

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/41425
IB/81536



INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNICAMP

G586

x



Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae*: taxonomia polifásica, filogenia e detecção

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Edmilson Ricardo Gonçalves</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

15/5/2000 *YBR*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular - Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Aluno : Edmilson Ricardo Gonçalves

Orientadora : Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

Campinas – S.P.

2000

ADE 1.15
 HAMADA:
UNICAMP
G586x
 Ex.
50 30/41425
278/00
☐ ☒ ☐
08.11.00
07-02-00
 CPU

I-00142823-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

G586x **Gonçalves, Edmilson Ricardo**
Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae*: taxonomia polifásica,
 Filogenia e detecção/Edmilson Ricardo Gonçalves. – Campinas, SP
 [s.n.], 2000.
 87f.ilus.

Orientador: Yoko Bomura Rosato
 Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1.Bactérias fitopatogênicas. 2.Filogenia. 3. Detecção. I.
 Rosato, Yoko Bomura. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia. II. Título.

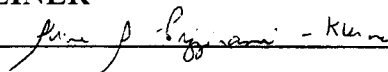
Data da defesa: 15/05/2000.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. YOKO BOMURA ROSATO(Orientadora)



Profa. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI KLEINER



Prof. Dr. DOMINGOS DA SILVA LEITE



Prof. Dr. GILSON PAULO MANFIO



Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM



Prof. Dr. TOMOMASA YANO

Profa. Dra. SUZETE APARECIDA LANZA DESTEFANO

Dedico este meu trabalho à minha mãe,
um espírito de luz que estará sempre em meu coração,
que muito me amou e que continua a me fazer feliz pela
certeza de um futuro reencontro.

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro.”

Fernando Pessoa

Meus agradecimentos

A Deus, pelo sopro de vida e a meu Anjo da Guarda, que trabalha tanto por mim...

À Profa. Yoko, pela orientação, amizade e compreensão durante estes anos todos;

Aos doutores Beriam, Domingos e Gilson pela ajuda com a pré-banca;

Ao Prof. Dr. Rui Pereira Leite Jr. e Dr. Júlio Rodrigues Neto pelas linhagens de bactérias doadas para a realização deste trabalho;

Aos amigos do lab, SanSan, “OrAngela”, Zezinho e Pät, pela harmoniosa convivência e pelos inúmeros bons momentos que vivemos;

Aos técnicos Wilson e Sandra, com quem eu sempre pude contar;

Aos amigos-irmãos “Juliete”, Dezoitão, Lucy, Lúcio Fábio, Stelinha, MariaI e Juliano, por terem sido minha família aqui em Campinas, pelo carinho e afeto que sempre me deram;

Aos amigos Leelous, Eneida (Ermã), DaniC, Marcela e Sharon pela amizade, companheirismo e boas “marceladas” e mais uma vez à DaniC pela MEGA ajuda!

À Andréa e ao Prof. Gonçalo pela super ajuda com os géis de sequenciamento;

Aos amigos da bioquímica de quem eu tanto gosto: Pô, Lu e à alminha maravilhosa Dani Japipa (OM)

Às almas queridas Toninho, Walter, Maria Elena, Eloísa e Manolo pelo tanto que mudaram minha maneira de ver Deus e o mundo;

Aos amigos CBMEGuianos (ou ex), Glub, Ana Cláudia, Roger, Luzinha, Sibov, Claudete, Cene, Edna, Renatinha e Jorge que de alguma forma me ajudaram a chegar aqui;

Aos amigos que já não estão na Unicamp: Duzão, Cris, Ricardo e Serginho, que mesmo distante sempre estiveram “presentes”;

E àqueles que mesmo distante me mandaram energia para que eu pudesse continuar a seguir meu caminho pessoal.

À Fapesp, CNPq e a meu pai pelo apoio financeiro

Agradecimentos especiais

**A meu pai, meus irmãos, minhas sobrinhas e meus cunhados
Todo meu carinho e amor**

SUMÁRIO

Resumo	01
Introdução	04
Objetivos	05
Revisão de literatura	06
O gênero <i>Xanthomonas</i>	06
Filogenia do gênero <i>Xanthomonas</i>	11
A bacteriose do maracujá	14
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	16
Artigo 1 – “Genotypic characterization of Xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (<i>Passiflora</i> spp.) and their relatedness to different <i>Xanthomonas</i> species”	17
Artigo 2 – “A phylogenetic analysis of <i>Xanthomonas</i> species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences”	29
Artigo 3 – “Detecção específica de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> através de sondas de DNA e PCR”	51
Summary	75
Referências Bibliográficas	77

RESUMO

A diversidade genética de 54 linhagens de *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae* isoladas de diferentes estados brasileiros foi avaliada inicialmente por RAPD (“Randomly Amplified Polimorphic DNA”) utilizando-se 4 primers. Foram detectados quinze grupos, apresentando correlação com a região geográfica de origem. Um representante de cada grupo foi selecionado para análises posteriores, assim como linhagens representativas de 18 diferentes espécies de *Xanthomonas*. A diversidade destas linhagens foi avaliada através de rep-PCR (PCR, “Polymerase Chain Reaction”, de regiões repetitivas) com os primers ERIC, REP e BOX, RFLP (“Restriction Fragment Length Polimorphism”) da região espaçadora dos genes 16S-23S e SDS-PAGE (PAGE, “Polyacrylamide gel electrophoresis”) de proteínas totais. Cada espécie de *Xanthomonas* apresentou um perfil único com o emprego destas técnicas. As linhagens de maracujá apresentaram perfil semelhante à diferentes espécies de *Xanthomonas*, não sendo possível determinar a sua posição taxonômica dentro do gênero *Xanthomonas*. Para este propósito, foram efetuadas hibridizações DNA:DNA e foi encontrado um nível de 67% de homologia com a espécie *X. axonopodis*, sendo portanto determinado que as linhagens de maracujá pertencem à esta espécie. Assim, sugere-se que tais linhagens sejam denominadas *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os produtos de amplificação da região espaçadora dos genes 16S-23S também foram utilizados para estudos filogenéticos dentro do grupo *Xanthomonas*. Os espaçadores 16S-23S de 19 espécies de *Xanthomonas* e de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram sequenciados e analisados para a construção de uma árvore filogenética. Dentro do grupo *Xanthomonas*, os espaçadores variaram de 492 a 578 pb com similaridade de 63 a 99% e

apresentaram dois tRNAs, um para alanina e outro para isoleucina. Estes dois tRNAs dividiram os espaçadores em três regiões denominadas ITS1, ITS2 e ITS3. A sequência ITS1, com média de similaridade de 88,4% foi a mais conservada, apresentando pequenas adições/deleções de nucleotídios isoladas. A sequência ITS3 também apresentou pequenas adições/deleções entre as *Xanthomonas* e uma grande deleção de 44 pb para a espécie *X. hyacinthi*. A maioria das espécies apresentou uma sequência ITS2 com 19-20 pb, no entanto, cinco espécies apresentaram uma inserção de 51-56 pb. Uma árvore filogenética foi construída com base na sequência destes espaçadores dividindo o grupo *Xanthomonas* em três principais grupos. O grupo I foi formado pelas espécies *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. cucurbitae*, , *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*. O segundo grupo foi formado pelas espécies *X. axonopodis*, *X. codiae* e *X. melonis*. O último grupo incluiu as espécies *X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. hyacinthi*, *X. translucens* e *X. theicola* que apresentaram a sequência ITS2 mais longa. A árvore obtida apresentou similaridades com aquela obtida para o gênero *Xanthomonas* com base no gene 16S.

Para diagnóstico e detecção específica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, foram pesquisadas sondas e primers específicos para o patovar, com base em três produtos de RAPD. Um deles, o fragmento de 1,0 kb obtido com o primer OPR2, apresentou os melhores resultados quando utilizado como sonda. A partir da sequência deste fragmento, foram construídos os primers Pas2-D, Pas2R e Pas 3D. O par de primers Pas2D e Pas2R amplificou um produto de 1000 pares de bases para todos os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, com exceção de 16 isolados. Quando os primers Pas2-R e Pas3-D foram utilizados, 52 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* apresentaram um produto de amplificação de aproximadamente 300 pares de bases, sendo que apenas duas linhagens do

Paraná apresentaram resultados negativos. Estes primers apresentaram uma banda de amplificação, de tamanho diferente com a espécie *X. vesicatoria* LMG911. Nenhum produto de amplificação foi obtido para as diferentes espécies de *Xanthomonas*, nem mesmo para *X. axonopodis* pv. *axonopodis*.

INTRODUÇÃO

Isolada na região de Araraquara (SP) pela primeira vez por Pereira (1969), a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, causadora da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* sp.), tem sido descrita em vários estados brasileiros, desde o sul até o nordeste do Brasil (Teixeira, 1994; Peruch *et al.*, 1997). Pouco se sabe sobre sua variabilidade genética ou relação com hospedeiros. Nem mesmo sua posição taxonômica foi definida até o momento. Na última reclassificação taxonômica (Vauterin *et al.*, 1995), o gênero *Xanthomonas* foi dividido em 20 espécies. *X. campestris*, à qual pertencia o patovar *passiflorae*, foi dividido em 16 espécies. No entanto, as linhagens isoladas de maracujazeiros não foram incluídas nesta análise taxonômica e os autores sugeriram a designação *X. sp. pv. passiflorae* até a definição conclusiva de sua taxonomia.

No momento, a detecção desta bactéria tem sido realizada através do seu isolamento a partir de tecidos infectados que já apresentam sintomas. Os métodos de detecção deste patógeno são realizados com tecidos já apresentando sintomas, sejam eles por sorologia (Beriam, *et al.*, 1999) ou por inspeção visual de exudação de bactéria. A bacteriose do maracujá é parcialmente controlada por compostos a base de cobre ou antibióticos. Para o controle da doença, é fundamental a detecção e identificação rápida e segura do patógeno. Conhecer melhor estas bactérias e a variabilidade de sua população são caminhos para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico rápido, sensível e seguro e de se evitar o prejuízo causado por este microrganismo para o cultivo do maracujá.

OBJETIVOS

Considerando-se a ausência de estudos sobre a variabilidade genética de linhagens de *Xanthomonas* patogênicas para maracujazeiro, a sua indefinição taxonômica e sua relação com outras espécies de *Xanthomonas*, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1 – Avaliar a variabilidade genética de linhagens de *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae* isoladas de plantas infectadas de diferentes estados brasileiros através de RAPD, RFLP de regiões intergênicas espaçadoras de genes 16S – 23S, rep – PCR e SDS- PAGE de proteínas totais.
- 2 – Classificar taxonomicamente estas linhagens dentro do gênero *Xanthomonas*.
- 3 – Estudar a filogenia das espécies de *Xanthomonas* utilizando a sequência do espaçador dos genes ribossomais 16S- 23S;
- 4 – Desenvolver primers específicos para a detecção e identificação de *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae* através de bandas diferenciais de RAPD.

REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Xanthomonas*

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são cosmopolitas sendo grande parte delas fitopatogênicas (Moore *et al.*, 1997). Cerca de 124 monocotiledôneas e 168 dicotiledôneas são hospedeiras de bactérias deste gênero (Hayward, 1993). As *Xanthomonas* são bactérias Gram-negativa, aeróbicas obrigatórias, com um único flagelo polar (raramente dois) e de coloração amarela pela presença do pigmento xantomonadina, característico do gênero (Bradbury, 1984). Bactérias deste gênero, além da relevante importância na agricultura, onde causa grandes prejuízos, produzem um exopolissacarídeo denominado goma xantana, de alto peso molecular usado como agente gelificante, emulsificador e estabilizante pela indústria alimentícia (Bradbury, 1984).

A primeira *Xanthomonas* foi descrita em 1883 por J.H.Wakker. Na época, o autor a descreveu como *Bacterium hyacinthi*, o agente causador da “doença amarela” em plantas de jacinto (*Hyacinthus orientalis*, da família Liliaceae). No entanto, o gênero *Xanthomonas* só foi proposto em 1939 por W.J.Dowson. Este autor descreveu 60 espécies para o gênero *Xanthomonas*. Até a década de 60, as bactérias eram classificadas apenas com base em características fenotípicas, como ensaios bioquímicos, morfologia e patogenicidade. A partir desta década, com o avanço da tecnologia e o surgimento da biologia molecular, análises numéricas de grande quantidade de dados fenotípicos e homologia entre moléculas de ácidos nucléicos, a taxonomia polifásica (incluindo dados fenotípicos, quimiotaxonômicos e genotípicos) tornou-se uma nova ferramenta utilizada pelos taxonomistas. Com estas novas técnicas, a taxonomia sofreu profundas modificações,

sobretudo na taxonomia bacteriana, onde o número de informações morfofisiológicas são bastante limitadas. Além disso, informações fornecidas por análises de moléculas de DNA e proteínas são mais constantes e reprodutíveis e têm permitido estudos filogenéticos (Li, 1997).

Muitos dos novos dados coletados pela taxonomia polifásica entram em conflito com a taxonomia clássica surgindo necessidades de reclassificação de diversos grupos de microrganismos. Até 1974, as espécies de bactérias fitopatogênicas eram classificadas de acordo com o princípio conhecido como “novo hospedeiro, nova espécie” (Starr, 1981; vauterin *et al.*, 1995). Ao longo destes anos, vários autores criticaram este princípio, demonstrando que a taxonomia das bactérias não podia se basear apenas numa característica fenética, no caso patogenicidade. Burkholder e Starr (1948) e Dye (1962, 1963 e 1966) demonstraram que as espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* não podiam ser distinguidas apenas por características fisiológicas e bioquímicas, sem os dados de hospedeiros, mostrando que a taxonomia baseada apenas na planta hospedeira de onde foi isolada a bactéria podia não refletir a real posição taxonômica das bactérias. Em 1974, Dye e colaboradores reduziram o número de espécies de *Xanthomonas* de cerca de 120 para 5 espécies: *X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. campestris* e *X. fragariae*. A grande maioria das antigas espécies passaram a ser incluídas na espécie *X. campestris*, diferenciadas agora pela categoria patovar. Patovar é uma variante do princípio “novo hospedeiro, nova espécie” que indica de qual hospedeiro a bactéria foi isolada (Young *et al.*, 1978; Dye *et al.*, 1980). No entanto, uma única espécie, *X. campestris*, ficou subdividida complexamente em mais de 125 patovares (Bradbury, 1984). A classificação em patovares sempre foi criticada por diversos autores (ver por exemplo, Vandamme *et al.*,1996), pois levando-se em conta a classificação apenas com

base na característica fenotípica patogenicidade, bactérias não patogênicas, como epífitas e saprófitas, não podem ser classificadas (Maas *et al.*, 1985; Gitaitis *et al.*, 1987, Vauterin *et al.*, 1990, Vauterin *et al.*, 1996). Mesmo assim, em 1980 foi publicada uma lista aprovando as 5 espécies definidas de *Xanthomonas* propostas por Dye *et al.* (1974), aceitando os inúmeros patovares (Skerman *et al.* 1980). Neste trabalho, a espécie *X. populi*, proposta por Ridé e Ridé (1978) com base em características fenotípicas e sorológicas não foi aceita como pertencente ao gênero *Xanthomonas*. Ridé e Ridé (1978) haviam proposto que *Aplanobacter populi* fosse reclassificada como *Xanthomonas populi*. Através de experimentos de hibridização DNA:DNA, DNA: rRNA e porcentagem de GC, De Vos e De Ley (1983) confirmaram os resultados de Ridé e Ridé (1978). Posteriormente, análises fenéticas (morfológicas, bioquímicas e fisiológicas) vieram a confirmar esta classificação (Van den Mooter e Swings, 1990; Yang *et al.*, 1993).

No mesmo ano de 1983, o gênero *Xanthomonas*, além da espécie *X. populi*, é aumentado em mais uma espécie. A então denominada *Pseudomonas maltophilia* (Hughes e Ryschenkov, 1961), isolada inicialmente de fluido pleural em 1943 como *Bacterium bookerii* por J.L. Edwards, passa a ser denominada *Xanthomonas maltophilia*, a única espécie do gênero patogênica para humanos. Esta modificação, proposta por Swings *et al.* (1983) se baseou em dados de homologia entre DNA e rRNA, DNA:DNA, tipagem de ubiquinonas, caracterização enzimática e composição de ácidos graxos. Com dados de hibridização DNA: rRNA, estes autores constataram que a espécie *Pseudomonas maltophilia* apresentava mais similaridade com o gênero *Xanthomonas* que com o gênero *Pseudomonas*. Os valores de Tm encontrados nestas hibridizações variaram de 76 a 81% nas hibridizações de *P. maltophilia* com rRNA de *X. campestris* pv. *campestris*, suportando a reclassificação de *Pseudomonas maltophilia* para o gênero *Xanthomonas*.

Em 1990, uma reavaliação da taxonomia do gênero *Xanthomonas* é realizada com base em extensivas análises de características fenéticas por Van den Mooter e Swings: crescimento em diferentes temperaturas e meios de cultura, morfologia de célula e da colônia, ensaios bioquímicos como presença de oxidase e redução de nitrato, utilização de fontes de carbono e resistência a antibióticos dentre outras. Com base nestes dados, os autores propuseram uma divisão do gênero em 7 espécies : *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populi*. Dentro da espécie *X. campestris*, foi encontrada grande variabilidade, o que foi confirmado por outros pesquisadores, como Yang *et al.*, (1993), que trabalharam com mais de 130 patovares de *X. campestris*, encontrando 24 grupos distintos. Além disso, estes autores encontraram correlação, em alguns casos, com os hospedeiros de onde as bactérias haviam sido isoladas. Em outras palavras, bactérias isoladas de hospedeiros relacionados se agruparam através da análise de ácidos graxos, como foi o caso de linhagens isoladas de cereais como *X. campestris* pv. *cerealis*, *X. campestris* pv *hordei*, *X. campestris* pv *undulosa*, *X. campestris* pv *secalis* e *X. campestris* pv *translucens*.

Em relação à espécie *X. maltophilia*, sua posição taxonômica não foi aceita por toda a comunidade científica desde sua descrição como *Xanthomonas* (Swings *et al.*, 1983). Van Zyl e Steyn (1992) sugeriram uma reinterpretação de sua posição taxonômica visto que os resultados de Swings *et al.* (1983) eram conflitantes com os resultados de De Vos e De Ley (1983) e de Van der Mooter e Swings (1990). Swings apresentou, em 1983, resultados de Tm de hibridização de DNA de *Xanthomonas maltophilia* com rRNA de *Xanthomonas* variando entre 78.8 a 81.5% enquanto De Vos e De Ley (1983) encontraram, para as mesmas linhagens, variações de 80 a 81.5%. Para De Vos e De Ley (1983), *Xanthomonas*

maltophilia deveria ser removido do gênero *Xanthomonas* por uma diferença encontrada de 3 °C, deixando *X. maltophilia* muito próximo deste gênero, porém, fora dele. Em 1993, Palleroni e Bradbury reclassificam este grupo de bactérias como um novo gênero, *Stenotrophomonas maltophilia*. Estes autores discutiram os resultados de Van den Mooter e Swings (1990) apontando diversos dados que não justificariam a inclusão de *X. maltophilia* no gênero *Xanthomonas*. Dentre elas, muitas diferenças fenotípicas como número de flagelos, fímbrias, produção de polissacarídeos extracelulares, temperatura de crescimento, redução de nitrato, patogenicidade e produção de xantomonadina. Com isso, o gênero *Xanthomonas* ficou reduzido a 6 espécies: *X. albilineas*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. oryzae* e *X. populi*.

Vauterin *et al.* (1995), com base em resultados de homologia DNA:DNA e utilização de fontes de carbono, sugeriram uma reclassificação dentro do gênero *Xanthomonas* que passa a apresentar 20 espécies. Um total de 183 linhagens, representando as 6 espécies de *Xanthomonas* e 62 patovares de *X. campestris* foram utilizadas neste estudo, assim como uma linhagem de *Stenotrophomonas maltophilia*. Das 6 espécies conhecidas deste gênero, quatro delas foram mantidas sem alterações taxonômicas: *X. albilineans*, , *X. fragariae*, *X. oryzae* e *X. populi*. As duas outras espécies, *X. axonopodis* e *X. campestris* sofreram grandes modificações. *X. axonopodis* passou a incluir 33 patovares antes classificados como patovares de *X. campestris*: *X. campestris* pv. *alfalfae*, pv. *bauhiniae*, pv. *begoniae*, pv. *cajani*, pv. *cassavae* tipo B, pv. *cassiae*, pv. *citri* tipo A, B, C, D e E, pv. *clitoriae*, pv. *coracanae*, pv. *cyamopsidis*, pv. *desmodii*, pv. *desmodiigangetici*, pv. *desmodiilaxiflori*, pv. *desmodiitundifolii*, pv. *dieffenbachiae*, pv. *erythrinae*, pv. *glycines*, pv. *lespedezae*, pv. *malvacearum*, pv. *manihotis*, pv. *patelii*, pv. *phaseoli*, pv. *phaseoli* var. *fuscans*, pv. *phyllanthi*, pv. *poinsettiicola* tipo A, pv.

rhynchosiae, pv. *ricini*, pv. *sesbaniae*, pv. *tamarindi*, pv. *vasculorum* tipo A, pv. *vesicatoria* tipo A, pv. *vignaeradiatae*, pv. *vignicola* e pv. *vitians* tipo A. . A espécie *X. campestris*, que apresentava mais de 140 patovares foi subdividida em 16 espécies: *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*. Dentre os antigos patovares de *X. campestris*, 66 deles não foram incluídos nestes estudos e os autores sugerem que sejam considerados como *Xanthomonas* sp. seguida do patovar até que suas posições taxonômicas possam ser confirmadas. Estes mesmos autores encontraram valores de homologia de DNA:DNA entre *Stenotrophomonas* e *Xanthomonas* menores que 25%, reafirmando a classificação de *Xanthomonas malthophilia* como pertencente a um novo gênero, *Stenotrophomonas*, proposto por Palleroni e Bradbury (1993), que apresenta *Stenotrophomonas maltophilia* como única espécie.

Filogenia do gênero *Xanthomonas*

Nas últimas décadas, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, análises de proteínas e de DNA tornaram-se uma importante ferramenta no estudo da história evolutiva dos organismos (Nei, 1996). Durante os últimos anos, inúmeras informações de seqüências de DNA foram se acumulando, incluindo genomas completos de diversos procariotos e eucariotos (Blattner *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997; Gofeau *et al.*, 1996). Algumas seqüências apresentam-se bastante conservadas entre as diferentes espécies, como é o caso dos genes ribossomais. Estes genes apresentam regiões conservadas, outras medianamente variáveis e outras ainda altamente variáveis. Modificações destas seqüências podem ser utilizadas como indicadores que nos fornecem

informações do caminho evolutivo trilhado pelos organismos e das relações existentes entre eles (Woese, 1987; Busse *et al.*, 1992 e 1996). São diversas as publicações utilizando genes ribossomais em estudos filogenéticos de procariotos (Leblond-Bourget *et al.*, 1996; Chatellier *et al.*, 1998; Nesme *et al.*, 1995).

