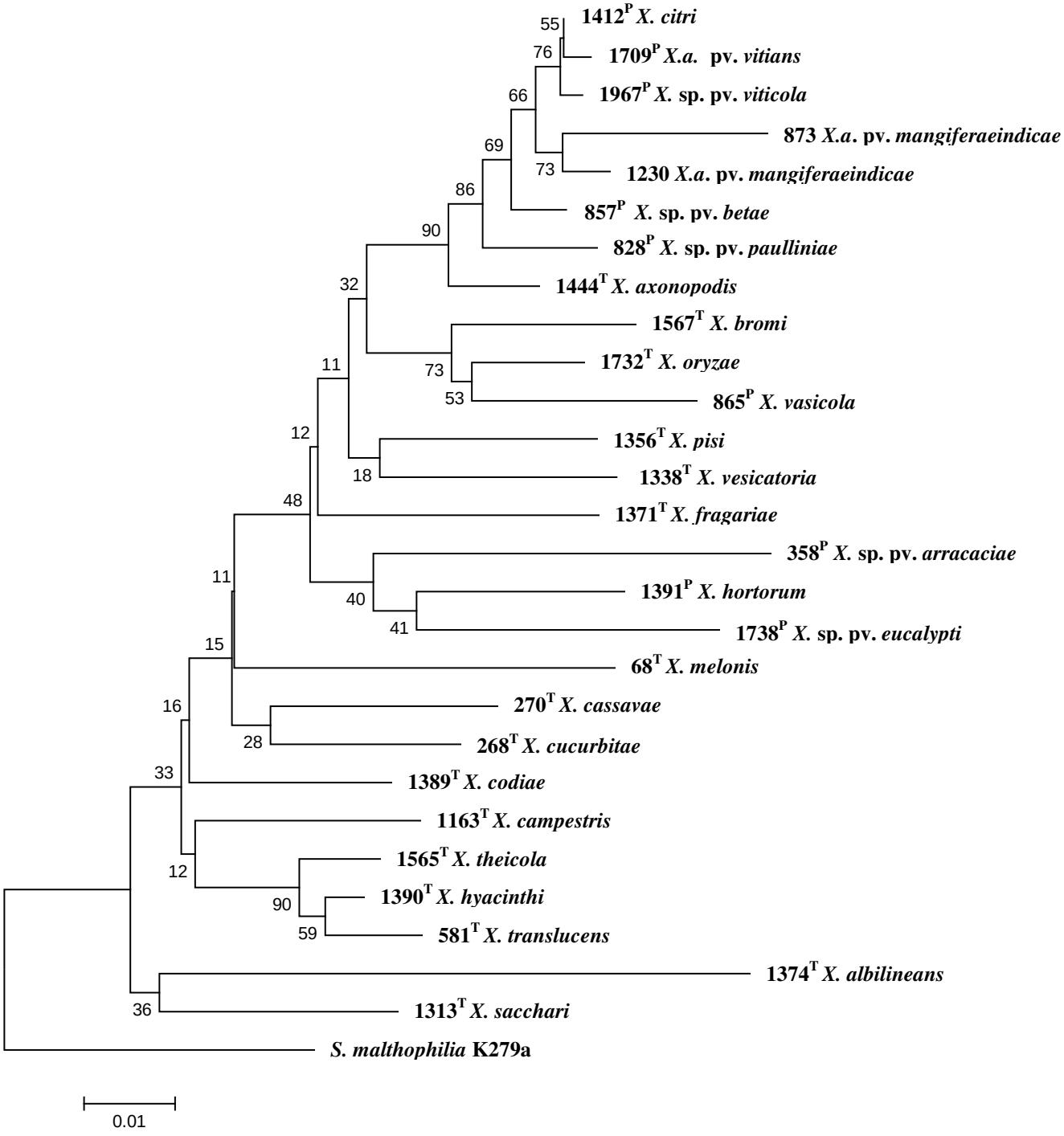
APÊNDICE 2 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *rpoA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



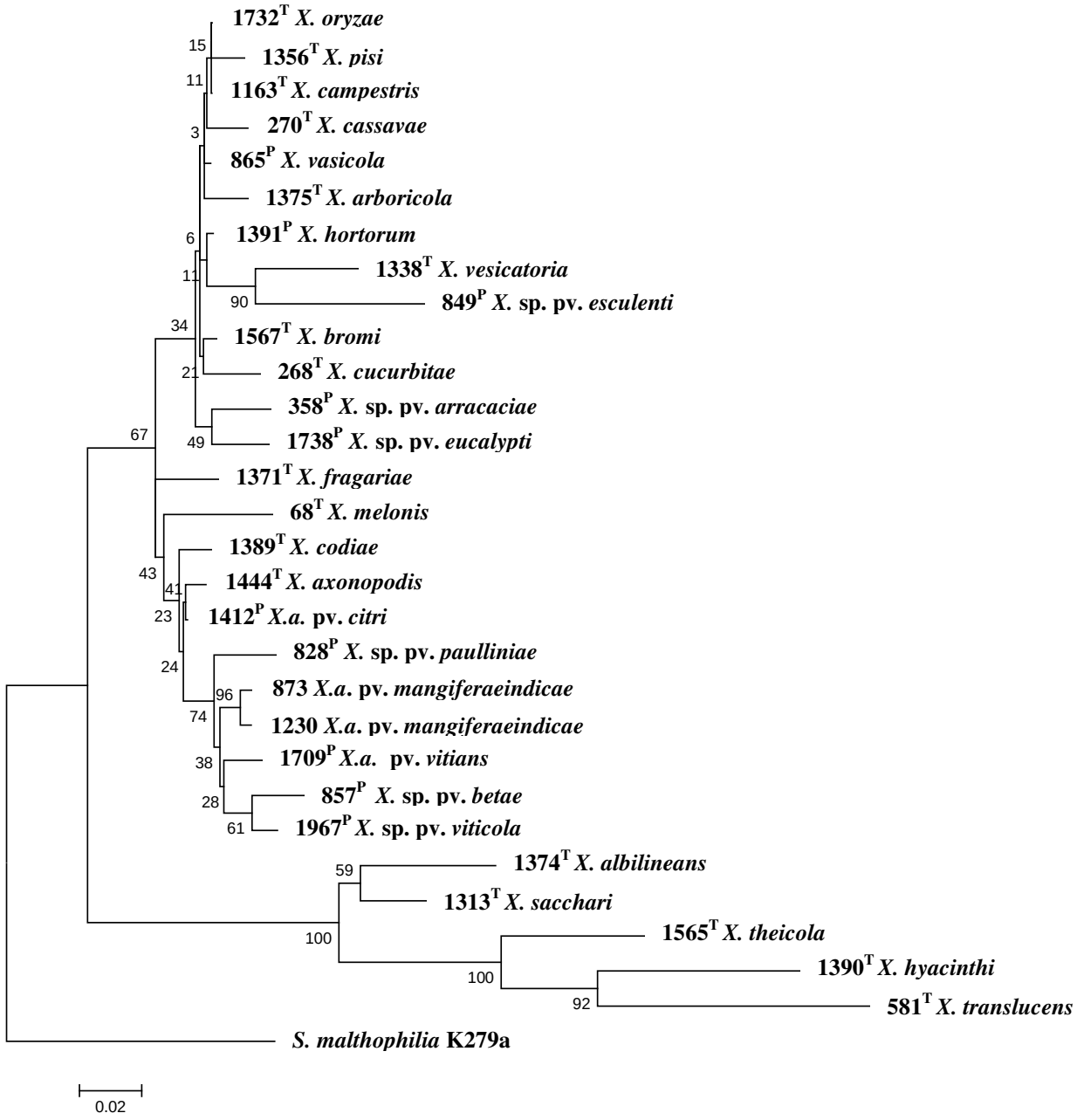
APÊNDICE 3 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *rpoB* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



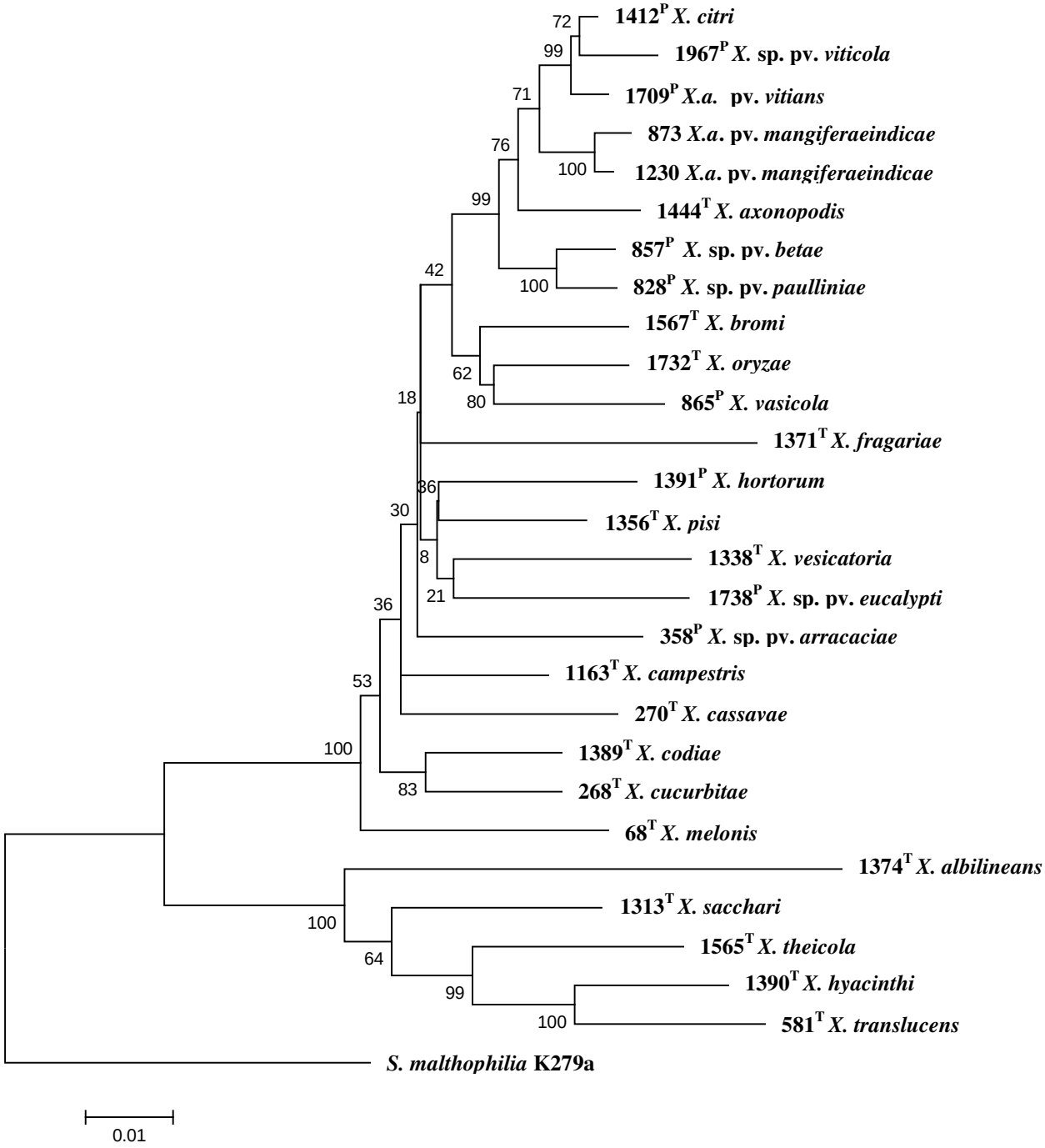
APÊNDICE 4 - Árvore filogenética construída à partir das sequências do gene *recA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



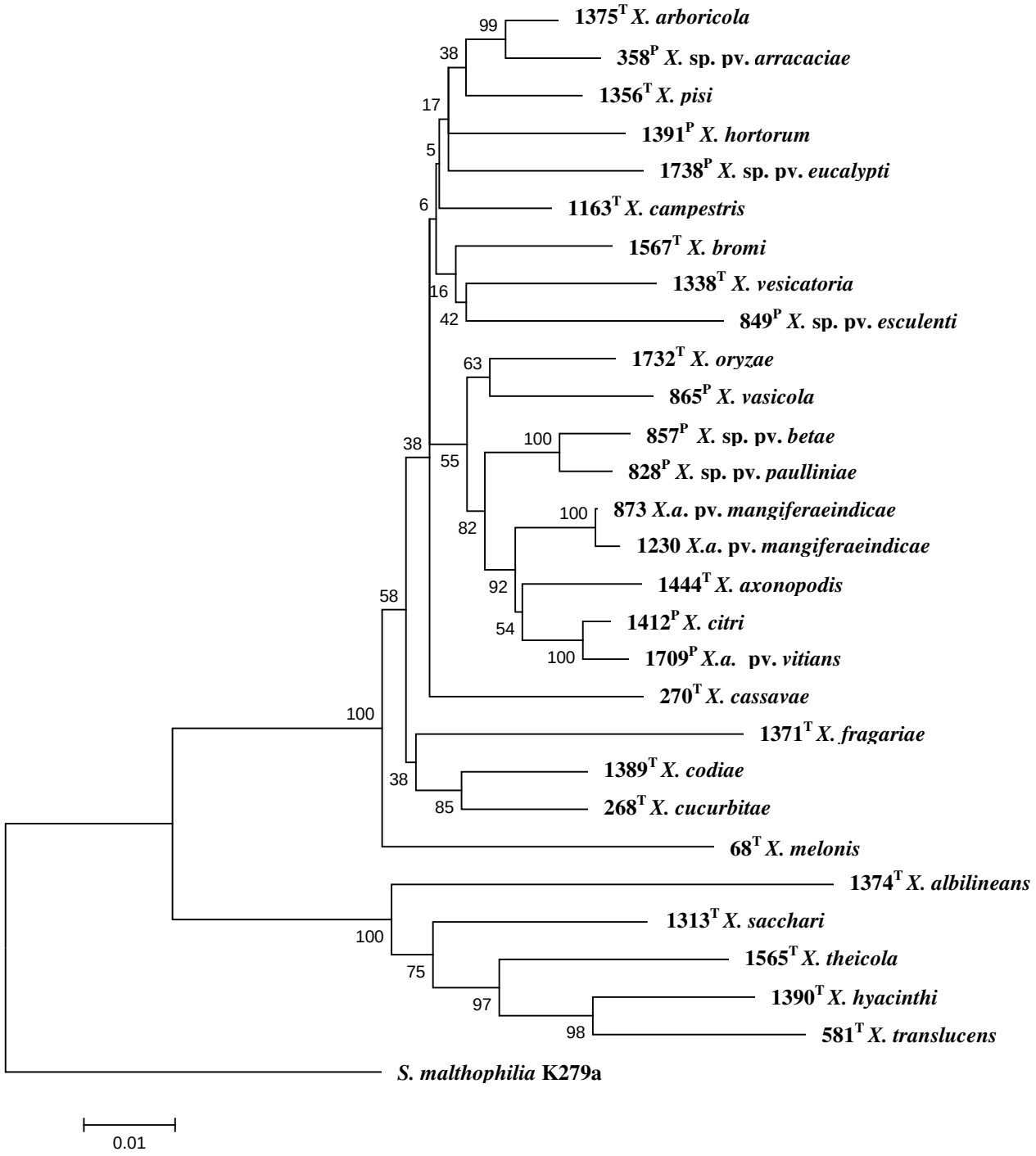
APÊNDICE 5 - Árvore filogenética construída à partir das sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr (*Neighbor joining* – Kimura 2)



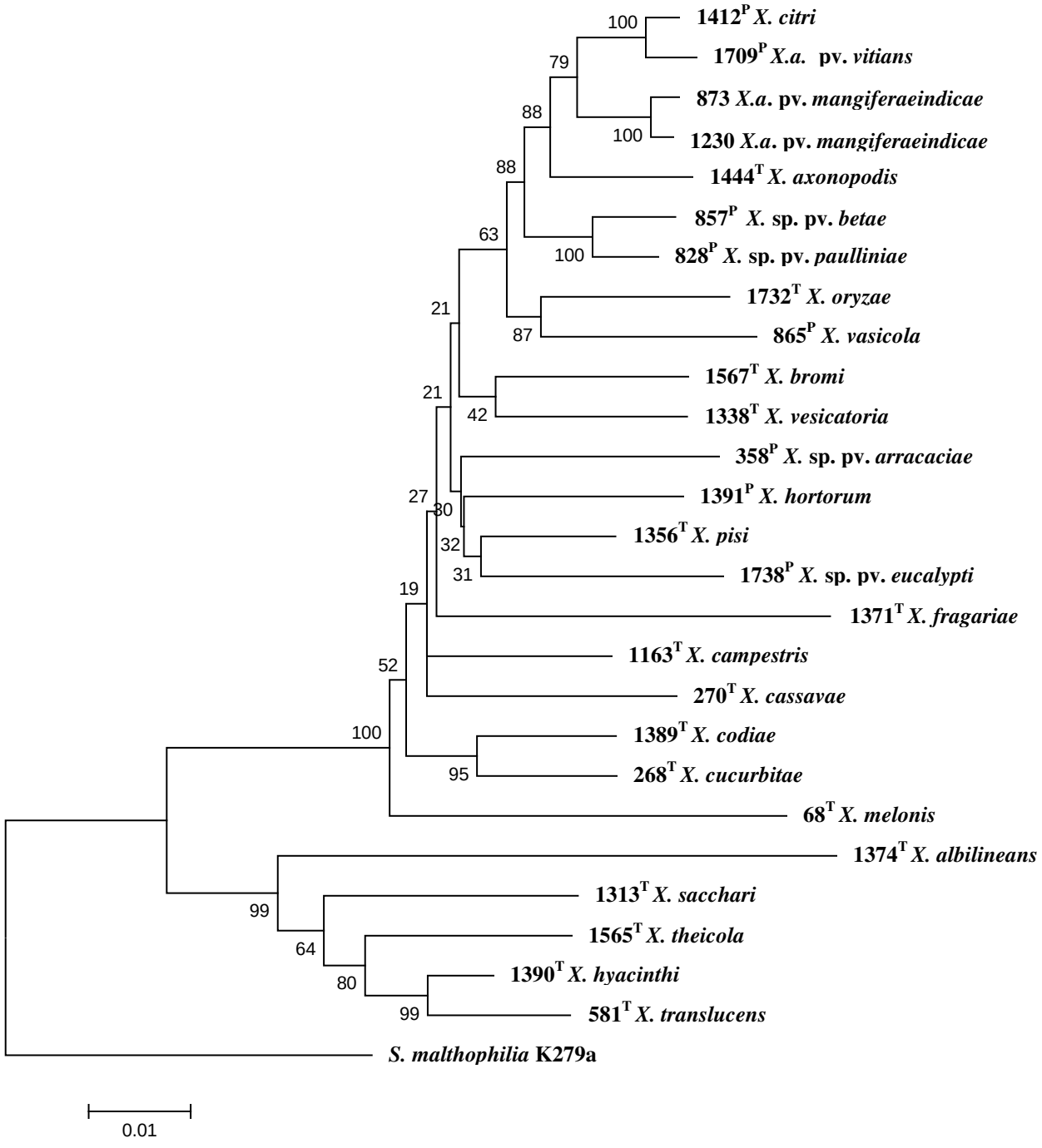
APÊNDICE 6 - Árvore filogenética contruída à partir das sequências concatenadas dos genes *recA, rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr (*Neighbor joining* – Kimura 2)



APÊNDICE 7 - Árvore filogenética contruída à partir das sequências concatenadas dos genes *atpA, rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr (*Neighbor joining* – Kimura 2)



