

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/41567
IB/81532

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

M348

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Lyriam Lobo Rosa Marques



**Avaliação de Marcadores Moleculares para o Estudo da
Diversidade de Bactérias *Xanthomonas* spp.
Patogênicas para Tomate e Pimentão**

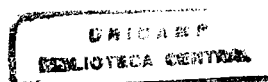
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) <i>Lyriam Lobo Rosa Marques</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>Gilson Paulo Manfio</i>
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na Área de Genética de Microrganismos.

Orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio

Co-Orientador: Dra. Yoko Bomura Rosato

Campinas, 2000



17.08.29

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	TTUNICAMP
	M348a
	41567
	278/00
	X
PREÇO	RB 11,00
DATA	13-07-00
N.º CPD	

CM-00142745-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Marques, Lyriam Lobo Rosa
M348a Avaliação de marcadores moleculares para o estudo da diversidade de bactérias *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão/Lyriam Lobo Rosa Marques. - - Campinas, SP[s.n.], 2000.
157f: illus.

Orientador: Gilson Paulo Manfio
Co-Orientadora: Yoko Bomura Rosato
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. *Xanthomonas*. 2. Sistemática. 3. Filogenia. I. Manfio, Gilson Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 04 de fevereiro de 2000.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio

_____ 

Prof. Dr. Júlio Rodrigues Neto

_____ 

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

_____ 

Prof. Dr. Sílvio Aparecido Lopes

_____ 

Prof. Dr. Rui Pereira Leite Junior

_____ 

Suplentes:

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi

Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo às pessoas profissionalmente mais envolvidas com este “processo cármico” (tese). Com enorme carinho, agradeço o apoio, a confiança, os conselhos, as cobranças, a paciência, a compreensão, as sugestões que sempre tive de meus orientadores, Dr. Gilson Paulo Manfio e Dra. Yoko Bomura Rosato, os quais contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, por ter gentilmente cedido, em várias ocasiões, linhagens bacterianas utilizadas na confecção deste trabalho, aproveitando para parabenizá-lo pela Coleção de Culturas de Bactérias Fitopatogênicas do IBSBF (Instituto Biológico, Campinas), fruto de tanto anos de trabalho e de tão grande importância à comunidade científica.

À Dra. Suely Lopes Gomes, pelos *primers* Hsp603/Hps605, desenhados por ela e gentilmente cedidos para utilização neste trabalho.

À Fundação André Tosello, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Acknowledgements...

I am very grateful to Dr. Martin Embley, for interesting discussions, for suggestions and for the contribution on the sequencing work. I acknowledge the work of Patricia Dyal on the sequencing as well.

To Dr. Jeffrey Jones and Dr. Blanca Canteros, for the gift of strains.

To Dr. Eric Lam, for the opportunity of working in his lab; thanks for everything I have learned from him and in his laboratory.

To my friend and “boss”, Carlos, for the job opportunity, for teaching me so much, for sharing his enthusiasm and knowledge of the English language; for the excellent work environment at Speak Out. To the “Speak Out team”, especially Carlos, Kitty and Mara, for sharing their stories and listening to my complaints many times. It has been very fun to work with you guys!

A todos os meus alunos, por muitos momentos divertidos e por toda a compreensão e paciência nos momentos em que não pude dar o melhor de mim nas aulas devido a este trabalho; por todo o apoio e “torcida”. Por todo o carinho que sempre tive de todos. Thank you very much.

Aos amigos e colegas da Fundação André Tosello, pelo agradável convívio, por toda a compreensão, o apoio técnico - ou moral, por toda a torcida, enfim, por tudo!

À Olga-san, por ter me ajudado a aprender a “viver um dia de cada vez”, por ter me ajudado a manter o equilíbrio em meio a tantos “stresses”, por ter me apresentado aos ginsengs, florais, EFAs e afins, os quais contribuíram bastante para o desenvolvimento deste trabalho!

Aos muitos amigos, os quais não seria possível nomear aqui, que direta ou indiretamente, dentro ou fora do lab, tomam a minha vida e a minha pessoa tão melhores.

Agradecimentos especiais

À minha família e aos meus grandes amigos de todas as horas:

É com dificuldade que tento colocar em palavras a importância que a conclusão deste trabalho tem para mim (um trabalho ao qual dediquei 7 anos, ou quase ¼ de minha vida!). Eu não poderia deixar de dizer que não teria sido capaz de desenvolvê-lo sem o apoio, a contribuição, o encorajamento, a paciência, a compreensão, o amor e o carinho de vocês.

Ao Gilson, Eduardo, Valéria, Cathia, Juliana, Manuela, Fabiana, Marinez, Regina, Silvana, Obrigada por todas as horas difíceis que se tornaram tão mais fáceis quando as dividimos; obrigada por todo o companheirismo; por tanta diversão e bom humor; por tanta paciência com os momentos de “mau” humor; por todas as nossas “saídas” e festas (tempos de glória!); pelas sessões de “terapia em grupo”, pelos jantares, música, danças, livros e conhecimentos divididos. Muito obrigada por TUDO! Vocês são a minha “família escolhida”.

Ao Gizi, por tanta amizade, carinho e pela incrível capacidade de manter o bom humor e conseguir me fazer sorrir e rir mesmo através de lágrimas, nas situações mais extremas. Por tantas horas de trabalho fora do expediente. Por tudo!

À Valzi, por tantos anos de uma amizade e convivência maravilhosas, por ter sempre estado presente em todos os momentos, nos risos ou nas lágrimas; pelas “cobranças” nas horas devidas, que tanto me fizeram crescer; por tomar tudo tão mais leve; por não ter me deixado desistir.

Ao Duzi, tão querido, por ser essa pessoa tão gostosa, divertida e carinhosa, pela grande paciência e compreensão em momentos de trabalho intenso; por cuidar tão bem de nós, com tantas maravilhosas “festas de Babete”, que nos reanimam e “levantam o espírito”.

À Juzi, amiga de todas as horas, por tanto carinho, por nunca deixar de acreditar na minha capacidade, pelas “duras” muito construtivas, por tantas histórias, livros e ótimos momentos que dividimos, por horas e horas de terapia pelo telefone.

À Manuela, pelo carinho, amizade, por todo o seu apoio, paciência, por tantas experiências e bons momentos que vivemos juntas, pelo muito que nossa amizade nos fez crescer.

À Fabi, por todo o apoio e ajuda com este trabalho, pela amizade e carinho, por me lembrar constantemente que tudo daria certo no final, através de seu exemplo.

À Cathia e ao Marcelo, pelo apoio, paciência, compreensão, por me ouvirem sempre que preciso, por uma convivência tão agradável. Cathinha, por tantas horas de companhia no lab em muitas noites, por tudo que você faz por mim, por saber que posso sempre contar com a sua amizade.

À Reuzi, sempre presente, por ter tanta paciência com essas “amiugas” muitas vezes “sumidas” de Campinas, pela amizade e apoio e pelas dicas do *groEL*!

À Silvana, tão amiga, que me ajudou a atravessar momentos tão difíceis no decorrer deste trabalho.

À Susy, pela longa e sempre agradável convivência no lab, pelo encorajamento, pela amizade e pelas sugestões a este trabalho.

To Maggie, for so much help when I needed it; for so much patience, understanding and encouragement; for being such a companion; for making everything seems so much easier; for so much fun and great moments; for everything! Thank you.

À minha família, por absolutamente tudo! Por tanto amor, carinho, pelo apoio incondicional, por tantos sacrifícios; pelos ótimos momentos que vivemos juntos; pelos momentos difíceis que atravessamos e através dos quais crescemos juntos; por sua grande contribuição à pessoa que sou hoje; pela alegria e grande força de minha mãe, que sempre nos manteve unidos e cheios de esperança, mesmo quando tudo parecia perdido; pela tranquilidade e segurança que meu pai sempre nos transmitiu, pelo exemplo de sua impressionante capacidade de trabalho; por tanto carinho e amor que meus pais sempre souberam nos dar; aos meus irmãos, tão queridos e companheiros, à minha cunhada e ao grande presente que todos nós tivemos, o Caio; aos outros pequenos que ainda estão por vir; aos meus avós e à minha família, especialmente minhas tias, pelo carinho e torcida.

Com todo o meu amor, Muito Obrigada a todos vocês!!

Dedico este trabalho às pessoas que tanto amo e que trazem o verdadeiro sentido à minha vida e a tudo que faço: aos meus pais, João Libero e Mary, meus irmãos Nando, Caco, Duda, Denery, ao pequeno Caio, meu sobrinho, e à minha “excêntrica família de Antônia”.

*à alma feminina, por toda a sua sensibilidade,
beleza, força e espírito guerreiro,
onde quer que se manifeste.
às mulheres pioneiras que nos ensinaram
a buscar e explorar nossas potencialidades
e a abrir novos caminhos,
dedico.*

“The victory belongs to love.”
(Daniel Ortega)

Conteúdo

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Abreviações.....	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. Aplicação de Taxonomia Polifásica na Caracterização de Bactérias.....	2
1.2. Sistemática de <i>Xanthomonas</i> Dowson 1939	7
1.2.1. <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel 1895) Dowson 1939	10
1.2.2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	22
1.3. Genes Conservados como Marcadores Moleculares	30
1.3.1. Operon Ribossômico: Análise Filogenética de Sequências de rRNA 16S e Regiões Espaçadoras rDNA 16S-23S	32
1.3.2. Operon GroESL na Taxonomia Bacteriana.....	37
1.4. Objetivos.....	41
2. Materiais e Métodos	42
2.1. Linhagens Bacterianas.....	42
2.2. Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	42
2.2.1. Meios NA e NB (Difco)	46
2.2.2. Meio NYGA e NYGB (Turner <i>et al.</i> , 1984)	47
2.2.3. Meio de Kado (Kado & Heskett, 1970).....	47
2.2.4. Meio GYCA, com modificações (Vauterin <i>et al.</i> , 1991).....	47
2.2.5. Meio para Detecção de Atividade Amilolítica	48
2.2.6. Meio para Detecção de Atividade Celulolítica	48
2.2.7. Meio para Detecção de Atividade Pectinolítica	48
2.2.8. Meio para Detecção de Atividade Proteolítica.....	49
2.3. Extração de DNA Genômico em Pequena Escala.....	49
2.3.1. Solução de Tiocianato de Guanidina 5 M	50
2.4. Amplificação de rDNA 16S, Região Espaçadora rDNA 16S-23S e <i>groEL</i> por PCR.....	51
2.4.1. Amplificação de rDNA 16S	51
2.4.2. Amplificação de região espaçadora de rDNA 16S-23S	51
2.4.3. Amplificação de sequência parcial do gene <i>groEL</i>	52
2.5. Análises de Polimorfismo de Restrição (RFLP).....	54
2.6. Sequenciamento e Análise Filogenética de Fragmentos da Região Espaçadora rDNA 16S-23S e Gene <i>groEL</i>	55
2.7. Caracterização Fenotípica de <i>Xanthomonas</i> spp.	55
2.7.1. Produção de enzimas extracelulares.....	55

3. Resultados.....	56
3.1. Análise de RFLP da Região Espaçadora do rDNA 16S-23S	56
3.1.1. Caracterização de linhagens de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas para tomate e pimentão	56
3.1.2. Caracterização de linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> atípicas (grupo <i>nonA/nonB</i>).....	67
3.2. Análise de RFLP do Gene rDNA 16S de Linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Atípicas (grupo <i>nonA/nonB</i>).....	70
3.3. Análise de RFLP de Região do Gene <i>groEL</i>	72
3.3.1. Caracterização de linhagens de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas para tomate e pimentão	72
3.3.2. Caracterização de linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> atípicas (grupo <i>nonA/nonB</i>).....	83
3.3.3. Caracterização de linhagens-tipo de diferentes espécies do gênero <i>Xanthomonas</i>	85
3.4. Análise Filogenética de Sequências da Região Espaçadora rDNA 16S-23S e Gene <i>groEL</i>	87
3.4.1. Análise de sequências da região espaçadora rDNA 16S-23S de linhagens de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas para tomate e pimentão.....	87
3.4.2. Análise de sequências do gene <i>groEL</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas para tomate e pimentão.....	92
3.4.3. Análise de sequências de <i>groEL</i> de linhagens-tipo de diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> spp.	98
3.5. Caracterização Fenotípica de Atividade Enzimática de Linhagens-Tipo e Isolados Atípicos de <i>Xanthomonas</i> spp. Patogênicas para Tomate e Pimentão.....	100
4. Discussão	102
4.1. Análises de RFLP de Região Espaçadora rDNA 16S-23S e do Gene <i>groEL</i>	102
4.2. Análise Filogenética de Sequências de Região Espaçadora 16S-23S e Gene <i>groEL</i> de <i>Xanthomonas</i> spp.	115
5. Conclusões	119
6. Perspectivas	121
7. Referências Bibliográficas.....	123

Índice de Figuras

Figura 2.1.	Esquema dos <i>primers</i> utilizados para amplificação da região espaçadora do rDNA 16S-23S de bactérias.....	52
Figura 2.2.	Esquema do operon <i>groES-groEL</i> e localização dos <i>primers</i> para região do gene <i>groEL</i> baseado em sequências conservadas da proteína GroEL (Hsp60) de bactérias.....	53
Figura 3.1.	Perfil de restrição de fragmentos da região espaçadora do rDNA 16S-23S de linhagens-tipo e referência de <i>Xanthomonas</i>	58
Figura 3.2.	Padrões de RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S de linhagens de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> , <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> e <i>X. vesicatoria</i>	61
Figura 3.3.	Padrões de RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S de isolados brasileiros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> obtidos com <i>Dde</i> I.....	63
Figura 3.4.	Padrões de RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S de isolados brasileiros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> obtidos com <i>Hinf</i> I.....	64
Figura 3.5.	Padrões de RFLP da região espaçadora do rDNA 16S-23S de linhagens de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. vesicatoria</i> e linhagens atípicas de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> do grupo <i>nonA/nonB</i>	68
Figura 3.6.	Padrões de RFLP da região espaçadora do rDNA 16S-23S de linhagens de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. vesicatoria</i> e linhagens atípicas de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> do grupo <i>nonA/nonB</i>	69
Figura 3.7.	Padrões de RFLP de rDNA 16S de linhagens de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. vesicatoria</i> e linhagens atípicas de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> do grupo <i>nonA/nonB</i>	71
Figura 3.8.	Produtos de amplificação do gene <i>groEL</i> de linhagens de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> , <i>X. axonopodis</i> , pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> e <i>X. vesicatoria</i>	73
Figura 3.9.	Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> , <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , <i>X. fragariae</i> e <i>X. vesicatoria</i>	75
Figura 3.10.	Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> e <i>X. vesicatoria</i>	76

Figura 3.11. Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de isolados brasileiros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> obtidos com <i>Hae</i> III.....	78
Figura 3.12. Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de isolados brasileiros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> obtidos com <i>Msp</i> I.	79
Figura 3.13. Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de isolados brasileiros de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> obtidos com <i>Rsa</i> I.....	80
Figura 3.14. Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de linhagens de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> atípicas do grupo <i>nonA/nonB</i>	84
Figura 3.15. Padrões de RFLP de <i>groEL</i> de diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> obtidos com <i>Hae</i> III (A) e <i>Msp</i> I (B).	86
Figura 3.16. Sequências de região espaçadora rDNA 16S-23S de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> LMG 929, <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> XV441 e <i>X. vesicatoria</i> LMG 911.....	89
Figura 3.17. Árvore filogenética obtida a partir da análise por Jukes e Cantor/ <i>Neighbor-Joining</i> de sequências de região espaçadora 16S-23S de linhagens de <i>Xanthomonas</i> patogênicas para tomate e pimentão e organismos-referência.....	91
Figura 3.18. Sequências de <i>groEL</i> de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> LMG 929, <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> XV441 e <i>X. vesicatoria</i> LMG 911.	95
Figura 3.19. Árvore filogenética obtida a partir da análise por DNA-ML de sequências de <i>groEL</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> patogênicas para tomate e pimentão e linhagens atípicas.....	97
Figura 3.20. Árvore filogenética obtida a partir da análise por Jukes e Cantor/ <i>Neighbor-Joining</i> de sequências parciais de <i>groEL</i> de linhagens-referência de <i>Xanthomonas</i> e isolados atípicos.....	99

Índice de Tabelas

Tabela 2.1.	Linhagens bacterianas estudadas neste trabalho.	43
Tabela 2.2.	<i>Primers</i> utilizados nas reações de amplificação por PCR.	53
Tabela 3.1.	Resultados da análise de restrição de fragmentos de região espaçadora rDNA 16S-23S de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> e <i>X. vesicatoria</i> utilizando diferentes endonucleases.	59
Tabela 3.2.	Classificação de linhagens-tipo e referência de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. vesicatoria</i> e isolados brasileiros do antigo grupo <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> baseada na análise de RFLP de região espaçadora do rDNA 16S-23S com <i>Alu</i> I, <i>Dde</i> I e <i>Hinf</i> I.	65
Tabela 3.3.	Classificação de linhagens de <i>Xanthomonas</i> do grupo <i>nonA/nonB</i> baseada na análise de RFLP da região espaçadora do rDNA 16S-23S com diferentes endonucleases.	70
Tabela 3.4.	Resultados da análise de restrição de fragmentos de <i>groEL</i> de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> e <i>X. vesicatoria</i> utilizando diferentes endonucleases.	74
Tabela 3.5.	Classificação de linhagens-tipo e referência de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>X. vesicatoria</i> e isolados brasileiros do antigo grupo <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> baseada na análise de RFLP de <i>groEL</i> com <i>Hae</i> III, <i>Msp</i> II e <i>Rsa</i> I.	81
Tabela 3.6.	Classificação de linhagens de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> atípicas (<i>nonA/nonB</i>) baseada na análise de RFLP de <i>groEL</i> com <i>Hae</i> III, <i>Msp</i> I e <i>Rsa</i> I.	85
Tabela 3.7.	Atividade de enzimas extracelulares de linhagens de <i>Xanthomonas</i> patogênicas para tomate e pimentão.	101
Tabela 4.1.	Classificação de linhagens de <i>Xanthomonas</i> spp. patogênicas para tomate e pimentão através de análises de RFLP de região espaçadora 16S-23S e RFLP de uma região do gene <i>groEL</i>	112

Lista de Abreviações

ARDRA:	do inglês: <i>amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
ATCC:	American Type Culture Collection
CCT:	Coleção de Culturas Tropical
dNTP:	deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
EDTA:	etileno-diamino-tetraacetato
IBSBF:	Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica
Kb:	Kilobase
LMG:	Belgium Collection of Microorganisms
<i>outlier</i> :	organismo classificado na periferia de grupos taxonômicos definidos
PAGE:	do inglês: <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>
PCR:	do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>
pb:	pares de base
<i>primer</i> :	oligonucleotídeo iniciador
pv.:	patovar
RAPD:	do inglês: <i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
RFLP:	do inglês: <i>restriction fragment length polymorphism</i>
SDS:	dodecil-sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sp.:	espécie
spp.:	espécies
T ₁ :	linhagem-tipo
TBE:	tampão Tris-Borato-EDTA
TE:	tampão Tris-EDTA
T _m :	temperatura de denaturação (" <i>melting temperatura</i> ")

Resumo

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* é o agente causador da mancha bacteriana em tomate e pimentão. Este grupo de microrganismos sofreu uma ampla revisão taxonômica nos últimos anos em função da relativa heterogeneidade dos organismos identificados como *X. campestris* pv. *vesicatoria*, sendo demonstrada, inicialmente, a ocorrência de dois subgrupos distintos de organismos, denominados grupos A e B, com base em análises de perfil de proteínas totais, perfil de atividade enzimática e homologia de DNA:DNA. O presente estudo teve como objetivos a prospecção de marcadores moleculares para a diferenciação de linhagens nos grupos A e B, atualmente classificados como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*, respectivamente, e de linhagens atípicas de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, previamente classificadas em um grupo distinto, denominado *nonA/nonB*. Foram analisadas 76 linhagens, incluindo 32 linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* isoladas no estado de São Paulo, 33 linhagens-tipo e referência de espécies de *Xanthomonas* do grupo *vesicatoria* e de outras espécies de *Xanthomonas*, 9 linhagens atípicas do grupo *nonA/nonB* e linhagens-referência de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Xylella fastidiosa*. Foram realizadas análises de PCR-RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S e de uma região de 1,0 Kb do gene *groEL*. Os resultados obtidos demonstraram que as linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* podem ser diferenciadas através dos polimorfismos de região espaçadora de rDNA 16S-23S com *Alu* I, *Dde* I e *Hinf* I e através de polimorfismos de uma região do gene *groEL* com *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I. A maioria das linhagens atípicas do grupo *nonA/nonB* foram agrupadas em *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* nas análises com os dois marcadores, com exceção de duas linhagens (XV440 e XV441), as quais apresentaram padrão de RFLP variável, agrupando com A ou B dependendo da enzima de restrição utilizada. A linhagem de *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV441 foi recentemente descrita como uma terceira espécie de *Xanthomonas* patogênica para tomate e pimentão. Foi observada a correlação entre o hospedeiro do qual a linhagem foi isolada e a espécie de *vesicatoria* em que agrupa, sendo demonstrado que linhagens provenientes de pimentão são

predominantemente *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e as linhagens de *X. vesicatoria* são predominantemente associadas a tomate. Foram ainda detectados 3 padrões distintos de RFLP de *groEL* para 3 linhagens brasileiras, sugerindo a existência de grupos adicionais de *X. campestris* pv. *vesicatoria* entre os isolados brasileiros, sendo esta a primeira descrição de sua ocorrência no Brasil.

Adicionalmente, análises de polimorfismo de restrição de 19 linhagens-tipo de espécies válidas de *Xanthomonas* indicaram que o gene *groEL* é um marcador taxonômico eficiente para o gênero, permitindo a diferenciação entre as linhagens. Análises filogenéticas de seqüências parciais de *groEL* de 15 dessas espécies, confirmaram, no geral, o agrupamento obtido a partir de análises de seqüências de rDNA 16S, apresentando, entretanto, maior resolução. Esses resultados sugerem que a utilização de seqüências de *groEL* como marcador filogenético para espécies do gênero *Xanthomonas* pode ser de grande importância, dada à inexistência, até o momento, de um marcador filogenético eficiente no estudo da filogenia do grupo.

Abstract

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* is the causal agent of bacterial leaf spot in tomato and pepper. The taxonomy of this group of microorganisms has been recently revised given the relatively high heterogeneity of the organisms identified as *X. campestris* pv. *vesicatoria*. The occurrence of two distinct subgroups of organisms, named groups A and B, was demonstrated on the basis of whole-cell protein profiles, enzymatic activity and DNA:DNA homology. The current study aimed at the definition of molecular markers to differentiate strains assigned to groups A and B, currently classified as *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and *X. vesicatoria*, respectively, and of atypical strains of the former *X. campestris* pv. *vesicatoria* group, named *nonA/nonB* strains. A total of 76 strains were analyzed, including 32 strains of *X. campestris* pv. *vesicatoria* isolated in the State of São Paulo, 33 type and reference strains from different *Xanthomonas* species, 9 atypical *nonA/nonB* strains and reference strains of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Xylella fastidiosa*. The taxonomic and phylogenetic markers evaluated comprised: RFLP of 16S rDNA, RFLP of 16S-23S rDNA spacer regions and conserved region of the *groEL* gene. The results demonstrated that strains of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and *X. vesicatoria* can be differentiated on the basis of the polymorphism in the 16S-23S rDNA using *Alu* I, *Dde* I and *Hinf* I, and in the conserved region of the *groEL* gene with *Hae* III, *Msp* I and *Rsa* I. Most of the atypical *nonA/nonB* strains were grouped with *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* in the analyses using both markers, except for two strains (XV440 and XV441), which presented variable RFLP patterns. It was observed a strong correlation between the grouping of strains and the host from which they were isolated. Strains identified as *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* were preferably isolated from pepper and strains which grouped with *X. vesicatoria* were predominantly isolated from tomato. Three distinct *groEL* RFLP groups were detected for 3 Brazilian strains, suggesting the existence of additional *X. campestris* pv. *vesicatoria* groups among the strains analyzed.

In addition, restriction polymorphisms analysis of 19 type strains of valid *Xanthomonas* species suggest that the *groEL* gene constitutes an efficient taxonomic marker to this genus, leading to the differentiation among the analyzed species. Phylogenetic analysis of partial *groEL* sequences of 15 of the aforementioned species corroborated the clustering originated from phylogenetic studies of rDNA 16S sequences, the former presenting a higher resolution level. These results suggest that *groEL* might be an important phylogenetic marker to the genus *Xanthomonas*.

1. Introdução

O gênero *Xanthomonas* compreende diversas espécies de bactérias fitopatogênicas, as quais afetam mais de 400 espécies de plantas no mundo todo, com impacto econômico significativo em culturas agrícolas importantes.

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* é o agente causador da mancha bacteriana em tomate e pimentão. Este grupo de microrganismos vem sofrendo uma ampla revisão taxonômica nos últimos anos em função de sua importância econômica e relativa heterogeneidade dos organismos alocados neste gênero.

Estudos recentes, empregando as técnicas de hibridização DNA:DNA e caracterização do perfil de utilização de fontes de carbono pelo sistema Biolog, reclassificaram *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies diferentes: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *Xanthomonas vesicatoria* (Vauterin *et al.*, 1995). Estudos de taxonomia polifásica de *X. campestris* pv. *vesicatoria* confirmaram a ampla diversidade destes organismos, com a ocorrência de diversos sub-grupos, além de organismos que merecem reclassificação taxonômica (Bouzar *et al.*, 1999).

A aplicação de técnicas de biologia molecular em estudos de sistemática microbiana vem se intensificando nos últimos anos, levando à definição de novas espécies e à revisão das relações filogenéticas entre taxa de importância ambiental, fitossanitária e médica. Metodologias baseadas na amplificação de fragmentos de DNA genômico, através da técnica de PCR, representam uma alternativa relativamente simples, econômica e rápida para a análise de rotina de grande número de isolados. As metodologias de análise taxonômica baseadas em PCR mais comumente usadas são: RAPD, RFLP de rDNA 16S (ARDRA) e RFLP de regiões espaçadoras rDNA 16S-23S.

Estudos envolvendo a comparação de seqüências de rDNA 16S entre todas as espécies de *Xanthomonas* com descrição válida (Hauben *et al.*, 1997) mostraram que as linhagens-tipo exibiam um grau de similaridade médio de 98.2%, correspondendo a uma diferença média de apenas 14 nucleotídeos entre

as seqüências de rDNA 16S. Este gene não se constitui, portanto, em um bom marcador taxonômico para as espécies do gênero *Xanthomonas*.

A classificação atual das espécies de *Xanthomonas* reflete as relações de homologia DNA:DNA entre estes organismos, derivada do estudo de Vauterin *et al.* (1995). Nesta reclassificação, as espécies e alguns patovares foram reagrupadas em 20 espécies. A inexistência de um esquema simplificado para identificação fenotípica através de testes convencionais, aliada à falta de resolução do rDNA 16S, tornam difícil a identificação rápida e/ou confirmação da identidade de organismos classificados segundo esquemas taxonômicos praticados no passado.

Assim, o estabelecimento de marcadores taxonômicos e filogenéticos para o gênero *Xanthomonas*, visando o seu emprego na caracterização da diversidade de linhagens e estudos de filogenia do grupo, é de grande interesse. A identificação precisa de espécies bacterianas fitopatogênicas deste grupo é fundamental para a detecção de patógenos em culturas agrícolas e monitoramento epidemiológico, permitindo a adoção de medidas apropriadas de controle e combate dos agentes no campo, além de permitir a detecção de novas espécies e patovares de *Xanthomonas* fitopatogênicas.

Dessa forma, o presente estudo visou a definição de marcadores taxonômicos moleculares para espécies de *Xanthomonas*, com especial atenção para os organismos do grupo *vesicatoria*, fitopatógenos de tomate e pimentão, bem como a avaliação preliminar da utilização destes marcadores na análise filogenética das espécies de *Xanthomonas*.

1.1. Aplicação de Taxonomia Polifásica na Caracterização de Bactérias

Nos últimos anos, os avanços em sistemática e taxonomia de bactérias têm se beneficiado da utilização conjunta de dados derivados do emprego de técnicas fenotípicas, quimiotaxonômicas e moleculares em uma abordagem integrada, denominada taxonomia polifásica. Nestes estudos, os esquemas de classificação são corroborados por resultados dos diferentes tipos de análise, evidenciando

essencialmente classificações baseadas em consenso (Vandame *et al.*, 1996; Vauterin *et al.*, 1995). Um resumo das principais técnicas utilizadas e características analisadas em sistemática bacteriana encontra-se em Busse *et al.* (1996) e o nível de resolução de algumas dessas técnicas é discutido por Vandamme *et al.* (1996).

A caracterização fenotípica convencional de bactérias inclui a determinação de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (para uma revisão, consultar Vandamme *et al.*, 1996, Busse *et al.*, 1996). De maneira geral, dados derivados de caracterização fenotípica têm sido usados para a classificação de linhagens em nível de gênero, espécie e infra-específico (Busse *et al.*, 1996; Vandamme *et al.*, 1996).