Estudos de filogenia do gênero *Xanthomonas* foram realizados com base em seqüências do gene 16S por Moore *et al.* (1997) e por Hauben *et al.* (1997). Moore *et al.* (1997) analisaram as seqüências do gene 16S das 8 espécies do gênero *Xanthomonas* descritas por Van den Mooter e Swings (1990): *X. campestris*, "*X. campestris* pv. *graminis*", *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populi*, além de seqüências de organismos dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Xylella*, *Comamonas*, *Thiobacillus*, *Chromatium*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Os resultados encontrados por estes autores demonstram que o gênero *Xanthomonas* é monofilético estando mais próximo do gênero *Stenotrophomonas* com valores médios de similaridade de 96,3%, seguido de *Xylella* com valor médio de similaridade de 94,7%. Estes mesmos autores concluem que dados de seqüência de gene 16S são extremamente informativos nos estudos filogenéticos intergenérico. No entanto, o trabalho de Hauben *et al.* (1997) demonstrou que esta técnica, utilizando o mesmo gene ribossomal, não é tão informativa e elucidativa quando se estuda a relação filogenética intragenérica. Analisando a seqüência do gene 16S das 20 espécies de *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1995), Hauben *et al.* (1997) puderam diferenciar 3 grupos principais. O grupo 3, mais próximo filogeneticamente do gênero *Stenotrophomonas*, formado pelas espécies *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. theicola* e *X. translucens*, espécies de bactérias patogênicas exclusivamente de monocotiledôneas; com exceção de *X. theicola*, o grupo 2, formado pelas espécies *X. sacchari* e o grupo 1, o mais complexo, formado pelas 15

demais espécies de *Xanthomonas*. No entanto, a sequência do gene 16S dentro deste gênero apresentou alta similaridade, com valor médio de 98,2% e algumas espécies distintas, com valores de homologia DNA:DNA variando entre 20 e 40 %, apresentaram o gene 16S com seqüências idênticas. O contraste observado por estes autores de baixo nível de homologia DNA: DNA entre espécies com alta similaridade entre as seqüências do gene 16S, também encontrados por Moore *et al.* (1997), demonstram a limitação deste gene para estudos filogenéticos dentro do gênero *Xanthomonas*. Tais autores sugerem que outras seqüências mais variáveis, que possam ser mais informativas, sejam utilizadas para que se consiga obter melhores resultados dentro deste grupo de bactéria.

A bacteriose do maracujá

A família *Passiflorae* está composta por mais de 580 espécies encontradas nas regiões tropicais. A maioria destas espécies são nativas do Brasil (Oliveira, 1987; Sacco, 1980). Dentre os doze gêneros desta família, quatro são encontrados no Brasil: *Dilkea*, *Tetrastylis*, *Mitostemma* e *Passiflora*. Este último possui cerca de 400 espécies, das quais 90 por cento são nativas das Américas. No Brasil, o maior centro de distribuição geográfica do gênero *Passiflora* (Lopes 1991), são encontradas 111 espécies de *Passiflora* (Sacco, 1973).

Embora o gênero *Passiflora* seja composto por um grande número de espécies, apenas duas apresentam valor comercial: *Passiflora edulis* (conhecido como maracujá amarelo), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá roxo) e *Passiflora alata* (maracujá doce). Estas espécies são economicamente valorizadas pela produção do calmante natural extraído da espécie *P. alata*, passiflorina, e pela utilização dos frutos na indústria alimentícia, sobretudo no preparo de suco como é o caso de *P. edulis* f. *flavicarpa*. O cultivo do maracujá, principalmente o maracujá amarelo, se intensificou muito nos últimos anos, estimulado pelas indústrias extratoras de suco, sendo que nos últimos trinta anos, só no estado de São Paulo, a área de cultivo desta fruta quintuplicou. Dados de 1997 descrevem no Brasil, o maior produtor mundial desta fruta, uma área de aproximadamente 25 mil hectares de cultivo de maracujá (Souza e Meletti, 1997).

Juntamente com a expansão do cultivo do maracujazeiro no Brasil tem sido relatado o aparecimento do patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em diferentes regiões do país (Kuroda, 1981; Teixeira, 1994; Peruch *et al.*, 1997). Esta bactéria, causadora da mancha bacteriana do maracujazeiro é responsável por grandes prejuízos na

produção desta fruta. As condições climáticas brasileiras onde o maracujá é cultivado, clima quente e úmido, são ideais para o crescimento da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Os sintomas causados por este microrganismo em plantas de maracujá são manchas grosseiramente circulares verde escuras, úmidas, de aspecto oleoso e translúcido. Estas manchas podem progredir até a morte do tecido. A infecção pode estender-se pelos sistemas vasculares da planta e atingir pecíolos, ramos e frutos (Oliveira *et al.*, 1988). Quanto ao fruto, os sintomas iniciam-se como pequenas áreas verde-escuras, úmidas, que aumentam de tamanho para áreas circulares ou irregulares, oleosas de cor pardacenta. Tais lesões comprometem até o interior dos frutos, alcançando as sementes, inviabilizando sua comercialização (Pereira, 1969). O controle químico deste patógeno, utilizando agentes a base de cobre pode ser utilizado na tentativa de controlar a doença. No caso de plantações contaminadas, utiliza-se antibióticos, principalmente agrimicina. No entanto, estas práticas não são tão eficientes (Torres Filho e Ponte, 1994; Mello e Oliveira , 1987) e podem selecionar linhagens resistentes (Stall, 1986). Além disso, a utilização de sementes contaminadas pode ser uma das formas de propagação da doença.

X. axonopodis* pv. *passiflorae

Em 1969, Pereira descreveu uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims), conhecida como bacteriose ou “mancha oleosa” do maracujazeiro na região de Araraquara, estado de São Paulo. O autor isolou e classificou o agente etiológico da doença como *Xanthomonas passiflorae*. Como os sintomas causados por esta bactéria eram semelhantes àqueles causados por *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* (identificada por Reid em 1938, na Nova Zelândia, e classificada como *Phytomonas passiflorae*), o autor comparou as duas linhagens por meio de estudos nutricionais, morfológicos (tamanho e forma da célula, número de flagelos) e bioquímicos (como produção de goma xantana) e pôde identificá-las como duas espécies distintas.

Com a classificação de Dye (1974), reduzindo o gênero *Xanthomonas* de 120 para 5 espécies, a espécie *Xanthomonas passiflorae* foi reclassificada como *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Van den Mooter e Swings (1990) através de diversos testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos confirmaram a taxonomia de *X. campestris* pv. *passiflorae* como pertencente ao grupo IX de *Xanthomonas campestris* com similaridade acima de 87% entre as linhagens e que engloba cerca de 100 patovares.

Na última grande reclassificação do gênero *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1995), não foi incluído o patovar *passiflorae* de *X. campestris* e os autores sugeriram que esta bactéria fosse denominada *X. sp.* pv. *passiflorae* até que sua posição taxonômica fosse definida.

Primeiro artigo: **“Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species**

Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species

Edmilson R. Gonçalves and Yoko B. Rosato

Author for correspondence: Yoko B. Rosato. Tel: +55 19 7881135. Fax: +55 19 7881089.
e-mail: yrosato@obelix.unicamp.br

Department of Genetics,
CBMEG, State University of
Campinas, 13087-930
Campinas, SP, Brazil

The genetic diversity of 55 xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and identified as *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* was initially assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. The strains showed a high level of polymorphism with almost unique fingerprints. Fifteen clusters with a similarity of ~70% were identified, three of which were prevalent. There was a correlation between the clusters and the geographic origin of the strains. A representative strain of each cluster, together with the pathovar reference strain, were used to verify the relationships of these strains to 18 *Xanthomonas* species and *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae*. All *Xanthomonas* species yielded a unique RAPD profile and no consistent relatedness to the *X. campestris* pv. *passiflorae* strains was observed. Amplification products were also analysed by repetitive (rep) primers (BOX, ERIC and REP), RFLP of the 16S–23S rDNA intergenic spacer and SDS-PAGE of whole-cell proteins. All of these approaches generated profiles characteristic for each *Xanthomonas* species but the taxonomic position of the *X. campestris* pv. *passiflorae* strains could not be unequivocally assigned. Finally, DNA–DNA hybridization allowed a sound taxonomic allocation of the strains to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Keywords: *Xanthomonas*, RAPD, rep-PCR, RFLP-16S–23S, SDS-PAGE of whole-cell proteins

INTRODUCTION

Xanthomonas campestris is a species complex including mainly phytopathogens which cause diseases in various economically important plants. The species includes pathovars designated according to their hosts. *X. campestris* pv. *passiflorae* (Pereira, 1969) Dye 1978, a pathogenic bacterium of passion fruit (*Passiflora* spp.), is a pathovar rarely included in general or taxonomic studies, perhaps because the host plant is cultivated in tropical and subtropical regions. In recent years passion fruit has become a commercial product in the Brazilian juice industry and large-scale cultivation now occurs. Only two varieties of passion fruit

are exploited commercially (*Passiflora edulis* Sims and *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), although about 400 species have been described (Souza & Meletti, 1997). An area of 25000 ha is currently used to produce passion fruit in Brazil (Teixeira, 1994) and the commercial demand has been increasing gradually. Concomitant with the expansion of passion fruit production, the incidence of disease is also rising (Torres Filho & Ponte, 1994). Bacteriosis, caused by *X. campestris* pv. *passiflorae*, is a major disease limitation in the development of cultivated areas in Brazil. The disease, designated premature death, has been increasing since the late 1970s (Torres Filho & Ponte, 1994). Infection occurs through natural openings and lesions and results in systemic invasion of the whole plant. In the leaves, the disease causes necrosis and soaked, greasy lesions of irregular shape surrounded by chlorotic areas. The fruit is also affected, with the

Abbreviations: IGS, intergenic spacer; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA.

Table 1. *X. campestris* pv. *passiflorae* strains used

Strains	Host	Sampling site	State*
8930, 11061, 11323, 11324, 11325, 11327, 11329, 11330, 11331	<i>Passiflora edulis</i>	Londrina	PR
11341, 11342	<i>Passiflora edulis</i>	S. Sebastião da Amoreira	PR
11043	<i>Passiflora edulis</i>	Siqueira Campos	PR
11343	<i>Passiflora edulis</i>	Arapoti	PR
11405	<i>Passiflora edulis</i>	Marumbi	PR
11406	<i>Passiflora edulis</i>	Apucarana	PR
11407	<i>Passiflora edulis</i>	Nova Esperança	PR
120, 428, 444, 445	<i>Passiflora edulis</i>	Campinas	SP
121, 148	<i>Passiflora edulis</i>	Valinhos	SP
617	<i>Passiflora edulis</i>	Registro	SP
658	<i>Passiflora alata</i>	Guaiçara	SP
777	<i>Passiflora edulis</i>	Bragança Paulista	SP
941, 960, 1007	<i>Passiflora edulis</i>	Vera Cruz	SP
996, 997	<i>Passiflora edulis</i>	Tupã	SP
1039	<i>Passiflora edulis</i>	Pilar do Sul	SP
1040	<i>Passiflora edulis</i>	Paulínia	SP
1151	<i>Passiflora edulis</i>	S. João da Boa Vista	SP
1154	<i>Passiflora edulis</i>	Jaguariúna	SP
1166	<i>Passiflora edulis</i>	Dracena	SP
1168	<i>Passiflora edulis</i>	Cosmópolis	SP
1171	<i>Passiflora alata</i>	Indaiatuba	SP
674	<i>Passiflora</i> sp.	Araguari	MG
649, 714, 715, 712, 717, 767, 1053, 621	<i>Passiflora</i> sp.	Brasília	DF
686, 687, 688	<i>Passiflora</i> sp.	Feira de Santana	BA
720, 748	<i>Passiflora</i> sp.	Propriá	SE
591, 592, 593	<i>Passiflora</i> sp.	Ibiapaba	CE
ICMP 3151†	<i>Passiflora</i> sp.	Araraquara	SP

* State in Brazil; see legend to Fig. 1.

† Pathovar reference strain from the International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand.

appearance of hard greasy spots making it unsuitable for consumption and industrial processing.

Reclassification of the genus *Xanthomonas* has been proposed by Vauterin *et al.* (1995) based mainly on DNA-DNA hybridization analysis, although the phytopathological identification was retained. Accordingly, the species *X. campestris* was divided into 16 new species and the Sub-Committee on Taxonomy of Plant-pathogenic Bacteria has validated this proposal (see Young *et al.*, 1996). However, xanthomonads from passion fruit plants have not been analysed and the former designation, *X. campestris* pv. *passiflorae*, has been maintained.

Genotypic diversity is being analysed increasingly by PCR-based methods. By using short arbitrary primers [randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR] or primers binding to repetitive extragenic sequences, BOX, ERIC and REP, generally known as rep, high-resolution genomic fingerprinting can be obtained (Welsh & McClelland, 1990; Versalovic *et al.*, 1991). The rep primers correspond to conserved

motifs in bacterial repetitive elements which have also been found in *Xanthomonas* and other phytopathogenic bacteria (Louws *et al.*, 1994, 1995). Both approaches are intensively used to assess genetic diversity and as an additional tool for bacterial classification (de Bruijn, 1992). Other molecular methods, including SDS-PAGE and multilocus enzyme electrophoresis are frequently employed in studies of *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1991). A more conserved genetic characteristic, the 16S-23S intergenic spacer (IGS) of the rDNA operon, has also been used to infer the phylogenetic relationships and identification of bacteria at different taxonomic levels (see Gürtler & Stanisich, 1996).

In this study we examined the genetic diversity of 55 strains of *X. campestris* pv. *passiflorae* (referred to as *passiflorae* strains) isolated from infected passion fruit leaves collected from different geographic regions of Brazil. The relatedness of a representative strain of 15 clusters generated by RAPD, 16 species of *Xanthomonas* and *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* was

verified by comparison of the genomic fingerprints generated by RAPD, rep-PCR, RFLP-IGS and SDS-PAGE of whole-cell proteins. A sound taxonomic allocation of the *passiflorae* strains within the genus *Xanthomonas* was obtained by DNA-DNA hybridization.

METHODS

Bacterial strains and culture medium. All *X. campestris* pv. *passiflorae* strains (Table 1) were obtained from the collection of the Instituto Biológico, Section of Phytopathological Bacteriology (IBSBF), Campinas, SP, Brazil, and from the Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, Brazil. The strains were collected from different states in Brazil (Fig. 1). Two strains, 960 and 1171, showed white colonies and were confirmed as pathogens of *Passiflora alata*. For comparison, other type and reference strains from the species of *Xanthomonas* described by Vauterin *et al.* (1995) were also used. The following type and reference strains were purchased from the culture collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium: *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538^T, *Xanthomonas bromi* LMG 947^T, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568^T, *Xanthomonas cassavae* LMG 673^T, *Xanthomonas codiae* LMG 8678^T, *Xanthomonas cucurbitae*

LMG 690^T, *Xanthomonas hortorum* pv. *hederae* LMG 733, *Xanthomonas hyacinthi* LMG 739^T, *Xanthomonas melonis* LMG 8670^T, *Xanthomonas pisi* LMG 847^T, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, LMG 5047, *Xanthomonas sacchari* LMG 471^T, *Xanthomonas theicola* LMG 8684^T, *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* LMG 876^T, *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* LMG 736^T, *Xanthomonas vesicatoria* LMG 911^T and *P. syringae* pv. *passiflorae* LMG 5185. The strains *Xanthomonas albilineans* ICMP 196, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ICMP 35 and *X. campestris* pv. *passiflorae* ICMP 3151 were provided by the International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), Auckland, New Zealand. All strains were grown on NYG medium (Turner *et al.*, 1984) at 30 °C.

DNA extraction. An aliquot (1.5 ml) of bacterial suspension, grown overnight, was washed with 500 µl TAS buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.8, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl), centrifuged and resuspended in 450 µl of the same buffer. Fifty microlitres of SDS (10%, w/v) and 100 µg proteinase K were added and the mixture was incubated for 1 h at 55 °C. Proteins and cell debris were extracted with phenol and chloroform and the aqueous suspension was then dialysed against TE buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.8, 1 mM EDTA) for 48 h. DNA concentration was estimated by comparison with known concentrations of λ DNA in agarose gel electrophoresis (Sambrook *et al.*, 1989).

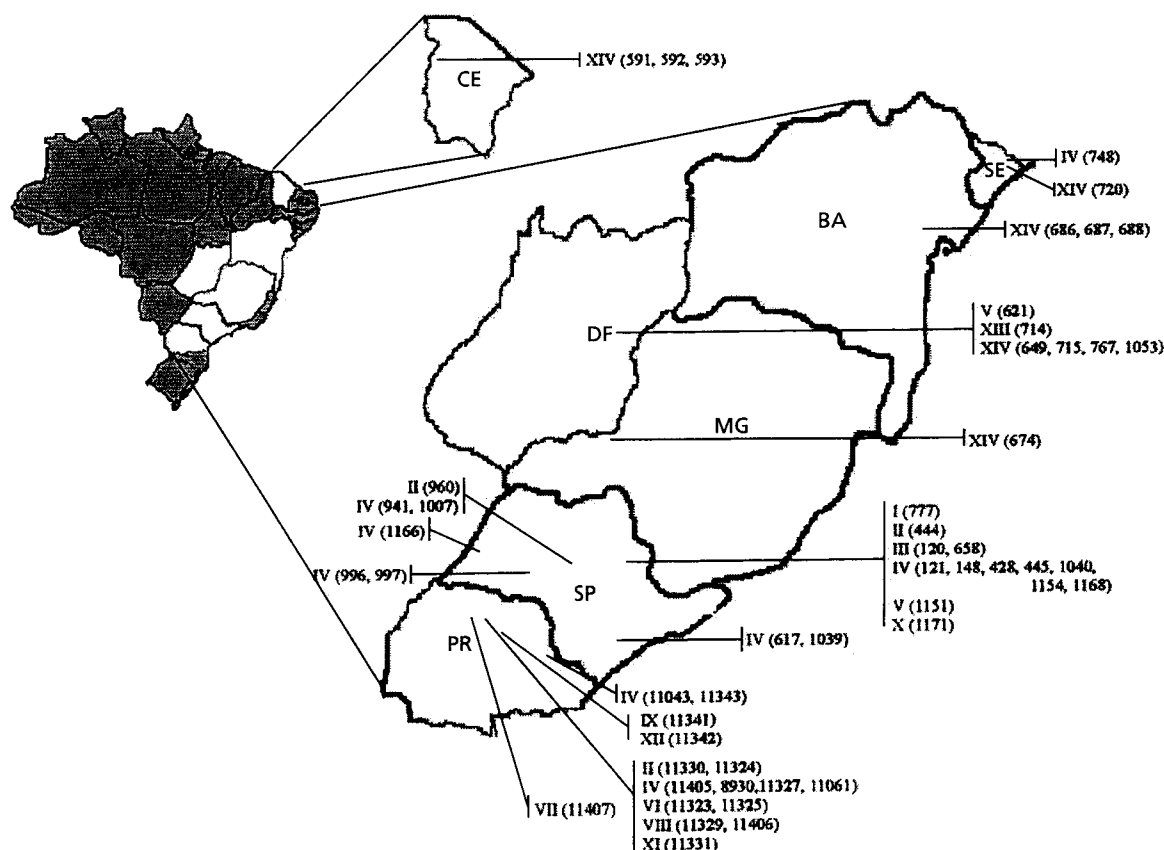


Fig. 1. Collection sites of *X. campestris* pv. *passiflorae* strains in Brazil. The Roman numerals refer to the clustering group obtained by RAPD analysis. The state name abbreviations are: BA, Bahia; CE, Ceará; DF, Federal District; MG, Minas Gerais; PR, Paraná; SE, Sergipe; and SP, São Paulo.

PCR amplification. All PCR reactions were performed in a total volume of 25 µl using 20–50 ng DNA. In the RAPD amplification, the primers OPR2, OPR6, OPR8 and OPQ4 (Operon Technologies) were used. The reaction contained 3.75 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 5 µM primer and 0.5 U *Taq* polymerase (BRL). The following cycling conditions were used: 1 × 94 °C for 3 min; 45 × (94 °C for 1 min, 34 °C for 1 min, 72 °C for 2 min). The rep primers (BOX, ERIC, REP) were used as described by Louws *et al.* (1994) with 100 µM dNTP for BOX and 300 µM for ERIC and REP. Amplification of the 16S–23S rDNA IGS was performed using the primers 16S uni330 and 23S uni322anti (Honeycutt *et al.*, 1995). The PCR reaction contained 3.75 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 5 µM primer and 0.5 U *Taq* polymerase (Pharmacia). The cycling conditions were: 1 × 94 °C for 1 min; 40 × (94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 1 min). Control reactions without DNA template were also run. The PCR amplifications were repeated at least twice for most of the strains. The DNA banding patterns obtained following electrophoresis in 1.2% agarose gels were recorded in a binary form (presence/absence). RFLP-IGS patterns were obtained by digestion of the amplification product (3–5 µl) with the restriction enzymes *Dde*I, *Hha*I, *Hinf*I, *Pst*I and *Sau*3AI. The digested fragments were separated in polyacrylamide gels (10%, w/v) and silver-stained (De Moreno *et al.*, 1985). The 16S rDNA gene, used as a probe to determine DNA concentration in DNA–DNA hybridization experiments, was obtained by PCR amplification of DNA from the strain ICMP 3151. The primers 16F27 and 16R1525 (Hauben *et al.*, 1997) were used in a reaction containing 20–50 ng DNA, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 0.5 µM of the primers and 0.5 U *Taq* polymerase (Pharmacia), in a total volume of 25 µl. The sample was cycled under the following conditions: 1 × 94 °C for 2 min; 40 × (94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min). The PCR product was purified from low-melting-point agarose gel according to Sambrook *et al.* (1989). In all cases, control reactions lacking DNA template were run.

SDS-PAGE of whole-cell proteins. SDS-PAGE was performed according to Jackman (1985) and Vauterin *et al.* (1991). Freshly grown cells (about 30 mg) were resuspended in TE buffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA), washed and resuspended in 100 µl of the sample buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 8.0, 20% (v/v) glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue). The mixture was heated at 95 °C for 5 min, centrifuged for 10 min and approximately 7 µl of the supernatant was loaded onto the gel. Electrophoresis was performed in a polyacrylamide gel (10 and 4% total acrylamide for the running and stacking gels, respectively). After electrophoresis, the protein bands were visualized by silver-staining (Blum *et al.*, 1987).

Data analysis. Data from the RAPD, rep-PCR and RFLP-IGS were scored in binary form (presence/absence) and similarity matrices were generated using the Jaccard coefficient (S_j). Relationships among strains were calculated with the algorithm UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) using the software package NTSYS-PC (Applied Biostatistics, Inc.).

DNA–DNA hybridization. Hybridization was performed using nylon membranes (Amersham) and a Hybri slot-blot manifold as described by the manufacturer (Bio-Rad). The probes were labelled using a DIG DNA labelling kit, and the bands were detected with the chemiluminescent substrate CSPD (disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan-4-yl) phenyl phosphate) as

recommended by the manufacturer (Boehringer Mannheim). The signal, detected by exposure to X-ray film (Kodak), was measured using an Ultrascan XL-enhancer laser densitometer (LKB Bromma).

RESULTS

Extensive polymorphism within the *passiflorae* group revealed by RAPD analysis

All *passiflorae* strains were collected from 1968 to 1996 in different states of Brazil (Fig. 1), mainly São Paulo and Paraná, and deposited in the IBSBF and IAPAR collections. The regions shown in Fig. 1 were broadly divided into a Northern region, consisting of the states of Bahia (BA), Ceará (CE), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) and Sergipe (SE); and a Southern region consisting of the states of Paraná (PR) and São Paulo (SP).

Preliminary RAPD experiments were conducted with 10 strains, using 13 primers to standardize the PCR conditions and to choose the appropriate primers. Most of the primers yielded no amplification or produced inconsistent PCR products and were not used. Four primers (OPR2, OPR6, OPR8 and OPQ4) were selected to assess the diversity among the 55 *X. campestris* pv. *passiflorae* strains. In the first evaluation, all *X. campestris* pv. *passiflorae* strains and the pathovar reference strain (ICMP 3151) were analysed. The PCR reaction was run at least twice for each strain. Inconsistent bands were checked by performing a third run. The primer OPR2 yielded fragments ranging from 0.3 to 1.6 kb and nine fragments were considered for analysis. A 1.0 kb band was common to all strains and variation was detected with the smaller fragments. Six different patterns were obtained and two major ones were shown by more than 75% of the strains. OPR6 amplified up to four fragments per strain (0.3–2.5 kb) and eight bands were included in the cluster analyses. A 2.5 kb band was shown by all strains. Two patterns were prevalent among the six detected. OPR8 produced greater polymorphism but visualization of the fragments was more difficult. Two bands, of 0.3 and 1.0 kb, were shared by all strains and the bands between these sizes yielded most of the differences among the strains. OPQ4 showed the lowest level of polymorphism, amplifying fragments of 0.5–2.0 kb. Two bands (0.8 and 1.4 kb) were shared by all strains. Five different patterns were detected, one of which was shown by more than 90% of the strains.