APÊNDICE 8 - Árvore filogenética contruída à partir das sequências concatenadas dos genes *atpA, recA, rpoA* e *rpoB* (*Neighbor joining* - Kimura 2)



APÊNDICE 9 - Valores de similaridade (%) das sequências concatenadas dos genes *rpoA, rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr

Linhagens	*X. albilineans*	*X. arboricola*	*X. axonopodis*	*X. citri*	*X. bromi*	*X. campestris*	*X. cassavae*	*X. codiae*	*X. cucurbitae*
X. albilineans	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. arboricola	87,3	-	-	-	-	-	-	-	-
X. axonopodis	86,6	95,9	-	-	-	-	-	-	-
X. citri	86,9	96,7	98,1	-	-	-	-	-	-
X. bromi	85,9	96,2	95,8	95,8	-	-	-	-	-
X. campestris	87,2	97,6	95,9	96,5	96,4	-	-	-	-
X. cassavae	86,1	95,9	95	95,4	95,8	95,7	-	-	-
X. codiae	86,7	95,9	95,6	96,1	95,4	95,9	95,3	-	-
X. cucurbitae	86,5	96,6	95,1	95,5	95,9	96,6	95,5	97,2	-
X. fragariae	84,7	94,2	93,4	93,9	93,9	94,7	93,3	93,6	94,3
X. hortorum	86,8	96,6	96	96,6	95,8	96,2	95,3	95	95,3