Diversos autores têm avaliado dados de utilização de carboidratos na classificação taxonômica de *Xanthomonas* spp., tanto através de testes microbiológicos clássicos, como através do emprego de sistemas automatizados e semi-automatizados, como BIOLOG e API (Busse *et al.*, 1996; Stall *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995). A produção de enzimas envolvidas na degradação de macromoléculas e polímeros complexos, como amilases, celulasas, DNAses, lipases, pectinases, proteases e quitinases, também tem sido um outro parâmetro utilizado na caracterização taxonômica de microrganismos, principalmente de fitopatógenos (Bouzar *et al.*, 1994b; Stall *et al.*, 1994). Outros métodos de caracterização fenotípica aplicados na caracterização de *Xanthomonas* spp. e outras bactérias incluem tipagem com anticorpos monoclonais, fagotipagem e eletroforese de isoenzimas (Vandamme *et al.*, 1996).

A quimiotaxonomia compreende a análise química de componentes celulares microbianos, visando a determinação e/ou quantificação destes e utilização destas informações na classificação e identificação de microrganismos (Goodfellow & O'Donnell, 1994). Os processos de análise quimiotaxonômica envolvem a extração, fracionamento/purificação e resolução dos compostos químicos de interesse, tais como proteínas, aminoácidos, lipopolisacarídeos, ácidos graxos,

poliaminas e açúcares, através de métodos analíticos, como cromatografia gasosa, líquida, em fase sólida ou eletroforese.

A análise de perfis de proteínas em géis de SDS-PAGE tem sido empregada na caracterização de *Xanthomonas* spp. por diversos autores. Diversos trabalhos demonstraram a utilidade deste tipo de análise no agrupamento de linhagens em nível de espécie e infra-específico (Vauterin *et al.*, 1990; Vauterin *et al.*, 1991a, 1991b; Bouzar *et al.*, 1994b), além da detecção de bandas características (bandas α e β) relacionadas a proteínas específicas em algumas espécies (Bouzar *et al.*, 1994a; Stall *et al.*, 1994).

Análises de ácidos graxos celulares, através da separação cromatográfica gasosa dos esteres metílicos (FAMES; *fatty acid methyl esters*), têm sido utilizadas em estudos taxonômicos de bactérias por vários autores (revisão em Suzuki *et al.*, 1993). Yang *et al.* (1993b) descreveram a utilização de perfis de FAMES em estudos taxonômicos de *Xanthomonas* spp., demonstrando que ocorre uma grande diversidade de ácidos graxos nesse táxon, tornando esse tipo de análise uma ferramenta valiosa para estudos taxonômicos neste grupo.

Análises genômicas de microrganismos oferecem como grande vantagem o fato de não estarem sujeitas a variações fenotípicas, uma vez que não se baseiam na expressão gênica e não sofrem interferência direta do ambiente (Towner & Cockayne, 1993). Os métodos moleculares mais amplamente utilizados na caracterização de bactérias envolvem análises da organização do genoma bacteriano total, ou de localização e seqüência de genes específicos no genoma. Os métodos empregados para este fim incluem a determinação de homologia DNA:DNA, polimorfismos de restrição e de amplificação.

Estudos de homologia DNA:DNA entre organismos diferentes baseiam-se na capacidade de denaturação/renaturação do DNA. Em uma mistura de DNAs denaturados provenientes de organismos distintos, ocorre, sob condições adequadas, o repareamento das fitas e formação de moléculas heterólogas, baseadas no grau de homologia das seqüências gênicas dentre os organismos comparados. Quanto mais geneticamente relacionados forem os organismos, mais

seqüências de bases terão em comum, e maior será a formação de moléculas heterólogas (híbridas). A quantificação do grau de homologia se faz através da comparação da formação de híbridos na reação heteróloga em relação às reações homólogas em sistemas de hibridização em solução ou com um dos DNAs fixado a um suporte sólido (Towner & Cockayne, 1993; Busse *et al.*, 1996). A principal vantagem apresentada por este método é que este permite a definição de “espécies genômicas”, sendo recomendado para a classificação de novas linhagens em nível de espécie (Stackebrandt & Goebel, 1994). Considera-se como espécie genômica (ou espécie genética) um grupo de linhagens que apresenta homologia de DNA de 70% ou mais em condições ótimas de hibridização (Wayne *et al.*, 1987), com diferença de T_m entre as hibridizações homólogas e heterólogas de 5 °C ou menor (Logan, 1994).

Em *Xanthomonas*, um amplo estudo incluindo homologia DNA:DNA, realizado por Vauterin *et al.* (1995), levou à reclassificação do gênero em 20 espécies genômicas.

A análise de polimorfismos de restrição (RFLP) baseia-se no princípio de especificidade de clivagem do DNA com enzimas de restrição, de forma a gerar fragmentos de DNA de acordo com a frequência e localização de seqüências de reconhecimento da enzima. O padrão de bandas resultante pode ser visualizado em gel de agarose por eletroforese convencional ou em eletroforese de campo pulsado (*pulsed field*), dependendo do tamanho dos fragmentos gerados (Towner & Cockayne, 1993), ou ainda através de hibridização dos fragmentos do RFLP com sondas de DNA para visualização de *fingerprints*.

Com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Saiki *et al.*, 1985), vários métodos derivados desse princípio, com as vantagens de serem rápidos e necessitarem de pequena quantidade de material genético para análise, vêm sendo utilizados na classificação e identificação de microrganismos. O RFLP baseado em PCR consiste na amplificação de seqüências gênicas alvo utilizando *primers* específicos e posterior restrição enzimática dos produtos amplificados, produzindo RFLPs a serem analisados por eletroforese. Vários

genes podem ser avaliados através desta metodologia, constituindo-se em seqüências altamente conservadas, como o operon ribossômico, que inclui o rDNA16S, 23S ou regiões espaçadoras (Lane, 1991), o que consiste na ribotipagem baseada em PCR. No presente estudo, esta metodologia foi aplicada na caracterização de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão.

Análises de DNA polimórfico amplificado ao acaso (*RAPD*) é outro método para a tipagem genômica de organismos, sem a necessidade de *primers* específicos. O técnica consiste na utilização de um único *primer*, escolhido arbitrariamente, com amplificação em condições de baixa estringência, possibilitando o anelamento do *primer* a várias porções do genoma. As seqüências alvo espaçadas no genoma e em fitas opostas serão amplificadas por PCR (Welsh & McClelland, 1990). O emprego desta metodologia na tipagem de isolados tem sido útil na detecção de variabilidade em nível infra-específico em diversos grupos de bactérias, incluindo *Xanthomonas* spp. (Permaul, 1996, Pooler *et al.*, 1996, Ferreira *et al.*, 1996).

Uma das técnicas de tipagem por PCR mais amplamente utilizada atualmente é o chamado rep-PCR, baseado em famílias de elementos repetitivos presentes em genomas bacterianos (Lupski *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1991). Essas seqüências contêm motivos altamente conservados, consistindo principalmente das seqüências REP (*repetitive extragenic palindromic elements*; Stern *et al.*, 1984), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*; Hulton *et al.*, 1991) e BOX (Martin *et al.*, 1992). A identificação de seqüências consenso nesses elementos permitiu o desenho de *primers* específicos para as seqüências REP e ERIC por Versalovic *et al.* (1991). Esses autores demonstraram que seqüências homólogas a REP e ERIC estão presentes em gêneros bastante diversos de bactérias, especialmente gram-negativas, e que os produtos de REP e ERIC-PCR geram padrões bastante característicos, constituindo num método potencial para *fingerprinting* de genomas bacterianos.

Posteriormente, de Bruijn (1992) demonstrou a aplicação de perfis de REP e ERIC-PCR no estudo de bactérias isoladas de solo, incluindo os gêneros

Rhizobium, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium* e membros do gênero *Pseudomonas*, confirmando os dados de Versalovic *et al.* (1991) quanto à aplicação desse método em análises moleculares e taxonômicas de bactérias. De Bruijn demonstrou que até mesmo linhagens de *Rhizobium* altamente relacionadas puderam ser diferenciadas com base nesse tipo de análise.

Louws *et al.* (1994) descreveram a utilização de *primers* de elementos REP, ERIC e BOX-PCR em análises de linhagens de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, comprovando mais uma vez a aplicação desse método a diversos grupos de bactéria em estudos taxonômicos. Esta técnica vem sendo bastante aplicada em estudos taxonômicos do gênero *Xanthomonas* (Louws *et al.*, 1995; Pooler *et al.*, 1996; Bouzar *et al.*, 1999).

1.2. Sistemática de *Xanthomonas* Dowson 1939

O gênero *Xanthomonas* tem sido objeto de vários estudos taxonômicos e determinativos, pois compreende bactérias fitopatogênicas que ocorrem no mundo todo e causam doenças em diversas plantas economicamente importantes (Bradbury, 1984; Leyns *et al.*, 1984). *Xanthomonas* causam doenças em pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas, incluindo espécies de valor comercial, como arroz, feijão, mandioca, algodão, tomate, trigo, crucíferas e cítricos, através de lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecidos (raízes) e hiperplasias, como o cancro cítrico (Leyns *et al.*, 1984; van den Mooter & Swings, 1990). Além disso, *Xanthomonas* também são produtoras do exopolissacarídeo goma xantana, de grande aplicação industrial (Paul *et al.*, 1986).

Dados relativamente recentes de análises de seqüências de rDNA 16S confirmaram que espécies do gênero *Xanthomonas* agrupam na subdivisão gama de *Proteobacteria* (Hauben *et al.*, 1997). As bactérias deste gênero estão alocadas no “grupo *Xanthomonas*”, ainda sem família definida (NCBI, 1999, URL: <http://ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>). São bactérias Gram-negativas, apresentam-se em forma de bastonetes, possuem flagelo polar, são móveis, estritamente aeróbias e, na sua maioria, de crescimento lento. *Xanthomonas* são encontradas

em associação com plantas ou material vegetal (Leyns *et al.*, 1984; Agrios, 1989) e não crescem em pH 4,5 ou em temperaturas de 4°C ou 37°C (Vauterin *et al.*, 1995). Apresentam em sua maioria colônias de coloração amarelada devido à presença do pigmento xantomadina. Esse pigmento é uma característica taxonômica importante devido a sua ocorrência única no gênero (Starr & Stephens, 1964), tendo sido observado inicialmente por Starr (1944). O conteúdo de guanina+citosina (G+C) no DNA genômico de membros deste gênero pode variar de 63,2 a 69,7 mol% (Vauterin *et al.*, 1993).

A primeira descrição de uma bactéria que atualmente seria incluída no gênero *Xanthomonas* foi feita por Wakker (1883), quando classificou o agente da doença amarela do jacinto, utilizando a denominação genérica de *Bacterium hyacinthi*.

Posteriormente, bactérias fitopatogênicas foram agrupadas por Winslow *et al.* (1917) em uma única tribo, com dois gêneros, *Erwinia* e *Phytomonas*, sendo aceito e utilizado na publicação do Manual de Bergey (1923-1948). O gênero *Phytomonas* agrupava basicamente todas as bactérias fitopatogênicas, até que, por volta dos anos 30, Burkholder propôs o desdobramento do gênero em diversos grupos, devido à heterogeneidade das espécies. Dowson (1939) propôs a criação de novos gêneros, incluindo o gênero *Xanthomonas* Dowson 1939.

Inicialmente, o gênero *Xanthomonas* Dowson (1939) apresentava 19 espécies. Burkholder e Starr (1948) levantaram a questão da impossibilidade de se diferenciar espécies deste gênero apenas por características bioquímicas e fisiológicas, considerando também a especificidade aos seus hospedeiros. Adotou-se, na época, o critério "hospedeiro novo - espécie nova", isto é, a identificação de um patógeno em um novo hospedeiro levava à sua descrição como uma nova espécie. Com isso, a prática em fitobacteriologia passou a ser a de se nomear patógenos sem estudos mais profundos sobre a taxonomia dos microrganismos (Robbs & Rodrigues Neto, 1993).

No Manual Determinativo de Bergey, Burkholder (1957) listou 60 espécies dentro do gênero *Xanthomonas*. Dye (1962) realizou um estudo fenotípico

comparativo com linhagens depositadas em coleções de culturas, utilizando caracteres morfológicos, tintoriais, culturais, bioquímicos e fisiológicos de 57 espécies reconhecidas de *Xanthomonas* e concluiu que a maioria das espécies não poderiam ser diferenciadas de *Xanthomonas campestris*.

Lelliott (1972) apontou que os resultados de similaridade fenotípica e hibridização DNA:DNA não permitiam a diferenciação das espécies representantes de grupos típicos de *Xanthomonas* fitopatogênicas entre si. Posteriormente, Dye e Lelliott (1974), na 8ª Ed. do Manual de Bergey, revisaram a classificação de 5 espécies: *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, *X. ampelina* (Panagopoulos), *X. axonopodis* Starr e Garcés 1950, *X. campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 e *X. fragariae* Kennedy e Krig. Foi sugerido que as demais espécies deveriam ser agrupadas em nível infra-específico, diferindo de *X. campestris* apenas em relação à sua patogenicidade a hospedeiros específicos, sendo então cunhado o termo patovar (Young *et al.*, 1978a, 1978b; Dye *et al.*, 1980; para revisão, consultar Robbs & Rodrigues Neto, 1993).

Ridé e Ridé (1978) adicionaram *Xanthomonas populi* ao gênero, anteriormente descrita como *Aplanobacterium populi*, baseando-se em dados fenotípicos e serológicos. Resultados de hibridização DNA:rRNA e determinação da composição de bases do DNA sustentaram esta nova classificação (de Vos & De Ley, 1983) e a descrição oficial da espécie, com o estabelecimento de uma linhagem tipo, foi realizada por Ridé e Ridé (1992).

Xanthomonas ampelina foi posteriormente excluída do gênero (de Vos & De Ley, 1983; Starr *et al.*, 1977; Murata & Starr, 1973), sendo transferida por Willems *et al.* (1987) para *Xylophilus ampelinus*.

Em 1983, De Vos e De Ley introduziram a aplicação de técnicas moleculares no estudo das relações filogenéticas em *Xanthomonas*. O uso de sondas de rRNA 23S de *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp. em experimentos de hibridização DNA:rRNA demonstrou ser possível a diferenciação de organismos do gênero *Xanthomonas* baseado nos resultados de homologia derivados desta técnica.

Swings *et al.* (1983) reclassificaram *Pseudomonas maltophilia* como *Xanthomonas maltophilia*. Posteriormente, van Zyl e Steyn (1990) demonstraram diferenças significativas entre os organismos desta espécie e *Xanthomonas* spp. quanto ao perfil de proteínas e taxonomia numérica. Van Zyl e Steyn (1992) levantaram a necessidade da criação de um novo gênero para *X. maltophilia*, formalizada por Palleroni e Bradbury (1993), com a criação do gênero *Stenotrophomonas* e realocação de *S. maltophilia*. Filogeneticamente, organismos do gênero *Stenotrophomonas* são relacionados a *Xanthomonas* spp. e *Xyllela* spp (Maidak *et al.*, 1999).

1.2.1. *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939

Xanthomonas campestris representava a espécie com taxonomia mais complexa no gênero, sendo subdividida em mais de 143 patovares (Vauterin *et al.*, 1990; Bradbury, 1984).

A partir do final dos anos 80 e início dos anos 90, a utilização de métodos quimiotaxonômicos e moleculares, aliada a uma abordagem de taxonomia polifásica, evidenciou a complexidade taxonômica dos diferentes patovares de *Xanthomonas campestris*.

A diferenciação de patovares de *Xanthomonas campestris* foi demonstrada através de métodos serológicos (Benedict *et al.*, 1990; Berthier-Bayle *et al.*, 1990), análise fenotípica e padrões eletroforéticos de proteínas celulares (Quobela *et al.*, 1991; Vauterin *et al.*, 1990a; 1991a; 1991b; 1992; van Zyl & Steyn, 1990), poliaminas (Auling *et al.*, 1991), perfis de ácidos graxos (Chase *et al.*, 1992; Graham *et al.*, 1990; Stead, 1989; Yang *et al.*, 1993b; Vauterin *et al.*, 1992; 1996) e proteínas de membrana (Ojanen *et al.*, 1993).

Lazo *et al.* (1987) utilizaram a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para diferenciar patovares de *Xanthomonas campestris*. Os autores analisaram o grau de variação genética entre 93 linhagens de *X. campestris*, compreendendo 26 patovares, demonstrando a utilidade desse método na diferenciação entre patovares e na identificação de linhagens de *Xanthomonas* desconhecidas.

Hartung e Civerolo (1987) analisaram linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isoladas em sete países e na Flórida através de análises de restrição do DNA genômico. Os autores compararam o perfil eletroforético dos fragmentos de DNA gerados com a restrição, verificando que linhagens do grupo A, ou Asiático, e linhagens do grupo B podem ser claramente distintas através desta técnica. As linhagens isoladas na Flórida (denominadas grupo "E") apresentaram grande variedade de polimorfismos genômicos, levando os autores a sugerirem a existência de uma população de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* "E" associada ao cancro cítrico na Flórida.

Em 1989, esses mesmos autores, através de dados obtidos com a técnica de RFLP combinada à utilização de sondas de DNA, o que gera padrões de bandas menos complexos e por vezes mais informativos do que a comparação eletroforética direta dos fragmentos de DNA, concluíram que as linhagens pertencentes ao grupo "E" estudadas em 1987 formam um grupo complexo, com características distintas de todos os outros grupos conhecidos de *X. campestris* pv. *citri*. Assim, com base nesses dados e em diferenças observadas quanto às interações patógeno-hospedeiro, sintomatologia e epidemiologia, além de características serológicas e fagotipagem, os autores sugeriram que a doença ligada às linhagens do grupo "E" não pertenciam ao grupo *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Os autores sugeriram ainda que a doença causada por essas linhagens não era o cancro cítrico bacteriano e propuseram o termo mancha bacteriana de citrus para a doença.

É importante ressaltar que discrepâncias em resultados de classificações derivadas de análises de RFLP podem estar relacionadas à utilização de diferentes enzimas de restrição, sondas e diferentes combinações das mesmas (Vauterin *et al.*, 1993).

Paralelamente, Gabriel *et al.* (1989), através da análise de variação do padrão de RFLP entre linhagens do grupo E, patogenicidade e dados de caracterização de trabalhos anteriores, propuseram uma nova classificação para as linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Foi proposto que o grupo A de

Xanthomonas campestris pv. *citri* fosse restabelecido para a espécie *Xanthomonas citri* (ex Hasse) e linhagens dos grupos B, C e D classificadas como *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* pv. nov. Linhagens do grupo E seriam designadas como *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* pv. nov. Contudo, a proposta de reclassificação de *X. campestris* pv. *citri* apresentada foi refutada por outros pesquisadores (Vauterin *et al.*, 1991a; Young *et al.*, 1991) e não foi validada pelo Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática.

Em 1990, van Zyl e Steyn demonstraram, através de perfil de proteínas totais e taxonomia numérica de linhagens de *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, que proteínas totais constituem importante recurso na diferenciação de patovares desses gêneros, sugerindo a exclusão de *X. maltophilia* do gênero *Xanthomonas*.

Vauterin *et al.* (1990b) analisaram linhagens de *X. campestris* pv. *begoniae* e *X. campestris* pv. *pelargonii* quanto à patogenicidade, perfil de proteínas, características fenotípicas e homologia DNA:DNA, concluindo que esses dois patovares compreendem grupos distintos de microrganismos, comparados a cinco outros patovares estudados. Os autores sugeriram que esses patovares poderiam constituir novas espécies de *Xanthomonas*.

Através da revisão de dados disponíveis em literatura (perfil eletroforético de proteínas, perfil de ácidos graxos e análise de restrição de DNA), Vauterin *et al.* (1990a) verificaram que patovares alocados na espécie *X. campestris* são heterogêneos e que seria necessário examinar um número maior de linhagens para uma conclusão taxonômica válida nestes grupos. Análises de homologia DNA:DNA foram realizadas, agrupando as linhagens dos patovares de *X. campestris* em pelo menos seis grupos genômicos. Os autores sugeriram, considerando a compilação de dados, que uma revisão taxonômica do gênero seria necessária dentro de uma abordagem polifásica, sendo que as análises deveriam se estender à uma coleção representativa de linhagens, com a inclusão de grande número de amostras, linhagens-tipo e de referência, englobando todos os patovares de *X. campestris* e todas as espécies de *Xanthomonas* descritas.

van den Mooter e Swings (1990), em um extenso estudo de taxonomia numérica, analisaram 295 características fenotípicas de 266 linhagens do gênero *Xanthomonas*, obtidas de diferentes regiões geográficas. Os autores concluíram que o gênero era constituído de pelo menos oito taxoespécies: *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. campestris* pv. *graminis*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populi*. Esse estudo empregou alguns dos parâmetros definidos como padrão na caracterização e taxonomia do gênero *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1990a).

Young *et al.* (1991) reforçaram a necessidade de uma abordagem polifásica na taxonomia de *Xanthomonas*, criticando o trabalho prévio de Gabriel *et al.* (1989), em que os autores propuseram a mudança dos patovares *X. campestris* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *phaseoli* para o status de espécie, com base em dados de RFLP. Young *et al.*, assim como Vauterin *et al.* (1990b), apontaram que essa proposição era inadequada por ser baseada em um único conjunto de dados, com poucos resultados de caracterização bioquímica.

Posteriormente, Vauterin *et al.* (1991a), analisando 61 linhagens dos grupos A, B, C, D e E de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* de diversas regiões geográficas quanto ao perfil eletroforético de proteínas, perfil de ácidos graxos e homologia DNA:DNA, confirmaram que a reclassificação proposta por Gabriel *et al.* (1989) não se sustentava. Os resultados demonstraram que todos os grupos de patogenicidade estavam relacionados entre si com homologia DNA:DNA > 60% e que todos pertenciam à uma mesma espécie genômica.

Vauterin *et al.* (1991b) analisaram 307 linhagens, compreendendo 27 patovares de *X. campestris* e representantes de outras espécies, através de análise numérica baseada em perfis de proteínas totais. Os autores verificaram a existência de tipos eletroforéticos distintos em *X. campestris*, delineando 19 grupos, sendo que alguns grupos apresentaram padrões distintos para linhagens de um mesmo patovar, como *X. campestris* pv. *vesicatoria* e pv. *dieffenbachiae*. Este trabalho tornou disponível uma extensa base de dados de perfis de proteínas para patovares de *X. campestris*.

Qhobela *et al.* (1991) também descreveram a separação de patovares através de perfis eletroforéticos de proteínas totais e RFLP. Os autores diferenciaram linhagens de *X. campestris* pv. *holcicola* de outros 22 patovares de *X. campestris* testados. Os resultados de análises de RFLP mostraram-se mais sensíveis na detecção de variação entre as linhagens de *X. campestris* pv. *holcicola* testadas.

Em 1991, Auling *et al.* reportaram o uso de poliaminas como marcadores taxonômicos para o gênero *Xanthomonas*, identificando espermidina como o principal componente dos padrões de poliamina das espécies de *Xanthomonas*. Os resultados permitiram ainda a clara distinção entre linhagens de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* com base nesse tipo de análise. Posteriormente, Yang *et al.* (1993a) demonstraram que a espécie *X. maltophilia* apresenta quantidades significativas de cadaverina, além de espermidina, diferindo de todas as demais espécies de *Xanthomonas*, o que confirma a validade desse marcador taxonômico para o gênero *Xanthomonas*. A espécie *X. maltophilia* foi transferida posteriormente para o gênero *Stenotrophomonas* (Palleroni & Bradbury, 1993).

Novamente, através de análises de perfis de proteínas, ácidos graxos e homologia DNA:DNA, Vauterin *et al.* (1992) demonstraram a heterogeneidade entre as linhagens da espécie *X. axonopodis* e do patovar *X. campestris* pv. *vasculorum*. Os resultados demonstraram que alguns patovares necessitavam de reclassificação, como *X. campestris* pv. *translucens*. Os autores propuseram um esboço de um novo esquema de classificação para o gênero, incluindo seis novas espécies, de acordo com dados de homologia DNA:DNA.

Estudos mais abrangentes do perfil de ácidos graxos (Yang *et al.*, 1993b), com a inclusão de 975 linhagens representando as espécies válidas de *Xanthomonas*, revelaram 31 *clusters* principais dentro do gênero, sendo a espécie *X. campestris* a mais heterogênea, com 24 *clusters*. Três ácidos graxos foram definidos como marcadores para o gênero *Xanthomonas*: iso-11:0, iso-11:0-3OH e iso-13:0-3OH.

O perfil de utilização de fontes de carbono, através de *kits* e sistemas automatizados, foi estudado por Verniere e colaboradores (1993) para *X. campestris* pv. *citri*. Os autores analisaram o sistema Biolog (com 96 substratos) e concluíram que a identificação correta das linhagens estudadas ocorria com maior frequência quando eram fornecidos dados adicionais sobre perfis metabólicos de linhagens de *X. campestris* pv. *citri* ao banco de dados utilizado pelo sistema para identificação. Os resultados foram úteis na confirmação dos subgrupos A, B, C e D de *X. campestris* pv. *citri*, além de detectar três fontes de carbono como marcadores na diferenciação dos mesmos.

Posteriormente, Verniere *et al.* (1998) descreveram um grupo de linhagens de *X. axonopodis* pv. *citri* (ex *X. campestris* pv. *citri*) isolados de árvores de limão em vários países no Sudeste da Ásia. A análise fenotípica preliminar dessas linhagens revelou características típicas de *X. axonopodis* pv. *citri* grupo A, o que foi confirmado por dados de RFLP. Entretanto, análises metabólicas das linhagens com o *kit* Biolog revelaram algumas diferenças com relação ao grupo A e as linhagens não mostraram afinidade com anti-soros policlonais específicos para *X. axonopodis* pv. *citri* A, ou com um anticorpo monoclonal específico para esse grupo. Os autores acreditam que essas linhagens representam um sub-grupo de *X. axonopodis* pv. *citri* grupo A, com patogenicidade limitada a plantas de limão, revelando uma diversidade ainda maior para estes organismos.

Berthier *et al.* (1993) caracterizaram linhagens de *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp. através de padrões de restrição e hibridização com sonda de rRNA 16+23S. Foram analisadas 187 linhagens diferentes de *Xanthomonas*, as quais foram diferenciadas em nível de gênero, espécie e patovar. A variabilidade dos padrões de restrição do rDNA em nível infra-específico foi determinada para 4 patovares de *Xanthomonas campestris*, sendo que o patovar *begoniae* apresentou somente um padrão para as 16 linhagens testadas, o patovar *manihotis* apresentou variação entre linhagens provenientes da África e América do Sul, sendo detectada maior variabilidade entre as últimas, e o patovar *malvacearum* não apresentou variação relacionada à origem geográfica das linhagens ou planta

hospedeira. Linhagens do patovar *dieffenbachiae* apresentaram o maior grau de variabilidade, apresentando 5 padrões distintos entre 53 linhagens analisadas.

Hartung *et al.* (1993) reportaram a detecção específica de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A partir de uma sequência de 572 pares de bases de um plasmídeo de *X. campestris* pv. *citri*, os autores desenharam *primers* para amplificação específica por PCR. Sete pares de *primers* foram testados com DNA de *X. campestris* pv. *citri* e outras linhagens de *X. campestris* associadas à doença da mancha bacteriana em citros. Quatro pares de *primers* amplificaram apenas DNA alvo de *X. campestris* pv. *citri*, confirmados através de análises de *Southern blot*. Produtos de PCR foram amplificados de DNA extraído de lesões com 7 meses, das quais não foi possível se isolar bactérias viáveis, superando nesse aspecto qualquer método de identificação utilizado previamente.

Em 1994(a), Leite *et al.* reportaram a utilização de *primers* baseados em regiões do *cluster* de genes *hrp* de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Utilizando três pares de *primers* e análises de hibridização tendo como sonda os fragmentos amplificados, os autores demonstraram que esses *primers* são úteis na detecção de bactérias do gênero *Xanthomonas*. Além disso, foi possível a diferenciação entre *Xanthomonas* patogênicas e não-patogênicas.

Leite *et al.* (1994b), através de análises de PCR-RFLP de genes do *cluster* *hrp* de patovares de *X. campestris* patogênicos para citrus, demonstraram que é possível diferenciar linhagens de diferentes grupos de *X. campestris* pv. *citri* através desse método. O perfil de restrição de fragmentos do gene *hrp* de linhagens pertencentes ao grupo A de *X. campestris* pv. *citri* permitiram a diferenciação entre as linhagens desse grupo e as linhagens dos grupos B e C, que mostraram perfis idênticos entre si. Além disso, os autores distinguiram linhagens de *X. campestris* pv. *citrumelo* em dois grupos de acordo com o perfil de restrição do gene *hrp*, um deles correspondendo às linhagens altamente agressivas e o outro incluindo as linhagens moderadamente ou fracamente

agressivas. Os autores propuseram, dessa forma, um método rápido e consistente para a identificação de linhagens de *Xanthomonas* patogênicas para citrus.

A definição de sondas e *primers* específicos para *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* foram descritos por Manulis *et al.* (1994). Os autores detectaram três *primers* capazes de diferenciar linhagens de *X. campestris* pv. *pelargonii* de linhagens de outros grupos de *Xanthomonas* em experimentos de RAPD. Um fragmento de cerca de 1.2 Kb, característico do perfil de RAPD de *X. campestris* pv. *pelargonii*, foi clonado e utilizado como sonda, hibridizando especificamente com linhagens deste patovar. O fragmento foi sequenciado e *primers* desenhados a partir da seqüência foram capazes de diferenciar 53 linhagens de *X. campestris* pv. *pelargonii* de outras 46 linhagens de *Xanthomonas* testadas, incluindo linhagens saprófitas isoladas de gerânio.