In the dendrogram constructed using 34 scored bands from the RAPD data (Fig. 2), few strains showed an identical RAPD pattern and three major clusters included 94% of the strains. One cluster comprised seven strains, isolated from different hosts (*P. edulis*, *P. alata* or *Passiflora* spp.) from the Southern states. A second cluster included 27 strains collected in the same region (Southern) but showed no correlation to the host and only two strains (748 and 621) were from the Northern region. A third cluster included 15 strains

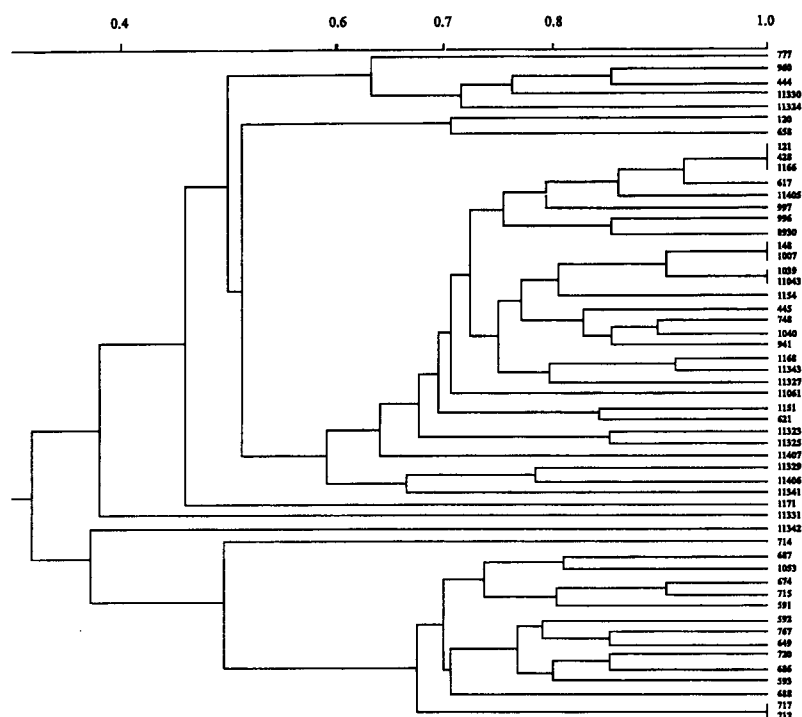


Fig. 2. Clustering (S/UPGMA) obtained from 54 *X. campestris* pv. *passiflorae* strains based on RAPD data for the primers OPR2, OPR6, OPR8 and OPQ4. Scale bar indicates similarity.

from the Northern states; most of these strains were isolated from an unknown host (*Passiflora* sp.). Five strains (714, 1171, 11407, 11331 and 11342) were not grouped and remained separated from the others.

A limit of 70 % of similarity was chosen in order to select representative strains of each cluster for further analysis. Accordingly, the 15 strains (I–XV) representing each cluster were: 777, 11324, 120, 121, 1151, 11323, 11407, 11329, 11341, 1171, 11331, 11342, 714, 592 and 717. Fig. 1 shows the distribution of all *passiflorae* strains designated by their cluster number. Clusters I–XII were collected in the Southern states, with a prevalence of strains from cluster IV (20 strains), which was widely distributed in both states (SP and PR). In contrast, strains from clusters XIII–XIV were found exclusively in the Northern region, with a prevalence of strains from cluster XIV (12 strains). These results indicate that the two regions have distinct populations (clusters) with almost no overlapping. Only two strains (748 and 621), from clusters IV and V, respectively, were found in the Northern states.

Relatedness of the selected *passiflorae* strains to different *Xanthomonas* species as assessed by RAPD

In a second evaluation by RAPD, the profiles of the 15 selected *passiflorae* strains and the pathovar reference strain, ICMP 3151, were compared to those obtained with 16 species of *Xanthomonas* and *P. syringae* pv. *passiflorae* using the primers OPR2, OPR6, OPR8 and OPQ4. A high level of polymorphism was detected and each species of *Xanthomonas* yielded a unique genomic

fingerprint. With OPR2, bands ranging from 0.3 to 3.0 kb were obtained and 23 bands were scored. All species showed a distinct profile; in some cases the profiles were similar but differed in at least one major band. OPR6 amplified fragments ranging from 0.5 to 3.0 kb and 20 bands were used in the analysis. This primer did not amplify DNA from *X. pisi* and *X. oryzae*. OPR8 produced fragments between 0.3 and 2.3 kb and 15 bands were scored. With OPQ4, 15 bands varying from 0.4 to 2.8 kb were used in the analysis. A total of 73 bands obtained with the four primers were used to construct the dendrogram based on a UPGMA algorithm (Fig. 3a). Each representative strain of the different *Xanthomonas* species showed a very distinctive pattern and the level of similarity among them was lower than 45 %. Some species, such as *X. campestris* and *X. axonopodis*, were closely related to each other (45 % similarity) and the *passiflorae* strains were also closer to these two species and to *X. vasicola* and *X. oryzae* (17 % similarity) than to the other species (<10 % similarity).

rep-PCR fingerprintings of selected *passiflorae* strains and *Xanthomonas* species

The set of rep primers, BOX, ERIC and REP, was used to amplify DNA from 16 *passiflorae* strains, 18 *Xanthomonas* species and *P. syringae* pv. *passiflorae*. Analysis of the individual and combined patterns using the three sets of primers revealed considerable genetic diversity. Amplification with BOX primers yielded 27 scorable bands, ranging from 4.0 to 0.5 kb. Within the *passiflorae* group, some strains showed

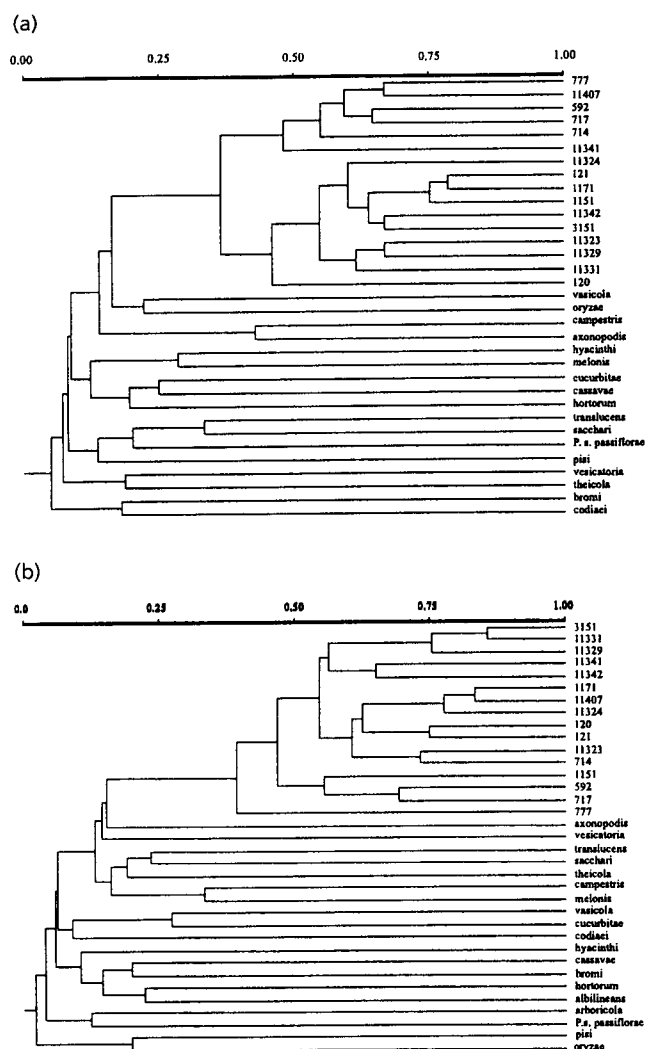


Fig. 3. (a) Clustering (S_1 /UPGMA) of 16 selected *passiflorae* strains and 16 *Xanthomonas* species based on RAPD data for the primers OPR2, OPR6, OPR8 and OPQ4. (b) Clustering (S_1 /UPGMA) obtained for the selected *passiflorae* strains and other *Xanthomonas* species using the combined data from rep-PCR experiments. Scale bar indicates similarity.

identical patterns (3151 = 120 = 121, 1151 = 11329, 1171 = 11407) and even though a reasonable degree of diversity was detected, a unique cluster was formed. Two bands (~ 0.7 and ~ 0.6 kb) were consistently shared by all *passiflorae* strains. ERIC primers yielded a broader range of variation and other *Xanthomonas* species (*cassavae*, *campestris* and *melonis*) were embedded within the *passiflorae* group. A total of 20 bands, most of them varying from 0.5 to 3.0 kb, were considered for cluster analysis. A very intense and high-molecular-mass (5.0 kb) band was observed with *X. arboricola*. Amplification with REP primers showed unique patterns for the *Xanthomonas* species. A total of 16 bands (0.3–3.1 kb) were scored and included in the analysis. Two strains (11329 and 11341) showed

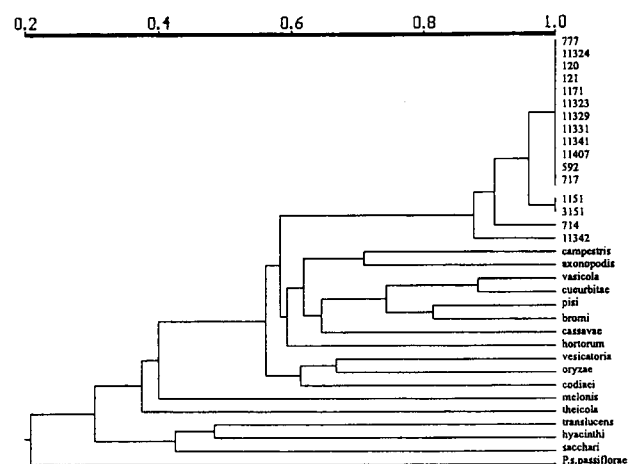


Fig. 4. Dendrogram (S_1 /UPGMA) of the RFLP patterns of the 16S–23S rDNA IGS of *passiflorae* strains and other *Xanthomonas* species digested with the restriction enzymes *DdeI*, *HhaI*, *HinfI*, *PstI* and *Sau3AI*. Scale bar indicates similarity.

identical patterns. The *Xanthomonas* species were clearly differentiated from the *passiflorae* strains.

A dendrogram based on the combined data of the rep primers (Fig. 3b) showed that each *passiflorae* strain and each *Xanthomonas* species was identifiable by unique patterns. The genetic diversity within the *passiflorae* group was substantial, with similarities of 38–85%. This group was distantly related to the other *Xanthomonas* species (< 15% similarity). The level of relatedness among the *Xanthomonas* species was also very low (< 15%).

RFLP-IGS of selected *passiflorae* strains and *Xanthomonas* species

All 16 *passiflorae* strains and most of the *Xanthomonas* species yielded a single PCR product of ~ 1.1 kb. The *Pseudomonas* species showed a higher band (~ 1.2 kb). The IGS products were digested with *DdeI*, *HhaI*, *HinfI*, *PstI* and *Sau3AI* restriction enzymes and the products were separated in polyacrylamide gels (data not shown). A low level of polymorphism was detected within the *passiflorae* group and identical profiles were obtained using *DdeI* or *HinfI*. With *HhaI*, *PstI* and *Sau3AI*, two patterns were obtained with each enzyme: a major pattern shown by most of the strains and a second which was shown by one or two strains. The dendrogram depicted in Fig. 4 was constructed by using 81 different bands, ranging from 20 to ~ 1100 bp. The *passiflorae* strains revealed an unexpected variation of up to 15%. This variation represents differences in one to three bands. Fig. 4 also shows the relationships with the other *Xanthomonas* species. A high degree of polymorphism was detected and the level of similarity ranged from 30 to 87%. The species *X. vasicola* and *X. cucurbitae* and *X. pisi* and *X. bromi*

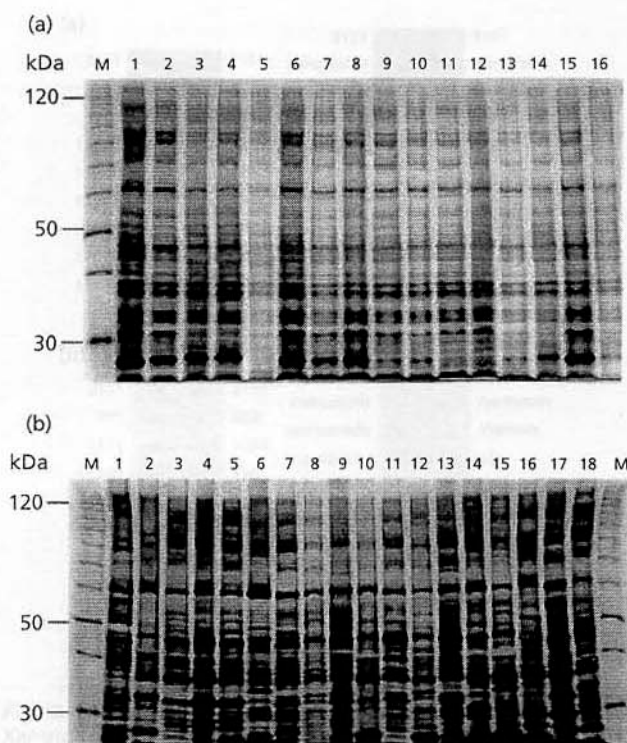


Fig. 5. SDS-PAGE of whole-cell proteins of (a) *passiflorae* strains and (b) other *Xanthomonas* species plus *P. syringae* pv. *passiflorae*. (a) Lanes: M, 1.0 kb molecular mass markers (Gibco-BRL); 1, ICMP 3151 (reference strain); 2, 777; 3, 120; 4, 121; 5, 714; 6, 1171; 7, 11324; 8, 11323; 9, 11407; 10, 11329; 11, 11341; 12, 11331; 13, 11342; 14, 592; 15, 1151; 16, 717. (b) Lanes: M, 1.0 kb molecular mass markers (Gibco-BRL); 1, ICMP 3151 (*X. campestris* pv. *passiflorae* reference strain); 2, *X. campestris*; 3, *X. axonopodis*; 4, *X. translucens*; 5, *X. hyacinthi*; 6, *X. vesicatoria*; 7, *X. sacchari*; 8, *X. vasicola*; 9, *X. cucurbitae*; 10, *X. melonis*; 11, *X. cassavae*; 12, *X. hortorum*; 13, *X. theicola*; 14, *X. pisi*; 15, *X. bromi*; 16, *X. codiae*; 17, *X. oryzae*; 18, *P. syringae* pv. *passiflorae*.

were closer to each other, whereas *X. theicola*, *X. translucens*, *X. hyacinthi* and *X. sacchari* were more distantly related to other *Xanthomonas* species. The *passiflorae* group showed ~60% similarity to a major cluster which included the following species: *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. vasicola*, *X. cucurbitae*, *X. pisi*, *X. bromi*, *X. cassavae* and *X. hortorum*.

SDS-PAGE of whole-cell proteins

The whole-cell protein patterns of the 16 *passiflorae* strains, 16 species of *Xanthomonas* and *P. syringae* pv. *passiflorae* were analysed by SDS-PAGE (Fig. 5). The protein bands showed a very homogeneous profile within the *passiflorae* strains and most of the bands were shared by all strains. Differences among the strains were most commonly related to the intensity of certain bands (Fig. 5a). In contrast, the protein patterns of the *Xanthomonas* species showed a high level of diversity and there was no identical profile

(Fig. 5b). A band of approximately 60 kDa was common to all *Xanthomonas* strains and a few other bands were considered common to some species. For example, a 52 kDa band was exhibited by the *passiflorae* strains, *X. campestris*, *X. axonopodis*, *X. vasicola*, *X. cassavae*, *X. theicola*, *X. pisi*, *X. bromi* and *X. codiae*. A dendrogram constructed (not shown) showed that the similarity within the *passiflorae* group was very high, ranging from 94 to 100%, and a major cluster included 87.5% of the strains analysed. The *passiflorae* strains were more related to *X. axonopodis*, *X. pisi*, *X. bromi* and *X. hyacinthi*. The different *Xanthomonas* species had a high level of heterogeneity (25–75%). *X. axonopodis*, *X. pisi*, *X. bromi*, *X. hyacinthi*, *X. hortorum*, *X. codiae*, *X. vesicatoria*, *X. vasicola*, *X. campestris*, *X. melonis* and *X. cassavae* showed the highest similarity values, from 50 to 75%. The other *Xanthomonas* species showed lower values (<37%).

DNA–DNA hybridization

The hybridization was performed using DNA from the 16 *passiflorae* strains, 16 species of *Xanthomonas* and *P. syringae* pv. *passiflorae*. Digoxigenin-labelled DNA of the pathovar reference strain (ICMP 3151) was used as a probe and detected by chemiluminescence. Although similar methods have been described previously, most of them have used biotinylated DNA (see Jahnke, 1994). For this reason, the detection limit of the assay and the effect of the amount of DNA were determined. The detection level was tested using different concentrations of DNA (100, 250, 500, 750, 1000 and 2000 ng) from two distantly related species, *X. campestris* pv. *passiflorae* ICMP 3151 and *X. albilineans*. The intensity of the bands was more variable when homologous DNA was used and less than 100 ng of DNA could be detected. However with this amount of DNA no band was seen with non-homologous DNA. For this reason, the amount of DNA used was fixed at 200 ng, which yielded a weak detectable band in non-homologous hybridization. As the amount of DNA had to be measured precisely, different methods were tested. Initially the DNA levels were estimated either by the absorbance at 260 nm or by visual inspection of gels containing a known amount of λ DNA. Since neither of these methods was precise, a finer estimate was obtained by hybridization. A presumed amount of 200 ng DNA was applied onto nylon membranes and hybridization was carried out with digoxigenin-labelled 16S rDNA, obtained by PCR amplification of *X. campestris* pv. *passiflorae* ICMP 3151, as a probe. The homology of the 16S rDNA was assumed to be equivalent in all *Xanthomonas* species because of the high level of similarity of this gene (mean of 98%) within the genus (Hauben *et al.*, 1997). Two nylon membranes (two replicates) were prepared using the estimated 200 ng DNA from all 16 *passiflorae* strains, 17 *Xanthomonas* species and *P. syringae* pv. *passiflorae* and the membranes were then hybridized to the 16S

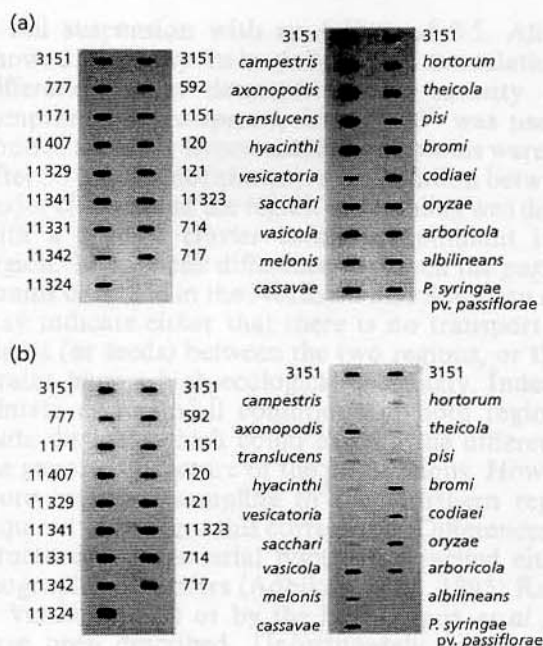


Fig. 6. DNA-DNA hybridization of *passiflorae* strains (left) and *Xanthomonas* species plus *P. syringae* pv. *passiflorae* (right) with a 16S rDNA probe (a) and with DNA from *passiflorae* ICMP 3151 as a probe (b).

rDNA probe to estimate the DNA concentration of each strain. The bands obtained (Fig. 6a) were read in a densitometer and one band was considered as a control with a defined DNA concentration. Thus, for example, a densitometer reading of 9.7 for the corresponding band of *passiflorae* ICMP 3151 was assumed as containing 200 ng DNA. All other readings were normalized to this control. The two membranes were dehybridized and reused for hybridization with the DNA from *passiflorae* ICMP 3151 used as a probe. The results (Fig. 6b) were read in a densitometer, corrected for the concentration of DNA and are shown in Fig. 7. For hybridizations within the *passiflorae* group, all strains showed homologies of 73–160%. Hybridization of the *passiflorae* ICMP 3151 to other *Xanthomonas* species revealed two groups of DNA homology. One group, with DNA homology values between 39 and 50%, included *X. oryzae*, *X. bromi*, *X. vasicola*, *X. cassavae* and *X. codiae*. The second group (2–27% homology) included all other *Xanthomonas* strains. *P. syringae* pv. *passiflorae* showed 0.65% homology to the *passiflorae* strain. A homology of 67.5% was obtained with *X. axonopodis*. The standard deviation ranged from 0.01 to 6.8%, excluding *X. cassavae*, which presented a considerable variation (18.5%), and *X. melonis* and *X. oryzae* (both ~8.5%). Pairwise comparisons of the binding values between *X. axonopodis* and other species reported by Vauterin *et al.* (1995) with the values obtained here revealed some similarities. The major discrepancies in the homology were related to the species *X. campestris* and *X.*

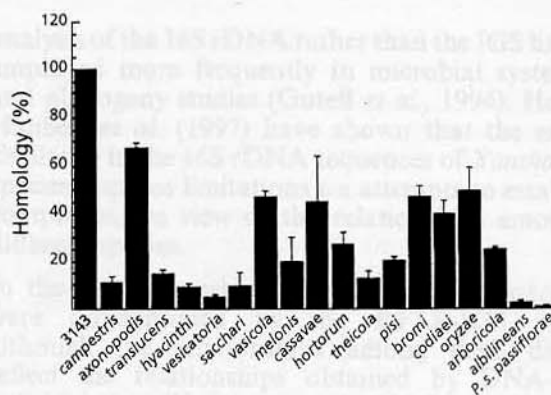


Fig. 7. DNA-DNA homology (%) of the *passiflorae* ICMP 3151 (used as a probe) compared to different *Xanthomonas* species plus *P. syringae* pv. *passiflorae*.

vesicatoria, which had values lower than 15%. In other cases, the relatedness between *X. axonopodis* and other *Xanthomonas* species was comparable, especially with the more distantly related species. Accordingly, the *Xanthomonas* species *translucens*, *hyacinthi*, *sacchari*, *theicola* and *albilineans* were the least related to *X. axonopodis*. The DNA-DNA hybridizations were repeated to confirm the homology of the *passiflorae* strain to *X. axonopodis* and its relationship to *X. campestris*. The results showed 54% homology of the *passiflorae* strain with *X. axonopodis* and 16% homology with *X. campestris*.