X. hyacinthi	89,3	87,5	86,7	87,1	86,8	87	86,3	86,8	86,8
X. melonis	86,4	95,1	95	95	94,8	95,3	94,7	95,6	95
X. oryzae	86,1	96,4	96,1	96,9	96,5	96,4	95,6	94,7	95,1
X. pisi	86,4	97,8	95,6	96,3	96,2	97,4	96,2	95,6	96,3
X. sacchari	92,3	89,9	89	89,4	89,3	89,7	88,6	89,8	89,4
X. theicola	90,6	88,3	87,4	88	87,3	87,8	87,5	88,1	87,9
X. translucens	87,8	87,4	86,5	87	86,3	86,9	86,3	86,9	86,9
X. vasicola	86	96,5	95,5	96,6	96,2	96,5	95,3	94,7	95,3
X. vesicatoria	85,6	95,8	94	94,5	95,4	95,5	94,9	94,5	95
X.a. pv. *vitians*	86,9	96,6	97,7	98,9	95,5	96,1	95,4	95,9	95,2
X. sp. pv. *arracaciae*	86,2	97,7	95,3	96,1	95,3	96,7	95,2	95,5	96,2
X. sp. pv. *betae*	86,5	95,9	96,6	97,3	96,1	96,2	95,1	96,1	95,5
X. sp. pv. *esculenti*	85,4	95	94	94,4	95,1	95,6	94,5	94,8	95,3
X. sp. pv. *eucalypti*	85,9	96,1	94,2	94,9	95,6	95,9	95,2	94,7	95
X.a. pv. *mangiferaindicae* 873	86,9	96,9	97,3	98,5	95,9	96,9	95,6	95,9	95,5
X.a. pv. *mangiferaindicae* 1230	86,9	96,9	97,2	98,4	95,9	96,8	95,5	95,9	95,4
X. sp. pv. *paulliniae*	86,4	95,9	96,6	97,4	96,1	96,1	95,3	96	95,6
X. sp. pv. *viticola*	86,1	96,2	97,1	98,6	95	95,7	94,5	95,3	94,7