A combinação de dados moleculares com outros métodos de tipagem e análise taxonômica também tem sido freqüentemente reportado. Alvarez *et al.* (1994) descreveram a utilização de anticorpos monoclonais, em associação com dados de fitopatogenicidade e RFLP, na identificação de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *armoraciae*, dentre as *Xanthomonas* patogênicas para crucíferas.

A aplicação de anticorpos monoclonais foi também empregada por Jones *et al.* (1997). Os autores demonstraram que, utilizando-se um anticorpo específico para o lipopolissacarídeo (LPS) de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, combinado à utilização de lisozima no tampão de extração para liberação de maiores quantidades de LPS, foi possível desenvolver um ensaio de ELISA mais sensível para a detecção direta do patógeno em tecido foliar.

Outra possibilidade de diagnóstico molecular de grupos de *Xanthomonas* foi descrita por Honeycutt *et al.* (1995). Com base na variação encontrada no tamanho de seqüências da região espaçadora do *operon* ribossômico (McClelland *et al.*, 1992; Welsh & McClelland, 1992), os autores desenharam *primers* específicos para anti-códons de diferentes tipos de tRNA, na tentativa de detectar polimorfismos de tamanho entre diferentes grupos de *Xanthomonas*. Utilizando

diferentes combinações de *primers*, foi detectada variação no tamanho de regiões espaçadoras de *X. campestris* e *X. albilineans* com um dos pares de *primers* utilizados entre os tRNA-alanina e tRNA-isoleucina. Os fragmentos foram sequenciados e após análises de alinhamento, novos *primers* foram desenhados, sendo encontrados dois pares de *primers* que detectaram *X. albilineans*, gerando um fragmento específico de 70 bp, constituindo um potencial recurso diagnóstico para bactérias desse grupo. Os autores sugeriram, ainda, com base na variação encontrada entre patovares de *X. campestris*, que este grupo poderia constituir mais de uma espécie (Honeycut *et al.*, 1995), o que foi posteriormente confirmado por Vauterin *et al.* (1995).

Em 1995, após diversos trabalhos indicando a necessidade de uma revisão taxonômica do gênero *Xanthomonas*, uma ampla reclassificação foi proposta por Vauterin *et al.* (1995). Com base em estudos de hibridização DNA:DNA e utilização de fontes de carbono (BIOLOG), os autores propuseram a divisão do gênero em 20 grupos, que passaram a ser considerados espécies genômicas de acordo com o conceito definido em Wayne *et al.* (1987), sendo *Xanthomonas campestris* designada como espécie-tipo do gênero.

Segundo a nova classificação do gênero (Vauterin *et al.*, 1995), *X. campestris* passou a incluir apenas os patovares de crucíferas, ou seja, *X. campestris* pv. *aberrans*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *barbareae*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *incanae*, *X. campestris* pv. *raphani*. Dentre os demais patovares previamente pertencentes à *X. campestris*, 34 foram alocados como patovares de *X. axonopodis* Starr e Garces 1950. Foram também descritas 15 espécies novas a partir de outros patovares de *X. campestris*: *Xanthomonas arboricola* sp. nov., incluindo *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *poinsetticola*, *X. arboricola* pv. *populi* e *X. arboricola* pv. *pruni*; *Xanthomonas bromi* sp. nov., para linhagens isoladas de capim-cevadinha, *Xanthomonas cassavae* (ex Wiehe & Dowson 1953) sp. nov., nom. rev.; *Xanthomonas codiae* sp. nov.; *Xanthomonas cucurbitae* (ex Bryan 1926) sp. nov., nom. rev.; *Xanthomonas hortorum* sp. nov., incluindo *X. hortorum* pv. *hederae*, *X. hortorum*

pv. *pelargonii* e *X. hortorum* pv. *vitians*; *Xanthomonas hyacinthi* (ex Wakker 1883) sp. nov., nom. rev.; *Xanthomonas melonis* sp. nov.; *Xanthomonas pisi* (ex Goto & Okabe 1958) sp. nov., nom. rev.; *Xanthomonas sacchari* sp. nov.; *Xanthomonas theicola* sp. nov.; *Xanthomonas translucens* (ex Jones, Johnson & Reddy 1917) sp. nov., nom. rev.; *Xanthomonas vasicola* sp. nov. e *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) sp. nov., nom. rev.

Foi também criado o grupo *Xanthomonas* sp. (Vauterin *et al.*, 1995), compreendendo 66 antigos patovares de *X. campestris* que não foram alocados em nenhuma das espécies descrita. Cinco grupos correspondentes à espécies anteriormente descritas não sofreram alteração: *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. fragariae*, *X. oryzae* e *X. populi*.

Vauterin *et al.* (1996) confirmaram a utilidade da comparação entre perfis de ácidos graxos na diferenciação da maioria das espécies de *Xanthomonas* spp. re-classificadas na revisão taxonômica do gênero (Vauterin *et al.*, 1995). O estudo englobou uma reavaliação dos dados do extenso trabalho de Yang *et al.* (1993), que estabeleceu um banco de dados para mais de 1.200 linhagens de *Xanthomonas*, destacando que algumas espécies, principalmente *X. axonopodis* e *X. translucens*, não mostraram perfis característicos de ácidos graxos, o mesmo acontecendo, apesar de não tão acentuadamente, com as espécies *X. arboricola*, *X. campestris* e *X. hortorum*. Todas essas espécies apresentaram certo grau de heterogeneidade, incluindo diversos patovares.

Recentemente, Stead (1999), reportou que, em análises extensivas de milhares de linhagens de *Xanthomonas* quanto ao perfil de ácidos graxos, freqüentemente não se confirma a re-classificação proposta por Vauterin *et al.* (1995) para todas as espécies genômicas de *Xanthomonas*.

A partir de 1995, pode ser notado um aumento significativo na aplicação da técnica de PCR, especialmente RAPD e rep-PCR, na caracterização de linhagens de *Xanthomonas* (Pooler *et al.*, 1996, Louws *et al.*, 1995, Louws *et al.*, 1997).

A variabilidade genética de linhagens de *X. fragariae* oriundas de diversas regiões geográficas foi estudada por Pooler *et al.* (1996), através de diferentes

métodos de tipagem por PCR, incluindo RAPD, REP- e ERIC-PCR. Os autores identificaram seqüências, a partir de RAPD, e desenharam 3 pares de *primers* específicos, que utilizados conjuntamente, permitem a identificação de *X. fragariae*. Foram identificados alguns subgrupos genômicos de acordo com cada marcador utilizado, sendo que as linhagens mostraram-se bastante relacionadas umas às outras.

Roberts *et al.* (1998) também estudaram a variabilidade de linhagens de *X. fragariae* empregando técnicas moleculares, como RFLP, eletroforese de campo pulsado (PFGE) e homologia DNA: DNA, além de perfis de ácidos graxos. Estes autores concluíram que, apesar da variabilidade encontrada entre as linhagens, estas representam uma única espécie segundo dados de homologia DNA:DNA.

Permaul *et al.* (1996) reportaram que marcadores de RAPD podem ser utilizados na diferenciação de *X. albilineans* de diferentes regiões geográficas. Os autores citam a importância destes dados para o monitoramento da dispersão de linhagens. Deve ser destacado, entretanto, que os autores basearam suas conclusões no estudo de apenas 5 linhagens, o que é um número bastante limitado para este tipo de estudo.

Outra aplicação do método de PCR, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, Vos *et al.*, 1995) tem sido utilizada no estudo de *Xanthomonas*. Janssen *et al.* (1996), analisando 36 linhagens de *Xanthomonas*, especialmente da espécie *X. axonopodis*, demonstraram que o agrupamento de linhagens através dessa técnica sustenta esquemas de classificação propostos segundo dados quimiotaxonômicos, fenotípicos e de homologia DNA:DNA. Esta metodologia apresentou, em alguns casos, maior sensibilidade na diferenciação de subgrupos e patovares que as técnicas quimiotaxonômicas e fenotípicas citadas anteriormente.

A metodologia de AFLP também foi utilizada com sucesso por Restrepo *et al.* (1999), confirmando resultados previamente relatados por Verdier *et al.* (1998). No primeiro trabalho, Verdier *et al.* (1998) demonstraram a ocorrência de alta

variabilidade entre 91 isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* isolados na Venezuela, através de análises de RFLP e padrão de virulência, agrupando as linhagens em oito *clusters*, sem correlação com origem geográfica. Posteriormente, Restrepo *et al.* (1999) demonstraram que os dados de AFLP confirmaram estes resultados, sendo que algumas combinações de *primers* do AFLP foram mais sensíveis na detecção de variabilidade entre as linhagens analisadas.

O refinamento das técnicas moleculares tem permitido a caracterização de variabilidade em nível infra-específico para diferentes espécies de *Xanthomonas*. Toth *et al.* (1998), a partir de análises de RAPD, desenharam *primers* específicos para detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* em plantas. Os *primers* não amplificam DNA de *X. campestris* pv. *phaseoli*, permitindo a diferenciação em nível infra-patovar.

Yashitola *et al.* (1997) estudaram a diversidade genética de *X. oryzae* pv. *oryzae* através de hibridização com sondas específicas. Os autores utilizaram duas seqüências isoladas do genoma de *X. oryzae*, o gene de avirulência *avrXa10* e o transposon *IS1112*, como sondas na análise de 67 linhagens dessa espécie, oriundas de diferentes regiões da Índia. Foi demonstrada a ocorrência de um genótipo predominante desse patógeno na maioria das regiões. Os dados combinados das análises de RFLP com as diferentes sondas permitiram a identificação de três grupos principais destes patógenos nas regiões analisadas.

A variabilidade entre 127 linhagens do patovar *mangiferaeindicae* de *Xanthomonas* foi analisada através de marcadores de RFLP e hibridização. Foram utilizadas três sondas, um *cluster* de genes *hrp* e um gene de *avr* de *X. oryzae* e um fragmento de DNA repetitivo do patovar *mangiferaeindicae*. A sonda de *hrp* separou 11 linhagens das demais, sugerindo que estas podem não ser representantes do patovar *mangiferaeindicae*. Análises com as outras sondas permitiram a definição de 4 grupos, sendo que a maior variabilidade foi detectada entre linhagens originárias do Sudeste asiático (Gagnevin *et al.*, 1997).

Várias das relações propostas por Vauterin *et al.* (1995) vêm sendo confirmadas por outros autores com base em análises taxonômicas complementares, incluindo dados moleculares, fenotípicos e quimiotaxonômicos. Revisões taxonômicas mais completas para cada grupo de espécies descritas por Vauterin *et al.* (1995) têm sido relatadas regularmente na literatura. Um dos grupos mais controversos dentre os propostos por estes autores é representado por *X. axonopodis*, incluindo vários ex-patovares de *X. campestris*. A taxonomia destes organismos foi revisada recentemente e pelo menos 5 espécies foram propostas, com base em dados mais completos de homologia DNA:DNA (Lacy *et al.*, 1997) e rep-PCR (Louws *et al.*, 1997).

Outras revisões, como a transferência de *Pseudomonas cissicola* para o gênero *Xanthomonas* com base em dados fenotípicos e perfil de ácidos graxos, foram propostas recentemente (Hu *et al.*, 1997). Os autores sugeriram ainda que, com base em características únicas do perfil de ácidos graxos e testes bioquímicos, estes organismos deveriam ser alocados em uma nova espécie de *Xanthomonas*, embora análises mais extensivas, incluindo o estudo polifásico de linhagens adicionais, sejam necessárias antes da formalização de tal proposta.

Recentemente, Jones *et al.* (1998) e Bouzar *et al.* (1999) propuseram "*Xanthomonas gardneri*" como um dos agentes que infectam tomate e pimentão. Através da análise polifásica de linhagens atípicas do antigo grupo *X. campestris* pv. *vesicatoria*, incluindo dados de homologia DNA:DNA, os autores demonstraram a existência de uma terceira espécie que causa mancha bacteriana em tomate e pimentão. A classificação taxonômica deste terceiro grupo ainda está sendo avaliada, sendo que dados de homologia DNA:DNA de Hildebrand *et al.* (1990) e Palleroni *et al.* (1993) sugeriram que "*X. gardneri*" está relacionada a linhagens do grupo de *X. campestris* pv. *carotae*, pv. *pelargonii* e pv. *taraxaci*.

1.2.2. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

X. campestris pv. *vesicatoria* é o agente causador da mancha bacteriana em tomate e pimentão. Em interação compatível, após ter invadido a planta via estômatos ou lesões, a bactéria se multiplica nos espaços intercelulares do tecido

provocando lesões necróticas úmidas em folhas, caules, pedúnculos e frutos (Stall *et al.*, 1994). Esta bactéria causa grandes prejuízos econômicos devido ao baixo rendimento e qualidade dos frutos, sendo que os danos mais graves são apresentados em regiões de elevada umidade relativa, chuvosas e temperatura próxima de 24 °C (Alippi, 1992).

A mancha bacteriana de tomate e pimentão figura entre as principais bacterioses de plantas constatadas no Brasil (Romeiro, 1985). Dado o grande valor econômico da cultura de tomate, uma das espécies de hortaliças de maior consumo e uma das mais industrializadas no Brasil e no mundo, um método mais eficaz para o controle dessa bacteriose se faz necessário.

Estratégias de manejo integrado têm sido baseadas na utilização de sementes livres de patógenos, práticas fitossanitárias e de cultivo agrícola, como enterrio de restos de plantas e rotação de culturas (Jones *et al.*, 1991). O controle químico através de pulverização das plantas com agentes cúpricos e estreptomicina (Jones *et al.*, 1985; Thayer & Stall, 1961) tem levado à seleção de resistência aos dois agentes.

Reifschneider *et al.* (1985) propuseram a divisão de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) em três grupos, de acordo com a patogenicidade para tomate e/ou pimentão: XcvT, virulenta apenas para tomate, XcvP, virulenta apenas em pimentão e XcvPT, virulenta para ambos os hospedeiros. Atualmente, 9 raças de patógenos de pimentão e três raças de patógenos de tomate estão descritas na literatura, de acordo com perfil fenotípico dos organismos e padrão de patogenicidade ao hospedeiro (Bouzar *et al.*, 1999).

A diversidade genética entre linhagens do antigo grupo *X. campestris* pv. *vesicatoria* começou a ser evidenciada nos anos 90. Vauterin *et al.* (1990b), em análises de perfis de proteínas totais, demonstraram a heterogeneidade entre linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Dados de homologia DNA:DNA mostraram que esse patovar consiste de dois grupos substancialmente diferentes, sendo designados como subgrupos A e B.

Vauterin *et al.* (1991b), através de análises numéricas de perfis de SDS-PAGE de todas as espécies de *Xanthomonas* com descrição válida e vários patovares de *X. campestris*, confirmaram a existência de dois grupos distintos de linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Dois grupos definidos foram também evidenciados por esses autores na análise de dados de perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Em 1991, Beaulieu *et al.* apresentaram um estudo de centenas de linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, provenientes de várias regiões do mundo, quanto à produção de enzimas pectinolíticas. Os autores também demonstraram a ocorrência de dois grupos de linhagens, as produtoras de pectinases e as não-produtoras.

Posteriormente, Bouzar *et al.* (1994b) analisaram a atividade amilolítica e pectinolítica de várias linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e detectaram a presença de bandas de proteínas específicas através de coloração por prata de gel de SDS-PAGE demonstrando, através dessas características, a divisão das linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em dois grupos distintos: o grupo A e o grupo B. Foi determinado que linhagens do grupo A de *X. campestris* pv. *vesicatoria* são não-produtoras de amilase e pectinase e apresentam uma banda de proteína de 32 kDa (banda α), não possuindo a banda de 27 kDa (banda β), característica de linhagens do grupo B, produtoras de amilase e pectinase (Bouzar *et al.*, 1994b). Os autores realizaram também análises serológicas, determinação de perfil de ácidos graxos e utilização de fontes de carbono, demonstrando que as populações de linhagens, apesar de heterogêneas, podem ser distintas umas das outras com base em características únicas de cada grupo. O composto cisaconitato foi o único, entre 95 testados, capaz de discriminar entre linhagens dos diferentes grupos, sendo que apenas linhagens do grupo A oxidam esse composto. Além disso, os autores testaram a patogenicidade das linhagens em tomate e pimentão, mostrando que linhagens do grupo A patogênicas para tomate pertenciam à raça T1, enquanto linhagens do grupo B, à raça T2. Os patógenos de pimentão foram sempre associados ao grupo A, exceto por algumas linhagens patogênicas para os dois hospedeiros, pertencentes ao grupo B. Os autores

também analisaram nesse trabalho a linhagem tipo de *Pseudomonas gardneri*, demonstrando semelhanças entre esta e organismos do grupo B de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em características serológicas, utilização de fontes de carbono e presença da banda beta em géis de SDS-PAGE, diferindo, entretanto, na atividade de enzimas extracelulares e perfil de ácidos graxos. Os autores concluíram que os dados apresentados corroboram a proposição de que *P. gardneri* é uma *Xanthomonas*.

Paralelamente, Stall *et al.* (1994) demonstraram a baixa homologia DNA:DNA (<46%) entre linhagens dos grupos A e B, comprovando as diferenças genômicas descritas em outros trabalhos e sugerindo que estes grupos de linhagens poderiam constituir espécies distintas. Estes dados foram corroborados por resultados de análises de utilização de fontes de carbono, serologia, perfil de ácidos graxos, RFLP por eletroforese de campo pulsado e bandas de proteínas específicas (Stall *et al.*, 1994).

Louws *et al.* (1994) também reportaram a ocorrência de pelo menos dois grupos distintos de *X. campestris* pv. *vesicatoria* através de análises de rep-PCR. Linhagens do grupo A apresentaram padrões de bandas muito similares quando analisadas com os *primers* de ERIC, REP ou BOX, o mesmo acontecendo entre linhagens do grupo B, porém os padrões entre A e B foram distintos, apresentando apenas uma banda do mesmo tamanho nos perfis de amplificação com ERIC-PCR.

Bouzar *et al.* (1994a) descreveram grupos adicionais de linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, as quais apresentavam características fenotípicas de linhagens do grupo A ou do grupo B, dependendo da característica analisada, revelando uma heterogeneidade ainda maior nesse grupo de patógenos (essas linhagens encontram-se referidas no presente trabalho como grupo *nonA/nonB*).

Louws *et al.* (1995), utilizando rep-PCR, detectaram quatro genótipos entre linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, confirmando claramente a divisão em dois grupos proposta previamente (Vauterin *et al.*, 1990a; Bouzar *et al.*, 1994a;1994b; Stall *et al.*, 1994). Os dados permitiram ainda a diferenciação de

dois genótipos adicionais dentre as linhagens analisadas, um dos quais incluía uma linhagem previamente descrita como atípica na literatura (Bouzar *et al.*, 1994a) e os organismos *outliers* correspondentes a linhagens atípicas isoladas por D. Cuppels em Ontário. Louws *et al.* (1995) detectaram maior diversidade entre linhagens do grupo B, diferenciando 6 grupos. Os dados obtidos pelos autores indicaram que uma nova avaliação taxonômica de linhagens do antigo grupo de *X. campestris* pv. *vesicatoria* seria necessária para elucidar as relações taxonômicas deste grupo de *Xanthomonas*.

Finalmente, Vauterin *et al.* (1995) propuseram que o patovar *X. campestris* pv. *vesicatoria* fosse dividido em duas espécies, com base em dados de homologia DNA:DNA e perfil de utilização de fontes de carbono. O antigo subgrupo A de *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi reclassificado como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e o antigo subgrupo B constitui atualmente a espécie *X. vesicatoria*.

Jones *et al.* (1993) realizaram um estudo de hibridização em linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (antigo grupo A de *X. campestris* pv. *vesicatoria*) e *X. vesicatoria* (antigo grupo B de *X. campestris* pv. *vesicatoria*) utilizando como sonda um fragmento de DNA genômico clonado de cerca de 0.65 Kb relacionado à expressão de determinantes antigênicos em *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Esse fragmento hibridizou fortemente com as linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e fracamente com linhagens de *X. vesicatoria*. Primers derivados desse fragmento foram utilizados em reações de PCR e resultaram na amplificação de fragmentos de DNA de 12 linhagens do grupo A e apenas 1 das linhagens do grupo B. O produtos de PCR foram analisados por RFLP, gerando perfis de bandas que diferenciaram claramente os dois grupos (Jones *et al.*, 1998).

Ferreira *et al.* (1997) demonstraram a diferenciação de linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* através de ribotipagem, com a utilização de uma sonda baseada no operon de rDNA de *Escherichia coli*. Os autores também utilizaram a técnica de RAPD, confirmando a classificação dos isolados em dois grupos principais. Essa técnica mostrou-se mais sensível na detecção de variabilidade infra-específica. Testes de atividade de enzimas

extracelulares realizados por esse autores corroboraram os agrupamentos obtidos por ribotipagem e RAPD. As linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) mostraram-se negativas quanto à atividade de amilase, fosfatase e pectinase, enquanto representantes de *X. vesicatoria* (grupo B) apresentaram atividade para estas enzimas.

Kuflu e Cuppels (1997), através de técnica de hibridização subtrativa entre linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas e epífitas, detectaram um fragmento de 1.75 Kb que hibridizou preferencialmente com linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*. Esse fragmento foi clonado e utilizado posteriormente como sonda específica, sendo capaz de detectar 46 dentre 52 linhagens de *vesicatoria* testadas, sendo que duas linhagens que não reagiram com a sonda tinham sido consideradas atípicas (*outliers*) em estudos anteriores de rep-PCR (Louws *et al.*, 1995). Os autores também analisaram 110 linhagens, incluindo 44 *Xanthomonas* não-patogênicas para tomate e 43 linhagens epífitas, sendo que apenas 8 hibridizaram fracamente com a sonda. Essa sonda pode constituir, portanto, um método preliminar para diferenciação de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* de outras *Xanthomonas*, embora não diferencie entre as duas espécies.

Mais recentemente, Jones *et al.* (1998) publicaram uma extensa revisão sobre a diversidade de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão. Os autores demonstraram a grande variabilidade fenotípica do grupo, destacando linhagens isoladas no México, identificadas como *X. campestris* pv. *vesicatoria* grupo A, as quais apresentaram forte atividade amilolítica, típica de linhagens do grupo B (Bouzar *et al.*, 1996). Linhagens semelhantes foram encontradas em Barbados (Bouzar *et al.*, 1994a; Bouzar *et al.*, 1999) e Ohio (Sahin & Miller, 1996). Os autores verificaram que essas linhagens são relacionadas a organismos do grupo A.

Jones *et al.* (1998) também reportaram a detecção de linhagens fortemente amilolíticas em campos da Flórida, na década de 90. Essas linhagens apresentaram expressão da banda β de proteína, típica do grupo B, mas não

apresentaram reação com anticorpos específicos para linhagens dos grupos A ou B. Essas linhagens também diferiram na resposta de patogenicidade a algumas variedades de tomate, sendo designadas como raça 3 de tomate (T3) (Jones *et al.*, 1995), e apresentaram características fenotípicas únicas, sendo designadas como um novo grupo, denominado C, as quais mostraram-se semelhantes a linhagens isoladas de plantas de tomate crescidas no México e sementes produzidas na Tailândia (Bouzar *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1995).

Posteriormente, Jones *et al.* (1998) demonstraram que linhagens do grupo C apresentaram mais de 70% de homologia DNA:DNA com linhagens do grupo A, podendo constituir uma subespécie do mesmo, ao passo que "*X. gardneri*" e linhagens dos grupos A e B apresentaram níveis de homologia inferiores a 50%, levando à proposição de "*X. gardneri*" como grupo D. Linhagens da Costa Rica, denominadas XV440 e XV441, previamente classificadas como atípicas (Bouzar *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1995), mostraram-se altamente relacionadas a "*X. gardneri*".

Uma revisão dos dados de Leite (1994c) quanto à análise de variação no *cluster* de genes *hrp*, mostrou que linhagens dos grupos A e C são recuperadas em um *cluster* distante de linhagens do grupo B, e que "*X. gardneri*" mostrou-se pouco relacionada a linhagens dos grupos A, B e C. De acordo com Leite (1994c), "*X. gardneri*" mostrou-se bastante similar a *X. campestris* pv. *taraxaci* e outros patovares, corroborando dados de Hildebrand *et al.* (1990) e Palleroni *et al.* (1993).

Jones *et al.* (1998) comentaram ainda que a nomenclatura de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* merece ser revista, com base nos dados de Lacy *et al.* (1997), que suportam a divisão de *X. axonopodis* em cinco espécies, com o patovar *vesicatoria* sendo removido da espécie *X. axonopodis*. Dados não publicados de homologia DNA:DNA citados no trabalho de Jones *et al.* (1998) confirmam essa sugestão.

Finalmente, Bouzar *et al.* (1999) apresentaram um amplo estudo de taxonomia polifásica de linhagens de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha

bacteriana, isoladas do Caribe e América Central. Foram caracterizadas 433 linhagens, mostrando que linhagens do grupo A são predominantes nessa região. Dentre as 32 linhagens do grupo B analisadas, todos os isolados foram oriundos de dois campos de cultivo de tomate ou pimentão na Guatemala e Costa Rica. Linhagens do grupo C não foram detectadas nesses campos de cultivo.

Linhagens relacionadas ao grupo A, mas com atividade amilolítica (Jones *et al.*, 1998), foram diferenciadas de linhagens típicas do grupo A de acordo com o perfil de utilização de fontes de carbono. Além disso, as primeiras não apresentaram a proteína de 32 kDa característica de organismos do grupo A, apresentando, alternativamente, uma proteína de 25 kDa. As linhagens atípicas com atividade amilolítica foram designadas A1 ou Amy-A, sendo considerada como um subgrupo de A. Em análises de rep-PCR, duas linhagens representantes do grupo A1 foram diferenciadas das demais, apresentando um padrão de bandas distinto, porém relacionado aos organismos do grupo A. Linhagens do grupo C também puderam ser diferenciadas dos demais grupos nas análises de rep-PCR, apresentando padrões similares aos de linhagens do grupo A, confirmando dados de homologia DNA:DNA (Jones *et al.*, 1998).

Outra importante contribuição de Bouzar *et al.* (1999) foi a detecção de cerca de 20 linhagens atípicas provenientes da Costa Rica, algumas analisadas em estudos anteriores (Bouzar *et al.*, 1994a; Louws *et al.*, 1995), que apresentaram propriedades fenotípicas distintas de linhagens do grupo A ou B, ou uma mescla de propriedades de ambos os grupos. Essas linhagens foram relacionadas a "*X. gardneri*", de acordo com dados de homologia DNA:DNA e eletroforese de campo pulsado, e puderam ser claramente diferenciadas dos demais grupos derivados do antigo patovar *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Em resumo, a diversidade dentre as *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão vem se revelando cada vez mais complexa, à medida que análises de taxonomia polifásica de um maior número de linhagens vêm sendo realizadas, aliadas à aplicação de metodologias de caracterização molecular e fenotípica mais informativas. O *status* atual desse grupo de patógenos inclui três espécies,

X. axonopodis pv. *vesicatoria*, "*X. gardneri*" e *X. vesicatoria*, sendo que linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* podem ser diferenciadas em pelo menos dois subgrupos, tipo A e A1, além do grupo C e "*X. gardneri*", apesar de constituir um grupo taxonômico diferenciado, ainda não foi formalmente descrita e apresenta ainda status de "nome inválido".

1.3. Genes Conservados como Marcadores Moleculares

Woese, em seu trabalho revolucionário publicado em 1987, apresentou a "árvore filogenética da vida", baseada na análise filogenética de seqüências de rRNA, ressaltando a propriedade de "relógio biológico" destas moléculas. Posteriormente, os organismos vivos foram separados em três Domínios: Archaea, abrangendo os microrganismos procariotos classificados no antigo grupo das arqueobactérias, geralmente associados a ambientes extremos; Bacteria, incluindo o grupo das bactérias *sensu estrito*; e Eucarya, incluindo os microrganismos eucariotos e demais organismos superiores (Woese *et al.*, 1990).

O aprimoramento das técnicas moleculares ao longo dos últimos anos forneceu a base necessária para a utilização de métodos moleculares e análise filogenética de seqüências de DNA e proteínas como instrumentos de rotina no estudo da diversidade de microrganismos. Diversas áreas da microbiologia, em especial a sistemática, evolução e ecologia microbianas, desenvolveram-se em ritmo exponencial nos últimos anos com a aplicação de novos métodos e geração de dados moleculares. Uma visão geral da contribuição de Woese para o desenvolvimento da microbiologia e filogenia pode ser encontrada em Morel (1997).

A filogenia sistemática enfoca as relações de ancestralidade entre os organismos através de evidências derivadas da análise de homologia entre caracteres. A relação entre os organismos é geralmente expressa em "árvores filogenéticas". A reconstrução da filogenia entre os organismos numa árvore filogenética é uma inferência estatística da evolução dos mesmos, devendo ser entendida como uma "hipótese" sobre a história evolutiva dos organismos, a qual, de fato, é desconhecida (Nei, 1996).

Os métodos filogenéticos têm por objetivo superar os desvios que taxas de evolução diferentes podem causar em linhas de descendência evolutiva (Tibayrenc, 1995). Os principais métodos de inferência filogenética utilizados atualmente em análises de filogenia molecular podem ser classificados em três grupos principais: métodos de distância, métodos de probabilidade (*likelihood*) e métodos de parcimônia (para revisão, consultar Nei, 1996).