DISCUSSION

Few studies have been conducted with xanthomonads from passion fruit plants and here we present a first survey of strains in this group analysed by RAPD genomic fingerprinting. Extensive genetic diversity was observed and very few of the 55 strains of *X. campestris* pv. *passiflorae* studied were considered to be identical. The high level of polymorphism in these pathogens may be attributed to the long period of existence of *Passiflora* plants in Brazil. *P. edulis* is native in Southern Brazil and was introduced into other countries (Australia, South Africa, New Zealand, Hawaii and Kenya) in the nineteenth century for commercial purposes (see Smith, 1976). Similar diversity has been described for *X. campestris* pv. *manihotis* in South America but is less in the more homogeneous populations of Africa where the *Manihot* plant was introduced more recently (Verdier *et al.*, 1994). Three major clusters, which included most of the strains, and 12 minor clusters were observed in the *passiflorae* strains, based on a minimum level of similarity of ~70%. The pathogenicity of a representative strain of each cluster together with the pathovar reference strain (ICMP 3151) was confirmed by bacterial infiltration on detached leaves of *P. alata*. Two leaves per strain were inoculated with 20–50 µl of

a cell suspension with an OD₆₀₀ of 0.5. All leaves showed a greasy halo 4–7 d after inoculation. No differences were detected in the severity of the symptoms. *X. campestris* LMG 568^T was used as a control and only hypersensitive symptoms were visible after 30 h (data not shown). A correlation between the major clusters and the region of sampling was detected, with a specific cluster being predominant in each region. The genetic differences between the *passiflorae* strains collected in the Northern and Southern regions may indicate either that there is no transport of the plants (or seeds) between the two regions, or that the strains have a high ecological specificity. Indeed, the climate and rainfall conditions in both regions are quite distinct, which could explain the differences in the genomic structure of the populations. However, a more intensive sampling in the Northern region is required to confirm this correlation. Differences in the structure of a bacterial population incited either by geographical barriers (Adhikari *et al.*, 1995; Restrepo & Verdier, 1997) or by the hosts (Saux *et al.*, 1998) have been described. Unfortunately, in the present work the hosts of the strains belonging to clusters XIII–XV were unavailable and the host–pathogen relationship could not be assessed.

Although the rep primers exploit more specific regions in the genome, the existence of a high level of polymorphism was confirmed by the amplification products obtained with these primers. A complex pattern of unique fingerprints was obtained for the 16 selected *passiflorae* strains and the 18 *Xanthomonas* species. The repetitive sequences ERIC and REP are highly conserved in eubacteria (Versalovic *et al.*, 1991; Sharples & Lloyd, 1990), including phytopathogenic bacteria such as *Xanthomonas* and *Pseudomonas* (Louws *et al.*, 1994, 1995). In bacteria interacting with plants, these three sets of repetitive primers have revealed substantial polymorphism at an infra-specific level (Selenska-Pobell *et al.*, 1995; Louws *et al.*, 1994, 1995; Vinuesa *et al.*, 1998). The evolutionary conservation of these repetitive elements in eubacteria has been explained by assuming they have a role in regulating important functions (Higgins *et al.*, 1998). However, the extensive infra-specific level variation has not been explained. Indeed, each strain analysed yielded a strain-specific fingerprint, indicating a high level of changes generating distinct genomic structures. In *Candida albicans* (Scherer & Stevens, 1998), repetitive elements may affect genomic stability by promoting chromosomal rearrangements or by providing hot-spots for recombination. In *Escherichia coli*, 500–100 copies of REP elements are present and because of the high level of homology among them (see Gilson *et al.*, 1987) possibly they can act as homology cassettes. Such variation has also been reported for another repetitive element described by Leach *et al.* (1992).

The RFLP-IGS analysis, although performed with a limited number of restriction enzymes, was still able to detect diversity within the *passiflorae* group. In general,

analysis of the 16S rDNA rather than the IGS has been employed more frequently in microbial systematics and phylogeny studies (Gutell *et al.*, 1994). However Hauben *et al.* (1997) have shown that the extreme similarity in the 16S rDNA sequences of *Xanthomonas* species imposes limitations on attempts to establish a comprehensive view of the relationships among the different species.

In the present work, all 16 species of *Xanthomonas* were differentiated by the RFLP-IGS pattern, although the relationships among them did not reflect the relationships obtained by DNA–DNA hybridization (Vauterin *et al.*, 1995) or 16S rDNA analysis (Hauben *et al.*, 1997). However, the data were comparable when distant species were considered. Accordingly, the *X. albilineans* (comprising *X. translucens*, *X. hyacinthi* and *X. theicola*) and the *X. sacchari* cores are more distantly related to the other *Xanthomonas* species (the *X. campestris* core). Although only a few strains representing different *Xanthomonas* species were tested in the present work, the level of differentiation among them was striking. Indeed, the RFLP-IGS pattern using only three restriction enzymes, *Dde*I, *Hinf*I and *Sau*3AI, was efficient in discriminating all 16 species of *Xanthomonas*. The *passiflorae* group could not be allocated to any *Xanthomonas* species based on the RFLP pattern and may therefore represent a new species. The species most related to the *passiflorae* strains were *X. campestris* and *X. axonopodis*, although the level of similarity was low (~59%). Indeed, the similarity between *X. vasicola* and *X. cucurbitae*, for example, was higher (89%) than the similarity of the *passiflorae* group to any other *Xanthomonas* species (<60%). Since it is not yet possible to establish the limits of RFLP-IGS in unambiguously delineating taxa at the species level, a greater number of strains representing each *Xanthomonas* species needs to be examined and the 16S–23S rDNA IGS sequences determined in order to establish the usefulness of this genomic region as a marker of genetic diversity and/or as a taxonomic tool. The heterogeneity in the 16S–23S rDNA IGS has been attributed to the number, length and composition of these spacers and it has been exploited to differentiate various bacterial species or strains (see Gürtler & Stanisich, 1996). Although the 16S–23S rDNA IGS of *Xanthomonas* has not been analysed in detail, it is likely that a higher level of heterogeneity exists in this region than in the conserved 16S rDNA. A more detailed analysis of this region in *Xanthomonas* species may reveal the extent of the differences observed and also would allow the construction of a phylogenetic tree more consistent with the DNA–DNA hybridization data by defining more clearly the phylogenetic relationships of closely related species.

SDS-PAGE of whole-cell proteins revealed a very uniform pattern within the *passiflorae* group, as described for other pathovars of *Xanthomonas* (see Vauterin *et al.*, 1991). In contrast, discriminating patterns were shown by different species of *Xantho-*

monas. Since the *passiflorae* group was closely related to a major cluster comprising various *Xanthomonas* species, the taxonomic position of this group could not be assigned with certainty.

A general comparison of the approaches used in this study shows that they are not comparable since clustering obtained by one method was disrupted when another method was used. The results were therefore not sufficiently consistent to allow a taxonomic allocation of the *passiflorae* strains within the genus *Xanthomonas*. DNA-DNA hybridization, however, allocated this group to *X. axonopodis* with a mean homology of 60.7%. This species is the largest and most genomically heterogeneous group in the *Xanthomonas* genus and includes 34 former *X. campestris* pathovars and *X. axonopodis* (Vauterin *et al.*, 1995). Based on these results, a new designation of *X. campestris* pv. *passiflorae* as *X. axonopodis* pv. *passiflorae* is suggested. The pathovar characterization described by Pereira (1969) is maintained.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (Proc. 90/7067-1). CNPq sponsored a studentship to E.R.G. The authors thank Dr L. O. S. Beriam and Dr J. Rodrigues Neto (IB/SBF) and Dr R. P. Leite (IAPAR) for providing the *passiflorae* strains, and Dr S. Hysiop for revising the English.

REFERENCES

- Adhikari, T. B., Vera Cruz, C. M., Zhang, Q., Nelson, R. J., Skinner, D. Z., Mew, T. W. & Leach, J. E. (1995). Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Appl Environ Microbiol* **61**, 966–971.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, J. J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–98.
- de Bruijn, F. J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2180–2187.
- De Moreno, M. R., Smith, J. F. & Smith, R. V. (1985). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Anal Biochem* **151**, 466–470.
- Gilson, E., Rousset, J. P., Clement, J. M. & Hofnung, M. (1987). Palindromic units: a case of highly repetitive DNA sequences in bacteria. *Trends Genet* **3**, 226–230.
- Gürtler, V. & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**, 3–16.
- Gutell, R. R., Larsen, N. & Woese, C. R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* **58**, 10–26.
- 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.
- Higgins, C. F., McLaren, R. S. & Newbury, S. F. (1998). Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene

expression: evolution by gene conversion? – a review. *Gene* **72**, 3–14.

Honeycutt, R. J., Sobral, B. W. S. & McClelland, M. (1995). tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology* **141**, 3229–3239.

Jackman, P. J. H. (1985). Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 115–129. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. London: Academic Press.

Jahnke, D. D. (1994). A modified method of quantitative colorimetric DNA-DNA hybridization on membrane filters for bacterial identification. *J Microbiol Methods* **20**, 273–288.

Leach, J. E., Rhoads, M. L., Vera Cruz, C. M., White, F. F., Mew, T. W. & Leung, H. (1992). Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2188–2195.

Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & de Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2286–2295.

Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & de Bruijn, F. J. (1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **85**, 528–536.

Pereira, A. L. G. (1969). Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n.sp. *Arq Inst Biol* **36**, 163–174.

Restrepo, S. & Verdier, V. (1997). Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4427–4434.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Saux, M. F.-L., Mauléon, H., Constant, P., Brunel, B. & Boemare, N. (1998). PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4246–4254.

Scherer, S. & Stevens, D. A. (1998). A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 1452–1456.

Selenska-Pobell, S., Gigova, L. & Petrova, N. (1995). Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. *J Appl Bacteriol* **79**, 425–431.

Sharples, G. P. & Lloyd, R. G. (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* **18**, 6503–6508.

Smith, P. M. (1976). Minor crops. In *Evolution of Crop Plants*, pp. 301–304. Edited by N. W. Simmonds. New York: Longman.

Souza, J. S. I. & Meletti, L. M. M. (1997). *Maracujá: Espécies, Variedades, Cultivo*, 1st edn. FEALQ, Piracicaba, Brazil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz.

Teixeira, C. G. (1994). Cultura. In *Maracujá: Cultura, Matéria Prima, Processamento e Aspectos Econômicos*, pp. 1–142 (Série Frutas Tropicais, 9). Campinas, Brazil: Instituto de Tecnologia de Alimentos.

Torres Filho, J. & Ponte, J. J. (1994). Estudo sobre o controle da bacteriose ou “morte precoce” (*Xanthomonas campestris* pv.

- passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Fitopatol Bras* **18**, 34–38.
- Turner, T., Barber, C. & Daniels, M. (1984). Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Gen Genet* **195**, 101–107.
- 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., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 472–489.
- Verdier, V., Boher, B., Maraite, H. & Geiger, J. P. (1994). Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Appl Environ Microbiol* **60**, 4478–4486.
- Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823–6831.
- Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., de Bruijn, F. J. & Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S–23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2096–2104.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213–7218.
- Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., De Boer, S. H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R. I. & Stead, D. E. (1996). Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. *Rev Plant Pathol* **75**, 721–763.

Segundo artigo: A phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences

A phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences

Edmilson R. Gonçalves and Yoko B. Rosato

Department of Genetics, CBMEG, State University of Campinas

13087-930 Campinas, SP, Brazil

Running Title: Phylogeny of *Xanthomonas*

Keywords: *Xanthomonas*, Phylogenetic analysis, 16S-23S spacer

A ser submetido para publicação na revista International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

A phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences

Edmilson R. Gonçalves and Yoko B. Rosato

Department of Genetics, CBMEG, State University of Campinas
13087-930 Campinas, SP, Brazil

Abstract

The phylogenetic relationships of 19 species of *Xanthomonas*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* and *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* were assessed based upon the analysis of 16S-23S intergenic spacer (ITS) sequences. ITS sequences varied from 492 to 578 bp within the genus *Xanthomonas*, and had 558 and 587 bp were found for *E. carotovora* and *P. syringae*, respectively. The similarity between *Xanthomonas* ITS sequences ranged from 63 to 99%. Major differences were found for the *translucens* group, which included *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola* and *X. translucens*. A common ITS structure with tRNA^{Ala} and tRNA^{Ile} embedded was found for all ITS sequences of *Xanthomonas* species and *Xylella fastidiosa* analysed. These tRNAs were highly conserved and divided the ITS sequence into three regions named ITS1, ITS2 and ITS3. ITS1 sequences of *Xanthomonas* species showed an average similarity of 88.4% and differences consisted basically of substitution and addition/deletion of isolated nucleotides. ITS2 showed remarkable divergence in sequence length, with most species exhibiting 19-20 bp, whereas a long insertion of 51-56 bp was found in *X. codiae*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. theicola* and *X. translucens*. ITS3 was the longest sequence and exhibited a mean sequence similarity of 82.9% within the genus. Major differences consisted of substitutions and addition/deletion of 1-5 bases. The most striking difference was observed in *X. hyacinthi*, which showed two large deletions, of 44 bp. The phylogenetic tree constructed based ITS sequences grouped *Xanthomonas* species into three major clusters. Cluster I included *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. vasicola* and *X. vesicatoria*. Cluster II, comprised *X. axonopodis*, *X. codiae* and *X. melonis* and Cluster III grouped *X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. hyacinthi*, *X. theicola* and *X. translucens*. The topology of the tree based on ITS sequences showed similarities with previous phylogenetic analysis based on rDNA 16S data (Hauben, *et al.*, 1997).

Introduction

The xanthomonads constitute a ubiquitous group of bacteria showing a diverse physiological traits and phytopathological specialization. Organisms from this group have been submitted to a range of taxonomic studies aiming to achieve a coherent view of the species relationships within the genus. Several approaches have been used for this purpose and large taxonomic modifications were introduced by Vauterin *et al.* (1995). Based mainly in studies of DNA:DNA reassociation the former *X. campestris* was split into 16 genomic species. Altogether the genus *Xanthomonas* comprises up to date 20 genomic species. These genomic species have also been analyzed by comparison of the 16S ribosomal DNA gene (Hauben *et al.*, 1997) and a very small degree of divergence was reported among the xanthomonads. Three phylogenetic lineages were detected and the major group included 15 *Xanthomonas* species indicating that the high level of conservation of the 16S gene restricts the studies of interspecific relationships within the genus.

The high level of similarity found in the sequence of 16S rDNA gene within the genus *Xanthomonas* prompted us to investigate another molecular phylogenetic marker, the 16S-23S rDNA intergenic spacer (ITS) to determine a more accurate species delineation. PCR-RFLP of ITS sequences has already been used in several *Xanthomonas* species and a consistent degree of variation was found (Gonçalves and Rosato, 2000). The ITS sequences have been under less intensive selection pressure during the evolution and it is considered to be tenfold more variable than the 16S gene (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). It is located between the ribosomal subunits, 16S and 23S, and in most Gram-negative bacterial species it contains both, a tRNA^{Ala} and tRNA^{Ile} embedded within the sequence (for a review, see Gürtler and Stanisich, 1996).

In the present report we determined the sequence of 20 complete ITS regions comprising 17 sequences of *Xanthomonas* species representing distinct genomic species described by Vauterin *et al.* (1995), *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. The comparison of the data permitted verify greater diversity of the ITS sequences than 16S gene and to infer the phylogenetic relationships within the genus.

METHODS

Bacterial strains and culture medium The following type (^T) and reference strains of *Xanthomonas* described by Vauterin *et al.* (1995) were acquired from the culture collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium: *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG538^T, *X. bromi* LMG 947^T, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568^T, *X. cassavae* LMG 673^T, *X. codiae* LMG8678, *X. cucurbitae* LMG 690^T, *X. fragariae* LMG708^T, *X. hortorum* pv. *hederae* LMG 733, *X. hyacinthi* LMG 739^T, *X. melonis* LMG 8670^T, *X. pisi* LMG 847^T, *X. sacchari* LMG 471^T, *X. theicola* LMG 8684^T, *X. translucens* pv. *translucens* LMG 876^T, *X. vasicola* pv. *holcicola* LMG 736^T, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* LMG 2404 and *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* LMG 5185. The strains *X. albilineans* ICMP196, *X. arboricola* pv. *juglandis* ICMP 35 and *X. axonopodis* pv. *passiflorae* ICMP 3151 were provided by the International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand. All strains were grown on NYG medium (Turner *et al.*, 1984) at 30 °C.

DNA extraction. An aliquot (1.5 mL) of bacterial suspension, grown overnight, was washed with 500 µL of TAS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl), centrifuged and resuspended in 450 µL of the same buffer. Fifty microliters of SDS (10%, w/v) and 100 µg of proteinase K were added and the mixture was incubated for 1 h at 55 °C. Proteins and cell debris were extracted with phenol and chloroform and the aqueous suspension was then dialyzed against TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA) for 48 h. DNA concentration was estimated by comparison with known concentration of λ DNA in agarose gel electrophoresis (Sambrook *et al.*, 1989).

PCR reaction and cloning. Amplification of the ITS region was carried out using the primers 16S uni1330 (5'-GTTCCCGGGCCTTGTACACAC-3') and 23S uni 322 anti (5'-GGTTCTTTTCACCTTTCCTC-3'), described by Honeycutt *et al.* (1995). All PCR reactions were performed in a total volume of 25 µL using 30-50 ng of DNA, 1.25 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0.5 mM of each primer and 0.5 U *Taq* polymerase

(Pharmacia). Cycling conditions were: 1 X 94 °C/30 s, 40 X (94 °C/30 s, 65 °C/30s, 72 °C/1 min). PCR products were cloned using the pGEM T-easy kit (Promega).

DNA sequencing. Plasmids were extracted using the Concert Rapid Plasmid Miniprep System (Gibco, BRL) and sequencing reaction were carried out with the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) using both primers M13/pUC forward (5'-CCCAGTCACGACGTTGAAAAACG-3') and M13/pUC reverse (5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'). Sequences were read in the automatic sequencer ABI 373 (Perkin Elmer). All sequencing procedures were repeated at least twice for each strain.

Analysis of sequence data. ITS sequences were aligned using the Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994) and the evolutionary distance was obtained using p-distance method and the topology of the tree was assessed by the neighbor joining method (Saitou and Nei, 1987) and the Bootstrap values were obtained from 2.000 replicates using the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) package, version 1.01.

Nucleotide sequence accession numbers. The ITS sequences determined in this work were deposited in the GenBank under the accession numbers shown in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Structure and similarity of ITS sequences among *Xanthomonas* spp.

16S-23S ITS fragments from *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, 17 strains representing distinct genomic species of the genus *Xanthomonas*, *P. syringae* pv. *passiflorae* LMG5185 and *E. carotovora* pv. *carotovora* ICMP5702 were amplified using primers binding to conserved regions of 16S and 23S ribosomal genes. A unique PCR product of approximately 1.1 kb was generated for all *Xanthomonas* strains. *P. syringae* pv. *passiflorae* and *E. carotovora* pv. *carotovora* yielded fragments of ~1.2 and ~1.0 kb, respectively. The nucleotide sequences of the ITS fragments from these

Table 1 - Size and GC contents of ITS sequences from *Xanthomonas* and some others taxa.

Species	Strain	Spacer size (pb)				% GC	Accession Number GenBank
		ITS1	ITS2	ITS3	TOTAL		
<i>Xanthomonas</i>							
<i>X. albilineans</i>	ICMP196	106	14	223	497	53,50	AF209751
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	ICMP35	109	19	226	507	51,08	AF209752
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	LMG538	113	18	232	519	51,63	AF209753
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	ICMP3151	113	18	229	507	53,06	AF209766
<i>X. bromi</i>	LMG947	112	19	228	510	51,96	AF209754
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	LMG568	112	19	225	509	50,69	AF209755
<i>X. cassavae</i>	LMG673	113	19	228	513	51,66	AF209756
<i>X. codiae</i>	LMG8678	113	79	228	578	54,30	AF260971
<i>X. cucurbitae</i>	LMG690	110	19	219	501	52,49	AF209757
<i>X. fragariae</i>	LMG708	114	19	226	512	51,40	AF260972
<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	LMG733	113	19	226	510	51,17	AF209758
<i>X. hyacinthi</i>	LMG739	103	75	166	493	55,57	AF209759
<i>X. melonis</i>	LMG8670	112	75	230	569	53,08	AF209760
<i>X. pisi</i>	LMG847	110	19	227	510	50,39	AF209761
<i>X. sacchari</i>	LMG471	106	15	218	492	53,05	AF209762
<i>X. theicola</i>	LMG8684	105	77	208	541	57,11	AF209763
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	LMG876	103	76	208	540	55,37	AF209764
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	LMG736	113	19	227	510	50,98	AF209765
<i>Erwinia</i>							
<i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	LMG2404	155	331	--	558	45,34	AF209772
<i>Pseudomonas</i>							
<i>P. syringae</i> pv. <i>passiflorae</i>	LMG5185	114	399	--	587	48,21	AF209771

strains were determined and the flanking ends, corresponding to the sequences of the 16S and 23S ribosomal genes excluded.

The 20 ITS sequences obtained in the present study were compared to other *Xanthomonas* sequences available in the GenBank database namely *X. gardneri* (AF123093), *X. oryzae* (ABO26287), *X. vesicatoria* (AF123088), and to *Xylella fastidiosa* (AF073215). ITS sequences similarities among the 19 *Xanthomonas* species, *P. syringae* pv. *passiflorae*, *E. carotovora* and *Xylella fastidiosa* are shown in Table 2. A wide range of similarity was found among the *Xanthomonas* species, from 63 to 99% (average of $86.2\% \pm 10.6\%$), which is highly contrasting with the similarity level of the 16S sequences of $99.0\% \pm 1.0\%$ (Hauben *et al.*, 1997). Overall the lowest level of similarities (63 – 72.6%) was presented by *X. hyacinthi*, followed by *X. theicola* and *X. translucens* (70.8 – 89.1%).

The size of ITS sequences varied from 492 to 578 bp among the *Xanthomonas* species and analysis of these revealed the existence of both tRNA^{Ala} and tRNA^{Ile} genes (see Fig. 1). This finding is consistent with previous report (Honeycutt *et al.*, 1995), which described the existence of these tRNAs in *X. albilineans*. Both tRNAs were highly conserved in all *Xanthomonas* species with small differences in size (Fig.2). tRNA^{Ala} ranged from 72 to 77 bases and the anticodon found was UGC. Addition/deletions of isolated bases were observed for the species *X. albilineans*, *X. arboricola*, *X. codiae*, *X. hortorum*, *X. pisi*, and *X. theicola*. Also an addition of 2 bases was showed by *X. codiae*. The species *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola* and *X. translucens*, refereed to as the translucens group, showed a substitution from T to A at position 7. tRNA^{Ile} varied from 73 to 80 bases and the anticodon found was GAU. The sequence was also highly conserved and a total of 9 substitutions and 11 addition/deletions were observed. *X. axonopodis* showed highest number of addition/deletions events (7), occurring isolated or as blocks of 2-3 bases. In *P. syringae* pv. *passiflorae* and *E. carotovora* one putative tRNA^{Ile} and tRNA^{Glu} were found, respectively.

The tRNAs split the ITS into three regions named ITS1, ITS2 and ITS3. Distinct ITS regions from *Xanthomonas* spp. showed variable degree of divergence (Table 1

Table 2 - Similarity levels of ITS sequence of different *Xanthomonas* species, *Xylella*, *Pseudomonas* and *Erwinia* obtained by pairwise comparison.