S._maltophilia	84,7	89,4	88	88	88,5	89,8	88,5	88,8	89

Linhagens	*X. fragariae*	*X. hortorum*	*X. hyacinthi*	*X. melonis*	*X. oryzae*	*X. pisi*	*X. sacchari*	*X. theicola*	*X. translucens*	*X. vasicola*
X. albilineans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. arboricola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. axonopodis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. citri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. bromi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. campestris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. cassavae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. codiae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. cucurbitae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. fragariae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. hortorum	92,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. hyacinthi	85,3	86,9	-	-	-	-	-	-	-	-
X. melonis	92,7	94,2	87	-	-	-	-	-	-	-
X. oryzae	93,8	96,2	86,4	94,2	-	-	-	-	-	-
X. pisi	93,5	96,4	87,5	94,8	96,2	-	-	-	-	-
X. sacchari	87,9	89,1	93,2	89,6	88,7	89,7	-	-	-	-
X. theicola	86,1	87,8	94	87,8	87,4	88,5	94,7	-	-	-
X. translucens	85	87,1	95,1	86,9	86,3	87,8	92,7	92,8	-	-
X. vasicola	93,7	95,8	86	93,9	96,6	96,2	88	86,6	85,8	-
X. vesicatoria	92,8	94,7	85,3	93,3	95,3	95,6	88	86,6	85,4	95,1
X.a. pv. *vitians*	93,6	96,2	87	94,7	96,5	96	89,4	87,7	86,9	96,2
X. sp. pv. *arracaciae*	93,5	95,6	86,6	94,5	95,4	96,8	88,8	87,5	86,3	95,4
X. sp. pv. *betae*	93,8	95,4	87	95,1	96,6	95,8	89,4	87,7	86,8	96
X. sp. pv. *esculenti*	92,2	94,4	85,7	93,6	94,8	95,3	87,7	87,1	85,4	94,5
X. sp. pv. *eucalypti*	93,1	95,1	86	94	95,8	96,3	88,5	87,1	86	95,2
X.a. pv. *mangiferaindicae* 873	94,3	96,5	87	94,7	96,8	96,6	89,7	87,9	87	96,8
X.a. pv. *mangiferaindicae* 1230	94,2	96,4	87,1	94,6	96,7	96,5	89,6	87,9	86,9	96,7
X. sp. pv. *paulliniae*	93,9	95,4	87,6	95,2	96,4	95,8	89,5	88,1	87	95,8
X. sp. pv. *viticola*	93	95,8	86,4	94	96,1	95,6	88,6	87,3	86,3	95,8
S._maltophilia	86,8	88,7	85,7	88,5	88	89,5	88,5	87	85,5	87,9