Correntes atuais enfatizam a importância da comparação entre genomas inteiros para o estabelecimento de relações filogenéticas entre organismos, apresentada como uma abordagem mais crítica em relação às inferências filogenéticas baseadas apenas em um ou poucos genes (Lake *et al.*, 1999). Entretanto, existem ainda poucos genomas disponíveis para comparação, tornando a abordagem de análise de genomas inviável para o estudo da grande maioria das espécies. Dessa forma, análises filogenéticas baseadas em seqüências gênicas e de proteínas evolutivamente conservadas (semantídeos) ainda são uma ferramenta extremamente valiosa para estudos de filogenia e evolução microbiana.

Diversas seqüências de DNA e proteínas têm sido rotineiramente usadas como marcadores taxonômicos e filogenéticos para diversos organismos. Chaperoninas pertencem a famílias de proteínas que atuam no *folding* de polipeptídeos e exportação de proteínas, podendo atuar também na montagem de estruturas oligoméricas de proteínas (Zeilstra-Ryalls, 1991). As chaperoninas constituem uma classe de proteínas altamente conservadas, presentes em todas as bactérias e em mitocôndrias e cloroplastos de eucariotos e em organismos do Domínio Archaea (para revisão, consultar Gupta, 1995; Viale & Arakaki, 1994; Marston *et al.*, 1999).

As chaperoninas figuram como algumas das moléculas altamente conservadas evolutivamente que têm sido avaliadas como marcadores taxonômicos e filogenéticos para diversos grupos de organismos. Gupta e Golding (1993) mostraram que Hsp70 ou DnaK é uma das proteínas mais conservadas descritas até o momento, mostrando homologia mínima média de 42% da

seqüência total de aminoácidos entre organismos dos Domínios Archaea, Bacteria e Eucarya, constituindo portanto um ótimo marcador filogenético. Falah e Gupta (1994) demonstraram que análises filogenéticas detalhadas utilizando Hsp70 confirmam as teorias de origem das organelas mitocôndria e cloroplastos, conforme inferências baseadas em outros marcadores, como 16S e *groEL*. Outra molécula analisada, DnaJ, localiza-se no mesmo operon de DnaK e pode ser usada para inferências filogenéticas, embora não seja tão conservada quanto a última (Bustard & Gupta, 1997).

A molécula de RecA também foi investigada quanto à aplicação em análises filogenéticas, demonstrando congruência com os dados obtidos para rRNA 16S considerando a análise comparativa de um mesmo conjunto de espécies (Eisen, 1995).

Contudo, seqüências do operon ribossomal (rDNA 16S, 23S, 5S e regiões espaçadoras rDNA 16S-23S) e de chaperoninas *groEL* figuram entre as mais utilizadas em estudos de filogenia em bactérias. Milhares de seqüências de rDNA 16S encontram-se disponíveis na base de dados do RDP (Ribossomal RNA Data Project; Maidak *et al.*, 1999) e do GenBank (URL: <http://ncbi.nlm.nih.gov>). Contudo, existe proporcionalmente menor número de seqüências dos genes 23S e 5S de bactérias. Dados de seqüência das regiões espaçadoras entre os genes rDNA 16S-23S têm se acumulado em anos recentes, demonstrando a ocorrência de variação considerável entre espécies, tanto no tamanho como na seqüência de bases (Gürtler & Stanisich, 1996).

1.3.1. Operon Ribossômico: Análise Filogenética de Seqüências de rRNA 16S e Regiões Espaçadoras rDNA 16S-23S

Os genes do operon ribossômico (rDNA) codificam os RNA ribossomais 16S, 23S e 5S integrantes do ribossomo, uma organela de função essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos (Woese, 1987; Gürtler & Stanisich, 1996). O operon rDNA de bactérias é transcrito em uma molécula de pré-rRNA que contém, geralmente, o gene 16S, uma região espaçadora que pode conter seqüências de tRNA, o gene 23S e uma segunda região espaçadora, seguida do gene 5S, na ordem 5' para 3' (Gürtler & Stanisich, 1996). Esse transcrito de pré-

rRNA é clivado posteriormente em moléculas de rRNA e tRNA, atuantes no processo de síntese de proteínas. Espécies bacterianas diferentes podem apresentar número de cópias variável do operon ribossômico (1 a 10), distribuídos ao longo do cromossomo bacteriano (Gürtler & Stanisich, 1996).

A análise filogenética da sequência de genes do operon ribossomal, particularmente do rDNA 16S, é uma metodologia relativamente simples e com alto poder de resolução, empregada na identificação de microrganismos em nível de gênero, e alguns casos espécie (Woese, 1987; Gürtler & Stanisich, 1996), sendo também útil na construção de classificações filogenéticas e elucidação das relações evolutivas entre microrganismos de modo geral (Woese, 1987; Doolittle, 1999). Essas moléculas podem ainda ser utilizadas como base para o desenvolvimento de sondas e *primers* específicos para identificação de bactérias (Giovannoni *et al.*, 1996).

O emprego de seqüências de rDNA 16S para estudos de filogenia se deve a algumas características apresentadas por essa molécula, como sua universalidade e alto grau de conservação através da evolução, além do fato de que diferentes posições do gene acumulam alterações diferencialmente, apresentando diferentes taxas de mutação (Woese, 1987). O fato desse gene ser essencial no funcionamento do ribossomo, interagindo com outros rRNAs e proteínas ribossomais, limita a possibilidade de transferência inter-específica, que pode interferir na construção de relações filogenéticas entre microrganismos. Estas características tornam esse gene um dos relógios moleculares ideais para a inferência de distâncias evolutivas (Doolittle, 1999).

Entretanto, para alguns grupos de bactérias, análises do gene 16S não são elucidativas para a diferenciação de espécies devido à baixa variabilidade encontrada na seqüência do gene.

Em *Xanthomonas*, análises preliminares de seqüências de rDNA 16S de 26 linhagens, incluindo 7 patovares de *X. campestris* e de outras espécies de *Xanthomonas*, mostraram a ocorrência de variação apenas na região compreendida entre as posições 1064 e 1068 (de Parasis & Roth, 1990).

Posteriormente, Moore *et al.* (1997) analisaram seqüências de rDNA 16S de oito taxa-espécies de *Xanthomonas*, definidas por van der Mooter e Swings (1990), demonstrando que essas seqüências são muito conservadas nos organismos do gênero *Xanthomonas*, limitando a possibilidade do desenvolvimento de *primers* específicos para diferenciação de espécies. Organismos identificados como taxa-espécies através de taxonomia numérica (van der Mooter & Swings, 1990) ou espécies genômicas em estudos de homologia DNA:DNA (Vauterin *et al.*, 1995) apresentaram seqüências de rRNA 16S praticamente idênticas, com apenas 0,1% de diferença, o que representa aproximadamente 1 a 2 nucleotídeos diferentes nos 1.500 pares de bases do rDNA 16S.

Posteriormente, Hauben *et al.* (1997), em estudo mais extenso incluindo todas as espécies de *Xanthomonas* com descrição válida (Vauterin *et al.*, 1995), mostraram que as linhagens-tipo exibem índice de similaridade médio de 98,2%, correspondendo a uma diferença média de apenas 14 nucleotídeos entre elas. A comparação das seqüências de rDNA 16S, cujo tamanho variou de 1.498 a 1.502 nucleotídeos, comprovaram que espécies desse gênero são agrupadas na subdivisão gama de Proteobacteria. Análise das relações filogenéticas entre as espécies foram realizadas por Neighbor-Joining, revelando a formação de dois *clusters* principais: *cluster* 1, incluindo *X. campestris* e mais 14 espécies, *cluster* 2, incluindo apenas *X. sacchari*, e *cluster* 3, compreendendo *X. albilineans*, *X. translucens*, *X. hyacinthi* e *X. theicola*. As diferenças entre espécies de um mesmo *cluster* foram muito baixas, sendo que entre algumas espécies não foram detectadas quaisquer diferenças nas seqüências de nucleotídeos do rDNA 16S (Hauben *et al.*, 1997).

Por outro lado, o alinhamento de seqüências de região espaçadora do rDNA 16S-23S disponíveis em bancos de dados evidenciou que não existem regiões altamente conservadas nessa molécula. As regiões onde ocorre maior homologia são as correspondentes aos tRNAs. Contudo, deve-se notar que tRNAs não estão presentes na seqüência de todas as espécies nem em todos os operons de rDNA (Gürtler & Stanisich, 1996).

As seqüências espaçadoras de rDNA 16S-23S podem apresentar variações de tamanho, devidas, em parte, ao número e tipo de tRNAs que contêm, sendo que a maioria das bactérias Gram-negativas contêm seqüências de tRNA em uma ordem conservada (Gürtler & Stanisich, 1996). Em *Xanthomonas albilineans*, Honeycutt *et al.* (1995) reportaram que os tRNA^{ile} e tRNA^{ala} ocorrem na ordem inversa à encontrada na maioria das outras bactérias, consistindo de 16S rDNA-tRNA^{ala}-tRNA^{ile}-23S rDNA. Posteriormente, Lin e Tseng (1997) mostraram evidências de que *X. campestris* tem duas cópias do operon ribossômico. Dados de eletroforese de campo pulsado indicaram que esses operons não estão organizados em *clusters* adjacentes.

Análises da região espaçadora para diferenciação de espécies bacterianas têm sido empregadas no estudo de diversos grupos taxonômicos. Variações no tamanho dessas seqüências podem ser suficientes para discriminar entre diferentes linhagens, enquanto que análises de fragmentos amplificados por PCR através de RFLP, DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*; Fisher e Lerman, 1983; Muyzer *et al.*, 1993) ou análise de seqüências podem fornecer informações adicionais para diferenciação de organismos com região espaçadora de mesmo tamanho (para revisão, consultar Gürtler & Stanisich, 1996).

Manceau e Horvais (1997), analisando a região espaçadora de linhagens de *Pseudomonas syringae* através de PCR-RFLP, demonstraram que ocorre grande variabilidade entre essas seqüências nesse grupo, possibilitando a diferenciação em nível infra-específico.

Aakra *et al.* (1999) demonstraram o potencial de utilização de regiões espaçadoras de rDNA 16S-23S em estudos filogenéticos de bactérias que promovem oxidação de amônia, dos gêneros *Nitromonas* e *Nitrosospira*. Os autores detectaram variação no tamanho da região espaçadora entre as diferentes espécies e níveis de similaridade entre as seqüências variando de 42,9 a 96,2%.

Everett e Andersen (1997) investigaram as seqüências espaçadoras do rDNA 16S-23S e parte do gene rDNA 23S de espécies de *Chlamydia*, concluindo, após análise de seqüências, que essa metodologia constitui um método rápido e

confiável para identificação, agrupamento e classificação de linhagens desse gênero. A aplicação destes métodos em análises taxonômicas e epidemiológicas de organismos de importância clínica pode ser exemplificada em estudos de identificação e diferenciação de espécies de *Staphylococcus* (Mendoza *et al.*, 1998) e *Legionella* (Riffard *et al.*, 1998), que empregaram amplificação do rDNA 16S-23S por PCR e detecção de polimorfismo de tamanho ou análises de PCR-RFLP.

A utilização de PCR e amplificação de seqüências de região espaçadora para diferenciação de *Xanthomonas* foi realizada no estudo de Honeycutt *et al.* (1995). Estes autores desenharam um par de *primers* capaz de detectar variações no tamanho das seqüências espaçadoras de rDNA 16S-23S de *X. albilineans* e outras espécies e patovares de *Xanthomonas*, servindo, inclusive, como um método diagnóstico para a espécie.

Maes *et al.* (1996) desenharam *primers* para diferenciação de linhagens de patovares de *Xanthomonas* que causam CLS (*Cereal Leaf Streak*), a partir da análise de seqüências variáveis na região espaçadora do rDNA 16S-23S de linhagens de dois patovares de *Xanthomonas* associadas a doenças em cereais. O par de *primers* apresentado amplificou especificamente linhagens que causam CLS, incluindo *X. campestris* pv. *cerealis*, pv. *hordei*, pv. *secalis*, pv. *translucens* e pv. *undulosa*. Análises de maior número de linhagens e outros grupos de *Xanthomonas* demonstraram que esses *primers* identificam especificamente o grupo de linhagens de CLS, assim como linhagens que causam doença em gramíneas, como *X. campestris* pv. *arrhenatheri*, pv. *graminis*, pv. *phlei*, pv. *phleipratensis* e pv. *poae*. Esses *primers* geram um fragmento de 139 pb, correspondente a seqüência de tRNA^{Ala} nesses dois grupos de patógenos. Análises de restrição demonstraram que os fragmentos são idênticos. Esse método pode ser utilizado para detectar a presença de patógenos que causam CLS em sementes, auxiliando no controle e prevenção da dispersão da doença.

1.3.2. Operon GroESL na Taxonomia Bacteriana

Dentre as famílias de chaperoninas, as proteínas GroE são bastante estudadas. GroEL é a principal proteína antigênica de diversas bactérias patogênicas, sendo denominada “antígeno comum das bactérias”. Estas proteínas estão associadas ao desencadeamento de mecanismos de resposta autoimune em várias doenças bacterianas em animais (Gupta, 1995).

O operon *groESL* é composto por dois genes, *groES* e *groEL*, bastante conservados evolutivamente, que agem em conjunto, auxiliando processos de empacotamento e exportação de proteínas celulares. As proteínas GroE são essenciais para o funcionamento das células em qualquer condição de crescimento, porém a expressão das mesmas é regulada por dois promotores temperatura-dependentes, um que atua na expressão do gene em temperaturas próximas à temperatura ótima de crescimento do organismo, e outro que passa a responder em temperaturas acima ou abaixo deste ótimo. Essas proteínas apresentam mecanismos de regulação típicos de proteínas que respondem a estresse por calor (*heat-shock proteins* ou Hsp), apresentando maior produção de proteínas GroE diretamente relacionada ao aumento de temperatura (para revisão, consultar Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991). Os genes *groES* e *groEL* são separados por uma região espaçadora, que pode variar de tamanho em diferentes microrganismos (Gupta, 1995).

Essas características sugerem que tanto as seqüências gênicas, como as de proteínas, apresentam potencial para serem utilizadas como marcadores taxonômicos e filogenéticos, a exemplo de outros semantídeos altamente conservados em estrutura e função, como rRNA 16S e enzimas de *house-keeping* (Woese, 1987; Maidak *et al.*, 1999).

Viale e Arakaki (1994) realizaram estudos de filogenia envolvendo a análise de seqüências de proteínas GroEL de 66 organismos, representantes de diversos taxa, incluindo bactérias e seqüências de mitocôndrias e cloroplastos. Os resultados demonstraram que inferências evolutivas baseadas em seqüências de GroEL concordam com a hipótese evolutiva de origem das mitocôndrias no grupo

das bactérias α -Proteobacteria. As análises de seqüência também sustentam a hipótese de origem dos cloroplastos no grupo das Cianobactérias.

Viale *et al.* (1994) demonstraram, através de análises de comparação de 58 seqüências de proteínas GroEL, que essa molécula é um relógio molecular válido para inferências filogenéticas, gerando dados que corroboram aqueles obtidos através de análises de seqüências de rRNA 16S. Análises de GroEL auxiliaram na elucidação de relações taxonômicas controversas em alguns taxa, que não puderam ser claramente definidas com base em análises de rRNA 16S.

Gupta (1995) realizou análises semelhantes empregando seqüências de GroEL e GroES em estudos filogenéticos. Quanto à origem de organelas, Gupta (1995) chegou à mesma conclusão delineada por Viale e Arakaki (1994), mostrando que as inferências baseadas em GroES levam à conclusões similares às obtidas para GroEL. As moléculas de GroEL apresentam um índice de identidade mínimo de 40% na suas seqüências de aminoácidos, constituindo, junto com as proteínas Hsp70 (DnaK), as proteínas mais evolutivamente conservadas conhecidas (Segal & Ron, 1996).

A análise de seqüências de chaperoninas como ferramenta para taxonomia e filogenia de bactérias é ainda relativamente pouco empregada. Lungu *et al.* (1994) descreveram a utilização de uma região do gene *groEL* como marcador para a diferenciação de espécies de *Mycobacterium* e *Nocardia*. A partir da utilização de *primers* específicos, uma região de 422 pb do gene *groEL* foi amplificada por PCR e análises de RFLP geraram padrões específicos para 10 espécies de *Mycobacterium* e 5 de *Nocardia*. Esse método permitiu a identificação correta de 105 amostras analisadas, comprovando a eficácia e sensibilidade desse método, aliada à vantagem da rapidez na realização de análises.

Amplificação de *groEL* de *Haemophilus ducreyi* por PCR, utilizando pares de *primers* específicos para o gene deste organismo, demonstrou que o gene apresenta grande potencial como marcador para essa espécie, muitas vezes difícil de ser identificada através de características culturais (Parsons *et al.*, 1995).

Dumler *et al.* (1995) utilizaram uma sequência de 425 pb do gene *groEL* na identificação de uma nova linhagem de *Ehrlichia chaffensis*. Essa espécie contava apenas com a linhagem-tipo como organismo-referência. O novo isolado mostrou-se praticamente idêntico à linhagem-tipo, apresentando 99,9% de identidade na sequência de rDNA 16S. Homólogos do operon *groEL* das linhagens analisadas apresentaram padrões de restrição idênticos e 99,8% de identidade de sequência, comprovando o potencial de utilização destes genes para tipagem e identificação de microrganismos.

A diferenciação de microrganismos em nível de espécie e infra-específico utilizando sequências de *groEL* também foi descrita para organismos do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC). Swanson *et al.* (1997) utilizaram uma região de 360 pb do gene *hsp65* de várias linhagens do complexo MAC, diferenciando entre organismos das espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. A análise de sequência desse marcador permitiu a identificação de subgrupos nas espécies estudadas e a diferenciação de três isolados de MAC com sequências distintas.

Análises de sequências de *groEL* de *Lawsonia intracellularis*, amplificadas por PCR após seleção de biblioteca de expressão para os genes *groES* e *groEL*, revelaram que a sequência de *groEL* deste organismo não é relacionada a nenhuma outra sequência disponível em banco de dados. Esse dados corroboram evidências provenientes de análises de sequências de rDNA 16S que sugerem *Lawsonia intracellularis* como um novo grupo de enterobactérias (Dale *et al.*, 1998).

Em 1997, Sumner *et al.* descreveram o que representa até o momento um dos estudos mais completos utilizando dados de sequência do operon *groELS* em análises taxonômicas e filogenéticas. Os autores compararam sequências parciais (409 pb) de *groEL* de espécies de *Ehrlichia*, *Rickettsia rickettsii* e *Bartonella henselae* obtidas por PCR, confirmando as relações filogenéticas estabelecidas por análises de sequência de rDNA 16S. Os resultados demonstraram uma maior variabilidade entre as sequências de *groEL* e sua maior utilidade como marcador

taxonômico para as espécies estudadas. Foram desenhados vários pares de *primers* degenerados, detectando variação entre os tamanhos de regiões espaçadoras do operon *groESL* entre as várias espécies analisadas, embora em alguns grupos o tamanho das regiões espaçadoras tenha sido o mesmo. Um método diagnóstico para *E. chaffeensis* foi proposto, com base na utilização de dois pares de *primers* em reações de *nested* PCR.

Em *Xanthomonas*, o estudo filogenético das seqüências de *groEL* das linhagens patogênicas para tomate e pimentão e linhagens-tipo de espécies de *Xanthomonas* descrito no presente trabalho representa o primeiro relato da utilização destes marcadores para este grupo de fitopatógenos.

1.4. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a investigação e definição de novos marcadores moleculares taxonômicos e filogenéticos para bactérias do gênero *Xanthomonas*, enfocando principalmente o estudo da diversidade de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão, previamente denominadas *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

O estudo envolve a caracterização de uma coleção extensa de linhagens, incluindo isolados brasileiros, linhagens-referência e tipo, e linhagens atípicas do grupo, que serão caracterizadas através de:

- análise de RFLP de rDNA 16S e regiões espaçadoras de rDNA 16S-23S;
- análise de polimorfismo do gene *groEL* através de PCR-RFLP;
- análise filogenética da sequência de regiões espaçadoras de rDNA 16S-23S e do gene *groEL*.

Os resultados obtidos nos estudos de caracterização citados acima serão analisados visando a avaliação do potencial dos diferentes marcadores para:

- diferenciação de espécies do gênero *Xanthomonas*;
- diferenciação de isolados atípicos do grupo de *Xanthomonas* fitopatogênicas para tomate e pimentão, incluindo linhagens *X. campestris* pv. *vesicatoria* atípicas (*nonA/nonB*);
- estudo das relações filogenéticas entre os organismos do gênero *Xanthomonas*;
- desenvolvimento de métodos específicos para detecção de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão.

2. Material e Métodos

2.1. Linhagens Bacterianas

As linhagens brasileiras de *Xanthomonas* sp. (*ex Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) estudadas neste trabalho foram cedidas pelo Dr. Júlio Rodrigues Neto, da coleção de culturas do IBSBF - Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Campinas (SP). As linhagens de referência e linhagens-tipo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria* e as demais linhagens-tipo de espécies de *Xanthomonas* foram adquiridas junto à Coleção de Culturas da LMG, (Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Bélgica), através da Coleção de Culturas Tropical (CCT). As linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* atípicas e do grupo *nonA/nonB*, foram cedidas pelo Dr. Jeffrey Jones, Universidade da Flórida e Dr. Blanca Canteros, Argentina. A lista completa de linhagens estudadas encontra-se na Tabela 2.1.

2.2. Meios de Cultura e Condições de Cultivo

As linhagens adquiridas, preservadas por liofilização, foram reativadas através de reidratação com a adição de alíquotas de meio NB ou NYGB, dentro das próprias ampolas, com auxílio de pipeta Pasteur, à temperatura ambiente. Alíquotas de 200 a 400 µL das culturas foram plaqueadas em meio NYGA ou NA com auxílio de alça de Drigalski. Paralelamente, uma alíquota de 100 µL da resuspensão foi também inoculada em 50 mL de meio NYGB ou NB para garantir a reativação caso as culturas não se mostrassem viáveis nos plaqueamentos em meio sólido. As culturas foram incubadas a 28 °C por 24-72 horas e sua pureza foi verificada através de coloração de Gram.

O cultivo das linhagens para os ensaios de caracterização fenotípica e preparação de biomassa foram realizados empregando-se meios de culturas específicos, conforme descrito nos protocolos experimentais a seguir.

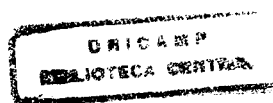


Tabela 2.1. Linhagens bacterianas estudadas neste trabalho.

Linhagens	Hospedeiro	Fonte ou referência
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
LMG 958 ^T	Paciente com câncer	R. Hugh, 1966.
<i>Xanthomonas albilineans</i>		
LMG 494 ^T	<i>Saccharum officinarum</i>	Fiji. D.Dye, 1961
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>		
LMG 747 ^T	<i>Juglans regia</i>	Nova Zelândia. D.Dye, 1956
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>		
LMG 538 ^T	<i>Axonopus scoparicus</i>	Colômbia. M. Starr, 1949.
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
LMG 667	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	D. Watson, 1976; LMG
LMG 668	<i>Capsicum annuum</i>	Cook Island. D. Watson, 1978.
LMG 906	Não citado	Kishun; LMG
LMG 909	<i>Capsicum</i> sp.	Costa do Marfim. H. Maraite, 1980.
LMG 910	<i>Capsicum</i> sp	Marrocos. H. Maraite, 1980.
LMG 913	<i>Capsicum</i> sp	Senegal. D. Perreaux, 1979.
LMG 914	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Senegal. D. Perreaux, 1979.
LMG 922	<i>Capsicum frutescens</i>	EUA. W. Burkholder, 1939.
LMG 929 ^{Ref}	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	EUA. R. Stall, 1969. (Referência do patovar).
<i>X. bromi</i>		
LMG 947 ^T	<i>Bromus carinatus</i>	França. R.Samson, 1980.
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
LMG 568 ^T	<i>Brassica oleracea</i>	UK. E. Billing, 1957.
<i>X. cassavae</i>		
LMG 673 ^T	<i>Manihot esculenta</i>	Malawi. J.Bradbury, 1951.
<i>X. codiae</i>		
LMG 8678 ^T	<i>Codiaeum variegatum</i>	EUA. A. Chase, 1987.

Tabela 2.1. Continuação.

Linhagens	Hospedeiro	Fonte ou referência
<i>X. cucurbitae</i>		
LMG 690 ^T	<i>Cucurbita maxima</i>	Nova Zelândia. D.Watson, 1968.
<i>X. fragariae</i>		
LMG 708 ^T	<i>Fragaria ananassa</i>	EUA. B. Kennedy, 1960.
<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>		
LMG 733 ^T	<i>Hedera helix</i>	EUA. W.Burkholder.
<i>X. hyacinthi</i>		
LMG 739 ^T	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Holanda. E.van Slogteren, 1958.
<i>X. melonis</i>		
LMG 8670 ^T	<i>Cucumis melo</i>	Brasil. J.R. Neto, 1974.
<i>X. oryzae</i>		
LMG 5047 ^T	<i>Oryza sativa</i>	Índia. Y.Rao, 1965.
<i>X. pisi</i>		
LMG 847 ^T	<i>Pisum sativum</i>	Japão. N.Okabe, 1957.
<i>X. sacchari</i>		
LMG 471 ^T	<i>Saccharum officinarum</i>	Guadelupe. M.Beramis.
<i>Xanthomonas</i> sp. (ex <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)		
IBSBF 251	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Piracicaba, SP. J. R. Neto, 1980.
IBSBF 317	<i>Nicotiana tabaccum</i>	n.d., O. Kimura, n.d.
IBSBF 331, 332	<i>Capsicum annuum</i>	Mogi-das-Cruzes, SP. J. R. Neto, 1981.
IBSBF 345, 346	<i>Capsicum annuum</i>	Ubatuba, SP. J. R. Neto, 1981.
IBSBF 400, 401	<i>Capsicum annuum</i>	Arealva, SP. J. R. Neto, 1982.
IBSBF 407	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Elias Fausto, SP. J. R. Neto, 1982.
IBSBF 411, 412	<i>Capsicum annuum</i>	Monte Mor, SP. J. R. Neto, 1982.
IBSBF 414, 415	<i>Capsicum annuum</i>	Elias Fausto, SP. J. R. Neto, 1982.
IBSBF 433	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Araçatuba, SP. J. R. Neto, 1982.
IBSBF 418, 419, 420	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Santa Bárbara D'Oeste, SP. J. R. Neto, 1982.

Tabela 2.1. Continuação.

Linhagens	Hospedeiro	Fonte ou referência
IBSBF 427	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Serra Negra, SP. J. R. Neto, 1982.
IBSBF 465	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Itu, SP. J. R. Neto, 1983.
IBSBF 478	<i>Capsicum annuum</i>	Casa Branca, SP. J. R. Neto, 1983.
IBSBF 479	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Monte Mor, SP. J. R. Neto, 1983.
IBSBF 483	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Dracena, SP. J.R. Neto, 1983.
IBSBF 484	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Presidente Prudente, SP. J. R. Neto, 1983.
IBSBF 486	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Santo Anastácio, SP. J. R. Neto, 1983.
IBSBF 646	<i>Capsicum</i> sp. (pimenta)	Atibaia, SP. V.A. Malavolta, 1988.
IBSBF 720	<i>Capsicum</i> sp.	Petrolina, PE. J.R. Neto, 1988.
IBSBF 925	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Boituva, SP. J.R. Neto, 1973.
IBSBF 948	<i>Capsicum bacatum</i>	Paranapuã, SP. I.M.G. Almeida, 1992.
IBSBF 978	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jaboticabal, SP. R.C. Panizzi, 1992.
IBSBF 1145	<i>Capsicum annuum</i>	Capão Bonito, SP. J. R. Neto, 1995.
IBSBF 1165	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Indaiatuba, SP. V.A. Malavolta, 1995.
IBSBF 1196	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Monte Mor, SP. I.M.G. Almeida, 1995.
IBSBF 1208	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Capão Bonito, SP. I.M.G. Almeida, 1995.
<i>Xanthomonas</i> sp. (ex <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>, grupo <i>nonA/nonB</i>*)		
BV5-4a	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Argentina. B. Canteros.
XV330	<i>Capsicum annuum</i>	Barbados. J. Jones.
XV334	<i>Capsicum annuum</i>	Barbados. J. Jones.
XV338	<i>Capsicum annuum</i>	Barbados. J. Jones.
XV343	<i>Capsicum annuum</i>	Barbados. J. Jones.
XV440	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Costa Rica. J. Jones.
XV441	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Costa Rica. J. Jones.
XV560	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Guatemala. J. Jones.
XV655	<i>Capsicum annuum</i>	Porto Rico. J. Jones.

Tabela 2.1. Continuação.