[illegible]

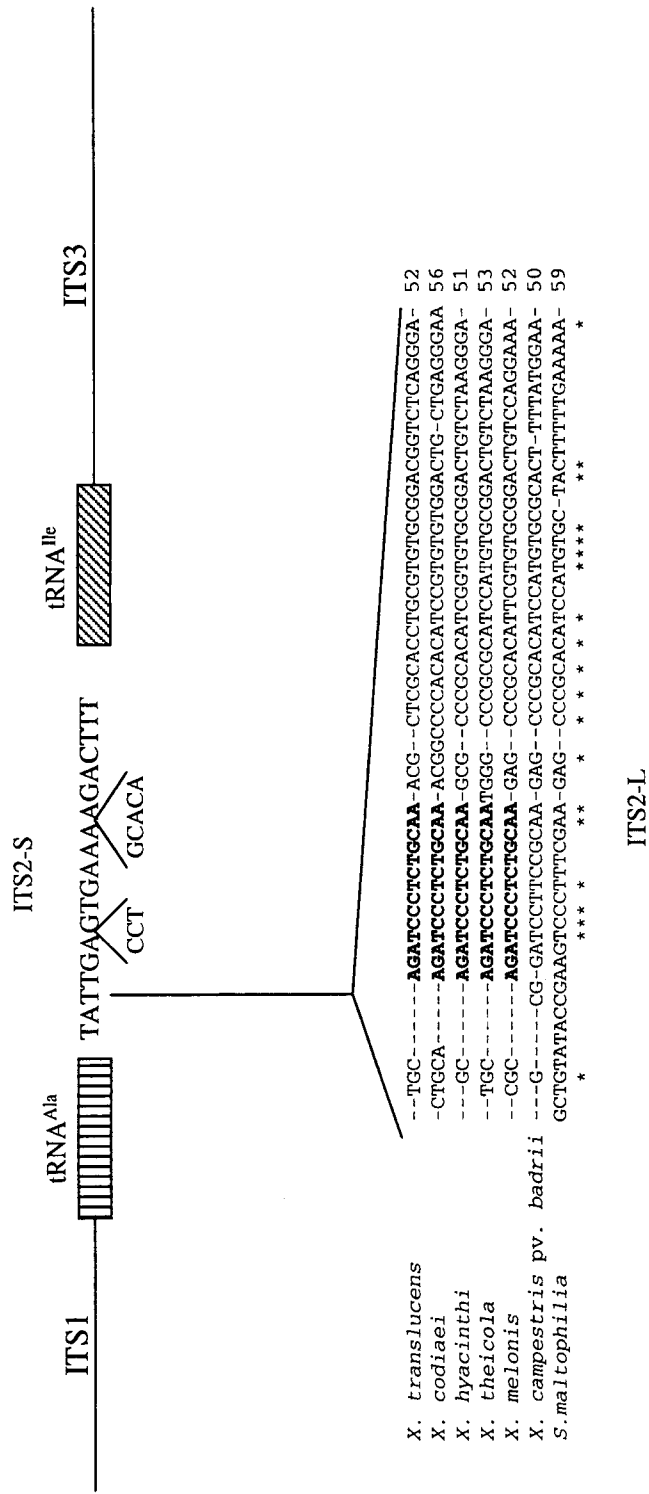


Figure 1 - Overall structure of the 16S-23S ITS of *Xanthomonas* with location of tRNA genes, and nucleotide sequence of

ITS2.

A

Base position	1	10	21	31	41	51	61	71	81
<i>X. axonopodis</i> *									..
<i>X. axonopodis</i>									..
<i>X. vesicatoria</i>									..
<i>X.c.gardneri</i>									..
<i>X. arboricola</i>									..
<i>X. pisi</i>						T..			..
<i>X. campestris</i>									..
<i>X. vasicola</i>									..
<i>X. oryzae</i>									..
<i>X. bromi</i>									..
<i>X. hortorum</i>									..
<i>X. cassavae</i>									..
<i>X. cucurbitae</i>									..
<i>X. fragariae</i>									..
<i>X. melonis</i>									..
<i>X. codiae</i>				T....			A	CA..	..
<i>X. sacchari</i>	A...								..
<i>X. albilineans</i>	A...		G.....						..
<i>X. hyacinthi</i>	A...								..
<i>X. theicola</i>	A..-								..
<i>X. translucens</i>	A...								..
Consensus	GGGGCCTTAG	CTCAGCTGGG	-AGAGCACCT	GCTTTT-GCAA	GCAGGGGGTC	GTCGGTT-CG	ATCCCGACT-	GGCTCC--AC	CA

B

Base position	1	10	21	31	41	51	61	71	81
<i>X. axonopodis</i> *						G..	C..		..
<i>X. axonopodis</i>	G.	--			A.....	GAA....G..	C..		..
<i>X. vesicatoria</i>							A.		..
<i>X.c.gardneri</i>							A.		..
<i>X. arboricola</i>							A.		..
<i>X. pisi</i>			A...				A.		..
<i>X. campestris</i>							A.		..
<i>X. vasicola</i>						-	A.	-	..
<i>X. oryzae</i>							A.		..
<i>X. bromi</i>							-		..
<i>X. hortorum</i>							A.		..
<i>X. cassavae</i>				G			A.		..
<i>X. cucurbitae</i>							A.		..
<i>X. fragariae</i>						G..	C..		..
<i>X. melonis</i>					-	G..	C.T		..
<i>X. codiae</i>						C....G..	C..		..
<i>X. sacchari</i>						G..	C..		..
<i>X. albilineans</i>						G..	G..C..		..
<i>X. hyacinthi</i>		-			-	G..	A..C..	-A..	..
<i>X. theicola</i>						G..	C..		..
<i>X. translucens</i>						G..	C..		..
Consensus	GGGTCTGT-A	GCTCAGGTGG	TTAGAGCGCA	CCCCTGATAA	-GGGTGAGGT	---CGGTAGT	TCGAGTCTTC	CCAGACCCAC	CA

Figure 2 – Alignment of tRNA^{Ala} (A) and tRNA^{Ile} (B) gene sequences from *Xanthomonas* spp. (*) *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* LMG3151 (pathovar reference strain). Dots represent nucleotides corresponding to consensus sequence; dashes represent absence of a nucleotide.

Base Position	1	11	21	31	41	51
<i>X. axonopodis</i> *						
<i>X. axonopodis</i>						C.
<i>X. vesicatoria</i>				T.	-	
<i>X. gardneri</i>				T.	-	
<i>X. arboricola</i>				T.	-	
<i>X. pisi</i>				T.		
<i>X. campestris</i>				T..T..		
<i>X. vasicola</i>				..T..C..		
<i>X. oryzae</i>						
<i>X. bromi</i>						
<i>X. hortorum</i>				..T..		
<i>X. cassavae</i>				..TGT..		
<i>X. cucurbitae</i>				T.	-	
<i>X. fragariae</i>				..T..		
<i>X. melonis</i>				T.	-	
<i>X. codiae</i>					TG.....	
<i>X. sacchari</i>			AG	..CCA..-	..A.....	G.A
<i>X. albilineans</i>			AG	..TCA..-	..A.....	G.A
<i>X. hyacinthi</i>			AG	..A..C..-	..A.....	G.C
<i>X. theicola</i>			AG	..CC..C..-	..A.....	G.G
<i>X. tranclucens</i>			AG	..A..C..-	A..A.....	G.A
Consensus	GGCTGGATCA	CCTCCTTTTG	AGCATGACGT	CAT-CGTCCT	GTCGGGCGTC	CTCACAAATT

Base position	61	71	81	91	101	121
<i>X. axonopodis</i> *		G.G.	.T.....	.C.A.....	A...	..A.CA.
<i>X. axonopodis</i>		G.G.	.T.....	.C.....	A...	..A.CA.
<i>X. vesicatoria</i>						
<i>X. gardneri</i>						
<i>X. arboricola</i>						
<i>X. pisi</i>						
<i>X. campestris</i>						
<i>X. vasicola</i>				.C.....	A...	
<i>X. oryzae</i>						
<i>X. bromi</i>						A.
<i>X. hortorum</i>					A...	
<i>X. cassavae</i>						CA.
<i>X. cucurbitae</i>						
<i>X. fragariae</i>		A...	.T.....		A...	..A.AA.
<i>X. melonis</i>		G.G.			A...	..A.CA.
<i>X. codiae</i>		G.G.	.T.....	.C...GG...	A...	..A.CA.
<i>X. sacchari</i>		---G.	T...C....	.G...AGCA.	CCC....A.A	-
<i>X. albilineans</i>		---G.	T...C...TG.	.G...AACA.	CCC....A.A	-
<i>X. hyacinthi</i>		---G.	T...C....	.G...G-CA.	...---.-C.	.GA..TC
<i>X. theicola</i>		T--G.	T...C...C.	.G...GGCA.	...---.-C.	.GA.GTC
<i>X. tranclucens</i>		---G.	T...C...G.	.G...AGCA.	...---.-C.	.GA..TC
Consensus	ACCTGCATTC	AGAGATTCAT	ACCGGCACAG	GTCGGTATGC	---GAA-GTC	CCTTT-T

Figure 3 – Alignment of ITS1 sequences from *Xanthomonas* spp. (*) *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* LMG 3151 (pathovar reference strain). Dots represent nucleotides corresponding to consensus sequence; dashes represent absence of a nucleotide.

and 2). ITS1 was the more conserved region (Fig. 3) and average similarity among the *Xanthomonas* analysed was $88.4 \pm 9.9\%$. Some species namely *X. campestris* pv. *gardneri*, *X. cucurbitae* and *X. vesicatoria*, showed identical ITS1. Differences consisted mainly of substitution or addition/deletion of isolated nucleotides. Addition/insertion of 2-3 contiguous bases were presented by the translucens group (positions 32, 39 and 76-78). This group also showed specific bases changes, which were not found in other *Xanthomonas* species. For example, in the positions 29-30, the sequence GT was replaced by AG in the translucens group. Other single base changes, also unique for this group, were found at positions 58, 85 and 98-99.

Major differences in size were found in the ITS2 region. Most *Xanthomonas* had 19 nucleotides (named ITS2-S) and five species exhibited a longer sequence with 75-79 bases (ITS2-L) due to the presence of a 51-56 bp insertion and two smaller blocks additions (Fig. 1). Although ITS2-S is a small sequence, both ends were conserved allowing the formation of a small hairpin secondary structure (Fig. 4). This structure is a putative target for RNase III during the processing of the whole rDNA transcript. ITS2-L, found in *X. codiae*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. theicola* and *X. translucens*, showed similar structure to ITS of *X. campestris* pv. *badrii* (Fig. 1 and 4) suggesting a common origin for this sequence among these organisms. The ITS sequence of this bacterium analyzed by Honeycutt *et al.* (1995) showed a 66 bases stretch, sharing > 60% identity with the corresponding sequence from *Stenotrophomonas maltophilia* distinct from the sequences found for other *Xanthomonas*.

Alignment of ITS2-L sequences obtained in the present study revealed a block of 14 nucleotides close to the tRNA^{Ala} with high level of conservation (see Fig.1, in bold). This conservation may be related to the formation of secondary structures. All structures (Fig. 4) show basically the presence of a primary stem and one loop (see *X. axonopodis*). When ITS2-L is present, different secondary structures could be predicted. A longer stem, which provides higher stability to the structure, is found for *X. campestris* pv. *badrii*, *X. codiae*, *X. hyacinthi*, *X. theicola* and *X. translucens*, whereas *X. melonis* and *S. maltophilia* form a shorter stem. The conservation of the 14 nucleotides block is not clear since its participation in the formation of the secondary structure is variable. The four upstream bases take part in the first loop and might be the

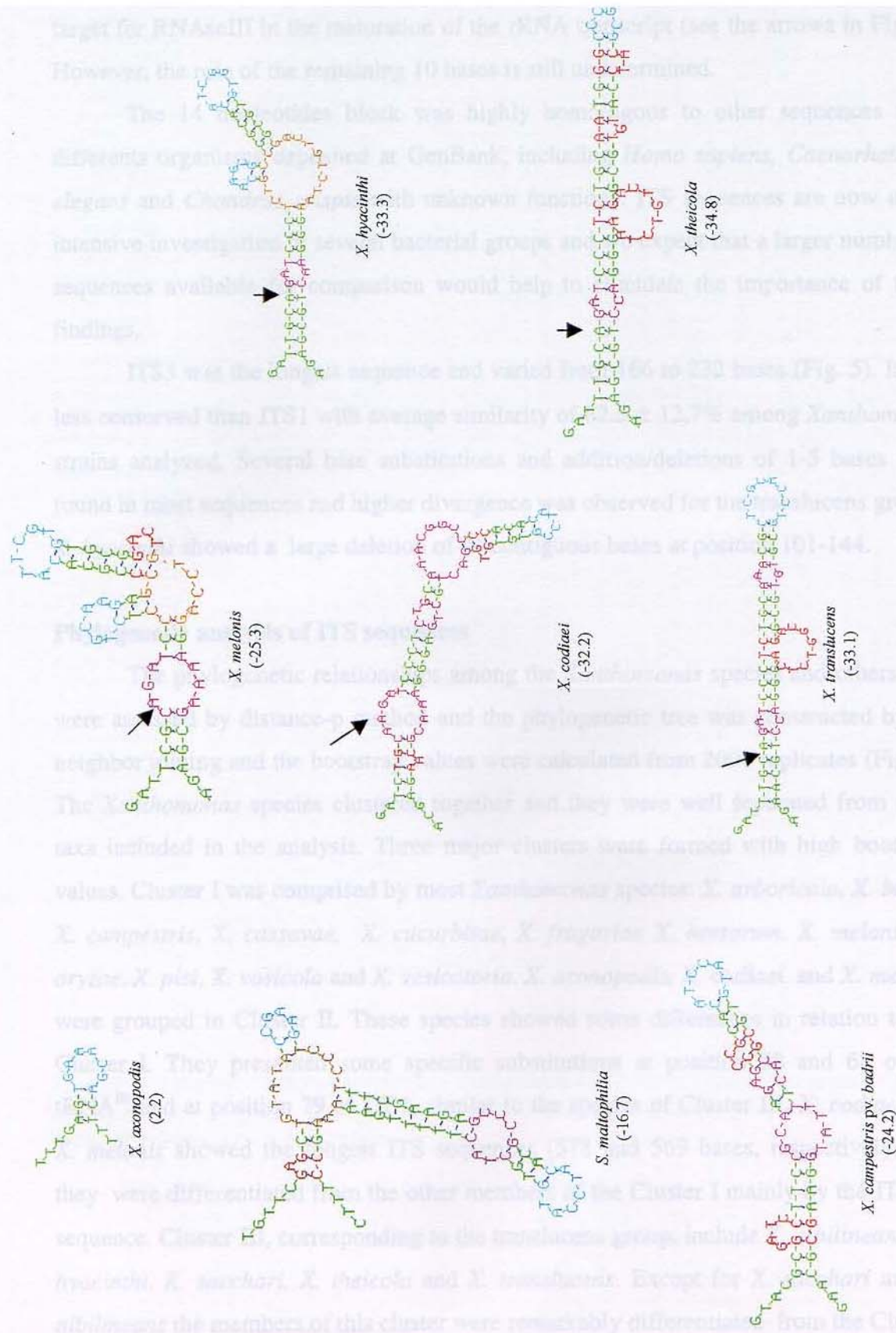


Figure 4 - Putative secondary structures of ITS2 (arrows refer to 5' end of 14 nucleotides block). Values (in parenthesis) indicate free energy (kcal/mol).

target for RNaseIII in the maturation of the rRNA transcript (see the arrows in Fig. 4). However, the role of the remaining 10 bases is still undetermined.

The 14 nucleotides block was highly homologous to other sequences from different organisms deposited at GenBank, including *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans* and *Chondrus crispis* with unknown functions. ITS sequences are now under intensive investigation in several bacterial groups and we expect that a larger number of sequences available for comparison would help to elucidate the importance of these findings.

ITS3 was the longest sequence and varied from 166 to 232 bases (Fig. 5). It was less conserved than ITS1 with average similarity of $82.3 \pm 12.7\%$ among *Xanthomonas* strains analyzed. Several base substitutions and addition/deletions of 1-5 bases were found in most sequences and higher divergence was observed for the translucens group. *X. hyacinthi* showed a large deletion of 44 contiguous bases at position 101-144.

Phylogenetic analysis of ITS sequences

The phylogenetic relationships among the *Xanthomonas* species and others taxa were assessed by distance-p method and the phylogenetic tree was constructed by the neighbor joining and the bootstrap values were calculated from 2000 replicates (Fig. 6). The *Xanthomonas* species clustered together and they were well separated from other taxa included in the analysis. Three major clusters were formed with high bootstrap values. Cluster I was comprised by most *Xanthomonas* species: *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. vasicola* and *X. vesicatoria*. *X. axonopodis*, *X. codiae* and *X. melonis* were grouped in Cluster II. These species showed some differences in relation to the Cluster I. They presented some specific substitutions at position 58 and 68 of the tRNA^{Ile} and at position 79 of ITS1, similar to the species of Cluster III. *X. codiae* and *X. melonis* showed the longest ITS sequences (578 and 569 bases, respectively) and they were differentiated from the other members of the Cluster I mainly by the ITS2-L sequence. Cluster III, corresponding to the translucens group, include *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola* and *X. translucens*. Except for *X. sacchari* and *X. albilineans* the members of this cluster were remarkably differentiated from the Cluster

Base position	1	11	21	31	41	51	61	71
<i>X. axonopodis</i> *					..C.....	.C.....		
<i>X. axonopodis</i>				..C.....		.C.....		
<i>X. vesicatoria</i>					.C.....		..GT..G..	
<i>X. gardneri</i>							..T.....	
<i>X. arboricola</i>	.G..AG....						..T.....	
<i>X. pisi</i>					..C.....	.C.....	..T.....	
<i>X. campestris</i>								
<i>X. vasicola</i>						.C.....		
<i>X. oryzae</i>								
<i>X. bromi</i>					..C.....	.C.....	..-...G....	
<i>X. hortorum</i>						.C.....		
<i>X. cassavae</i>					..C.....	.C.....		..-.....
<i>X. cucurbitae</i>					.C.....		..G-----	
<i>X. fragariae</i>					.C..A.....		..TG..G....	
<i>X. melonis</i>			TAAA	CG..A....	.C..ATCA..		..GT..-...GTC.....	
<i>X. codiae</i>					.C.....		..GT..G....	
<i>X. sacchari</i>	C.....	-.....			..-C...G..	.A.....	C..TAG..G....A...	
<i>X. albilineans</i>	C.....	..G-.....		GA	..AT...G..	..C.....	C..G..T..G....A...	
<i>X. hyacinthi</i>	T..AA....	..G-.....	G....AGA	..CGC..A..	..AG.....	..-...G..G....C--...A..		
<i>X. theicola</i>	C..AAG....	..-.....	-GA	C..CGC....	..A.....	..TGG..G..G....C--...A..		
<i>X. translucens</i>	A..AAG....	..-.....	A..G	..CG-...--	..AG.....	..-...G..GT...A...		
Consensus	CTCTGAATGT	A-GTG-CACA	CTTAAG----	--AATTT-AT	ATGGAT-CAG	C-GTTGAGGC	TG-AGACATG	TTCITTTTATA
Base position	81	91	101	111	121	131	141	151
<i>X. axonopodis</i> *								..-CA....
<i>X. axonopodis</i>						..A.....		..TCA..AT
<i>X. vesicatoria</i>								
<i>X. gardneri</i>								
<i>X. arboricola</i>								
<i>X. pisi</i>	A....						..A....	..T.....
<i>X. campestris</i>								
<i>X. vasicola</i>		A....	G....					
<i>X. oryzae</i>								
<i>X. bromi</i>							..-.....	..GA....
<i>X. hortorum</i>						..-.....		..A....
<i>X. cassavae</i>							..GT-....	..A....
<i>X. cucurbitae</i>								
<i>X. fragariae</i>								..A....
<i>X. melonis</i>	..---.....	..-.....						..A..TT
<i>X. codiae</i>	A.....				..A.....C..		G....	
<i>X. sacchari</i>	..T.....T..		A..GA.C	..AACT...C..		T.....		
<i>X. albilineans</i>	..T..A...T..	ACG	A..GA.C	..ATAC...CG		T.....		
<i>X. hyacinthi</i>	..-.....	A....						A....
<i>X. theicola</i>	..-.....	..-..CGA...	..GAGATA.C	TATCTCGACG	..TG..CGT..	..-...-....		
<i>X. translucens</i>	..-.....	..G-GCGA...	..-GAGATC	..A..TAT..G..		..-GT..--CT	..A.....	..C.....C..
Consensus	ACTTGATACG	TAGCGA-GCG	TTTG--AGAT	ATCTATCTAA	A-CGTGTC-G	TT-GAGGCTA	AGGCGGG-GA	CTTC-GAG--

Figura 5 – Alignment of ITS3 sequences from *Xanthomonas* spp. (*)*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* LMG3151 (pathovar reference strain). Dots represent nucleotides corresponding to consensus sequence; dashes represent absence of a nucleotide.

Base position	161	171	181	191	201	211	221	231
<i>X. axonopodis</i> *	G.-.			-C.....	G.....	...-...G.	GCG	T-....G..C
<i>X. axonopodis</i>				..C.....	G.....	...-...-	GA.	TG....GA.C
<i>X. vesicatoria</i>							TA.	G....
<i>X. gardneri</i>							A.	G..A..
<i>X. arboricola</i>								G....
<i>X. pisi</i>	C.....							T.
<i>X. campestris</i>							TA.	G.G-..
<i>X. vasicola</i>			C	..--.....		...-.....	TA.	G..A..
<i>X. oryzae</i>						..T.....	..G.....	
<i>X. bromi</i>				..C.....			G.T	..CAG....C
<i>X. hortorum</i>		A....	C	..-.....-		..A.....		..G.T..G..C
<i>X. cassavae</i>			C	..--.....	A..G..		GA.	TGAT..G.AC
<i>X. cucurbitae</i>	G.-.		C	..--.....	..C..G..	...-...G.		..G.T..GA.C
<i>X. fragariae</i>	G..							G
<i>X. melonis</i>	G.A..CC..				..G..		..-...TT.	
<i>X. codiae</i>	G.-.							G.GA.C
<i>X. sacchari</i>	G.-.		..T..A..	CCA-			TG..TGA--	GA.C
<i>X. albilineans</i>	-A	T.....	..T..AA..	CC-		...-...T.	GG..TG---	GA.C
<i>X. hyacinthi</i>	-T....G.--	G.....T.	AAA--	CC-	..G..G..	...-...-	..GT-----	---...AC
<i>X. theicola</i>	-T....G.--	G.....	CGT--	C--	..G...TCC	..G...TT	..G.-----	---...A.C
<i>X. translucens</i>	-T....G.--	..A.....	AGT-	CC-	..G.....	..CGG..TT	..G.-----	----GC.A
Consensus	TCCCTAAATA	ATTGA-GT-C	GT-AT--GTT	C-GCGTTGGT	GGCTTTG-TA	CCCC--ACA-	CAACACG-GC	-AT-ATAGCT

Base position	241	251	261
<i>X. axonopodis</i> *			
<i>X. axonopodis</i>	..T.T.....		
<i>X. vesicatoria</i>			
<i>X. gardneri</i>			
<i>X. arboricola</i>			
<i>X. pisi</i>			-.....
<i>X. campestris</i>	..-.....		
<i>X. vasicola</i>			
<i>X. oryzae</i>			
<i>X. bromi</i>			
<i>X. hortorum</i>			..G..
<i>X. cassavae</i>	..T.....	G.	
<i>X. cucurbitae</i>		G.	
<i>X. fragariae</i>			
<i>X. melonis</i>	CG	..AC.....	
<i>X. codiae</i>			
<i>X. sacchari</i>	TT.....	A.....	
<i>X. albilineans</i>	TT.....	A.....	
<i>X. hyacinthi</i>	..T.....	-A.....	
<i>X. theicola</i>	TT.....	A.....	
<i>X. translucens</i>	TT.....	-A.....	
Consensus	CCG-AGGCAA	C-TTGGGG-T	TA-TA