Linhagens	*X. vesicatoria*	*X.a.* pv. *vitians*	*X.* sp. pv. *arracaciae*	*X.* sp. pv. *betae*	*X.* sp. pv. *esculenti*	*X.* sp. pv. *eucalypti*	*X.a.* pv. *mangiferaindicae* 873	*X.a.* pv. *mangiferaindicae* 1230	*X.* sp. pv. *paulliniae*	*X.* sp. pv. *viticola*
X. albilineans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. arboricola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. axonopodis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. citri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. bromi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. campestris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. cassavae	-	-		-	-	-	-	-	-	-
X. codiae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. cucurbitae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. fragariae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. hortorum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. hyacinthi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. melonis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. oryzae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. pisi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. sacchari	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. theicola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. translucens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. vasicola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. vesicatoria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X.a. pv. *vitians*	94,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X. sp. pv. *arracaciae*	95,1	95,9	-	-	-	-	-	-	-	-
X. sp. pv. *betae*	94,7	96,9	95,1	-	-	-	-	-	-	-
X. sp. pv. *esculenti*	94,8	94,1	94,5	94,9	-	-	-	-	-	-
X. sp. pv. *eucalypti*	95,1	94,8	95,4	95,2	94,6	-	-	-	-	-
X.a. pv. *mangiferaindicae* 873	94,7	98,1	96,1	97,1	94,4	95,2	-	-	-	-
X.a. pv. *mangiferaindicae* 1230	94,6	98,1	96,1	97,1	94,3	95,2	99,8	-	-	-
X. sp. pv. *paulliniae*	94,4	97	95,4	98,7	95	94,9	97,2	97,1	-	-
X. sp. pv. *viticola*	93,9	98,1	95,3	96,9	93,5	94,2	97,6	97,6	96,7	-
S._maltophilia	87,9	87,7	88,7	88,3	88,2	88,3	88,3	88,2	88,3	87,3