Linhasgens	Hospedeiro	Fonte ou referência
<i>X. theicola</i>		
LMG 8684 ^T	<i>Camellia sinensis</i>	Japão. K.Uehara, 1974.
<i>X. translucens</i>		
LMG 876 ^T	<i>Hordeum vulgare</i>	EUA. C.Reddy, 1933.
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>		
LMG 736 ^T	<i>Sorghum bicolor</i>	Nova Zelândia. D.Watson, 1969
<i>X. vesicatoria</i>		
LMG 911 ^T	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Nova Zelândia. D. Dye, 1955.
LMG 916	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Nova Zelândia. D. Dye, 1955.
LMG 917	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Nova Zelândia. D. Dye, 1955.
LMG 919	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Rodésia. A. Rothwell, 1956.
LMG 920	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Itália. G. Goidanich, 1959.
LMG 935	<i>Lycopersicon lycopersicum</i>	Hungria. Z. Klement, 1960.
<i>Xylella fastidiosa</i>		
PLS 6	n.d.	n.d.

n.d. – dado não disponível; * linhagens *nonA/nonB*: linhagens descritas por Bouzar *et al.* (1994a) que apresentam características fenotípicas das linhagens de *ex X. campestris* pv. *vesicatoria* grupos A (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) e B (*X. vesicatoria*).

2.2.1. Meios NA e NB (Difco)

Extrato de carne (Difco)3,0 g
 Bacto-Peptona (Difco)5,0 g
 Água destiladaq.s.p. 1000 mL

O meio sólido NA foi preparado adicionando-se 12,0 g de ágar para cada litro de NB.

2.2.2. Meio NYGA e NYGB (Turner *et al.*, 1984)

Bacto-Peptona (Difco)	5,0 g
Extrato de levedura (Difco)	3,0 g
Glicerol (Sigma)	20,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O meio sólido NYGA foi preparado adicionando-se 12,0 g de ágar para cada litro de NYGB.

2.2.3. Meio de Kado (Kado & Heskett, 1970)

Caseína hidrolisada (Difco)	8,0 g
Extrato de levedura (Difco)	4,0 g
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sigma)	0,3 g
Sacarose (Sigma)	10,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O MgSO₄.7H₂O foi dissolvido separadamente em 50 mL de água e adicionado ao meio imediatamente antes de autoclavar. O meio sólido foi preparado com a adição de 12,0 g de ágar por litro de meio.

2.2.4. Meio GYCA, com modificações (Vauterin *et al.*, 1991b)

CaCO ₃ (Sigma)	30,0 g
Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Glicose (Sigma)	10,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

2.2.5. Meio para Detecção de Atividade Amilolítica

Amido solúvel (Sigma)	2,0 g
Meio NYGB	q.s.p. 1000 mL

O meio sólido foi preparado com a adição de 1,2% de ágar. A revelação das placas foi feita através de coloração com solução alcoólica de lugol, permitindo a visualização de halos formados ao redor das colônias positivas.

2.2.6. Meio para Detecção de Atividade Celulolítica

Carboximetilcelulose (Sigma).....	5,0 g
Extrato de levedura (Difco).....	1,0 g
Glicerol (Sigma).....	5,0 g
Meio mínimo M9.....	q.s.p. 1000 mL

O Meio Mínimo foi preparado previamente de acordo com Sambrook *et al.*, (1989). A carboximetilcelulose foi dissolvida separadamente. A solução foi eventualmente aquecida para facilitar a dissolução e o meio sólido foi preparado com a adição de 1,2% de ágar. A revelação das placas foi feita corando-se as mesmas com solução de Congo-Red 0,1%, permitindo a visualização de halos mais claros ao redor das colônias positivas.

2.2.7. Meio para Detecção de Atividade Pectinolítica (Bocarra *et al.*, 1988)

Glicerol (Sigma).....	5,0 g
Extrato de Levedura (Difco)	1,0 g
Pectina cítrica.....	5,0 g
Meio mínimo M9.....	q.s.p. 1000 mL

O Meio Mínimo foi preparado anteriormente de acordo com Sambrook *et al.*, (1989). O meio sólido foi preparado com a adição de 1,2% de ágar. A revelação das placas foi feita com a adição de uma solução de *hexadeciltrimetil ammonium bromide* 1%, com visualização de halos translúcidos em torno das colônias positivas, em contraste com o precipitado opaco derivado do contato da pectina com a solução de reveladora.

2.2.8. Meio para Detecção de Atividade Proteolítica (Tang *et al.*, 1989)

Solução de Leite Desnatado 10% (Skim Milk, Difco)200,0 mL

Meio NYGAq.s.p. 1000 mL

Foi preparada uma solução de Skim Milk a 10%. A solução foi autoclavada por 7 min., à pressão de 1 atm. A solução estoque foi misturada ao meio NYGA (1,2% de ágar) na proporção de 1:5, para uma concentração final de 2,0%. A detecção de atividade proteolítica foi verificada a partir da formação de halos translúcidos ao redor das colônias positivas.

2.3. Extração de DNA Genômico em Pequena Escala

O DNA genômico das linhagens foi extraído de acordo com Pitcher *et al.* (1989), com pequenas modificações. As extrações foram feitas a partir de cerca de 50 mg de biomassa celular cultivada em placas de meio NA ou NYGA, incubadas a 28 °C por 24-72 horas. A biomassa celular foi raspada da superfície do meio de cultura com alça de platina e as células foram homogeneizadas em 500 µL de tampão TE (Sambrook *et al.*, 1989) em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, para lavagem e eliminação do excesso de exopolissacarídeos, sendo centrifugadas em seguida. Algumas extrações foram feitas a partir de 2-5 mL de cultura líquida em meio NB ou NYGB. Após crescimento por 16 h, as células foram precipitadas por centrifugação em tubos de microcentrífuga e a biomassa celular foi lavada em TE como descrito anteriormente.

Foi então preparada uma suspensão a partir do precipitado de células com a adição de 100 µL de TE pH 8.0 contendo 2 mg/mL de lisozima e os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Foram adicionados 500 µL de solução de tiocianato de guanidina 5 M para promover a lise. As amostras foram agitadas brevemente em vortex, incubadas a temperatura ambiente por 5-10 minutos e os lisados foram resfriados em gelo. Adicionou-se 250 µL de acetato de amônio 7,5 M gelado, misturados às amostras por inversão dos tubos repetidas vezes, gentilmente. Os tubos foram incubados por 10 min. em gelo, sendo então adicionados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v) com agitação

manual até homogeneização e posterior centrifugação a 13.000 rpm (Sorvall MC12V) por 10 minutos.

A fase aquosa foi transferida para novo tubo e adicionou-se 0.54 V de isopropanol para a precipitação do DNA. Os tubos foram invertidos várias vezes para misturar bem as fases, até visualização de um precipitado fibroso branco. As amostras foram centrifugadas a 6.500 rpm por 20 segundos. Os precipitados de DNA foram lavados 3-4 vezes com etanol 70%. Pulsos curtos de centrifugação (30 seg. a 1 min.) foram aplicados para reprecipitar o DNA entre as lavagens caso necessário. O excesso de álcool foi evaporado por secagem em estufa a 37 °C ou 55 °C.

O DNA precipitado e seco foi dissolvido em 200 µL de TE pH 8.0. Foram adicionados 2 µL de RNase A (10 mg/mL), com incubação a 37 °C por 1 h. Foram adicionados 40 µL de LiCl 4 M para ajuste da concentração de sal, após o que foi feita a extração com clorofórmio/álcool isoamílico para remoção de proteínas. As fases foram misturadas manualmente e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O DNA foi precipitado com a adição de 2 V de etanol gelado, o material foi misturado por inversão e centrifugado por 20 segundos, 6.500 rpm. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%, as amostras foram secas a vácuo e o DNA foi dissolvido em 20-50 µL de H₂O mili-Q e estocado a 4 °C.

2.3.1. Solução de Tiocianato de Guanidina 5 M

A preparação da solução de Tiocianato de Guanidina 5 M seguiu o protocolo descrito por Pitcher *et al.* (1989), onde 60,0 g de tiocianato de guanidina (Sigma) foram dissolvidos em 20,0 mL de H₂O mili-Q (esterilizada) e 20,0 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 (esterilizada), sob agitação constante, em banho aquecido a 65 °C. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e 5,0 mL de N-lauril sarcosina 10% (esterilizado) foram adicionados. O volume foi completado para 100,0 mL com H₂O mili-Q esterilizada e a solução foi filtrada em membrana 0.45 µm. A solução foi estocada à temperatura ambiente em vidro escuro.

2.4. Amplificação de rDNA 16S, Região Espaçadora rDNA 16S-23S e *groEL* por PCR

As seqüências de DNA utilizadas como marcadores taxonômicos neste trabalho, o gene de rDNA 16S, fragmentos da região espaçadora de rDNA 16S-23S e fragmentos de seqüência conservada do gene *groEL*, foram amplificadas por PCR empregando conjuntos de *primers* e condições de amplificação distintas, conforme descrito a seguir. Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados na amplificação do DNA encontram-se listados na Tabela 2.2.

As reações de PCR continham as seguintes concentrações de componentes: 0,4 µM dos *primers* (16S e região espaçadora); 0,5 µM dos *primers* (*groEL*); 0,2 mM dNTPs; 2 U *Taq* polimerase (CentBio ou Pharmacia); tampão de reação fornecido pelo fabricante da enzima utilizada; 2 mM MgCl₂ (para o tampão da enzima CentBio); volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas em equipamento Perkin-Elmer GeneAmp 9600 (Perkin Elmer, USA), com a utilização de tubos de reação de 0,2 mL (Perkin Elmer, USA).

2.4.1. Amplificação de rDNA 16S

As condições utilizadas para amplificação foram: 1 ciclo a 95 °C/2 min., seguido de 30 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min. e 72 °C/3 min., seguidos de um ciclo final de extensão a 72 °C/5 min. Para as reações, foram utilizados 50 a 100 ng de DNA genômico como molde. A seqüências dos *primers* utilizados encontram-se listadas na Tabela 2.2.

2.4.2. Amplificação de região espaçadora de rDNA 16S-23S

As condições utilizadas para amplificação foram: 1 ciclo a 95 °C/2 min., seguido de 30 ciclos de 94 °C/1 min, 60 °C/1 min. e 72 °C/3 min., seguidos de um ciclo final de extensão a 72 °C/5 min. Para as reações, foram utilizados 50 a 100 ng de DNA genômico como molde. A seqüências dos *primers* utilizados encontram-se listadas na Tabela 2.2 e um esquema dos *primers* e fragmento amplificado encontra-se representado na Figura 2.1.

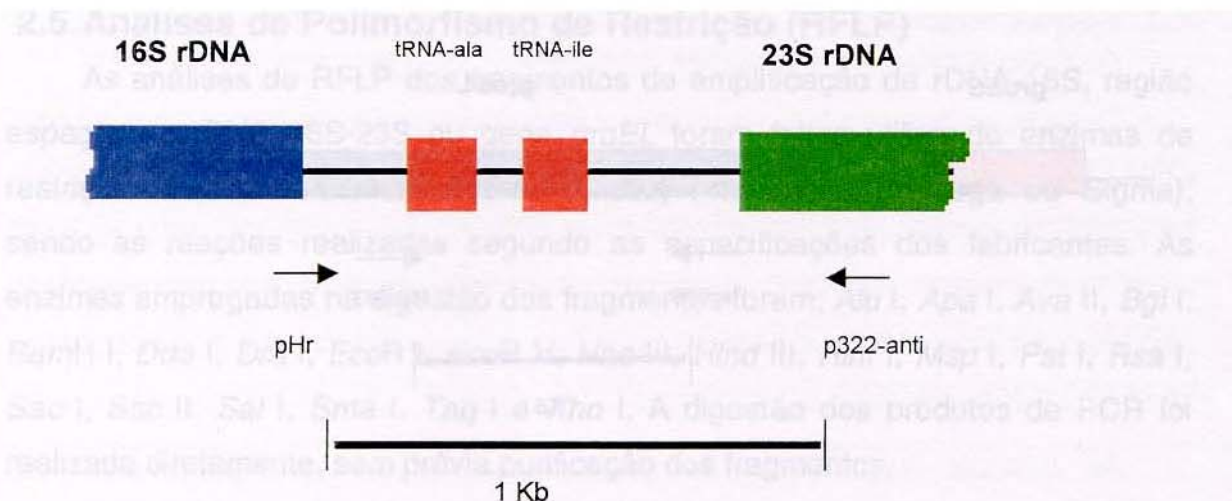


Figura 2.1. Esquema dos *primers* utilizados para amplificação da região espaçadora do rDNA 16S-23S de bactérias.

2.4.3. Amplificação de sequência parcial do gene *groEL*

Os *primers* utilizados foram obtidos com a Prof. Dra. Suely Lopes Gomes (Instituto de Química, USP, São Paulo, SP), tendo sido desenhados com base em sequências conservadas de GroEL de diferentes organismos pela referida autora (Suely Gomes, comunicação pessoal). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se listadas na Tabela 2.2 e um esquema dos *primers* e fragmento amplificado encontra-se representado na Figura 2.2.

As reações de PCR foram montadas como descrito anteriormente, utilizando as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo 94 °C/5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C/1 min., 40 °C/2 min. e 72 °C/3 min., com um ciclo final de extensão a 72 °C/7 min.

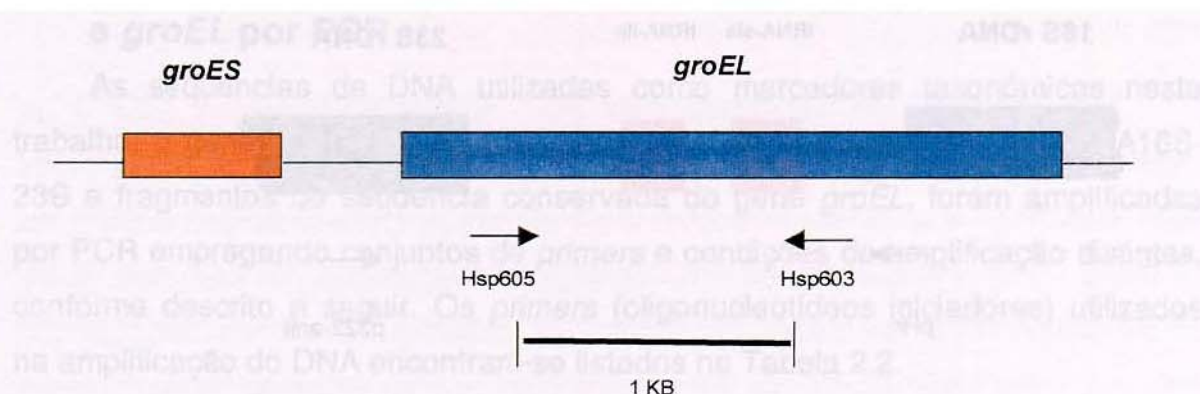


Figura 2.2. Esquema do operon *groES-groEL* e localização dos primers degenerados Hsp605 e Hsp603 para um fragmento do gene *groEL* baseados em sequências conservadas da proteína GroEL (Hsp60) de bactérias.

Tabela 2.2. Primers utilizados nas reações de amplificação por PCR.

Primer	Sequência (5' → 3')*	Fonte ou referência	Fragmento amplificado
27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane, 1991	rDNA 16S
1525r	AAG GAG GTG WTC CAR CC	Lane, 1991	rDNA 16S
pHr	TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT	Massol-Deya <i>et al.</i> , 1995	Região espaçadora do rDNA 16S-23S
p322-anti	GGT TCT TTT CAC CTT TCC CTC	Honeycutt <i>et al.</i> , 1995	Região espaçadora do rDNA 16S-23S
Hsp605 (forward)	TAT GAA TTC GGB CCS AAG GGB CGS AAC GT	Dr. Suely Gomes, IQ, USP	Fragmento do gene <i>groEL</i>
Hsp603 (reverse)	TAT AAG CTT GCS AGS CGY TCC TGS AGC TTY TC	Dr. Suely Gomes, IQ, USP	Fragmento do gene <i>groEL</i>

*Bases degeneradas: B = T,G,C; M = C,A; R = A,G; S = G,C; W = A,T; Y = C,T.

2.5. Análises de Polimorfismo de Restrição (RFLP)

As análises de RFLP dos fragmentos de amplificação de rDNA 16S, região espaçadora rDNA 16S-23S ou gene *groEL* foram feitas utilizando enzimas de restrição adquiridas comercialmente (Gibco, Pharmacia, Promega ou Sigma), sendo as reações realizadas segundo as especificações dos fabricantes. As enzimas empregadas na digestão dos fragmentos foram: *Alu* I, *Apa* I, *Ava* II, *Bgl* I, *Bam*H I, *Dde* I, *Dra* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Pst* I, *Rsa* I, *Sac* I, *Sac* II, *Sal* I, *Sma* I, *Taq* I e *Xho* I. A digestão dos produtos de PCR foi realizada diretamente, sem prévia purificação dos fragmentos.

O perfil de bandas de DNA foi visualizado através da técnica de eletroforese horizontal com gel de agarose submerso. As concentrações dos géis de agarose variaram de 0.6% a 4%, de acordo com o tamanho do fragmento de DNA a ser visualizado. A agarose foi preparada em tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 1 X (preparado a partir de solução estoque TEB 5 X: 0,1 M Tris, pH 8,0; 0,1 M ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,0). O mesmo tampão foi utilizado para as corridas eletroforéticas.

Os géis com concentração de agarose acima de 2% foram utilizados para análises de RFLP e preparados sempre a partir de mistura 2:1 de agarose comum: agarose *low-melting* e dissolvidos em banho-maria em microondas. As eletroforeses para visualização de fragmentos derivados de análises de RFLP foram realizadas a 5 a 6 V/cm de gel.

Os géis foram pré-corados com solução de brometo de etídio 10 mg/mL e após a corrida o DNA foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. Os resultados foram fotografados em filme de revelação instantânea Polaroid preto-e-branco.

2.6. Sequenciamento e Análise Filogenética de Fragmentos da Região Espaçadora rDNA 16S-23S e Gene *groEL*

O sequenciamento dos fragmentos de amplificação de região espaçadora rDNA 16S-23S e *groEL* foi feito diretamente a partir dos produtos de PCR, segundo protocolos recomendados para *cycle-sequencing* do sistema ABI (Applied Biosystems, USA). O sequenciamento foi realizado em equipamento ABI 397 (Applied Biosystems, USA), empregando os mesmos *primers* utilizados para as amplificações de PCR.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa GDE (<http://ftp.bio.indiana.edu/soft/molbio/unix/GDE>) e pacotes de análises associados ao programa, incluindo ClustalW e o pacote de programas PHYLIP de inferência filogenética (*Phylogenetic Inference Package*, Felsenstein, 1993). Sequências-referência de outros microrganismos foram recuperadas do GenBank através de buscas de homologia empregando o programa BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram utilizadas os métodos de inferência filogenética baseados em distância e probabilidade nas análises filogenéticas efetuadas (Nei, 1996), com o emprego dos algoritmos de distância de Jukes/Cantor (JC) e o *maximum likelihood* (DNAML), implementados no pacote de programas PHYLIP (Felsenstein, 1993). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo de *Neighbor-Joining* (Nei, 1996).

2.7. Caracterização Fenotípica de *Xanthomonas* spp.

2.7.1. Produção de enzimas extracelulares

A produção de enzimas extracelulares foi verificada através de degradação de substratos específicos em meios de cultura. Os meios de cultura utilizados e a revelação dos testes encontram-se descritos nos itens 2.2.5 a 2.2.8.

Os inóculos para os testes foram feitos utilizando-se uma suspensão bacteriana crescida em meio NYGB por 18 hs a 28 °C em agitador (180-200 rpm). As culturas foram inoculadas com alça de platina em pontos definidos nas placas contendo meio de ensaio. As placas foram incubadas a 28 °C com leituras realizadas após 24 e 48 horas de incubação.

3. Resultados

Um total de 76 linhagens, incluindo 32 linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) isoladas no estado de São Paulo, 33 linhagens-tipo e referência de espécies de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão e de outras espécies do gênero *Xanthomonas*, 9 linhagens atípicas do grupo *nonA/nonB* de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) e linhagens-referência de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Xylella fastidiosa*, foram analisadas através da aplicação de métodos de caracterização molecular, fenotípica e quimiotaxonômica.

As análises de taxonomia molecular incluíram a caracterização de polimorfismo de rDNA 16S, região espaçadora rDNA 16S-23S e de uma região do gene *groEL*, amplificados por PCR, além de sequenciamento e análise filogenética dos fragmentos de região espaçadora rDNA 16S-23S e gene *groEL* para um grupo de linhagens selecionadas. A caracterização fenotípica incluiu a determinação do perfil de atividade de enzimas extracelulares de linhagens tipo de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* e linhagens atípicas brasileiras e do grupo *nonA/nonB* de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*).

3.1. Análise de RFLP da Região Espaçadora do rDNA 16S-23S

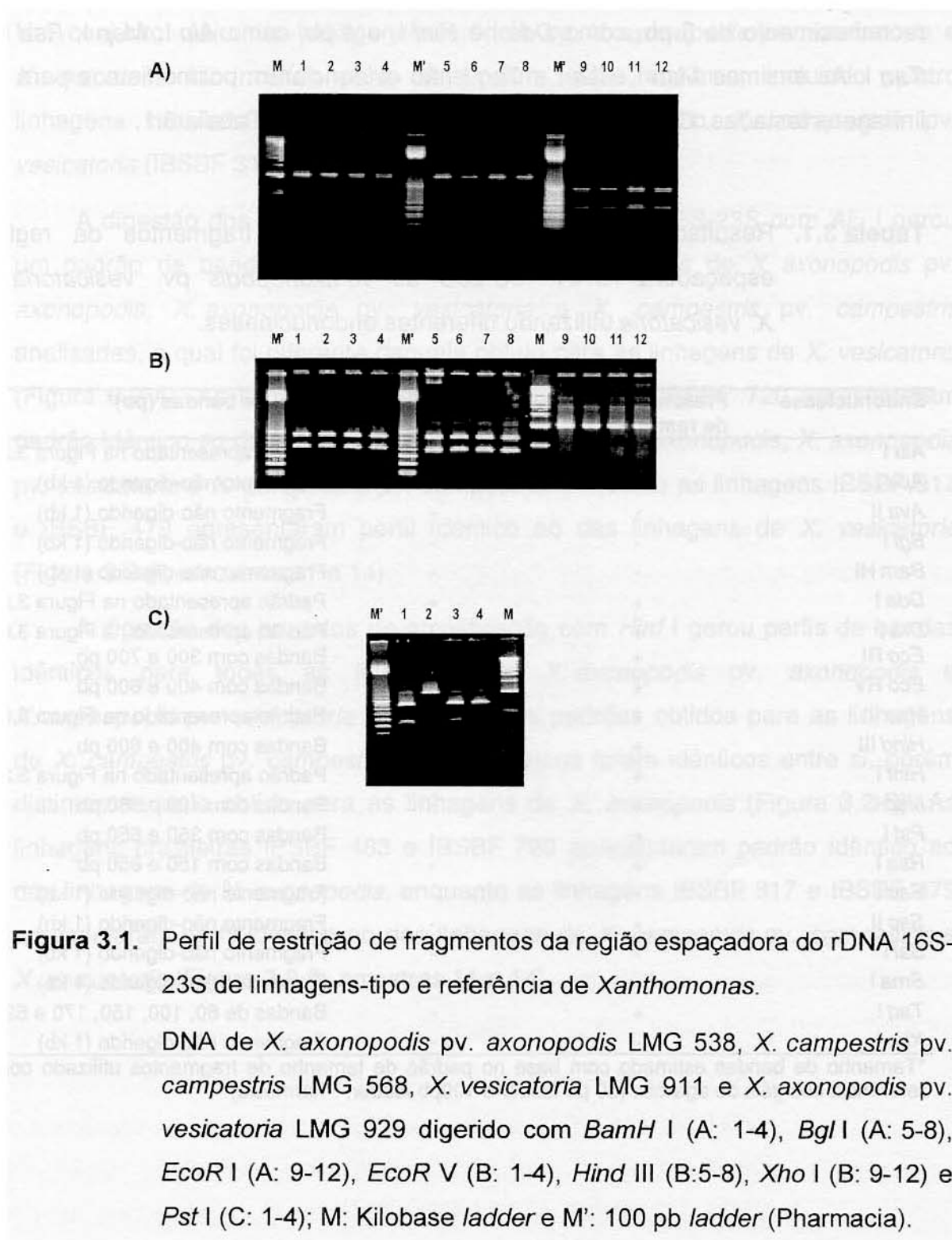
3.1.1. Caracterização de linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão

Inicialmente, o potencial da região espaçadora do rDNA 16S-23S para diferenciação de *Xanthomonas* em nível de espécie foi avaliado através de análises de RFLP. Foram amplificados os DNAs genômicos das seguintes linhagens tipo e referência de *Xanthomonas* spp. (definidas por Vauterin *et al.*, 1995): *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568 e *X. vesicatoria* LMG 911.

A amplificação da região espaçadora do rDNA 16S-23S com os *primers* pHr e p322-anti (Figura 2.1) resultou em uma banda de cerca de 1 kb, para todas as linhagens testadas, incluindo além da região espaçadora, com cerca de 600pb, uma região de cerca de 300 pares de base do gene 23S.

Diversas enzimas de restrição foram utilizadas para investigação de polimorfismos no fragmento de região espaçadora rDNA 16S-23S de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568 e *X. vesicatoria* LMG 911. Inicialmente, foram testadas endonucleases com sítio de reconhecimento de 6 pares de base, como: *Apa* I, *Ava* I, *Bam*H I, *Dra* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I, *Sac* II, *Sal* I, *Sma* I e *Xho* I, e a enzima *Bgl* I, que reconhece sítios degenerados com 11 pares de base.

Foi observado que o fragmento gênico amplificado não apresentou sítio de restrição para a maioria das enzimas testadas, incluindo *Apa* I, *Ava* I, *Bam*H I, *Sac* I, *Sac* II, *Sal* I, *Sma* I e *Xho* I. Restrições com *Eco*R I, *Eco*R V, *Hind* III ou *Pst* I geraram duas bandas, mas não foi detectado polimorfismo entre as linhagens testadas, exceto para a enzima *Pst* I, que permitiu a diferenciação de *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568 das demais linhagens testadas. A Figura 3.1 ilustra os resultados obtidos para algumas das enzimas testadas.



Devido à ausência de sítios de restrição e polimorfismos para as enzimas inicialmente selecionadas, foram testadas endonucleases com sítios de reconhecimento de 5 pb, como *Dde* I e *Hinf* I, e 4 pb, como *Alu* I, *Msp* I, *Rsa* I e *Taq* I. As enzimas *Msp* I, *Rsa* I e *Taq* I não evidenciaram polimorfismos para as linhagens testadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Resultados da análise de restrição de fragmentos da região espaçadora rDNA 16S-23S de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* utilizando diferentes endonucleases.

Endonuclease	Presença de sítio de restrição	Polimorfismo	Perfil de bandas (pb)*
<i>Alu</i> I	+	+	Padrão apresentado na Figura 3.2
<i>Apa</i> I	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Ava</i> II	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Bgl</i> I	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Bam</i> HI	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Dde</i> I	+	+	Padrão apresentado na Figura 3.2
<i>Dra</i> I	+	+	Padrão apresentado na Figura 3.6
<i>Eco</i> RI	+	-	Bandas com 300 e 700 pb
<i>Eco</i> RV	+	-	Bandas com 400 e 600 pb
<i>Hae</i> III	+	+	Padrão apresentado na Figura 3.6
<i>Hind</i> III	+	-	Bandas com 400 e 600 pb
<i>Hinf</i> I	+	+	Padrão apresentado na Figura 3.2
<i>Msp</i> I	+	-	Bandas com 120 e 880 pb
<i>Pst</i> I	+	-	Bandas com 350 e 650 pb
<i>Rsa</i> I	+	-	Bandas com 150 e 850 pb
<i>Sac</i> I	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Sac</i> II	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Sal</i> I	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Sma</i> I	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)
<i>Taq</i> I	+	-	Bandas de 60, 100, 150, 170 e 520 pb
<i>Xho</i> I	-	-	Fragmento não-digerido (1 kb)

*Tamanho de bandas estimado com base no padrão de tamanho de fragmentos utilizado como referência nos géis de agarose (50 pb *ladder* e 100pb *ladder*, Pharmacia)

Digestões com *Alu* I, *Dde* I e *Hinf* I resultaram em polimorfismos para as linhagens-referência das diferentes espécies e patovares testadas (Figura 3.2). Um conjunto maior de linhagens-referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* foi incluído para testes com estas enzimas, incluindo quatro linhagens brasileiras, anteriormente classificadas como *X. campestris* pv. *vesicatoria* (IBSBF 317, 479, 483 e 720).

A digestão dos fragmentos de região espaçadora 16S-23S com *Alu* I gerou um padrão de bandas idêntico para todas as linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris* analisadas, o qual foi diferente daquele obtido para as linhagens de *X. vesicatoria* (Figura 3.2-A). As linhagens brasileiras IBSBF 483 e IBSBF 720 apresentaram padrão idêntico ao das linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris*, enquanto as linhagens IBSBF 317 e IBSBF 479 apresentaram perfil idêntico ao das linhagens de *X. vesicatoria* (Figura 3.2-A, amostras 11 a 14).

A digestão dos produtos de amplificação com *Hinf* I gerou perfis de bandas idênticos para todas as linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* analisadas. Os padrões obtidos para as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. vesicatoria* foram idênticos entre si, porém distintos daquele obtido para as linhagens de *X. axonopodis* (Figura 3.2-B). As linhagens brasileiras IBSBF 483 e IBSBF 720 apresentaram padrão idêntico ao das linhagens de *X. axonopodis*, enquanto as linhagens IBSBF 317 e IBSBF 479 apresentaram perfil idêntico ao das linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. vesicatoria* (Figura 3.2-B, amostras 11 a 14).