Figura 5 – Continued

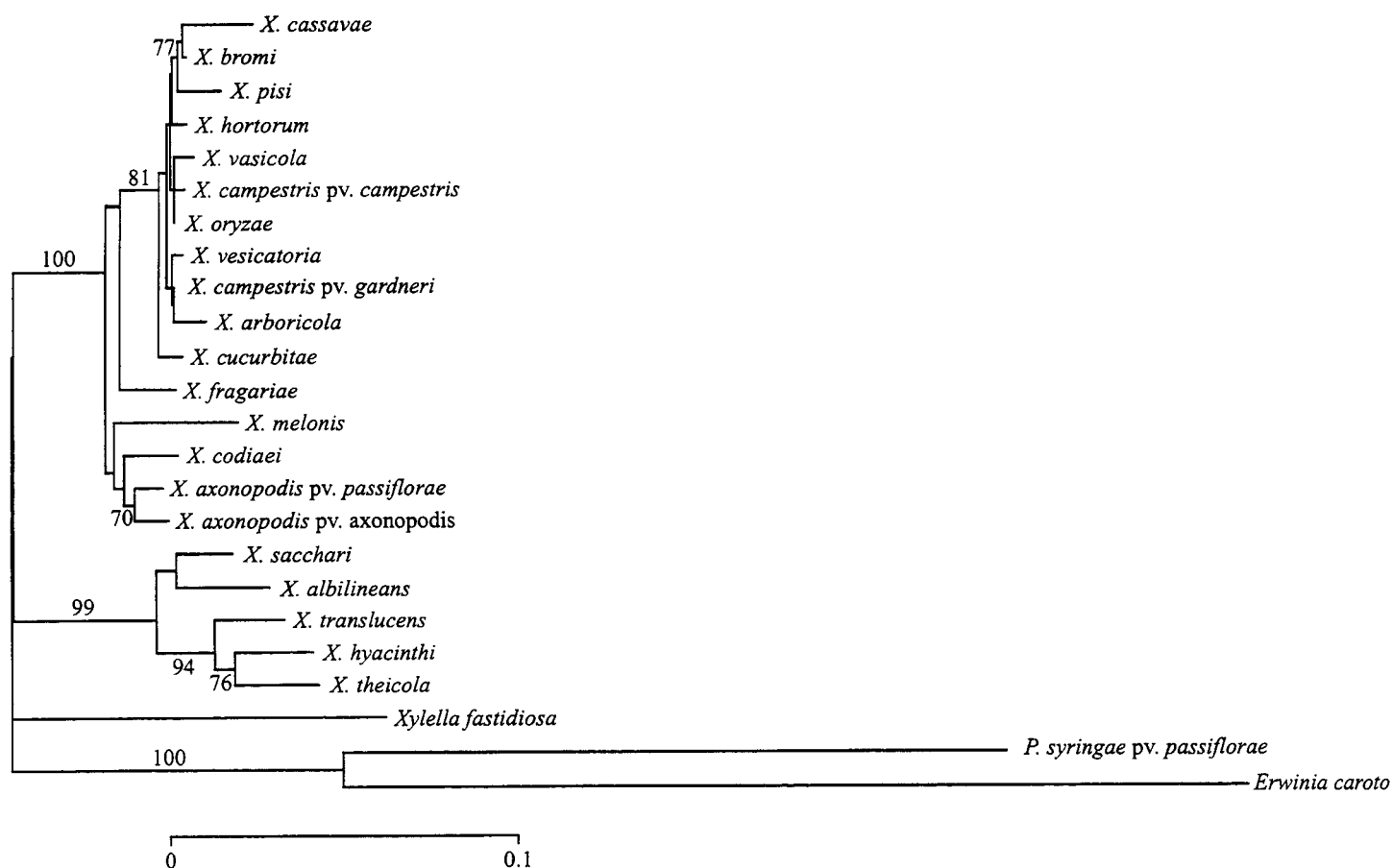


Figure 6 – Neighbor joining tree based on distances derived from 16S-23S rDNA spacer sequences showing the relationships among species of the genus *Xanthomonas* and some others taxa. Distances were determined by p-distance method, using the aligned sequences by ClustalW. The number on the branch indicates the number of times (in %) that the node was supported by the 2000 replicates of Bootstrap analysis (only values equal or higher than 70% are shown) and the bar indicates 0.1 change per nucleotide.

I species by some characteristics as substitutions of bases of ITS1 (position 81, 85, 92 and 98-99) and the presence of ITS2-L sequence. Also the GC content was higher in these species from 55.3 – 57,1 % whereas in the Cluster I the variation was from 50.4 to 53.1%.

The addition of 51-56 nucleotides in the longer ITS2 sequence is a remarkable difference in the ITS sequence. The sharp discontinuity in the ITS sequence caused by this interposing sequence suggests that a horizontal transfer of the whole sequence occurred in the past. As there is great diversity in the five sequences, except for the conservation of 14 upstream bases, the event of transfer should have not occurred in recent times. Although the great diversity in the ITS2-L sequences a putative secondary structure was predicted in all strains. Another possibility to explain the presence of ITS2-L sequence is a recombination process between different operons of rDNA, which could give rise to the divergence between genes in different species. This process is called concerted evolution and has been suggested to occurs in *Vibrio cholerae* (Lan and Reeves, 1998) and eukaryotes (for a revision see, Li, W.-H., 1997). A conclusive determination of the number of copies of rDNA in *Xanthomonas campestris* are lacking and at least two copies occur for this species (Lin and Tseng, 1997) however their sequences has not been determined. The conservation of nucleotide blocks at the flanking ends of the spacer and rearrangements in the ITS2 region is suggestive of the occurrence of a recombination process.

The total GC content in the genus *Xanthomonas* ranges from 63.3 to 69.7 % (for a revision, see Swings and Civerolo, 1993) whereas in the ITS sequence the variation was from 50.4 to 57.1%. We do not have a clear explanation of this lower GC content in the ITS sequence however this finding has been found in other prokaryotes. Syvanen (1994) reported a large sampling of DNA fragments of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* and analyzed the distribution of GC content. Most of the fragments clustered around the GC content of the corresponding species however a significant skew to lower GC content was observed. Skew to high GC content was not observed excluding possibilities of horizontal transfer from remotely distant donors or stochastic processes. The author suggested that a lower GC content could cause decrease of the melting

temperature facilitating steps of recombination between copies of the rDNA operons or between heterologous DNA.

The topology of the tree obtained using the ITS sequences showed some similarities with the tree constructed with the 16S sequences by Hauben *et al.* (1996). These authors found three major clusters: one comprising the majority of *Xanthomonas* species, the second group represented by *X. sacchari* and the other with *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola* and *X. translucens*. In the present work, three different clusters were found. The species *X. axonopodis*, *X. codiae* and *X. melonis* were grouped separately in the cluster II. The Cluster III showed similar to the Cluster III presented by Hauben *et al.* (1997). Other minor differences regarding the relationships among the species within Cluster I was observed however the low bootstrap values does not give support for a definitive allocation of these species.

REFERENCES

- Gonçalves, E.R. & Rosato, Y.B. 2000. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** **50**: 811-821.
- Gürtler, V. & Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S spacer region. **Microbiology** **142**, 3-16.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. & Moore, E.R.B. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. 1997. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **47**: 328-335.
- Honeycutt, R.J., Sobral, B.W.S. & McClelland, M. 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology** **141**, 3229-3239.
- Lan, R. & Reeves, P.R. 1998. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. **Microbiology** **144**: 1213-1221.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. & Decaris, B. 1996. 16S rRNA and 16S to internal Transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **46**: 102-111.
- Li, W.-H. & Graur, D. 1991. Chapter 11: Concerted evolution of multigene families. In: *Molecular Evolution*. Li, W.-H. (ed.). Sinauer Associates, Inc., Publishers. pp. 309-334.
- Lin, N. T. & Tseng, Y.H. 1997. Sequence and copy number of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gene encoding 16S rRNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **18**;235(2):276-80.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, **4**: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.A. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Syvanen, M. 1994. Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. **Ann. Rev. Genet.** **28**: 237-261.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, **22**: 4673 – 4680.
- Turner, T., Barber, C. & Daniels, M. (1984). Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Mol. Gen. Genet.** **195**, 101-107.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. **Int J Syst. Bacteriol** **45**, 472-489.

Terceiro artigo: **“Desenvolvimento de sondas de DNA e primers para a detecção específica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*”**

**Desenvolvimento de sondas de DNA e primers para a detecção específica
de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***

E.R. Gonçalves e Y.B. Rosato

Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia e CBMEG, Universidade
Estadual de Campinas, Campinas, SP. 13087-930

Palavras chaves: *Xanthomonas*, sondas de DNA, primers específicos

A ser submetido para publicação na revista Summa Phytopathologica

Desenvolvimento de sondas de DNA e primers para a detecção específica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

E.R. Gonçalves e Y.B. Rosato

Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia e CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 13087-930

Resumo

Durante a análise de biodiversidade entre diversos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* por RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA), foram detectados 4 fragmentos de amplificação comuns a todos os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* que não estavam presentes nas diferentes espécies de *Xanthomonas* (Gonçalves e Rosato, 2000). No presente trabalho, estes quatro fragmentos diferenciais de RAPD foram selecionados e testados como sondas específicas para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Duas das sondas mostraram-se específicas para o patovar *passiflorae*. Não houve hibridização destas sondas com nenhuma espécie de *Xanthomonas* ou patovar testado. Um destes fragmentos, R210, foi clonado e sequenciado para a criação de primers específicos para o patovar *passiflorae*. Estes primers, PAS2D e PAS2R, foram testados com 55 linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e 18 espécies de *Xanthomonas*. Um fragmento de 1 kb foi amplificado para 71% das linhagens do patovar *passiflorae*, não amplificando DNA dos isolados no estado do Paraná. Os fragmentos homólogos à sonda R210 de linhagens do nordeste e sudeste, incluindo Paraná foram sequenciados e desenhou-se um novo primer, PAS3-D, com base nos dados de alinhamento destas sequências. A utilização dos primers PAS2R e PAS3D foram capazes de detectar 53 das linhagens do patovar *passiflorae*, exceto duas linhagens do estado do Paraná.

Introdução

O maracujá é uma planta explorada economicamente no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais incluindo o Equador, Peru, Austrália e Sri Lanka (Teixeira *et al.*, 1994). Mais de 530 espécies de *Passiflorae* já foram descritas (Piza, 1996). Entretanto, somente a variedade amarela de *Passiflorae edulis* é comercializada para a indústria de sucos (Teixeira, *et al.*, 1994). De acordo com os dados fornecidos pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 1993, o Brasil foi o maior produtor mundial de maracujá, produzindo 3645 toneladas anualmente para exportação de sucos. A área de cultivo desta planta abrange cerca de aproximadamente 33000 hectares no Brasil. A bacteriose do maracujá, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (recentemente classificada por Gonçalves & Rosato, 2000) é o maior problema no desenvolvimento do cultivo em grande escala de *P. edulis* e já foi relatada a sua ocorrência em todas as regiões produtoras do Brasil (Teixeira, 1994). A infecção bacteriana ocorre através de aberturas naturais da planta ou lesões dos tecidos e provoca lesões úmidas, de aparência oleosa contornadas por halos cloróticos. A bactéria pode atingir o sistema vascular e se propagar por todos os tecidos da planta. Os ramos atingidos apodrecem e as folhas caem prematuramente (Pereira, 1969; Yamashiro, 1987). Ainda não se tem medidas de controle eficientes desta doença no campo e usualmente, a erradicação, a poda ou a rotação de cultura são indicados (Torres, Filho e Ponte, 1994). Também não se tem ainda informações de genótipos resistentes de *Passiflorae* a este patógeno.

No momento, a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* é realizada por inspeção visual de plantas sintomáticas e por sorologia (Beriam *et al.*, 1998) seguidos de testes de patogenicidade em maracujazeiro ou em suas folhas destacadas para comprovação. Nos últimos anos, entretanto, a detecção de patógenos tem sido bastante facilitada pela utilização de técnicas de sondas específicas de DNA e primers específicos baseados em PCR ("Polimerase Chain Reaction") que permitem uma detecção mais rápida, fácil e precisa comparada aos métodos tradicionais. Os métodos baseados em PCR apresentam também um nível de detecção mais alto permitindo a identificação do patógeno mesmo antes do surgimento de sintomas na planta. Detecção específica de diferentes espécies de *Xanthomonas* utilizando-se sondas de DNA (Gilbertson *et al.*, 1989; Kuflu e Cuppels, 1997) ou PCR (Audy *et al.*, 1994; Hartung *et al.*, 1993) já foram descritas.

Durante a análise da biodiversidade entre várias linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se produtos de amplificação com primers randômicos (RAPD), foram obtidos fragmentos de amplificação comuns a todas as linhagens do patovar *passiflorae*, porém, ausentes nas demais espécies de *Xanthomonas* (Gonçalves e Rosato, 2000). No presente trabalho, quatro fragmentos diferenciais de RAPD foram selecionados e usados como sondas específicas para a detecção de linhagens do patovar *passiflorae*. Um desses fragmentos foi sequenciado e primers foram desenhados para a detecção específica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Material e métodos

Linhagens bacterianas e meios de cultura.

Todas as linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* foram obtidas da coleção do Instituto Biológico, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, SP (linhagens IBSBF) e do Instituto Agrônomo do Paraná (linhagens I), Londrina, PR. As linhagens foram coletadas no estado de São Paulo (IBSBF120, IBSBF121, IBSBF148, IBSBF428, IBSBF444, IBSBF445, 617, 658, 777, 941, 960, 996, 997, 1007, 1039, 1040, 1151, 1166, 1168, 1171), Paraná (11061, 11323, 11324, 11325, 11327, 11329, 11330, 11331, 11043, 11341, 11342, 11351, 11405, 11406, 11407), Minas Gerais (674), Bahia (686, 687, 688), Sergipe (720, 748), Ceará (591, 592, 593) e Distrito Federal (621, 649, 712, 714, 715, 717, 767, 1053). Outras linhagens, representando diferentes espécies de *Xanthomonas*, cedidas pelo IBSBF, foram utilizadas: *X. arboricola* pv. *pruni* 443, diferentes patovares de *X. axonopodis* (*citri* A 223 e *citrumelo* 1011, *glycines* 333, *malvacearum* 556, *manihotis* 289, *phaseoli* 558), diferentes patovares de *X. campestris* (*campestris* Ca 110, *vesicatoria* 408 e *viegasii* 576), *X. hortorum* pv. *carotae* 366, *X. codiae* 505, *X. fragariae* 89, *X. translucens* pv. *undulosa* 578, *X. vesicatoria* 411, *Pseudomonas cichorii* 1053 e *Burkholderia gladioli* 604. Linhagens tipos e referências utilizadas foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Gent (LMG), Bélgica: *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538^T, *X. bromi* LMG 947^T, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568^T, *X. cassavae* LMG 67^T, *X. codiae* LMG 867^T, *X. cucurbitae* LMG690^T, *X. hortorum* pv.

hederae LMG 733, *X. hyacinthi* LMG739^T, *X. melonis* LMG8670^T, *X. pisi* LMG 847^T, *X. oryzae* pv. *oryzae* LMG 5047, *X. sacchari* LMG 471^T, *X. theicola* LMG 8684^T, *X. translucens* pv. *translucens* LMG 876^T, *X. vasicola* pv. *holcicola* LMG 736^T, *X. vesicatoria* LMG 911^T, *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* LMG 5185. As linhagens *X. albilineans* ICMP 196, *X. arboricola* pv. *juglandis* ICMP 35, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* ICMP 3151^T foram obtidas da Coleção Internacional de Microrganismos de plantas (ICMP) da Nova Zelândia. Todas as linhagens foram crescidas em meio NYG (Turner, *et al.*, 1984) a 30°C.

Extração de DNA. Alíquotas de 1,5 ml de suspensão bacteriana, cultivadas por 16 horas, foram centrifugadas e os sedimentos lavados em 500 µl de tampão TAS (50 mM Tris-HCl pH8,0, 50 mM EDTA e 150 mM NaCl). As células bacterianas foram suspendidas em 450 µl do mesmo tampão. Cinquenta microlitros de SDS 10% e 75 µg de proteinase K foram adicionadas e o sistema foi incubado por 1 hora a 55°C. Proteínas e restos celulares foram extraídos com fenol e clorofórmio e a fase aquosa foi recuperada e dialisada em tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH7,8) por 48 horas. A concentração de DNA foi estimada por comparação com DNA de fago λ através de eletroforese em gel de agarose (Sambrook, *et al.*, 1989).

Reações de PCR. Todas as reações de PCR foram elaboradas em um volume total de 25µl utilizando-se 20-50 ng de DNA. Nas reações de RAPD foram utilizados os primers OPR2 (5' CACAGCTGCC3'), OPR6 (5' GTCTACGGCA3') e OPQ4 (5' AGTGCCTGA3') da Operon Technologies. Foram utilizadas nas reações 3,75 mM MgCl₂, 100µM de dNTP, 5 mM de primer e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco, BRL). As condições de amplificação foram: 1x 94°C/3 min, 45x (94°C/1 min, 34°C/1 min e 72°C/2 min). Os primers desenhados, Pas2-D (5' CACAGCTGCCATGATGAG3'), Pas2-R (5' CACAGCTGCCGAAAGAAG3') e Pas3-D (5' GAGGCGTTTTTGGGACCC3'), foram utilizados em reações contendo um volume total de 25µL utilizando-se 20-50 ng de DNA. Nas reações, tanto com o par de primers PAS, direto e reverso, quanto para os primers PAS2 reverso e PAS3 direto, foram utilizados 1,5 mM MgCl₂, 100µM de dNTP, 1,5mM de primer e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco, BRL). As condições de amplificação para

ambos os pares de primers foram: 1x 94°C/3 min, 35x (94°C/1 min, 58°C/1 min e 72°C/1 min). Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose 1,2%.

Transferência e hibridização dos produtos de PCR. Os produtos de RAPD obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,0% e transferidos para membrana de náilon pelo método de transferência alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) para hibridização. As sondas foram marcadas com digoxigenina e a detecção foi efetuada com CSPD (Disódio 3-(4-metoxyspiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro) tríciclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) fenil fosfato) de acordo com o fabricante (Boehringer Mannheim). A revelação foi efetuada utilizando-se filme de raio X.

Clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados. Os diferentes fragmentos das reações de amplificação foram isolados de agarose de baixo ponto de fusão e purificados de acordo com Sambrook *et al.* (1989). As extremidades foram preenchidas com Klenow e dNTPs e ligados ao vetor de clonagem pBluescript KS+ (Stratagene) previamente digerido com *EcoRV*. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar *E. coli* DH5 α . Colônias brancas foram selecionadas em meio LB-ágar suplementado com 60 μ g/mL de ampicilina e 40 μ g/mL X-gal (Sambrook *et al.*, 1989). Os fragmentos clonados e selecionados por hibridização, foram sequenciados utilizando-se o kit “Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing pre mix” (Amershan) e os primers M13 e reverso. As amostras foram corridas em sequenciador automático ABI Prism (Perkin Elmer). O programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) foi utilizado para alinhamento de sequências e o Gene Runner, versão 3.0 (Hastings Software, Inc.) foi utilizado para desenhar primers adequados para amplificação do inserto.

Resultados e discussão

Seleção de bandas diferenciais de linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* a partir de RAPD. Seis linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram inicialmente testadas para investigar produtos de amplificação diferencial. Utilizando-se os primers OPQ4, OPR2

e OPR6, foram amplificados fragmentos diferenciais de 1,4 kb + 0,8 kb, 1,0 kb e 2,5 kb, respectivamente, para as linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Esses fragmentos foram também amplificados para todas as outras 54 linhagens do patovar *passiflorae*, apresentando resultado negativo para as seguintes linhagens e espécies de *Xanthomonas*: *X. arboricola* pv. *pruni* 443, *X. axonopodis* pv. *citri* 223, *X. axonopodis* pv. *citrumelo* 1011, *X. axonopodis* pv. *glycines* 333, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* 556, *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 558, *X. campestris* Ca110, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 408, *Xanthomonas campestris* pv. *viegasii* 576, *X. hortorum* pv. *carotae* 366, *X. codiae* 505, *X. fragariae* 89, *X. translucens* pv. *undulosa* 578, *X. vesicatoria* 411, *Pseudomonas cichorii* 1053 e *Burkholderia gladioli* 604. Os quatro fragmentos selecionados como sondas potenciais, designados Q414, Q408, R210 e R625, foram utilizados para hibridização com os produtos de PCR obtidos com cada primers de RAPD com todas as linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e diferentes espécies e linhagens de *Xanthomonas* para comprovar a especificidade destes fragmentos.

A sonda Q414 hibridizou com duas bandas amplificadas (1,4 e 0,8 kb) do DNA de todas as linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (figura 1) com o primer OPQ4. Com as diferentes espécies de *Xanthomonas* e patovares distintos, não foi observada hibridização (figura 2), exceto para as linhagens de *X. vesicatoria* 411, *X. axonopodis* pv. *citrumelo* 1011 e *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289. As duas primeiras linhagens apresentaram uma banda de hibridização de 1,4, embora nenhum produto de amplificação deste tamanho fosse observado em gel de agarose. Duas bandas de hibridização de intensidade fraca entre 0,8 e 1,4 kb foram observadas para a linhagem *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289. A sonda Q408 apresentou o mesmo padrão de hibridização da sonda Q414, com bandas de 1,4 e 0,8, entretanto, algumas linhagens do patovar *passiflorae* apresentaram também duas bandas de hibridização menores que 0,8 kb. Os resultados de hibridização obtidos com as sondas Q414 e Q408 indicam que alguns produtos de RAPD, embora não visíveis no gel de agarose, podem ser detectados por hibridização. Estes resultados também mostraram que os diferentes fragmentos obtidos com o primer Q4, de 1,4 e 0,8 kb, apresentam homologia, podendo o fragmento de 0,8 kb ser parte do fragmento maior.

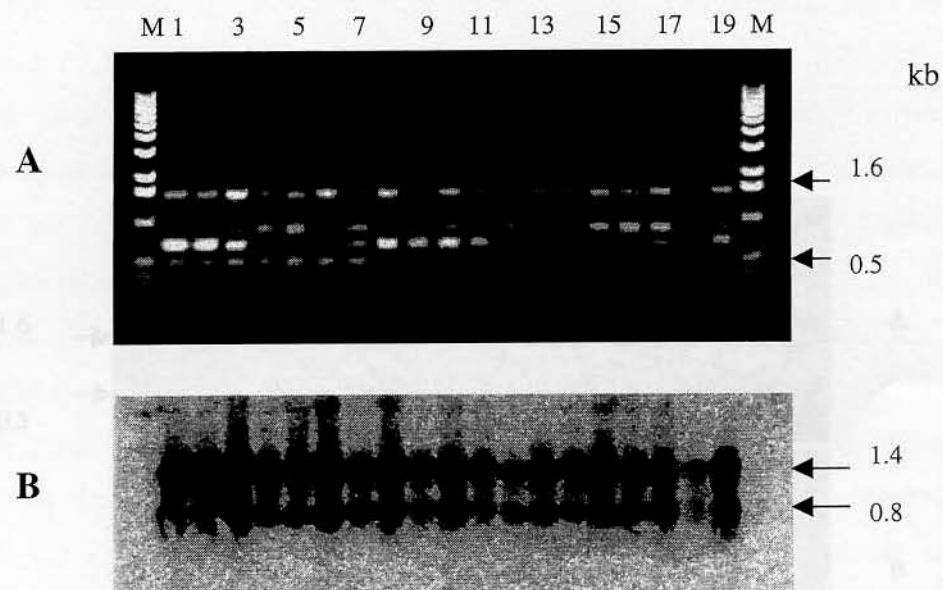


Figura 1. A) Produtos de RAPD de linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* com o primer OPQ4 separados em gel de agarose 1.4%. B) Hibridização dos produtos de RAPD utilizando como sonda o fragmento de OPQ4/1.4 kb da linhagem LMG3151. M: marcador de peso molecular ladder 1.0 kb (Gibco BRL). 1: 777, 2: 120, 3: 121, 4: 148, 5: 428, 6: 445, 7: 617, 8: 658, 9: 748, 10: 941, 11: 996, 12: 997, 13: 1007, 14: 1039, 15: 1040, 16: 1141, 17: 1171, 18: 1169, 19: 1166.