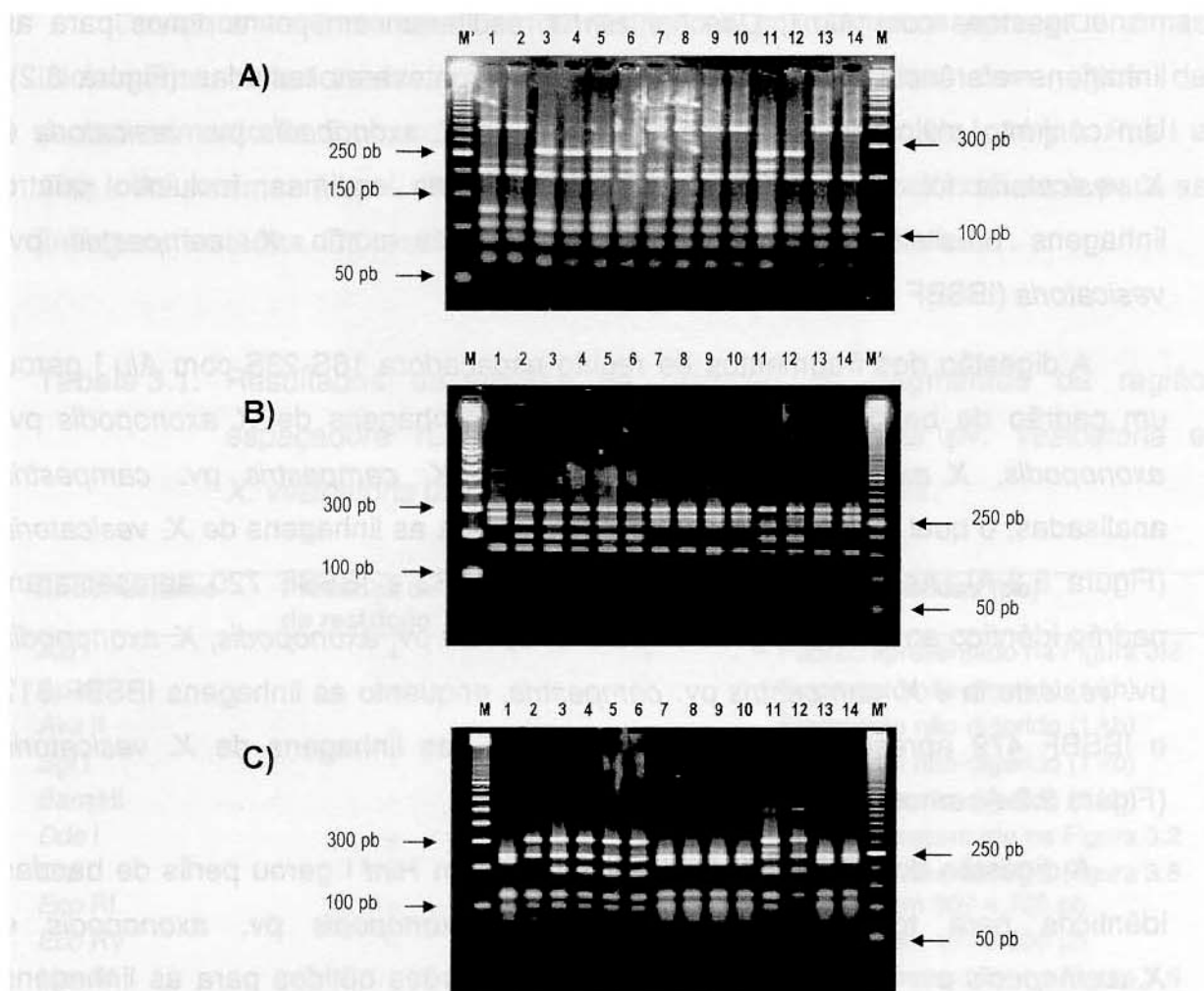


Figura 3.2. Padrões de RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) e *X. vesicatoria*.

DNA de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538 (1), *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568 (2), *X. vesicatoria* LMG 911, LMG 916, LMG 919 e LMG 935 (3-6), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, LMG 914, LMG 910 e LMG 906 (7-10) e isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 479, IBSBF 483 e IBSBF 720 (11-14), digerido com *Alu* I (A), *Hinf* I (B) e *Dde* I (C); M e M': 100 pb e 50 pb ladder (Pharmacia).

A digestão com *Dde* I gerou três padrões de restrição polimórficos para as linhagens analisadas. Os organismos da espécie *X. axonopodis*, incluindo linhagens dos patovares *axonopodis* e *vesicatoria* apresentaram um padrão de bandas comum (Figura 3.2-C). Este foi diferente do padrão apresentado por todas as linhagens de *X. vesicatoria*, que por sua vez diferiu do padrão de *X. campestris* pv. *campestris* (Figura 3.2-C). As linhagens brasileiras IBSBF 483 e IBSBF 720 apresentaram padrão idêntico ao das linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, enquanto as linhagens IBSBF 317 e IBSBF 479 apresentaram perfil idêntico ao das linhagens de *X. vesicatoria* (Figura 3.2-C, amostras 11 a 14).

A análise de polimorfismo de região espaçadora rDNA 16S-23S das demais linhagens-referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) e *X. vesicatoria* (grupo B), descritas no estudo de Vauterin *et al.* (1995), utilizando as enzimas *Alu* I, *Dde* I e *Hinf* I, gerou perfis de restrição idênticos aos obtidos para as linhagens destes grupos analisadas anteriormente. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 3.2.

No estudo de polimorfismo de região espaçadora rDNA 16S-23S de 32 linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, isoladas no Estado de São Paulo, digeridas com *Alu* I, *Dde* I e *Hinf* I, verificou-se que 16 linhagens apresentaram perfis de restrição idênticos aos de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A), o mesmo acontecendo com a linhagem IBSBF 720, isolada em Pernambuco. As demais linhagens agruparam com *X. vesicatoria* (grupo B). Os resultados da caracterização com *Dde* I e *Hinf* I encontram-se nas Figuras 3.3 e 3.4, respectivamente. Um sumário do agrupamento das linhagens de acordo com os padrões de polimorfismo obtidos com as três enzimas e planta hospedeira de origem estão representados na Tabela 3.2.

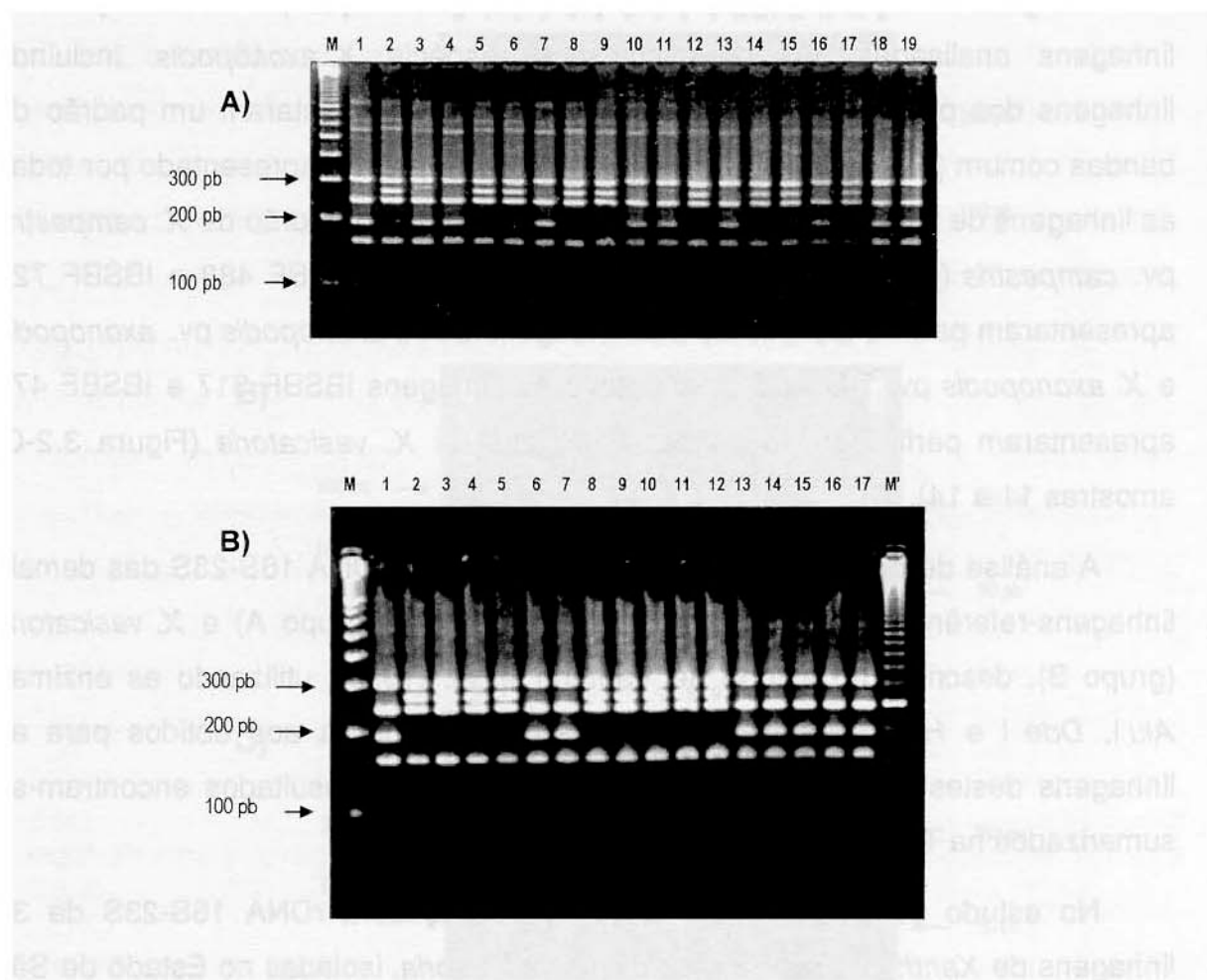


Figura 3.3. Padrões de RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S de isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (ex *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) obtidos com *Dde* I.

DNA de *X. vesicatoria* LMG 911 (A-1 e B-1), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (A-2 e B-2), *Xanthomonas* sp. IBSBF 251, 317, 345, 346, 407, 414, 415, 465, 479, 483, 484, 486, 948, 978, 1145, 1196, 1208 (A-3 a 19, respectivamente), *Xanthomonas* sp. IBSBF 331; 332; 401; 419; 433; 478; 646; 400; 411; 412; 418; 420; 427; 925; 1165, (B-3 a 17, respectivamente); M: 100 pb ladder e M': 50 pb ladder (Pharmacia).

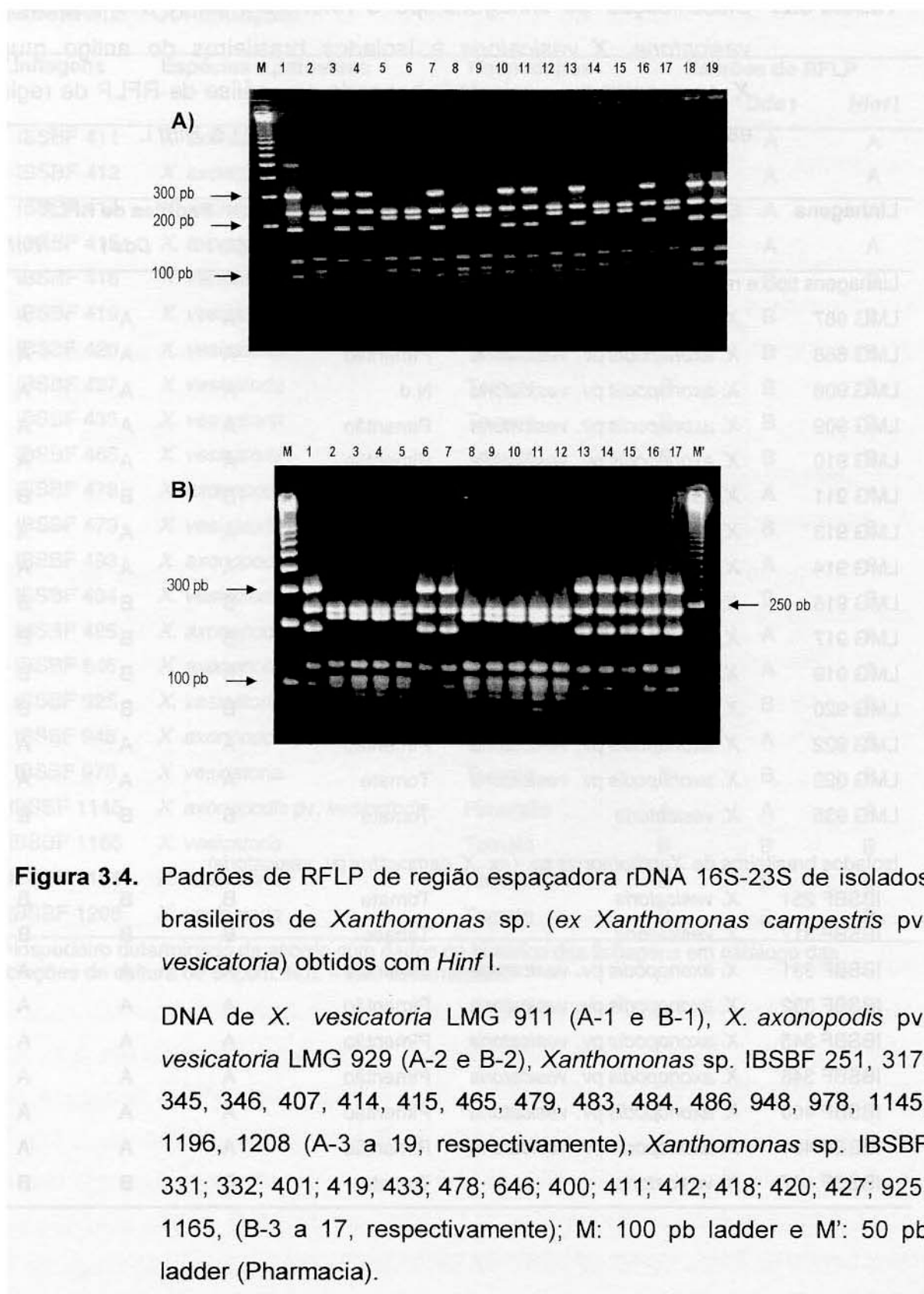


Tabela 3.2. Classificação de linhagens-tipo e referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e isolados brasileiros do antigo grupo *X. campestris* pv. *vesicatoria* baseada na análise de RFLP de região espaçadora do rDNA 16S-23S com *Alu* I, *Dde* I e *Hinf* I.

Linhagens	Espécies e patovares	Hospedeiros*	Padrões de RFLP		
			Alu I	Dde I	Hinf I
Linhagens tipo e referência					
LMG 667	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
LMG 668	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 906	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	N.d.	A	A	A
LMG 909	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 910	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 911	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 913	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 914	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
LMG 916	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 917	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 919	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 920	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 922	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 929	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
LMG 935	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
Isolados brasileiros de <i>Xanthomonas</i> sp. (ex <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)					
IBSBF 251	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 317	<i>X. vesicatoria</i>	Tabaco	B	B	B
IBSBF 331	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 332	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 345	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 346	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 400	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 401	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 407	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B

Tabela 3.2. Continuação.

Linhagens	Espécies e patovares	Hospedeiros	Padrões de RFLP		
			<i>Alu</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Hinf</i> I
IBSBF 411	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 412	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 414	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 415	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 418	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 419	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 420	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 427	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 433	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 465	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 478	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 479	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 483	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
IBSBF 484	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 486	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
IBSBF 646	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 925	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 948	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 978	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 1145	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 1165	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 1196	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 1208	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B

*Hospedeiro determinado de acordo com dados de histórico das linhagens em catálogo das coleções de cultura de origem. N.d. = não determinado.

3.1.2. Caracterização de linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* atípicas (grupo *nonA/nonB*)

As linhagens atípicas de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão, descritas no trabalho de Bouzar *et al.* (1994a), apresentam características fenotípicas das espécies *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*, sendo referidas como linhagens do grupo *nonA/nonB*.

Um conjunto de 9 linhagens do grupo *nonA/nonB*, incluindo *Xanthomonas* sp. (ex *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) XV330, XV334, XV338, XV343, XV440, XV441, XV560, XV655 e BV5-4a, foi analisado para testar a aplicabilidade do RFLP de região espaçadora 16S-23S como marcador para detecção de variabilidade e diferenciação dessas linhagens atípicas. Como referência, foram incluídas linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (antigo grupo A) e *X. vesicatoria* (antigo grupo B), classificadas por Vauterin *et al.* (1995).

O fragmento de região espaçadora rDNA 16S-23S amplificado por PCR apresentou cerca de 1,0 Kb para todas as linhagens testadas. Diversas enzimas foram utilizadas nas análises de RFLP desse fragmentos, incluindo *Alu* I, *Bam*H I, *Dde* I, *Dra* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Sac* II e *Sal* I. Nenhuma das linhagens testadas apresentou sítios de restrição para *Bam*H I, *Sac* II ou *Sal* I. A digestão dos fragmentos com *Eco*R I, *Hind* III e *Pst* I gerou perfis de restrição idênticos para todas as linhagens (dados não apresentados).

As linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) XV440 e XV441 agruparam com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) quando digeridas com *Alu* I e *Dra* I. Por outro lado, estes organismos apresentaram perfil de bandas idêntico ao de linhagens de *X. vesicatoria* (grupo B) quando digeridas com *Dde* I, *Hae* III e *Hinf* I (Figuras 3.5-B, 3.6 e 3.5-C, respectivamente, e Tabela 3.3). As linhagens XV330, XV334, XV338 e XV343 foram agrupadas com linhagens do grupo A com base nos perfis de restrição obtidos com as enzimas *Alu* I, *Dra* I, *Hae* III e *Hinf* I (Figuras 3.5-A, 3.6 e 3.-C). Contudo, quando digeridas com *Dde* I, estas linhagens apresentaram um perfil ligeiramente diferente, com a ausência de uma banda de cerca de 75 pb presente em todas as outras linhagens do grupo A testadas (Figura 3.5-B, linhagens 15 a 18).

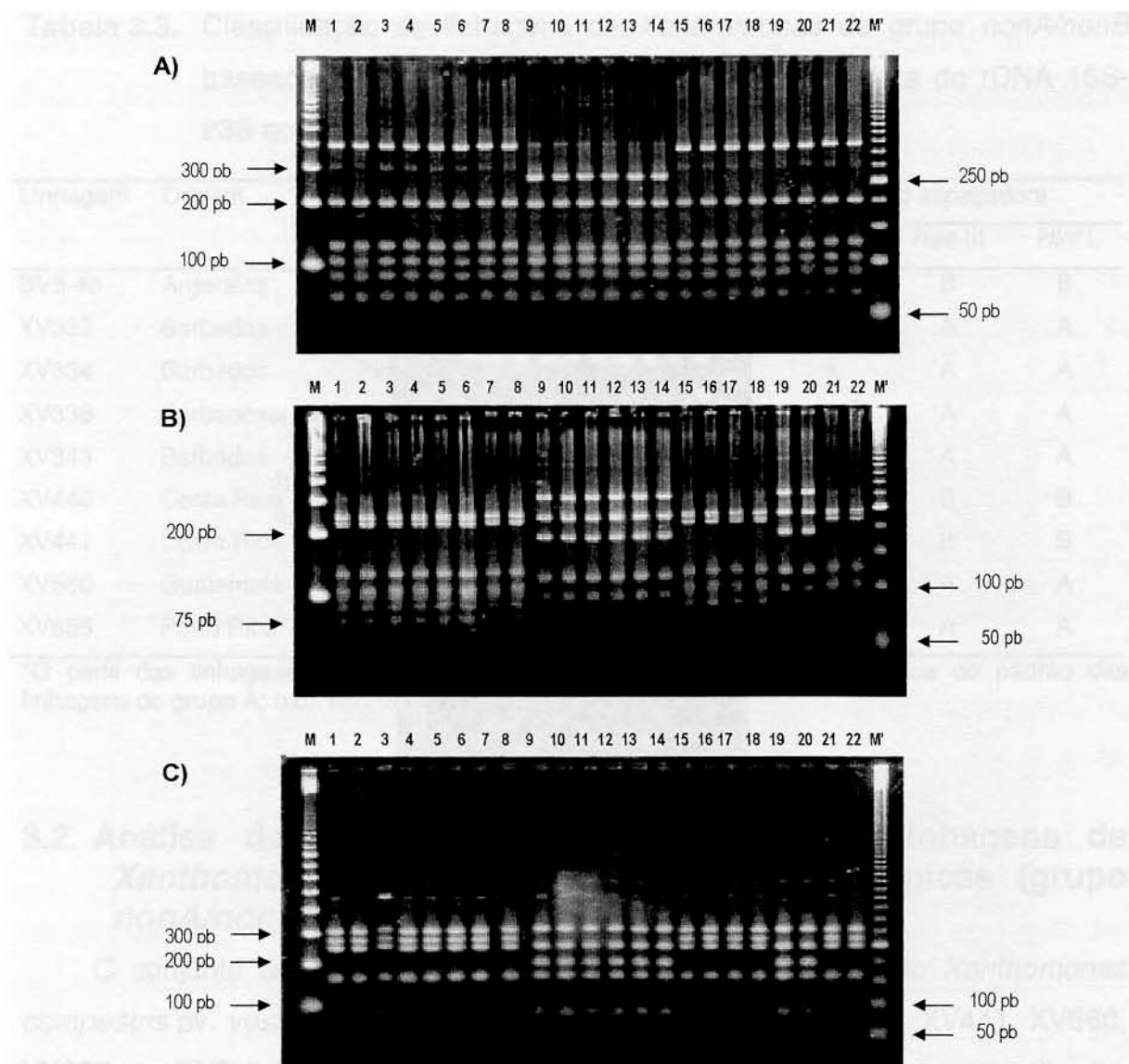


Figura 3.5. Padrões de RFLP da região espaçadora do rDNA 16S-23S de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e linhagens atípicas de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) do grupo *nonA/nonB*.

DNA de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 667, 668, 906, 910, 913, 914, 922 e 929 (1-8), *X. vesicatoria* LMG 911, 916, 917, 919, 920 e 935 (9-14), XV330 (15), XV334 (16), XV338 (17), XV343 (18), XV440 (19), XV441 (20), XV560 (21), XV655 (22), digerido com *Alu* I (A), *Dde* I (B) e *Hinf* I (C); M: 100 pb ladder e M': 50 pb ladder (Pharmacia).

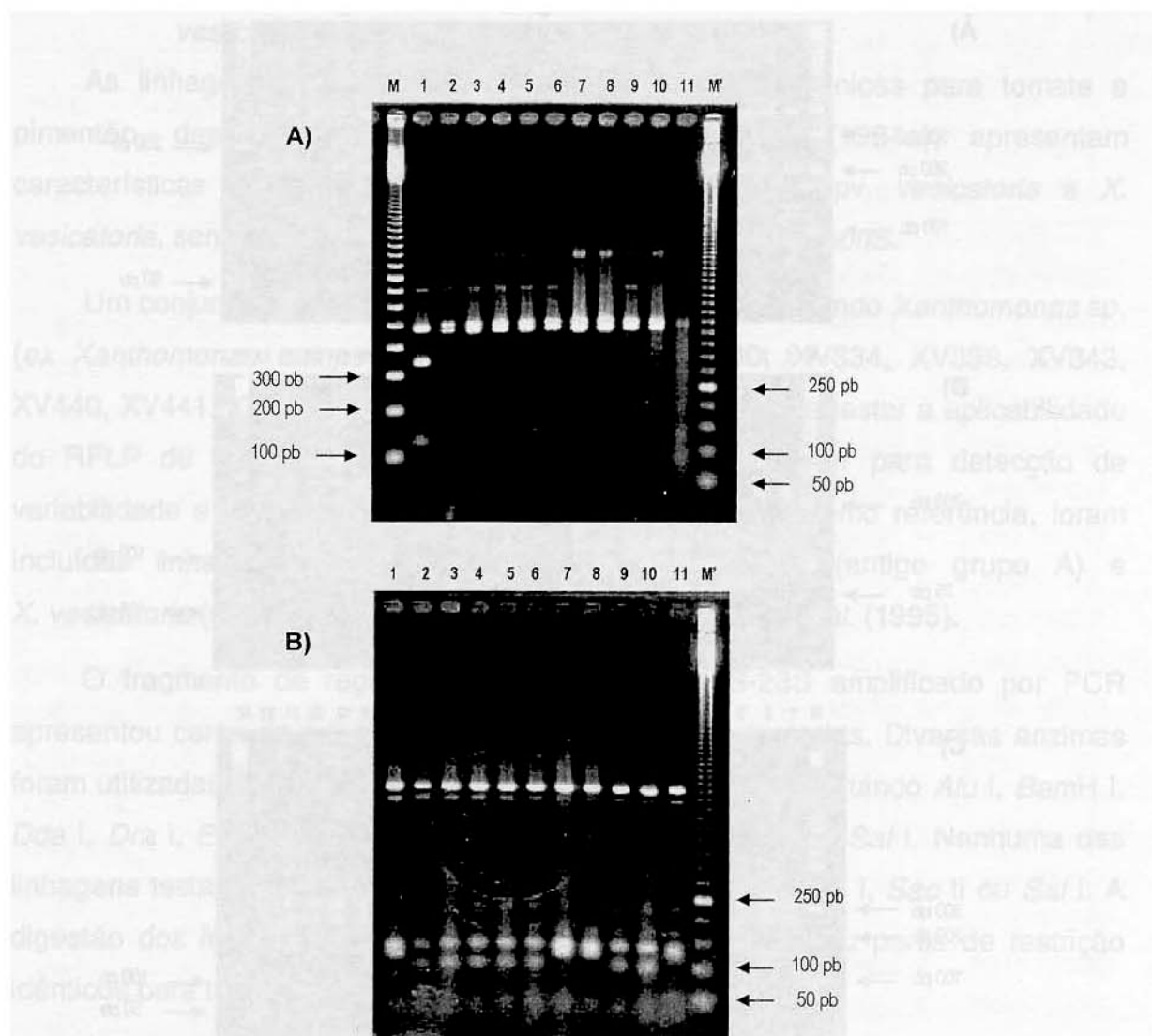


Figura 3.6. Padrões de RFLP da região espaçadora do rDNA 16S-23S de linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e linhagens atípicas de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) do grupo *nonA/nonB*.

DNA de *X. vesicatoria* LMG 911(1), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (2), *Xanthomonas* sp. XV330 (3), XV334 (4), XV338 (5), XV343 (6), XV440 (7), XV441 (8), XV560 (9), XV655 (10), BV5-4a (11), digerido com *Dra* I (A) e *Hae* III (B). M: 100 pb ladder e M': 50 pb ladder (Pharmacia).

Tabela 3.3. Classificação de linhagens de *Xanthomonas* do grupo *nonA/nonB* baseada na análise de RFLP da região espaçadora do rDNA 16S-23S com diferentes endonucleases.

Linhagem	Origem	Hospedeiro	Padrão de RFLP de região espaçadora				
			<i>Alu</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I
BV5-4b	Argentina	Tomate	n.d.	n.d.	n.d.	B	B
XV330	Barbados	Pimentão	A	A*	A	A	A
XV334	Barbados	Pimentão	A	A*	A	A	A
XV338	Barbados	Pimentão	A	A*	A	A	A
XV343	Barbados	Pimentão	A	A*	A	A	A
XV440	Costa Rica	Tomate	A	B	A	B	B
XV441	Costa Rica	Tomate	A	B	A	B	B
XV560	Guatemala	Tomate	A	A	A	A	A
XV655	Porto Rico	Pimentão	A	A	A	A	A

*O perfil das linhagens não apresentou uma banda de 75 pb característica do padrão das linhagens do grupo A; n.d.: não determinado.

3.2. Análise de RFLP do Gene rDNA 16S de Linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Atípicas (grupo *nonA/nonB*)

O conjunto das 9 linhagens do grupo *nonA/nonB*, incluindo *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* XV330, XV334, XV338, XV343, XV440, XV441, XV560, XV655 e BV5-4a, incluindo as linhagens-referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (antigo grupo A) e *X. vesicatoria* LMG 911 (antigo grupo B), classificadas por Vauterin *et al.* (1995), foi analisado para avaliação de polimorfismos do gene rDNA 16S na diferenciação de linhagens atípicas.

O DNA genômico das linhagens foi amplificado por PCR utilizando os *primers* universais p27f e p1525r, conforme descrito anteriormente, resultando num fragmento de cerca de 1,5 kb. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I e *Msp* I.

As linhagens atípicas e linhagens-referência dos grupos A e B apresentaram perfis de bandas invariáveis para todas as enzimas testadas. Os padrões resultantes encontram-se na Figura 3.7.

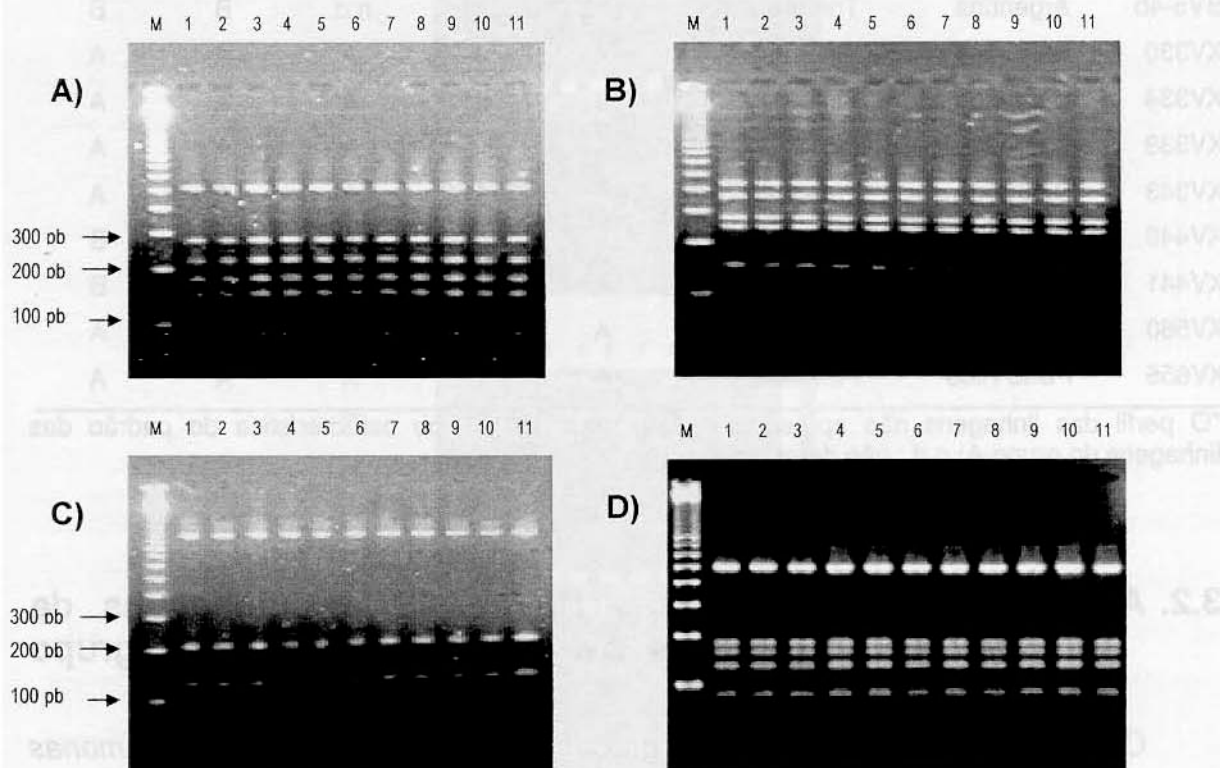


Figura 3.7. Padrões de RFLP de rDNA 16S de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e linhagens atípicas *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) do grupo *nonA/nonB*.

DNA de *X. vesicatoria* LMG 911 (1), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (2), *Xanthomonas* sp. XV330 (3), XV334 (4), XV338 (5), XV343 (6), XV440 (7), XV441 (8), XV560 (9), XV655 (10) e BV5-4a (11) digerido com *Dde* I (A), *Hae* III (B), *Hinf* I (C) e *Msp* I (D); M: 100 pb ladder (Pharmacia).

3.3. Análise de RFLP de Região do Gene *groEL*

3.3.1. Caracterização de linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão

Os *primers* degenerados Hsp 605 e Hsp 603 (Figura 2.2), desenhados pela Dra. Suely Lopes Gomes, foram utilizados para amplificação de DNA genômico de linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão e de linhagens-referência de diferentes espécies de *Xanthomonas*. Como controles de amplificação, foram utilizadas amostras de DNA do plasmídeo pUCBM20/*groESL*, contendo um inserto do operon *groESL* de *Caulobacter* sp., e DNA genômico de *Caulobacter* sp. (cedidos pela Dra. Suely Lopes Gomes, IQ/USP).

A amplificação de DNA genômico das linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (grupo A), *X. vesicatoria* LMG 911 (grupo B) e amostras de DNA dos controles de amplificação resultaram em produtos de PCR com cerca de 1.0 kb (Figura 3.8). *X. fragariae* foi também incluída nas análises preliminares de detecção de polimorfismos de *groEL* utilizando diferentes endonucleases.

Os fragmentos de *groEL* amplificados por PCR de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568, *X. fragariae* LMG 708 e *X. vesicatoria* LMG 911 foram digeridos com *Alu* I, *Apa* I, *Ava* II, *Bam*H I, *Dde* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Pst* I, *Rsa* I e *Taq* I.

Os fragmentos de *groEL* amplificados não apresentaram sítios de restrição para *Apa* I, *Bam*H I, *Eco*R I e *Pst* I. A digestão com *Alu* I e *Hinf* I geraram perfis de restrição idênticos para todas as linhagens testadas.

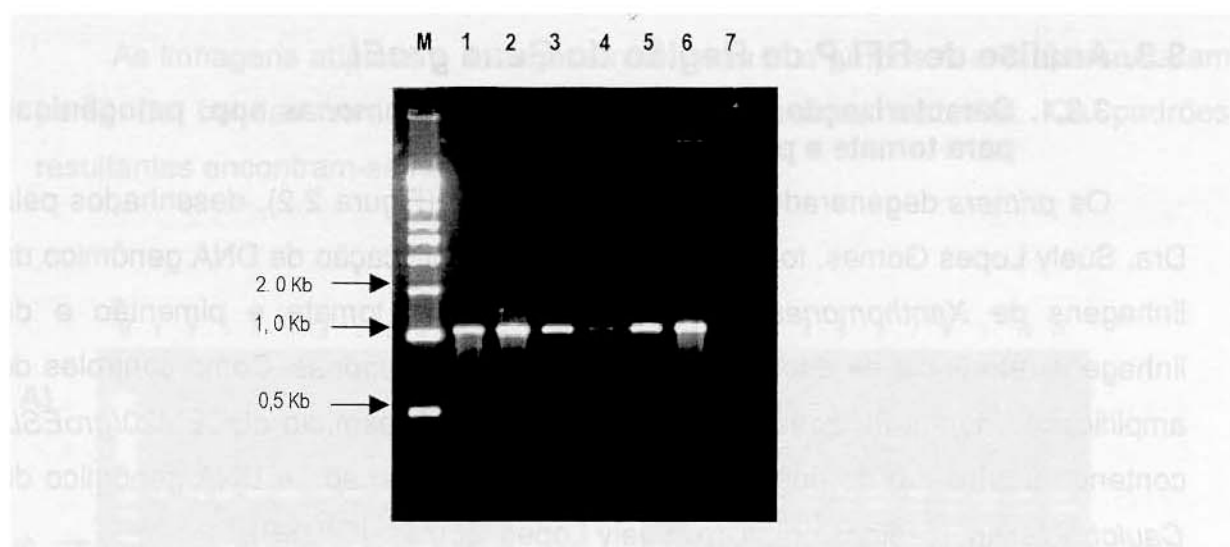


Figura 3.8. Produtos de amplificação do gene *groEL* de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. vesicatoria*.

DNA de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538 (1), *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568 (2), *X. vesicatoria* LMG 911 (3), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (4), *Caulobacter* sp. (5) e plasmídeo pUCBM20/*groELS* (6); controle negativo de reação, sem DNA (7); M: kilobase ladder (Pharmacia).

Os perfis resultantes da digestão com *Ava* II permitiram a diferenciação das linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. campestris* pv. *campestris* (as quais não apresentaram sítio de restrição para a enzima) das linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*. A digestão com *Taq* I permitiu a diferenciação de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* das demais linhagens analisadas, as quais apresentaram perfis de restrição idênticos, enquanto apenas os produtos de PCR de *X. fragariae* apresentaram sítio de restrição para *Dde* I.

Os resultados de análise de restrição de *groEL* referentes a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* encontram-se sumarizados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Resultados da análise de restrição de fragmentos de *groEL* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* utilizando diferentes endonucleases.

Endonuclease	Presença de sítio de restrição	Polimorfismo	Perfil de bandas
<i>Alu</i> I	+	-	Bandas de 180, 280 e 550 pb.
<i>Apa</i> I	-	-	Banda de 1 Kb
<i>Ava</i> II	-	-	Banda de 1 Kb
<i>Bam</i> H I	-	-	Banda de 1 Kb
<i>Dde</i> I	-	-	Banda de 1 Kb
<i>Eco</i> R I	-	-	Banda de 1 Kb
<i>Hae</i> III*	+	+	vide Figura 3.9, 3.11
<i>Hinf</i> I	+	-	Bandas de 400 e 600 pb
<i>Msp</i> I*	+	+	Figura 3.9, 3.10, 3.12
<i>Pst</i> I	-	-	Banda de 1Kb
<i>Rsa</i> I*	+	+	Polimórfico: vide Figura 3.13.
<i>Taq</i> I	+	-	Bandas de 70, 90, 100, 170, 180, 250 pb

*Enzimas que permitem a diferenciação entre *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*.

A digestão dos produtos de amplificação de *groEL* com *Rsa* I gerou padrões de bandas idênticos para *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, os quais diferiram dos padrões obtidos para *X. campestris* pv. *campestris* e *X. vesicatoria*. *X. fragariae* apresentou um padrão diferente dos demais, com bandas de 150, 350 e 500 pb (dados não apresentados).

A maioria das linhagens analisadas puderam ser diferenciadas através dos padrões de restrição gerados com a enzima *Hae* III. Os padrões polimórficos obtidos para *X. axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. fragariae* e *X. vesicatoria* encontram-se na Figura 3.9-A, sendo que as linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. campestris* pv. *campestris* (amostras 2 e 3) apresentaram perfis de restrição idênticos. A digestão com *Msp* I gerou perfis de restrição diferentes para as linhagens testadas, exceto para *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, que apresentaram perfis idênticos (Figura 3.9-B, amostras 1 e 4, respectivamente).

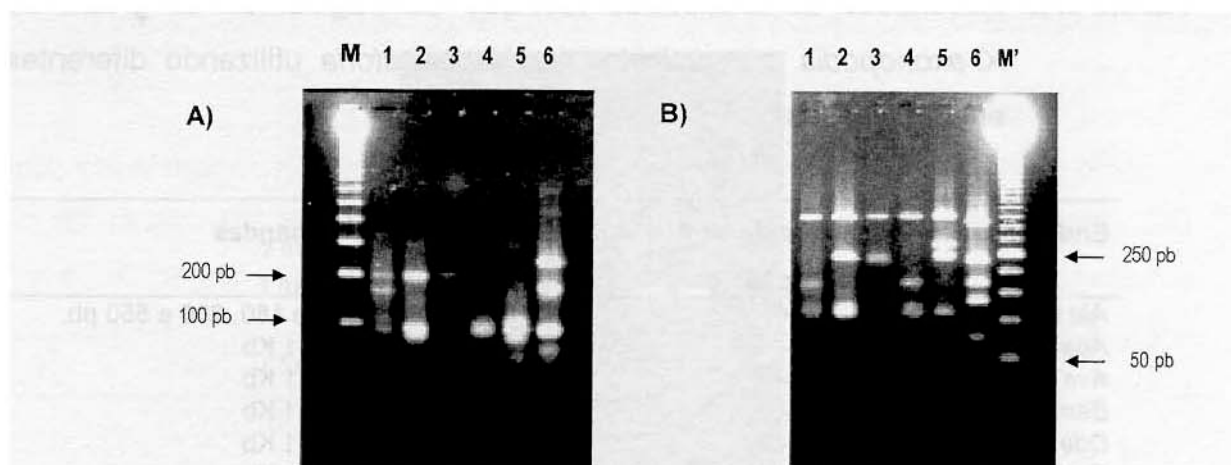


Figura 3.9. Padrões de RFLP de *groEL* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. fragariae* e *X. vesicatoria*.

DNA de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538 (1), *X. campestris* pv. *campestris* LMG 568 (2), *X. vesicatoria* LMG 911 (3), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (4), *X. fragariae* LMG 708 (5) e operon *groELS* de *Caulobacter* sp. (6), digerido com *Hae* III (A) e *Msp* I (B). M: 100 pb; M': 50 pb ladder (Pharmacia).

A análise de polimorfismos de restrição de *groEL* de diversas linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* patogênicas para tomate e pimentão obtida com as enzimas *Msp* I e *Rsa* I resultou em padrões polimórficos que permitiram a diferenciação das linhagens em dois grupos (Figura 3.10). As linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* analisadas apresentaram o mesmo padrão de restrição da linhagem-referência *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, enquanto as linhagens de *X. vesicatoria* apresentaram perfil idêntico ao da linhagem-tipo *X. vesicatoria* LMG 911^T. A banda de cerca de 300 pares de base que aparece na Figura 3.10-B, amostras 11, 12, 13 e 15, apareceu em algumas amostras como fragmento residual de amplificação, não-específica, não sendo resultado das digestões.

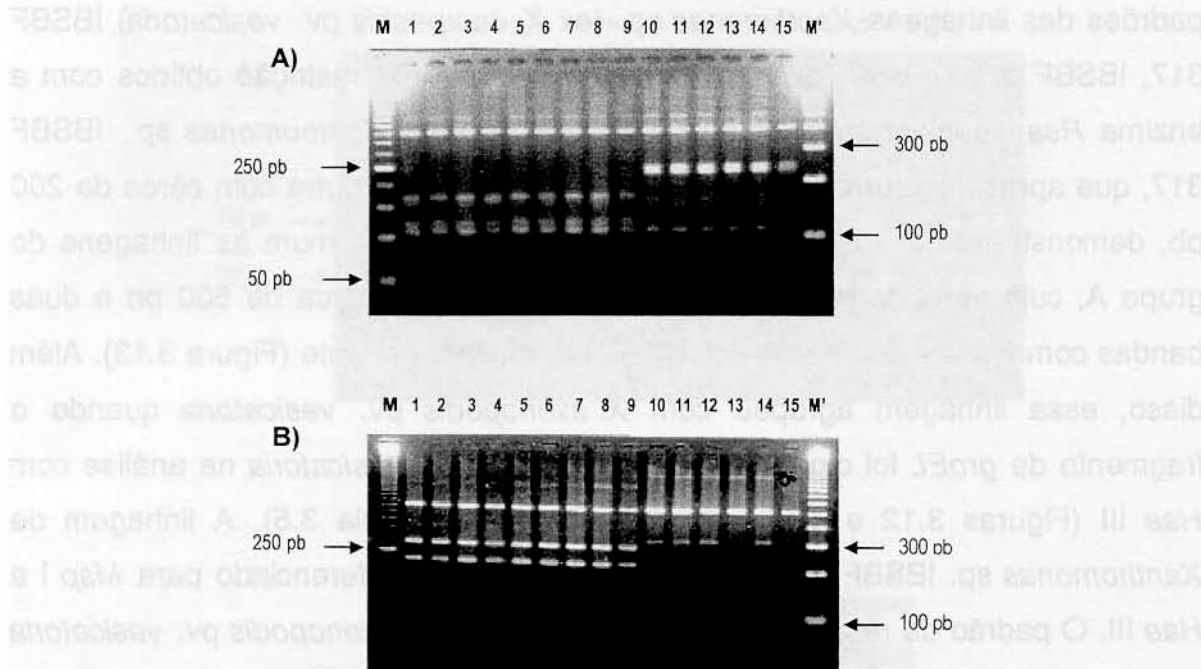


Figura 3.10. Padrões de RFLP de *groEL* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*.

DNA de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 667, LMG 668, LMG 906, LMG 909, LMG 910, LMG 913, LMG 914, LMG 922 e LMG 929 (1-9) e *X. vesicatoria* LMG 911, LMG 916, LMG 917, LMG 919, LMG 920 e LMG 935 (10-15), digeridos com *Msp* I (A) e *Rsa* I (B). M: 50 pb ladder, M': 100 bp ladder (Pharmacia).

As análises de restrição de fragmentos de *groEL* com a enzima *Hae* III resultaram nos mesmos agrupamentos (Tabela 3.5).

A análise de polimorfismo de *groEL* de 32 linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) isoladas no estado de São Paulo com as enzimas *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I resultou na diferenciação destas em dois grupos distintos, correspondentes a organismos que apresentaram padrão de polimorfismo idêntico ao de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 ou ao de *X. vesicatoria* LMG 911^T (Figuras 3.11, 3.12 e 3.13, e Tabela 3.5).

Foram detectados, ainda, três padrões de polimórficos, representados pelos padrões das linhagens *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978 (*outliers*). Os padrões de restrição obtidos com a enzima *Rsa* I permitiram a diferenciação da linhagem *Xanthomonas* sp. IBSBF 317, que apresentou uma banda com cerca de 800 pb e outra com cerca de 200 pb, demonstrando a ausência de um sítio de restrição comum às linhagens do grupo A, cujo perfil de restrição inclui uma banda com cerca de 500 pb e duas bandas com aproximadamente 300 e 200 pb, respectivamente (Figura 3.13). Além disso, essa linhagem agrupou com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* quando o fragmento de *groEL* foi digerido com *Msp* I, e com *X. vesicatoria* na análise com *Hae* III (Figuras 3.12 e 3.11, respectivamente, e Tabela 3.5). A linhagem de *Xanthomonas* sp. IBSBF 925 apresentou polimorfismo diferenciado para *Msp* I e *Hae* III. O padrão de restrição foi semelhante ao de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* na análise com *Msp* I, com uma banda de 250 pb e ausência de banda com 120 pb, além de vários fragmentos com tamanho menor que 100 pb (Figura 3.12 e Tabela 3.5). Contudo, esta linhagem apresentou padrão semelhante ao de *X. vesicatoria* quando digerida com *Hae* III, com a presença de uma banda de cerca de 170 pb e ausência de fragmentos menores que 100 pb (Figura 3.11 e Tabela 3.5). *Xanthomonas* sp. IBSBF 925 agrupou com *X. vesicatoria* quando o fragmento foi digerido com *Rsa* I (Figura 3.13 e Tabela 3.5). *Xanthomonas* sp. IBSBF 978 foi agrupada com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* quando o fragmento de *groEL* foi digerido com *Msp* I (Figura 3.12 e Tabela 3.5) e com *X. vesicatoria* quando digerido com *Hae* III ou *Rsa* I (Figuras 3.11 e 3.13, respectivamente, e Tabela 3.5).

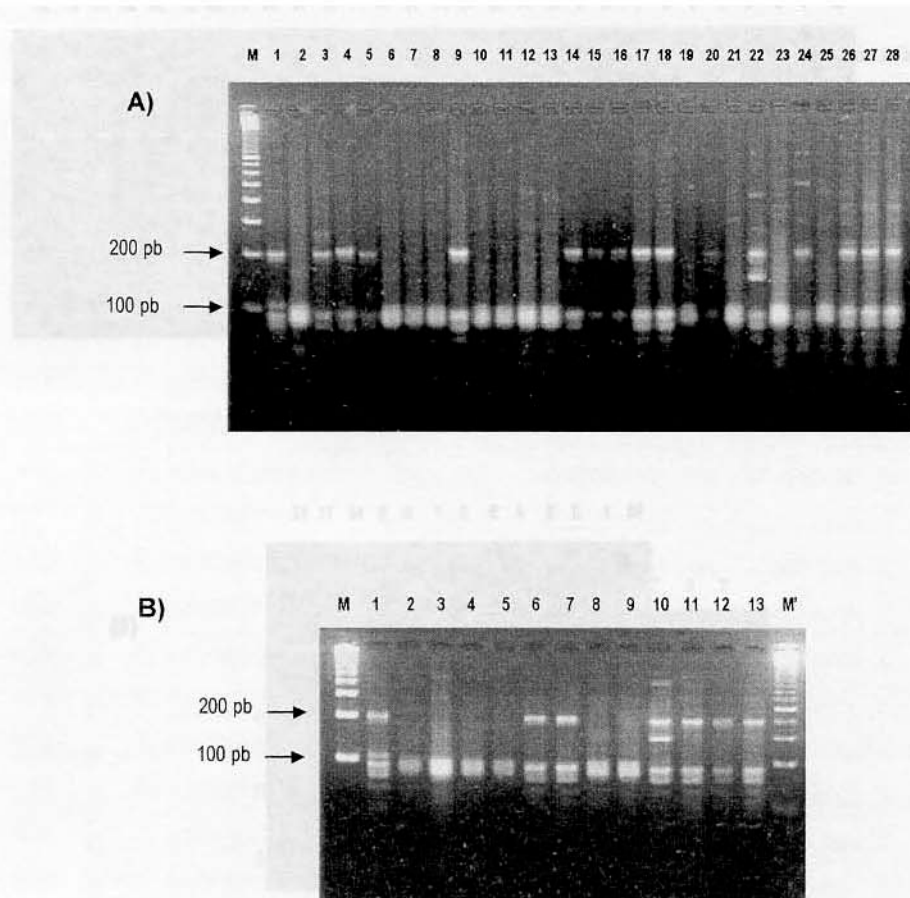


Figura 3.11. Padrões de RFLP de *groEL* de isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (ex *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) obtidos com *Hae* III.

DNA de *X. vesicatoria* LMG 911 (A-1 e B-1), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (A-2 e B-2), *Xanthomonas* sp. XV441, *Xanthomonas* sp. IBSBF 251, IBSBF 317, IBSBF 345, IBSBF 346, IBSBF 400, IBSBF 407, IBSBF 411, IBSBF 412, IBSBF 414, IBSBF 415, IBSBF 418, IBSBF 420, IBSBF 427, IBSBF 465, IBSBF 479, IBSBF 483, IBSBF 484, IBSBF 486, IBSBF 925, IBSBF 948, IBSBF 978, IBSBF 1145, IBSBF 1165, IBSBF 1196 e IBSBF 1208 (A-3 a A-28, respectivamente); IBSBF 331, IBSBF 332, IBSBF 401, IBSBF 419, IBSBF 433, IBSBF 478, IBSBF 646, IBSBF 925, IBSBF 978, IBSBF 317 e IBSBF 317-duplicata (B-3 a B-13, respectivamente); M: 100 pb ladder, M': 50 pb ladder (Pharmacia).

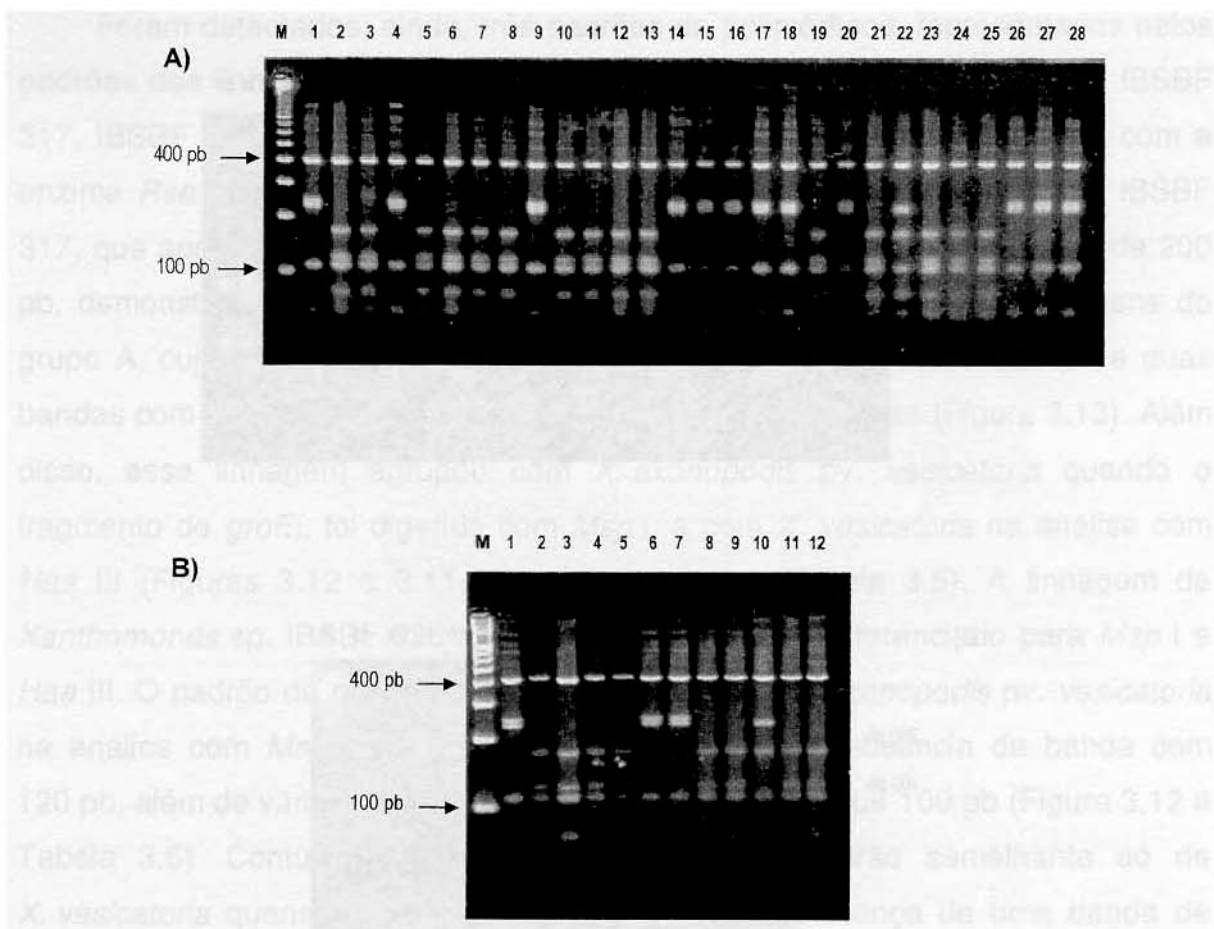


Figura 3.12. Padrões de RFLP de *groEL* de isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (ex *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) obtidos com *Msp* I.

DNA de *X. vesicatoria* LMG 911 (A-1 e B-1), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (A-2 e B-2), *Xanthomonas* sp. XV441, *Xanthomonas* sp. IBSBF 251, IBSBF 317, IBSBF 345, IBSBF 346, IBSBF 400, IBSBF 407, IBSBF 411, IBSBF 412, IBSBF 414, IBSBF 415, IBSBF 418, IBSBF 420, IBSBF 427, IBSBF 465, IBSBF 479, IBSBF 483, IBSBF 484, IBSBF 486, IBSBF 925, IBSBF 948, IBSBF 978, IBSBF 1145, IBSBF 1165, IBSBF 1196 e IBSBF 1208 (A-3 a A-28, respectivamente); IBSBF 331, IBSBF 332, IBSBF 401, IBSBF 419, IBSBF 433, IBSBF 478, IBSBF 646, IBSBF 925, IBSBF 978 e IBSBF 317 (B-3 a B-12, respectivamente); M: 100 pb ladder (Pharmacia).

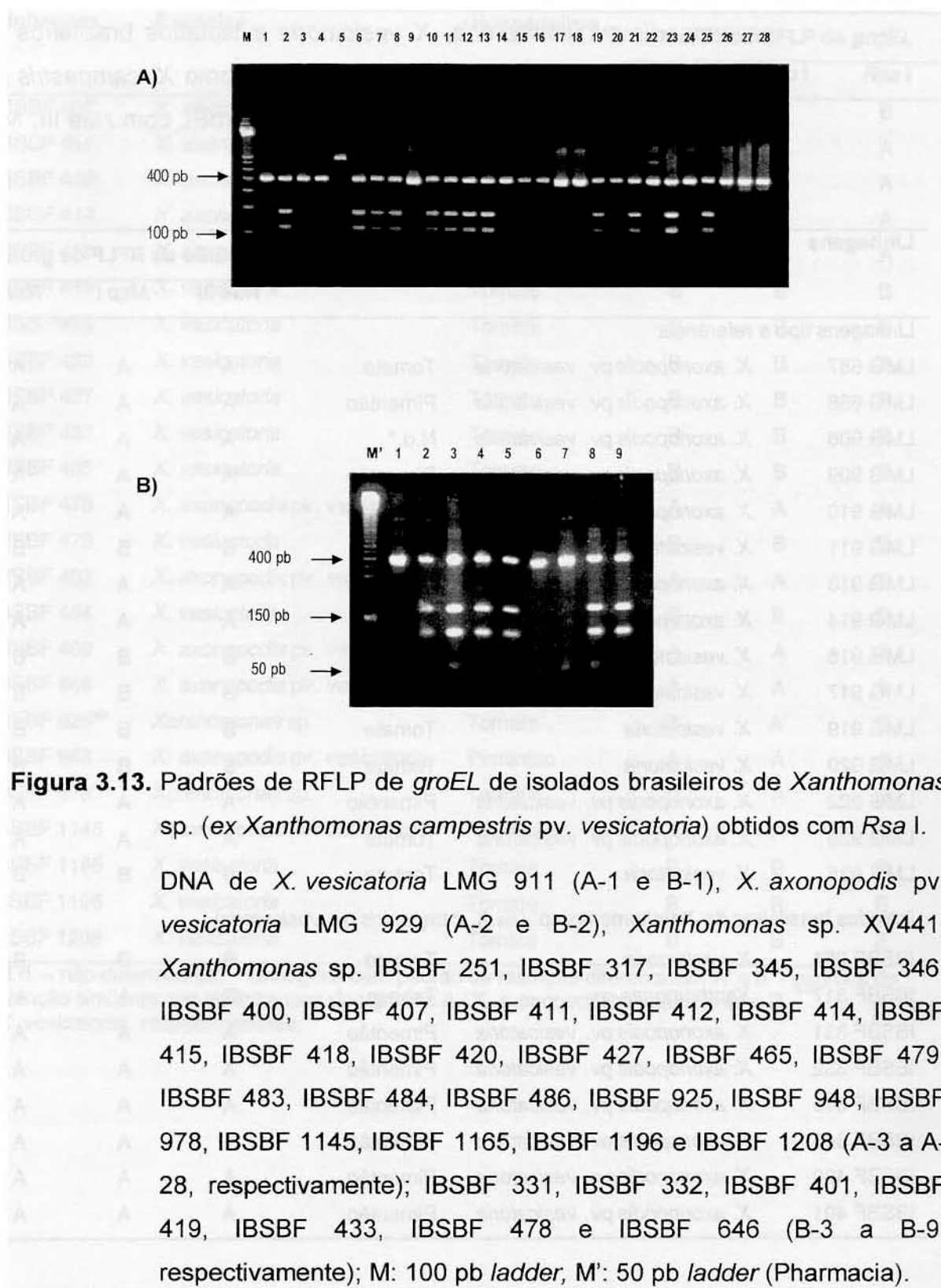


Tabela 3.5. Classificação de linhagens-tipo e referência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (previamente identificados como *X. campestris* pv. *vesicatoria*) baseada na análise de RFLP de *groEL* com *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I.