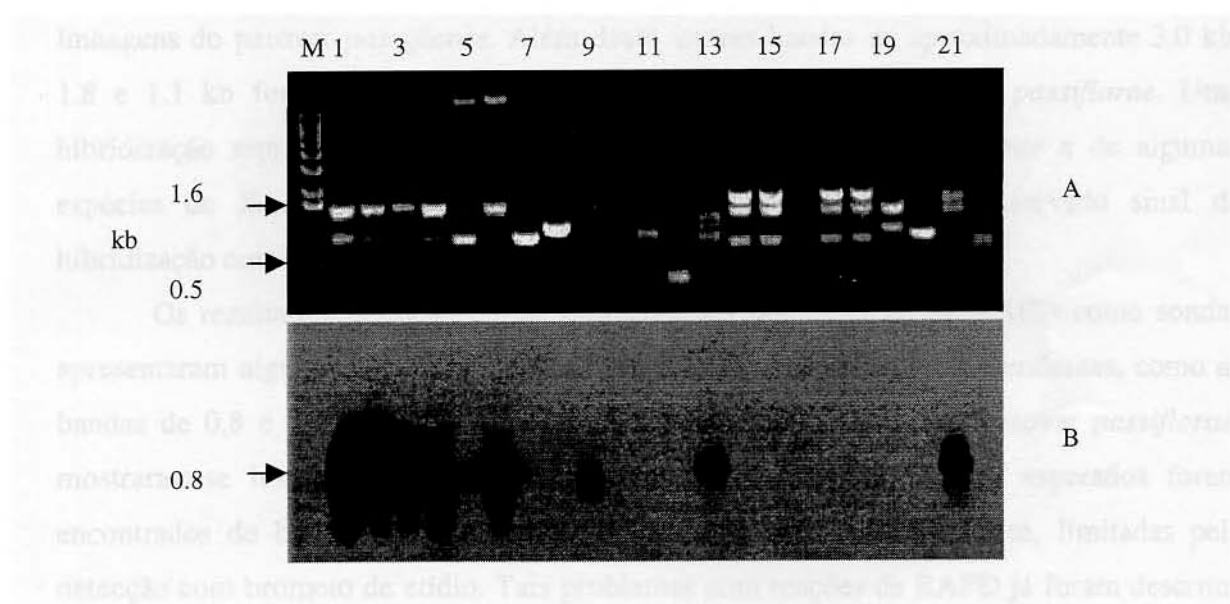


Figura 2. A) Produtos de RAPD de diferentes espécies de *Xanthomonas* e patógenos com o primer OPQ4 separados em gel de agarose 1,4%. B) Hibridização dos produtos de RAPD de diferentes espécies e patógenos de *Xanthomonas* utilizando como sonda o fragmento Q414: 1-5, linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*: 777, 960, 444, 11330, 11324, respectivamente, 6: *X. axonopodis* pv. *glycines* 333, 7: *X. arboricola* 443, 8- 10, diferentes patógenos de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 558, pv. *manihotis* 289, pv. *citri* 223, 11, *X. codiae* 505, 12: *X. campestris* pv. *campestris* CA110, 13: *X. axonopodis* pv. *citrumelo* 1011, 14: *X. fragariae* 89, 15: *X. campestris* pv. *viegasii* 576, 16: *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, 17: *X. translucens* pv. *undulosa* 578, 18: *X. hortorum* pv. *carotae* 366, 19: *X. campestris* pv. *vesicatoria* 408, 20: *P. cichorii* 1053, 21: *X. vesicatoria* 411, 22: *Burkholderia gladioli* 604.

O fragmento de 1.0 kb obtido da amplificação da linhagem *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 3151 foi usado como sonda (R210) para hibridizar os produtos de amplificação, com o mesmo primer OPR2 de todas as linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Foram observadas bandas de 1,0 kb para todas as linhagens isoladas de São Paulo, MG, Distrito Federal e nordeste enquanto as linhagens do Paraná apresentaram bandas de hibridização de tamanho um pouco menor, de cerca de 900 pares de bases. Não foram observadas bandas de hibridização para os produtos de amplificação de nenhuma outra espécie ou linhagem de *Xanthomonas* amplificados com o primer OPR2 (figura 3).

Utilizando a sonda R625, foi detectada uma banda de 2.5 kb exclusivamente para as linhagens do patovar *passiflorae*. Além desta, outras bandas de aproximadamente 3.0 kb, 1.8 e 1.1 kb foram identificadas em algumas linhagens do patovar *passiflorae*. Uma hibridização representativa de algumas linhagens do patovar *passiflorae* e de algumas espécies de *Xanthomonas* é apresentada na figura 4. Não foi observado sinal de hibridização com as outras *Xanthomons* utilizadas.

Os resultados obtidos com as hibridizações dos produtos de RAPD como sondas apresentaram alguns problemas. Produtos de RAPD considerados independentes, como as bandas de 0,8 e 1,4 kb com o primer OPQ4 para as linhagens do patovar *passiflorae*, mostraram-se homólogas. Além disso, produtos de hibridização não esperados foram encontrados de bandas aparentemente não visíveis num gel de agarose, limitadas pela detecção com brometo de etídio. Tais problemas com reações de RAPD já foram descritos e considerados em análises filogenéticas (Smith *et al.*, 1994).

Os resultados obtidos das hibridizações com as sondas selecionadas mostraram, que em geral, a técnica de RAPD oferece uma boa alternativa para a busca de sondas específicas. No presente trabalho, somente as sondas Q414 e Q408 mostraram hibridização com outras espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. vesicatoria* e *X. citri*. No entanto, este fato não é tão relevante uma vez que estas espécies não são patógenos para o hospedeiro *Passiflora* sp.. A técnica utilizada, obtenção de sondas a partir de produtos diferenciais de RAPD, é bastante simples de ser conduzida e mais rápida que outras técnicas utilizadas com os mesmos propósitos. A hibridização subtrativa, por exemplo, já foi utilizada em bactérias fitopatogênicas como *Pseudomonas* (Cook e Sequeira, 1991), *Erwinia* (Darrasse *et*

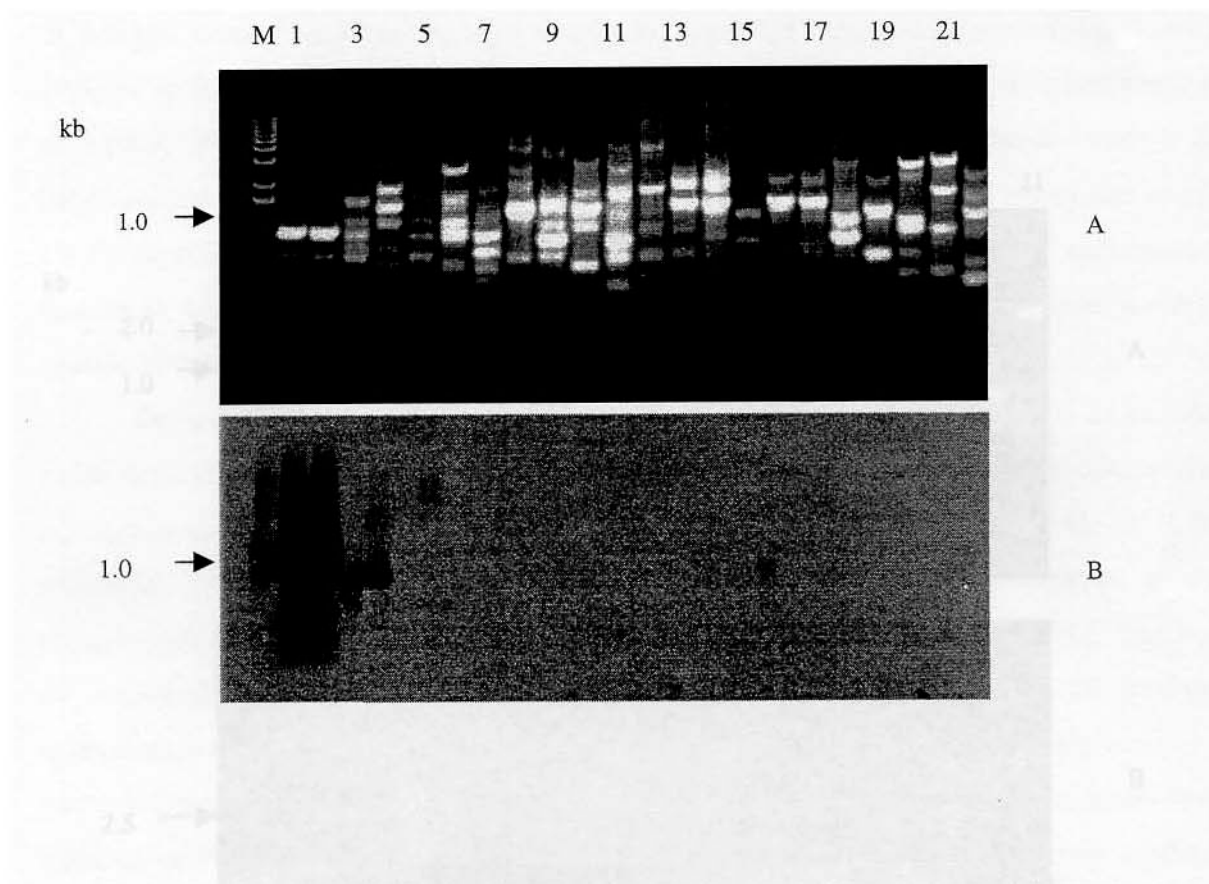


Figura 3. A) Produtos de RAPD de diferentes espécies de *Xanthomonas* e patovares com o primer OPR2 separados em gel de agarose 1,4%. B) Hibridização dos produtos de RAPD de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas* utilizando como sonda o fragmento Hibridização de linhagens de *passiflorae* e diferentes espécies de *Xanthomonas* e patovares utilizando-se OPR/1,0 kb como sonda. 1-2: linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* do estado de São Paulo, 3-4: linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* do estado do Paraná; 5. *X. campestris* pv. *glycines* 333, 6: *X. arboricola* pv. *pruni* 443, 7-12: diferentes patovares de *X. axonopodis* (*citri* 223 and 1011, *glycines* 333, *malvacearum* 556, *manihotis* 289, *phaseoli* 558), 13-15: *X. campestris* pv. *campestris* CA110, pv. *vesicatoria* 408, pv. *viegasii* 576), 16: *X. hortorum* pv. *carotae* 366, 17: *X. codiae* 505, 18: *X. fragariae* 89, 19: *X. translucens* pv. *undulosa* 578, 20: *X. vesicatoria* 411, 21: *P. cichorii* 1053, 22: *B. gladioli* 604.

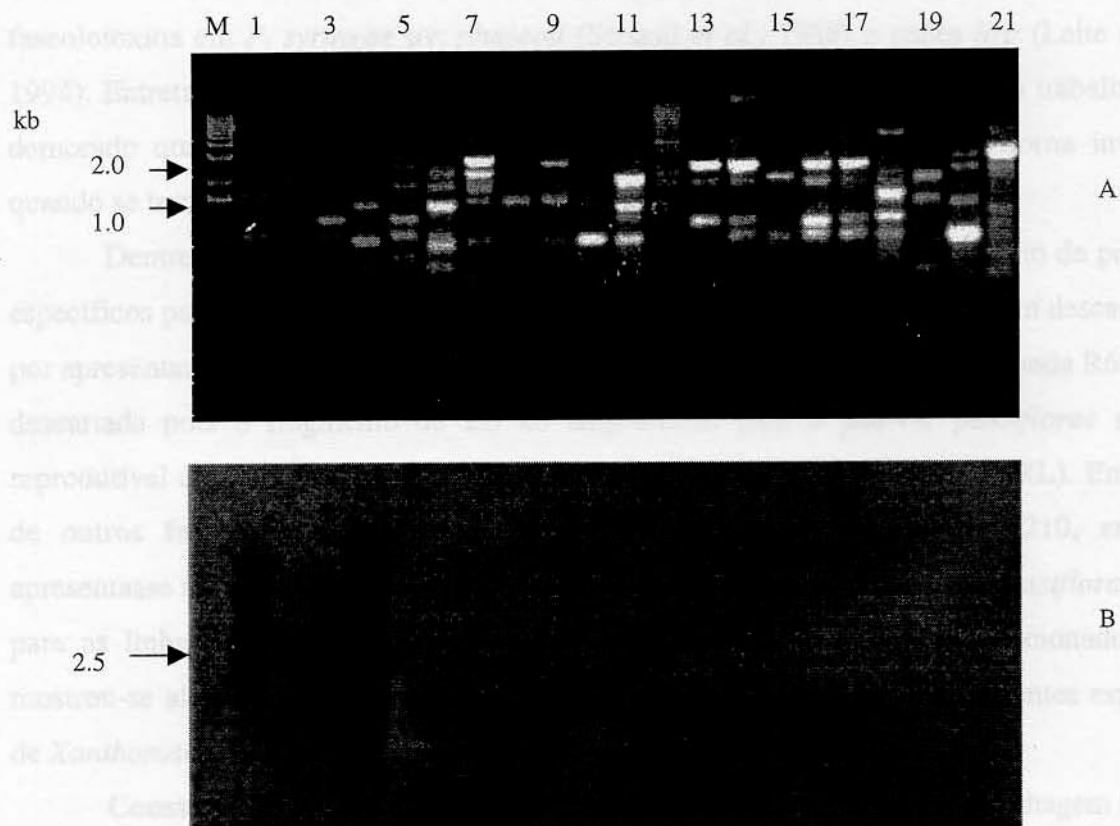


Figura 4. A) Produtos de RAPD de diferentes espécies de *Xanthomonas* e patovares com o primer OPR6 separados em gel de agarose 1,4%. B) Hibridização dos produtos de RAPD de diferentes espécies e patovares de *Xanthomonas* utilizando como sonda o fragmento OPR6/2,5 kb. (1-4) Algumas linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*; 5: *X. axonopodis* pv. *glycines* 333, 6: *X. arboricola* 443, 7- 10, diferentes patovares de *X. axonopodis* (*X. a.*); *manihotis* 289, *phaseoli* 558, *citri* 223 and 1011, 11: *X. campestris* pv. *campestris* CA110, 12: *X. codiae* 505, 13: *X. fragariae* 89, 14: *X. campestris* pv. *viegasii* 576, 15: *X. a.* pv. *malvacearum*, 16: *X. translucens* pv. *undulosa* 578, 17: *X. hortorum* pv. *carotae* 366, 18: *X. c.* pv. *vesicatoria* 408, 19: *X. vesicatoria* 411, 20: *P. cichorii* 1053, 21: *Burkholderia gladioli* 604

al., 1994), *Clavibacter* (Mills *et al.*, 1997), *Xylella* (Ferreira *et al.*, 1999) e *Xanthomonas* (Kuflu e Kuppels, 1997). O método utilizado por estes autores entretanto demanda vários dias de trabalho, com construções de bancos genômicos, várias hibridizações e marcações de sondas. Outros métodos incluem o achado casual de fragmentos específicos durante análises de RFLP, hibridização de clones genômicos (Hartung *et al.*, 1993; Thompson, *et al.*, 1989; Ward, e de Boer, 1994; Denny, 1988) ou genes específicos como o da faseolotoxina em *P. syringae* pv. *phaseoli* (Schaad *et al.*, 1989) e genes *hrp* (Leite *et al.*, 1994). Entretanto, o uso de sondas para a detecção de patógeno é um método trabalhoso e demorado quando comparado aos métodos baseados em PCR, o que o torna inviável quando se tem um grande número de amostras a serem testadas.

Dentre as quatro sondas avaliadas, a R210 foi selecionada para desenho de primers específicos para *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. As sondas Q414 e Q408 foram descartadas por apresentarem-se homólogas e hibridizarem com outras *Xanthomonas*. A sonda R625 foi descartada pois o fragmento de 2.5 kb amplificado para o patovar *passiflorae* só foi reproduzível com uma determinada enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco –BRL). Enzimas de outros fabricantes não amplificaram tal fragmento. O fragmento R210, embora apresentasse uma sutil diferença de tamanho entre as linhagens do patovar *passiflorae* (0.9 para as linhagens do Paraná e 1,0 kb para as demais linhagens) foi selecionado pois mostrou-se altamente específico, não apresentando homologia com as diferentes espécies de *Xanthomonas* utilizadas.

Construção e teste de primers. O fragmento R210 amplificado da linhagem tipo *X axonopodis* pv. *passiflorae* ICMP3151 foi clonado em pBluescriptKS+ e sequenciado parcialmente (figura 5). A análise das extremidades da seqüências obtidas permitiu a elaboração dos primers PAS2 com as seguintes seqüências: PAS2-D, 5' CACAGCTGCCATGATGAG 3' e PAS2-R, 5' CACAGCTGCCGAAAGAAG 3' (em negrito está representada a seqüência do primer OPR2). Estes primers foram testados inicialmente com o DNA da linhagem tipo *X axonopodis* pv. *passiflorae* ICMP3151, em condições diferentes, variando a concentração de DNA (12.5, 25 e 50 ng), a concentração de MgCl₂ (1.25, 2.25, 3.25 e 4.5 mM) e a temperatura de anelamento (40, 50 e 58°C). Em todas as condições utilizadas, uma banda única e consistente de 1.0 kb foi observada

65

confirmando o sucesso da construção do primer. A reação de PCR foi realizada com 15 linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* representando 15 diferentes grupos de RAPD (Gonçalves e Rosato, 2000) e com a linhagem referência do patovar , ICMP3151 (figura 6). Surpreendentemente, as linhagens provenientes do estado do Paraná que foram testadas não apresentaram amplificação. Estudos com todas as outras linhagens disponíveis do patovar *passiflorae* (total de 54 linhagens) mostraram que os primers PAS identificaram apenas linhagens provenientes do Estado de São Paulo, Minas Gerais, DF e do nordeste, num total de 39 linhagens, falhando na identificação de linhagens do estado do Paraná. Assim, este fragmento de aproximadamente 1,0 kb pode representar um fragmento diferencial entre populações do patógeno isolado de diferentes regiões geográficas do Brasil. Populações de *X axonopodis* pv. *passiflorae* isoladas de diferentes estados brasileiros foram analisadas por RAPD e alguns grupos mostraram-se comuns a diferentes regiões enquanto outros grupos eram específicos de determinados estados (Gonçalves e Rosato, 2000). A linhagem utilizada para o sequenciamento do fragmento R210, linhagem ICMP3151, pertence ao grupo V de RAPD, encontrado apenas no Estado de São Paulo e não no Paraná. Estudos de hibridização de produtos de RAPD com o primer OPR2, utilizando-se como sonda o fragmento R210 da linhagem ICMP3151 apresentou uma leve diferença das linhagens provenientes do Paraná (com banda de hibridização de aproximadamente 0,9 kb) em relação às demais, com cerca de 1,0 kb. Tais resultados indicam que as bandas de tamanhos diferentes, embora homólogas, devem apresentar diferenças nas suas seqüências, explicando a não amplificação de linhagens provenientes do Paraná pelos primers PAS. A partir destes resultados, foram selecionadas linhagens representando diferentes grupos de RAPD e regiões geográficas. As linhagens selecionadas foram 592 (isolada no CE, pertencente ao grupo XIV de RAPD), I11331 (isolada no PR, pertencente ao grupo XI), 11407 (isolada no PR, pertencente ao grupo VII) e 444 (isolada em SP, grupo II). Os produtos de amplificação destas linhagens com o primer OPR2, de 1.0 kb para as linhagens 444 e 592 e de 0.9 para as linhagens do Paraná foram hibridizados com a sonda R210 e por apresentarem-se homólogos, foram clonados em pBluescript KS+ para posterior sequenciamento de suas extremidades. Os resultados do sequenciamento (figura 5) apresentam claramente diferenças de seqüências de bases em uma das extremidades (de onde foi desenhado o primer PAS-direto) entre as linhagens do Paraná e as demais. Tais

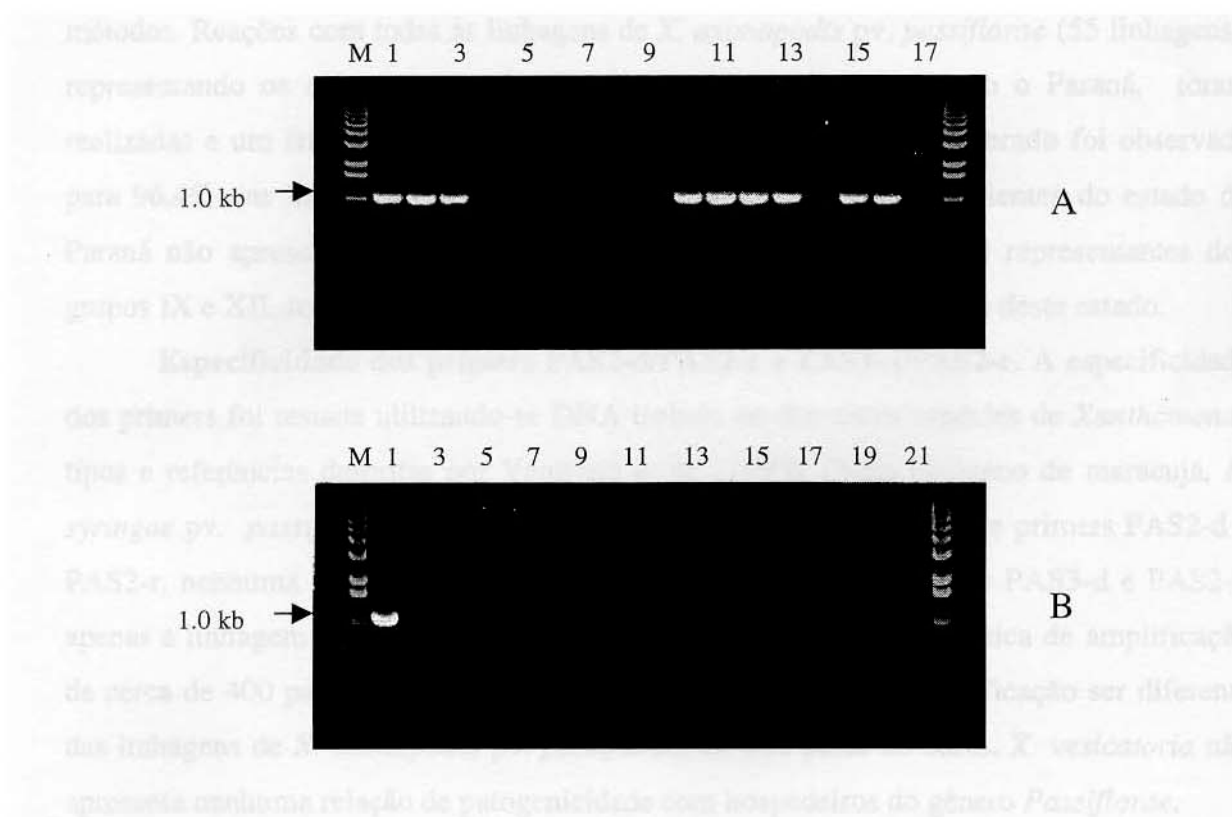


Figura 6 – (A) Amplificação de linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e diferentes espécies de *Xanthomonas* (B) utilizando-se os primers Pas2-R e Pas2-D. Em (A): 1, LMG3151; 2, 777; 3, 1171; 4, 11407; 5, 11329; 6, 11341; 7, 11331; 8, 11342; 9, 11329; 10, 592; 11, 1151; 12, 120; 13, 121; 14, 11323; 15, 714; 16, 717; 17, controle negativo sem DNA. Em (B): 1, LMG3151; 2, *X. campestris*; 3, *X. axonopodis*; 4, *X. translucens*; 5, *X. hyacinthi*; 6, *X. vesicatoria*; 7, *X. sacchari*; 8, *X. vasicola*; 9, *X. cucurbitae*; 10, *X. melonis*; 11, *X. cassavae*; 12, *X. hortorum*; 13, *X. theicola*; 14, *X. pisi*; 15, *X. bromi*; 16, *X. codiae*; 17, *X. oryzae*; 18, *X. arboricola*; 19, *X. albilineans*; 20, *P. syringae* pv. *passiflorae* e 21, controle negativo sem DNA.

resultados explicam a falha na identificação das linhagens do Paraná com os primers PAS2. A outra extremidade, mais conservada, foi então utilizada para a elaboração de um novo primer, mantendo o primer PAS2-Reverso, para que pudesse amplificar todas as linhagens do patovar *passiflorae*, independente da origem geográfica. O novo par de primers, PAS2-reverso e PAS3-direto, 5' CCCAGGGTTTTTGCGGAG 3', foi testado inicialmente com a linhagem ICMP3151 para testar as condições ideais de amplificação descritas em material e métodos. Reações com todas as linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (55 linhagens), representando os diferentes estados brasileiros amostrados, incluindo o Paraná, foram realizadas e um fragmento único de cerca de 300 pares de bases esperado foi observado para 96,4% das linhagens. Duas linhagens, I11341 e I11342, provenientes do estado do Paraná não apresentaram amplificação. Estas duas linhagens, únicas representantes dos grupos IX e XII, respectivamente, foram isoladas de uma mesma cidade deste estado.

Especificidade dos primers PAS2-d/PAS2-r e PAS3-d/PAS2-r. A especificidade dos primers foi testada utilizando-se DNA isolado de diferentes espécies de *Xanthomonas* tipos e referências descritas por Vaulterin *et al.* (1995). Outro patógeno de maracujá, *P. syringae* pv. *passiflorae* também foi incluído na análise. Com o par de primers PAS2-d e PAS2-r, nenhuma linhagem apresentou amplificação. Com os primers PAS3-d e PAS2-r, apenas a linhagem *X. vesicatoria* LMG 911^T apresentou uma banda única de amplificação de cerca de 400 pares de bases. Além do tamanho da banda de amplificação ser diferente das linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, de 300 pares de bases, *X. vesicatoria* não apresenta nenhuma relação de patogenicidade com hospedeiros do gênero *Passiflorae*.

Sensibilidade da detecção de *X. axonopodis* pv *passiflorae* com os pares de primers PAS-d/PAS-r e com PAS3-d/PAS-r. Para avaliar o nível de detecção dos primers específicos por PCR, diferentes concentrações de DNA de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* ICMP3151 foram utilizadas para as reações de PCR (figura 7).

Os primers PAS2-D e PAS2-R foram capazes de detectar até a concentração de 2 pg de DNA, enquanto os primers Pas3-D e Pas2-R, foram capazes de amplificar uma concentração maior de DNA, de 40 pg. Considerando 0.1 pg como equivalente a 10 cópias do genoma de bactéria (Audy *et al.*, 1994) os primers Pas2-R e Pas2D seriam capazes de detectar ~200 células enquanto os primers Pas2-R e Pas3D seriam capazes de detectar

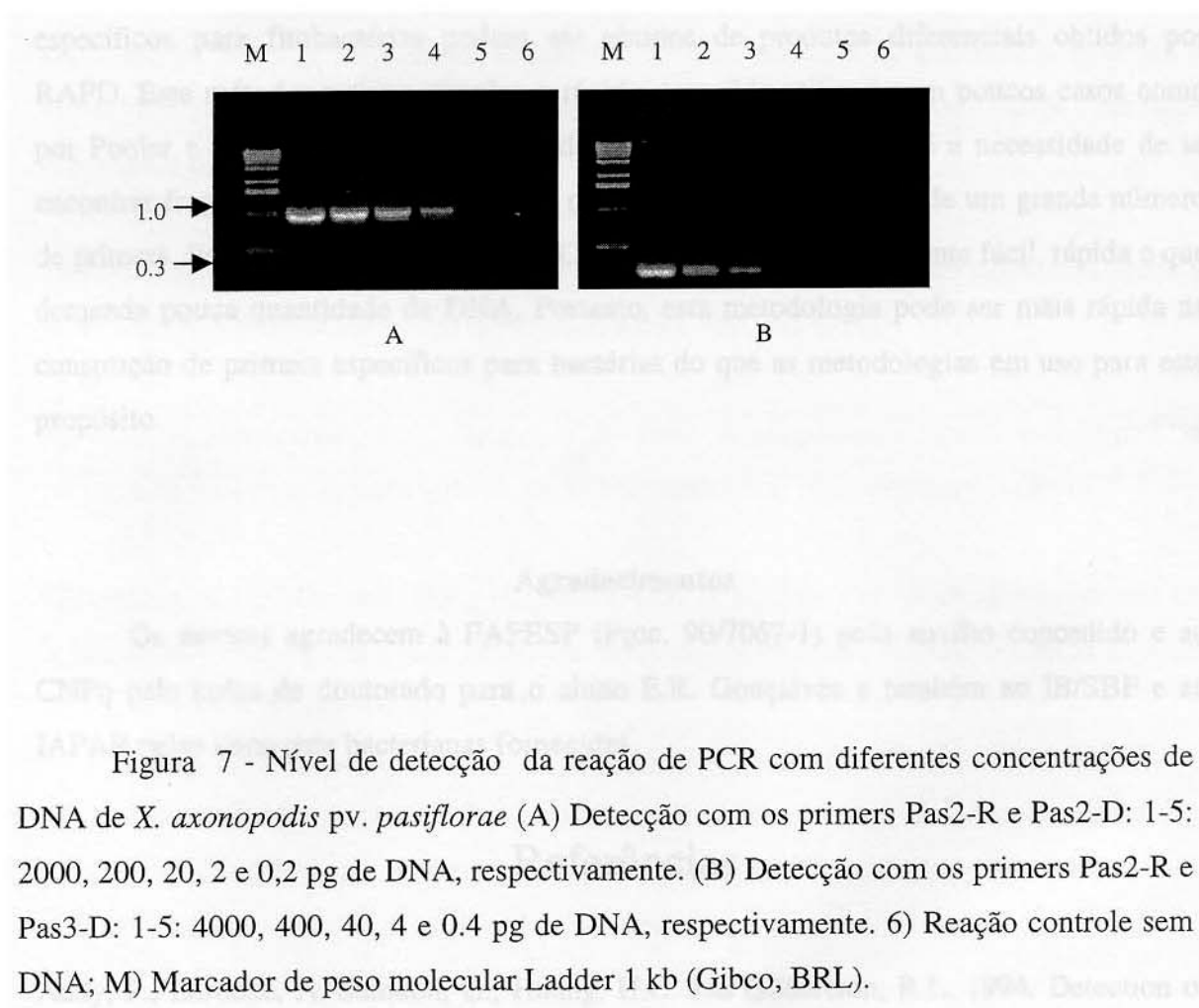


Figura 7 - Nível de detecção da reação de PCR com diferentes concentrações de DNA de *X. axonopodis* pv. *pasiflorae* (A) Detecção com os primers Pas2-R e Pas2-D: 1-5: 2000, 200, 20, 2 e 0,2 pg de DNA, respectivamente. (B) Detecção com os primers Pas2-R e Pas3-D: 1-5: 4000, 400, 40, 4 e 0.4 pg de DNA, respectivamente. 6) Reação controle sem DNA; M) Marcador de peso molecular Ladder 1 kb (Gibco, BRL).

~4000 células. Este número limite de detecção de patógenos por PCR, pode variar de acordo com o patógeno, primers e condições específicas. Audy *et al.* (1994), por exemplo, elaboraram primers baseados em seqüências plasmidiais capazes de detectar de 10 a 100 células de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Outros autores relatam a construção de primers capazes de amplificar até 4 células (Prosen, *et al.*, 1993). Seria interessante testar a capacidade dos primers PAS2-D, PAS2-R e Pas3-D em detectar *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em tecidos da planta hospedeira. Detectar a bactéria em sementes seria uma forma de se evitar a propagação de material contaminado com este patógeno, evitando prejuízos futuros.

Em conclusão, os resultados descritos aqui mostraram que sondas e primers específicos para fitobactérias podem ser obtidos de produtos diferenciais obtidos por RAPD. Este método, embora simples e rápido, tem sido utilizado em poucos casos como por Pooler e Hartung (1995). A maior desvantagem deste método é a necessidade de se encontrar fragmentos diferenciais, o que pode implicar na utilização de um grande número de primers. Por outro lado, a reação de PCR é uma técnica extremamente fácil, rápida e que demanda pouca quantidade de DNA. Portanto, esta metodologia pode ser mais rápida na construção de primers específicos para bactérias do que as metodologias em uso para este propósito.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (Proc. 90/7067-1) pelo auxílio concedido e ao CNPq pela bolsa de doutorado para o aluno E.R. Gonçalves e também ao IB/SBF e ao IAPAR pelas linhagens bacterianas fornecidas.

Referências

Audy, P., Laroche, A, Saindon, G., Huang, H.C. and Gilbertson, R.L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Phytopathology** 84: 1185-1192.

- Beriam, L.O.S., Malavolta Jr., V.A., Rosato, Y.B. & Yano, T. 1998. Serologia aplicada ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Arq. Inst. Biol.**, **65**: 25 – 33.
- Cook, D. & Sequeira, L. 1991. The use of subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race 3. **Mol. Gen. Genet.** **227**: 401-410.
- Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Sawczyc, M.K., Byrde, R.J.W. and Fieding. A. H. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **EMBO J.** **3**: 3323-3328.
- Darrasse, A., Kotoujansky, A and Bertheau, Y. 1994. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Appl. Environ. Microbiol** **60**:298-306.
- Denny, T.P. 1988. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. tomato from *P. s. syringae* with a DNA hybridization probe. **Phytopathology** **78**:1186-1192.
- Ferreira, H., Gonçalves, E.R., Rosato, Y.B. 1999. A simplified subtractive hybridization protocol to isolate sequences specific of *Xylella fastidiosa*. **Microbiology**, **145**: 1975-1999.
- Gilbertson, R.L.; Maxwell, D.P.; Hagedorn, D.J. & Leong, S.A. 1989. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. **Phytopathology** **79**: 518-524.
- Gonçalves, E.R. & Rosato, Y.B. 2000. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** **50**: 811-821.
- Hartung, J.S., Daniel, J.F. and Pruvost, O. P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. **Appl. Environ. Microbiol.** **59**:1143-1148.

Kuflu, K.M. and Cupples, D.A. 1997. Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 4462-4470.

Leite, R.P., Minsavage, G.V., Bonas, U. and Stall, R.E. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**: 1068-1077.

Mills, D., Russel, B.W. and Hanus, J.W. 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtractive hybridization. **Phytopathology** **87**: 853-861.

Pereira, A.L.G. 1969. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n.sp. **Arq. Inst.Biol.** **36**: 163-174.

Piza Jr., C.T. 1996. Cultura do maracujá. Departamento de Produção Vegetal da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, SP, Brasil, P. 102 (Série Boletim Técnico).

Pooler, M.R. and Hartung, J.S. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Cur.Microbiol.** **31**: 377-381.

Prosen, D.; Hatziloukas, E.; Schaad, N.W. & Panopoulos, N.J. 1991. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. **Phytopathology** **83**: 965-970.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T.A. 1989. Molecular cloning in laboratory. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Schaad, N. W.; Azad, H.; Peet, R. C. & Panopoulos, N. J. 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA hybridization probe. **Phytopathology** **79**: 903-907.

Smith, J.J., Scott-Craig, J.S., Leadbetter, J.R., Bush, G.L., Roberts, D.L. and Fulbright, D. 1994. Characterization of random amplified polymorphic DNA products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. **Mol. Phylogen. Evol.** **3**: 135-145.

Teixeira, C.G. 1994. Cultura. In: Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos, P. 1-142. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP., Brasil, Série Frutas Tropicais, 9.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research.**, **22**: 4673 – 4680.

Thompson, E.; Leary, J.V. & Chun, W.C. 1989. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsP. *michiganense* by a homologous DNA probe. **Phytopathology** **79**: 311.

Torres Fo., J. & Ponte, J.J. 1994. Estudo sobre o controle da Bacteriose ou "Morte precoce" (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopat. Bras.** **18**: 34-38.

Turner, T.; Barber, C. & Daniels, M. 1984. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Mol. Gen. Genet.** **195**: 101-107.

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

Ward, L. J. & De Boer, S. H. 1994. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsP. *atroseptica* with a digoxigenin-labeled DNA probes. **Phytopathology** **84**: 180-186.

Yamashiro, T. 1987. Principais doenças do maracujazeiro amarelo no Brasil . **In**: Maracujá. C. Ruggiero (ed.), pp 146-149. Legis Summa, Ribeirão Preto, SP., Brasil.

SUMMARY

Genetic biodiversity of 54 strains of *Xanthomonas* isolated from passion fruit (*Passiflorae* spp) were evaluated by RAPD fingerprinting. Fifteen cluster showing similarity >70%, exhibited relationships with geographic sampling region. A representative strain of each cluster and 16 species of *Xanthomonas* were assessed by rep-PCR using the BOX, ERIC and REP primers, PCR-RFLP of 16S-23S intergenic spacer (ITS) and SDS-PAGE of whole-cell proteins. A distinct profile was generated for each species of *Xanthomonas*. The passion fruit strains were not consistently allocated to any species. DNA:DNA hybridization results finally permitted a sound designation of these strains as *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

The phylogenetic relationships of 19 species of *Xanthomonas*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* based on the sequences of 16S-23S intergenic spacer (ITS) were determined. The ITS sequences varied from 492 to 578 bp within the genus *Xanthomonas* and 558 and 587 bp for *E. carotovora* and *P. syringae*, respectively. The similarity between *Xanthomonas* species ranged from 63 to 99.0%. These sequences and others from *X. vesicatoria*, *X. oryzae* and *Xylella fastidiosa* deposited in GenBank were compared and a common structure of the ITS including both tRNA^{Ala} and tRNA^{Ile} embedded within the sequence was found for all *Xanthomonas* species and *Xylella fastidiosa*. These tRNAs were highly conserved and divided the ITS sequence into three regions named ITS1, ITS2 and ITS3. Comparison of the ITS1 sequences of the *Xanthomonas* species showed a similarity average of 88.4% and differences consisted basically of substitution and addition/deletion of isolated nucleotides. ITS3 was the longest sequence and exhibited a mean sequence similarity of 82.9% within the genus. Major differences consisted of substitutions and addition/deletion of 1-5 bases. The most striking divergence was observed in *X. hyacinthi*, which showed two large insertion of 44. ITS2 showed remarkable differences in the length of the sequence. Most species exhibited 19- 20 bases whereas a long insertion of 51-56 bases was found in the *X. codiae*, *X. melonis*, *X. hyacinthi*, *X. translucens* and *X. theicola* sequences. The phylogenetic tree constructed showed three major clusters. Cluster I

included *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. cucurbitae*, , *X. hortorum*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. vasicola* and *X. vesicatoria* and Cluster II, *X. axonopodis*, *X. codiae*, *X. fragariae* and *X. melonis*. *X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. hyacinthi*, *X. theicola* and *X. translucens* were grouped in Cluster III.

Probes and primers specific for *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, based on differential RAPD products were also searched. A 1.0 kb fragment yielded with OPR2 primer showed to be useful as a probe for specific detection of the bacterium. Three primers, Pas2-D, Pas2R and Pas 3D, were designed based on the 1.0 kb fragment sequence. Pas2D and Pas2R amplified a 1.0 kb product for 70% of the strains however Pas2-R e Pas3-D primers identified 52 out 54 strains of *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Except for *X. vesicatoria* LMG911, which yielded a distinct product, amplification was not observed for the other species of *Xanthomonas*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beriam, L.O.S., Malavolta Jr., V.A., Rosato, Y.B. & Yano, T. 1998. Serologia aplicada ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Arq. Inst. Biol.**, **65**: 25 – 33.
- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science** **277**: 1453 – 1462.
- Bradbury, J.F. 1984. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187^{AL}, p. 199-210. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Burkholder, W. H. & Starr, M.P. 1948. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathol.** **38**: 494 – 502.
- Chatellier, S., Harel, J., Zhang, Y., Gottschalk, M., Higgins, R., Devriese, L.A. & Brousseau, R. 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. **Int. J. System. Bacteriol.** **48**: 581 – 589.
- Busse HJ, el-Banna T, Oyaizu H, Auling G. 1992. Identification of xenobiotic-degrading isolates from the beta subclass of the Proteobacteria by a polyphasic approach including 16S rRNA partial sequencing. **Int J Syst Bacteriol** **42**:19-26.
- Busse HJ, Denner EB, Lubitz W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **J. Biotechnol** **47**: 3-38.
- De Vos, P. & De Ley, J. 1983. Intra-and Intergenic similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. **Int. J. System. Bacteriol.**, **33**: 487-509.
- Dowson, W.J. 1939. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2** **100**: 177 – 193.
- Dye, D.W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. **N. Z. J. Sci Technol.** **5**: 393 – 416.
- Dye, D.W. 1963. Comparative study of the biochemical reactions of additional *Xanthomonas* spp. **N. Z. J. Sci Technol.** **6**: 483 – 486.

- Dye, D.W. 1966. Cultural and biochemical reactions of additional *Xanthomonas* spp. **N. Z. J. Sci Technol.** **9**: 913 – 919.
- Wakker, J.H. 1883. Vorläufige Mitteilungen über Hyacinthen-Krankheiten. **Bot. Zentralbl.** **14**: 315 – 317.
- Dye, D.W., Bradbury, M.G., Hayward, R.A., Lelliott, R.A. & Schroth, N.M. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Ver. Plant Pathol.**, **59**: 153 – 168.
- Dye, D.W. & Lelliott, R.A. 1974. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187, p. 243- 249. **In**: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Gitaitis, R.D., Sasser, M.J., Beaver, R.W., McInnes, T.B., Stall, R. E. 1987. Pectolytic xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants. **Phytopathol.** **77**: 611- 615.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 genes. **Science** **274**: 563 – 567.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. & Moore, R.B. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *xanthomonas* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **47**: 328 – 335.
- Hayward, A.C. 1993. The hosts of *Xanthomonas*, pp. 1- 192. **In**: J.G. Swings & E.L. Civerolo (eds.), *Xanthomonas*, 1st ed. Chapman & Hall, London.
- Hughs, R. & Ryschenkow, E. 1961. *Pseudomonas maltophilia*, na *Alcaligenes*-like species. **J. Gen. Microbiol.** **26**: 123 – 132.
- Kuroda, N.H. 1981.. Dissertação de graduação. FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP., Brazil, 47pp.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. & Decaris, B. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **46**: 102 – 111.
- Li, W.-H. 1997. Molecular Phylogenetics: Methods. **In**: Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc. Publishers. pp. 99 – 148.
- Lopes, S.C. 1991. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. **In**: São José, A.R. *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal, Funep, 1991. p. 201-209.

- Maas, J. L., Finney, M.M., Civerolo, E.L. & Sasser, M. 1985. Association of an unusual strain of *Xanthomonas campestris* with apple. **Phytopathol.** **75**: 438 – 445.
- Mello, S.C.M. & Oliveira, M.Z.A. 1987. Ocorrência da bacteriose do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no estado da Bahia. *Fitopat. Bras.*, **12** (2): 140
- Moore, E.R.B., Krüger, A.S., Hauben, L., Seal, S.E., de Baere, R., Wachter, R., Timmis, K. N. & Swings, J. 1997. 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. **FEMS Microbiol. Lett.** **151**: 145 – 153.
- Nei, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. 1996. **Annu. Rev. Genet.**, **30**: 371 – 403.
- Nesme, X. , Vaneechoutte, M., Orso, S., Hoste, B. & Swings, J. 1995. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene. **System. Appl. Microbiol.** **18**: 127 – 135.
- Oliveira, J.C. 1987. Melhoramento genético. In: Ruggiero, C. *Maracujá*. Ribeirão Preto, **Legis Summa**, 1987. p. 218 – 246.
- Oliveira, G.H.N., Sudo, S., Silva, J.R. & Kimura, O. 1988. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* infectando vascularmente plantas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, **13**: 107.
- Palleroni, N.J. & Bradbury, J.F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **43**: 606 – 609.
- Pereira, A.L.G. 1969. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflorae edulis*, SIMS) causada por *Xanthomonas passiflorae* n.sp. *Arquivos do Instituto Biológico*, **36**: 163-174.
- Peruch, L.A.M., Schroeder, A.L., Bertolini, E. & Calvette, K. 1997. Ocorrência da mancha oleosa do maracujá no Estado de Santa Catarina. **Fitopatol. Bras.**, **22**: 237.
- Piza Jr., C.T. 1966. Departamento de Produção Vegetal da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, SP, Brasil, p. 102 (Série Boletim Técnico).
- Reid, W.D. 1938. Grease spot of passion fruit. **New Zeland. Journal of Science and Technology**, **A XX** e, 260-265.
- Ridé, M. & Ridé, S. 1978. *Xanthomonas populi* (Ridé) comb. Nov. (syn. *Aplanobacter populi* Ridé) spécifité, variabilité, et absence de relation avec *Erwinia cancerogena*. **Eur. J. For. Pathol.** **8**: 310 – 333.

- Sacco, J.C. 1973. Contribuição ao estudo das *Passifloraceae* do Brasil IV. *Passiflorae castellanosi* Sacco n. sp. **In: Bradea** 1 (33): 349 – 352.
- Sacco, J.C. 1980. Passifloráceas. **In: Flora Ilustrada Catarinense**, I, v. Pass. Itajaí, 1980. p. 131.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P.H.A. (ed.). 1980. Approved lists of bacterial names. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 30: 225 – 420.
- Souza, J.S.I & Meletti, L.M.M. 1997. **In: Maracujá: espécies, variedades e cultivos.**
- Stall, R.E., Loschke, D.C. & Jones, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathol.** 76: 240 – 243.
- Starr, M.P. 1981. The genus *Xanthomonas*. **In: The prokaryotes**, Vol. 1 (eds. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows & H.G. Schlegel), Springer Verlag, Berlin, pp. 742-763.
- Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M. & De Ley, J. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 33: 409-413.
- Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M. & De Ley, J. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 33: 409 – 413.
- Teixeira, C.G. 1994. **In: Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**, p. 1-142. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP., Brasil, Série Frutas Tropicais, 9.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Neslson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C. *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 388: 539 – 547.
- Torres Filho, J. & Ponte, J.J. 1992. Estudo sobre o controle da bacteriose ou “morte precoce” (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo. **Fitopatologia Brasileira** 17 (2): 181.
- Torres Filho, J. & Ponte, J.J. 1994. Estudo sobre o controle da bacteriose ou “morte precoce” (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira** 19: 34-38.

- Van den Mooter, M. & Swings, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and na improved taxonomy of the genus. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **40** (4): 348- 369.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Ver.** **60** (2): 407 – 438.
- Van den Mooter, M. & Swings, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and na improved taxonomy of the genus. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **40**: 348 – 369.
- Van Zyl, E. & Stein, P.L. 1992. Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maptophilia* and taxonomic criteria in this genus. Request for na opinion. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **42**: 193 – 198.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **Inter. J. Syst. Bacteriol.** **45**: 472 – 489.
- Vauterin, L., Vantomme, R., Pot, B., Hoste, B., Swings, J. & Karsters, K. 1990. Taxonomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* by means of phytopathological, phenotypic, protein electrophoretic and DNA hybridization methods. **System. Appl. Microbiol.** **13**: 166 – 176.
- Vauterin, L., Yang, P., Alvarez, A., Takikawa, Y., Roth, D.A., Vidaver, A.K., Stall, R.E., Kersters, K & Swings, J. 1996. Identification of non-pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. **System. Appl. Microbiol.** **19**: 96 – 105.
- Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J. and Kersters, K. 1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **System. Appl. Microbiol.** **16**: 47 – 71.
- Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G. & Robbs, C.F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **N. Z. J. Agric. Res.** **21**: 153 – 177.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** **51**: 221 – 271.