Linhagens	Espécies	Hospedeiros	Padrão de RFLP de <i>groEL</i>		
			<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
Linhagens tipo e referência					
LMG 667	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
LMG 668	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 906	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	N.d.*	A	A	A
LMG 909	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 910	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 911	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 913	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 914	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
LMG 916	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 917	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 919	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 920	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
LMG 922	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
LMG 929	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
LMG 935	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
Isolados brasileiros de <i>Xanthomonas</i> sp. (ex <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>)					
IBSBF 251	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 317**	<i>Xanthomonas</i> sp.	Tabaco	B	A	A'
IBSBF 331	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 332	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 345	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 346	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 400	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 401	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A

Tabela 3.5. Continuação.

Linhagens	Espécies	Hospedeiros	Padrão de RFLP de <i>groEL</i>		
			<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
IBSBF 407	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 411	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 412	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 414	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 415	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 418	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 419	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 420	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 427	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 433	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 465	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 478	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 479	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 483	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
IBSBF 484	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 486	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomate	A	A	A
IBSBF 646	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 925**	<i>Xanthomonas</i> sp.	Tomate	B'	A'	B
IBSBF 948	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 978**	<i>Xanthomonas</i> sp.	Tomate	B	A	B
IBSBF 1145	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Pimentão	A	A	A
IBSBF 1165	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 1196	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B
IBSBF 1208	<i>X. vesicatoria</i>	Tomate	B	B	B

*N.d. = não determinado; **Linhagens com padrão de restrição diferenciado; A' e B' - padrões de restrição similares aos de linhagens dos grupos A (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*) e B (*X. vesicatoria*), respectivamente.

3.3.2. Caracterização de linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) atípicas (grupo *nonA/nonB*)

Os DNAs genômicos das linhagens referência e tipo de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria*, respectivamente, e das linhagens atípicas de *Xanthomonas* sp. do grupo *nonA/nonB* foram amplificados com os *primers* degenerados Hsp 605 e Hsp 603 para o gene *groEL*, gerando fragmentos de cerca de 1 Kb (Figura 2.2).

Os produtos de amplificação foram posteriormente digeridos com *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I. O padrão de bandas das linhagens de *Xanthomonas* sp. XV440 e XV441 foi distinto dos demais. Estes organismos agruparam com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* na análise com *Msp* I e com *X. vesicatoria* com *Rsa* I (Figura 3.14-B e 3.14-C). Bandas de menor intensidade podem ser observadas nos perfis das amostras XV440 e XV441 (Figura 3.14-B e 3.14-C, amostras 7 e 8), provavelmente decorrentes de digestão parcial das mesmas (essas bandas não aparecem em repetições de PCR/RFLP dessas linhagens – Figuras 3.12 e 3.13, amostra 3). A restrição com a enzima *Hae* III (Figura 3.14-A) evidenciou perfis de bandas diferenciados para as linhagens de *Xanthomonas* sp. XV440 e XV441, similares ao de *X. vesicatoria* (grupo B). Uma réplica do perfil de restrição da linhagem XV441 encontra-se representado na Figura 3.11 (amostra 3). O alinhamento das sequências de fragmentos *groEL* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *Xanthomonas* sp. XV441, IBSBF 317, IBSBF 925, IBSBF 978 e *X. vesicatoria* LMG 911, com os sítios de restrição das enzimas *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I em destaque, estão apresentados na Figura 3.18.

As demais linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) do grupo *nonA/nonB* apresentaram padrões de polimorfismo idênticos aos de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* nas análises com as três enzimas utilizadas, exceto a linhagem *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* BV5-4a, que apresentou sempre o perfil de bandas de *X. vesicatoria*.

Os resultados de caracterização de polimorfismo de *groEL* das linhagens atípicas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* do grupo *nonA/nonB* encontram-se representados na Figura 3.14 e sumarizados na Tabela 3.6.

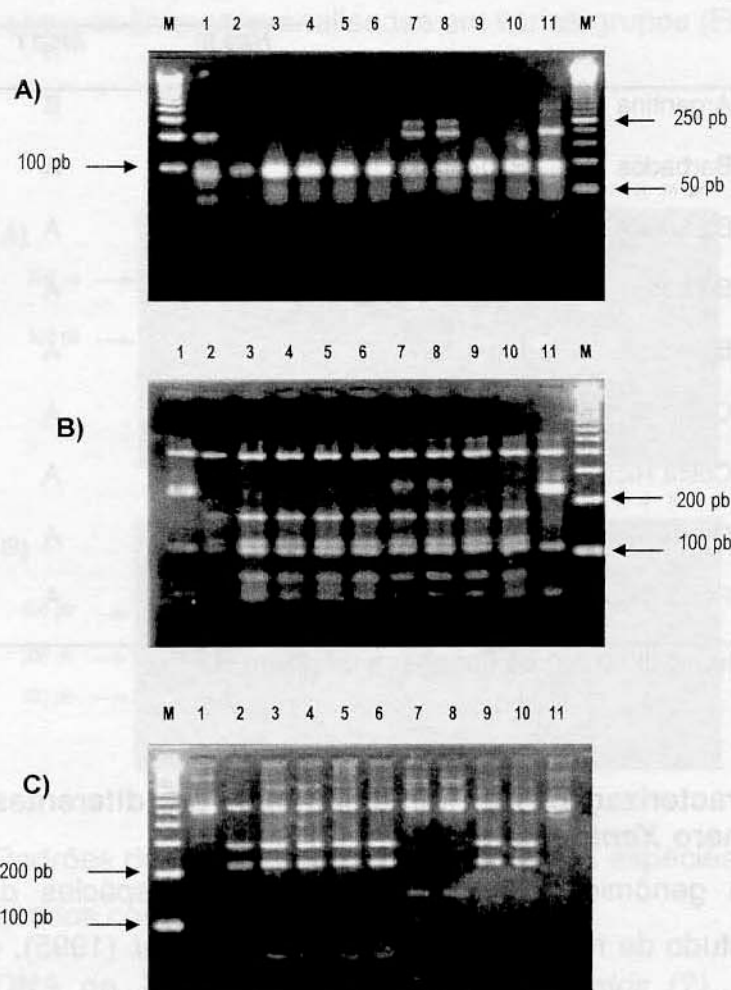


Figura 3.14. Padrões de RFLP de *groEL* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) atípicas do grupo *nonA/nonB*.

DNA de *X. vesicatoria* LMG 911 (1), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 (2), linhagens atípicas XV330, XV334, XV338, XV343, XV440, XV441, XV560, XV655 e BV5-4a (3-11, respectivamente), digeridos com *Hae* III (A), *Msp* I (B) e *Rsa* I (C); M: 100 pb ladder, M': 50 pb ladder (Pharmacia).

Tabela 3.6. Classificação de linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* atípicas (*nonA/nonB*) baseada na análise de RFLP de *groEL* com *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I.

Linhagem	Origem	Hospedeiro	Padrão de RFLP de <i>groEL</i>		
			<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
BV5-4b	Argentina	Tomate	B	B	B
XV330	Barbados	Pimentão	A	A	A
XV334	Barbados	Pimentão	A	A	A
XV338	Barbados	Pimentão	A	A	A
XV343	Barbados	Pimentão	A	A	A
XV440	Costa Rica	Tomate	B*	A	B
XV441	Costa Rica	Tomate	B*	A	B
XV560	Guatemala	Tomate	A	A	A
XV655	Porto Rico	Pimentão	A	A	A

* padrão ligeiramente diferente de linhagens do grupo B

3.3.3. Caracterização de linhagens-tipo de diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*

Os DNAs genômicos de linhagens-tipo das espécies de *Xanthomonas* descritas no estudo de reclassificação de Vauterin *et al.* (1995), com exceção de *X. populi*, foram amplificados por PCR com o par de *primers* Hsp603 e Hsp605 para *groEL*. *Stenotrophomonas maltophilia* e *Xylella fastidiosa*, organismos filogeneticamente relacionados a bactérias do gênero *Xanthomonas*, foram também incluídos nas análises como referências de *outgroups*.

As enzimas utilizadas nos estudos preliminares de restrição dos fragmentos de amplificação de *groEL* incluíram: *Ava* II, *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I e *Rsa* I. As enzimas *Hae* III e *Msp* I foram selecionadas para caracterização dos produtos de amplificação do gene *groEL* das diferentes espécies de *Xanthomonas* por

permitirem a detecção de polimorfismos entre as linhagens analisadas (dados não apresentados).

Os perfis de restrição obtidos com *Hae* III e *Msp* I para 19 espécies do gênero *Xanthomonas* evidenciaram a existência de polimorfismos que permitem a diferenciação entre as linhagens analisadas em vários grupos (Figura 3.15).

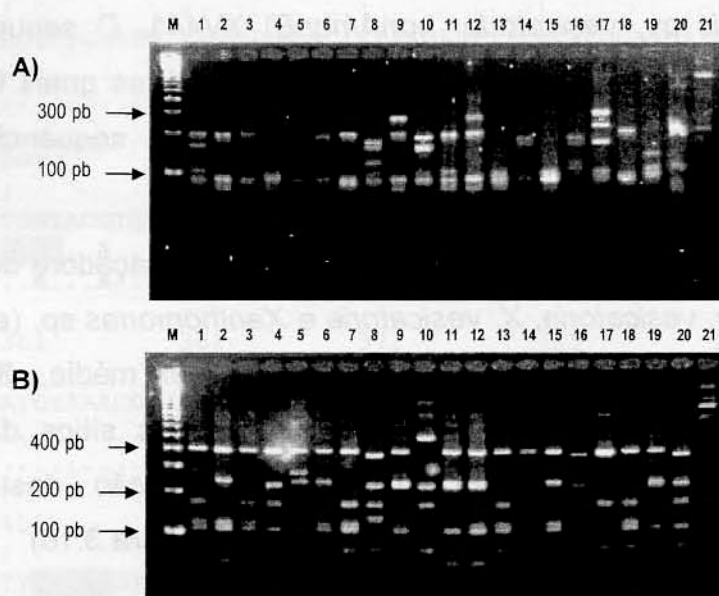


Figura 3.15. Padrões de RFLP de *groEL* de diferentes espécies de *Xanthomonas* obtidos com *Hae* III (A) e *Msp* I (B).

DNA de *X. axonopodis* (1), *X. campestris* (2), *X. cassavae* (3), *X. cucurbitae* (4), *X. fragariae* (5), *X. hortorum* (6), *X. vasicola* (7), *X. hyacinthi* (8), *X. pisi* (9), *X. translucens* (10), *X. vesicatoria* (11), *X. bromi* (12), *X. codiae* (13), *X. theicola* (14), *X. melonis* (15), *X. sacchari* (16), *X. albilineans* (17), *X. arboricola* (18), *X. oryzae* (19), *Stenotrophomonas maltophilia* (20) e *Xylella fastidiosa* (21); M: 100 pb ladder (Pharmacia).

3.4. Análise Filogenética de Sequências da Região Espaçadora rDNA 16S-23S e Gene *groEL*

3.4.1. Análise de sequências da região espaçadora rDNA 16S-23S de linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão

Inicialmente, foi realizado o sequenciamento de fragmentos de região espaçadora rDNA16S-23S das linhagens-tipo *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *X. vesicatoria* LMG 911, além da linhagem atípica de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *nonA/nonB*) XV441. O sequenciamento dos fragmentos resultou em aproximadamente 920 bases, as quais foram alinhadas utilizando o programa ClustalW. O alinhamento das sequências encontra-se representado na Figura 3.16.

A análise preliminar das sequências de região espaçadora das linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) XV441 revelou diferenças de, em média, 35 nucleotídeos (aproximadamente 3,6%) entre estes organismos. Os sítios das enzimas de restrição utilizadas na caracterização e diferenciação destes organismos encontram-se destacados nas sequência alinhadas (Figura 3.16).

1	11	21	31	41	50	
Spacer911	CGTCTTGCGG	GCGTCCTCAC	AAATTACCTG	CATTCAGAGA	TTCATACCGG	
Spacer929	-----..				.G.G..T...	
Spacer441	-.....					
	51	61	71	81	91	100
Spacer911	CACAGGTCGG	TATGCGAA-G	TCCCTTT-TG	GGGCCTTAGC	TCAGCTGGGA	
Spacer929	C..A	A.	A.CA..			
Spacer441						
	101	111	121	131	141	150
Spacer911	GAGCACCTGC	TTTGCAAGCA	GGGGGTCGTC	GGTTCGATCC	CGACAGGCTC	
Spacer929						
Spacer441						

	151	161	171	181	191	200
Spacer911	CACCATATTG	AGTGA AAAAGA	CTTCGGGTCT	GTAGCTCAGG	TGGTTAGAGC	
Spacer929	-....	C..	...T.....			
Spacer441						
	201	211	221	231	241	250
Spacer911	GCACCCCTGA	TAAGGGTGAG	GTCGGTAGTT	CGAGTCTACC	CAGACCCACC	
Spacer929			G...	CT..		
Spacer441						
	251	261	271	281	291	300
Spacer911	ACTCTGAATG	TAGTGCACAC	TTAAGAATTT	ATACGGATCA	GCGTTGAGGC	
Spacer929				...T..C...		
Spacer441				...T.....		
	301	311	321	331	341	350
Spacer911	TGGTACGTGT	TCTTTTATAA	CTTGTGACGT	AGCGAGCGTT	TGAGATATCT	
Spacer929	..AG..A...					
Spacer441	..A...A...					
	351	361	371	381	391	400
Spacer911	ATCTAAACGT	GTCGTTGAGG	CTAAGGCGGG	GACTTCGAGT	CCCTAAATAA	
Spacer929						
Spacer441						
	401	411	421	431	441	450
Spacer911	TTGAGTCGTA	TGTTTCGCGTT	GGTGGCTTTG	TACCCACAC	AACACGTACA	
Spacer929					G-	
Spacer441					A-	
	451	461	471	481	491	500
Spacer911	TGTAGCTCCG	AGGCAACTTG	GGGTTATATG	GTCAAGCGAA	TAAGCGCACA	
Spacer929	..--A.C.T..					
Spacer441	A.....					
	501	511	521	531	541	550
Spacer911	CGGTGGATGC	CTAGGCGGTC	AGAGGCGATG	AAGGACGTGG	TAGCCTGCGA	
Spacer929						
Spacer441						
	551	561	571	581	591	600
Spacer911	AAAGTGTCGG	GGAGCTGGCA	ACAAGCTTTG	ATCCGGCAAT	ATCCGAATGG	
Spacer929		T.....				
Spacer441						

	601	611	621	631	641	650
Spacer911						
Spacer911	GGAAACCCAC	TGCTTCGGCA	GTATCCTGCA	GTGAATTCAT	AGCTGCTGGA	
Spacer929						
Spacer441						
	651	661	671	681	691	700
Spacer911						
Spacer911	AGCGAACCCG	GTGAACTGAA	ATATCTAAGT	AACCGGAGGA	AAAGAAATCA	
Spacer929						
Spacer441						
	701	711	721	731	741	750
Spacer911						
Spacer911	ACCGAGATTC	CCTAAGTAGT	GACGAGCGAA	CGGGGAACAG	CCCTTAAGCT	
Spacer929				G.....		
Spacer441				G.....		
	751	761	771	781	791	800
Spacer911						
Spacer911	GGAATGGCTT	TAGAAAAACA	ATCTGGAAAG	ATTGGCCATA	GAAGGTGATA	
Spacer929						
Spacer441						
	801	811	821	831	841	850
Spacer911						
Spacer911	GCCCTGTATT	TAAAAGGGCC	ACTCCAGTGA	AGACGAGTAG	GGCGGGGCAC	
Spacer929						
Spacer441						
	851	861	871	881	891	900
Spacer911						
Spacer911	GTGAAACCCT	GTCTGAATAT	GGGGGGACCA	TCCTCCAAGG	CTAAATACTC	
Spacer929						
Spacer441						
	901	911	921			
Spacer911						
Spacer911	CTGACCGACC	GATAGTGAAC	CAG			
Spacer929						
Spacer441						

Figura 3.16. Sequências de região espaçadora rDNA 16S-23S de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) XV441 e *X. vesicatoria* LMG 911.

Os sítios de enzimas de restrição e posições polimórficas encontram-se destacados: *Alu* I em cinza, *Dde* I em rosa, *Hae* III em amarelo e *Hinf* I em azul.

A análise filogenética das sequências de região espaçadora rDNA 16S-23S de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *X. vesicatoria* LMG 911 e *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV441, incluindo dados de sequência relativos a outras linhagens de *Xanthomonas* disponíveis no GenBank, foi realizada através do método de *Neighbor-Joining*, evidenciando o agrupamento dos organismos analisados em 9 *clusters* (Figura 3.17).

X. vesicatoria LMG 911 foi alocada a um *cluster* compreendido por *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* XV111, próximo ao grupo representado por *X. cucurbitae* e *X. pisi*.

X. campestris pv. *vesicatoria* XV441 agrupou próxima a “*X. gardneri*”, mostrando-se relativamente relacionada ao primeiro *cluster* de *X. vesicatoria* LMG 911.

X. axonopodis pv. *vesicatoria* LMG 929 foi agrupada com a linhagem de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* XV338, representante do chamado grupo A1 ou Ami-A (Bouzar *et al.*, 1999) em um *cluster* distante, incluindo também linhagens dos patovares *dieffenbachiae* e *physalidicola*.

As duas linhagens de *X. campestris* pv. *zinniae* foram alocadas a um grupo distinto, o mesmo acontecendo com duas das três linhagens de *X. campestris* pv. *vitians*, que foram agrupadas próximas a uma linhagem isolada de *X. campestris* pv. *campestris*. A terceira linhagem de *X. campestris* pv. *vitians* foi colocada próxima a uma linhagem de *X. campestris* pv. *glycines* e *X. campestris* pv. *citri*. Este último *cluster* foi colocado na proximidade do *cluster* representado pela linhagem *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929.

Deve ser ressaltado que a nomenclatura das linhagens apresentadas nesta análise reflete o nome com os quais as sequências da região espaçadora 16S-23S estão depositadas no GenBank, não estando, necessariamente, de acordo com a proposta por Vauterin *et al.* (1995), aceita como válida no momento.

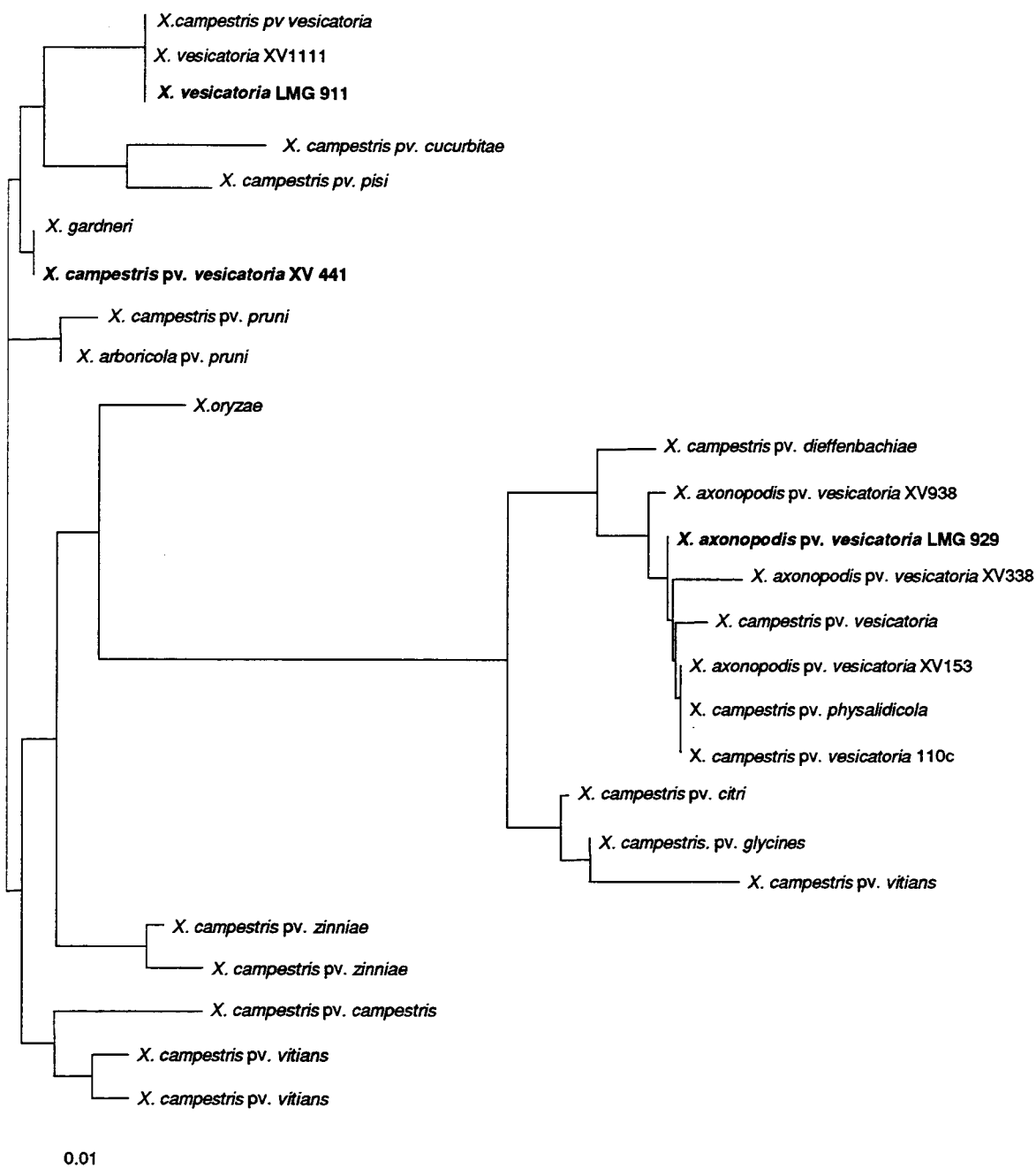


Figura 3.17. Árvore filogenética obtida a partir da análise por Jukes e Cantor/*Neighbor-Joining* de sequências de região espaçadora 16S-23S de linhagens de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão e organismos-referência.

3.4.2. Análise de sequências do gene *groEL* de linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão

Os fragmentos de *groEL* das linhagens-referência e tipo dos grupos A e B, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *X. vesicatoria* LMG 911, além da linhagem atípica *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV441, e três linhagens brasileiras atípicas diferenciadas nas análises de RFLP de *groEL*, foram sequenciados. O sequenciamento dos fragmentos resultou em aproximadamente 960 bases, as quais foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Figura 3.18).

As análises de sequência de *groEL* revelaram que a diferença entre as seis linhagens estudadas variou entre 22 a 45 nucleotídeos. As sequências do gene apresentaram diversas regiões de posições variáveis e sítios de restrição polimórficos (Figura 3.18).

	1	11	21	31	41	50
GroEL911						
GroEL929	-----CT	TCGGCGCGCC	GACCATCACC	AAGGACGGCG	TCTCCGTCGC	
GroEL441	TCGAAAGA..	..	..	..	.T.....	
GroEL978	A..	..	..	..	.T.....	
GroEL925	--	-----	..	..	..	
GroEL317	A..	..	..	..	..	
	51	61	71	81	91	100
GroEL911						
GroEL929	CAAGGAAATC	GAAGTGGCTG	ACAAGTTCGA	GAACATGGGC	GCGCAGATGG	
GroEL441		C				
GroEL978						
GroEL925						
GroEL317						
	101	111	121	131	141	150
GroEL911						
GroEL929	TCAAGGAAGT	TGCTTCCAAG	ACCAATGACA	ACGCTGGCGA	CGGCACCACC	
GroEL441		C..G.....	C.....	C.....		
GroEL978	.G.....	C..G..GCGC	C.....	C.....		
GroEL925		C.....	C.....	C.....		
GroEL317		C.....	C.....	C.....		

	151	161	171	181	191	200
GroEL911	ACCGCCACCG	TGCTGGCCCA	GGCCCTGATC	CGCGAAGGCG	CCAAGGCCGT	
GroEL929						
GroEL441					T..	
GroEL978					T..	
GroEL925					T..	
GroEL317					T..	
	201	211	221	231	241	250
GroEL911	GGCCGCCGGC	ATGAACCCGA	TGGACCTCAA	GCGCGGTATC	GACCAGGCCG	
GroEL929				T..		
GroEL441						
GroEL978						
GroEL925						
GroEL317						
	251	261	271	281	291	300
GroEL911	TCAAGGCCGC	CGTCATCGAG	CTGAAGAACA	TCTCCAAGCC	CACCACCGAC	
GroEL929	T..	G...G....				
GroEL441			C			
GroEL978		G..				
GroEL925		GC..				
GroEL317						
	301	311	321	331	341	350
GroEL911	GACAAGGCGA	TTGCCCAGGT	CGGCACCATC	TCGGCCAACT	CGGACGAATC	
GroEL929			T..		G..	
GroEL441					G..	
GroEL978					G..	
GroEL925					G..	
GroEL317					G..	
	351	361	371	381	391	400
GroEL911	GATCGGCAAC	ATCATTGCCG	AAGCGATGCA	GAAGGTCGGC	AAGGAAGGCG	
GroEL929			A..			
GroEL441						
GroEL978						
GroEL925						
GroEL317						
	401	411	421	431	441	450
GroEL911	TGATCACCCT	TGAAGAAGGC	TCGGCCCTGG	AAAACGAGCT	GGACGTGGTC	
GroEL929						
GroEL441						
GroEL978						
GroEL925	C.....					
GroEL317						

	451	461	471	481	491	500
GroEL911	GAGGGCATGC	AGTTCGATCG	CGGCTATCTC	TCCCCGTACT	TCATCAACAA	
GroEL929		C..	C...			
GroEL441			...T..C...			
GroEL978			C...			
GroEL925			C...		T..	
GroEL317			C...	T.		
	501	511	521	531	541	550
GroEL911	CCAGCAGAGC	CAGTCGGCCG	ACCTGGACGA	CCCGTTCATC	CTGCTGCACG	
GroEL929						
GroEL441			.T.			
GroEL978						
GroEL925						
GroEL317						
	551	561	571	581	591	600
GroEL911	ACAAGAAGAT	CTCCAACGTG	CGCGATCTGC	TGCCCGTGCT	GGAAGGCGTG	
GroEL929			..T..C...			
GroEL441			C...			
GroEL978			C...			
GroEL925		C	..T..C...			
GroEL317		A.....	C...			
	601	611	621	631	641	650
GroEL911	GCCAAGGCGG	GCAAGCCGCT	GCTGATCGTG	GCTGAAGAAG	TCGAAGGCGA	
GroEL929				..C.....		
GroEL441				C		
GroEL978			T	C		
GroEL925						
GroEL317			T	C		
	651	661	671	681	691	700
GroEL911	AGCGCTGGCG	ACGCTGGTGG	TCAACACCAT	CCGCGGCATC	GTCAAGGTCG	
GroEL929		..C.....				
GroEL441		..C.....		...T.....		
GroEL978	...C	..C.....		...T.....		
GroEL925		..C.....				
GroEL317	...C	..C.....		...T.....		
	701	711	721	731	741	750
GroEL911	TAGCCGTCAA	GGCCCGGGGC	TTCGGCGACC	GTCGCAAGGC	GATGCTGGAA	
GroEL929	.G.....	...G.....				
GroEL441	.G.....	...A.....				
GroEL978	.G.....	...A.....				
GroEL925	.G..T.....	...A.....				
GroEL317	.G.....	...A.....				

	751	761	771	781	791	800
GroEL911	GACATGGCCG	TGCTGACCGG	CGGCACCGTG	ATCTCCGAGG	AAGTGGGCCT	
GroEL929			..T..			
GroEL441		..T..				..T..
GroEL978						..T..
GroEL925						
GroEL317			..T..			..T..
	801	811	821	831	841	850
GroEL911	GGCGCTTGAG	AAGGCGACCA	TCAAGGACCT	GGGCGCGCG	AAGAAGGTGC	
GroEL929					..C..	
GroEL441	G..	C..				
GroEL978	G..	C..G.				
GroEL925	G..				..C..	
GroEL317	G..	C..G.				
	851	861	871	881	891	900
GroEL911	AGGTTTCCAA	GGAAACACC	ACCATCATCG	ACGGTGCTGG	CGATTTCGGCC	
GroEL929	...C....			...C..C..	...CA..C..G	
GroEL441	...C....	..G....		...C..C..	...C....	
GroEL978	...C....	..G....		...C..C..	...C....	
GroEL925			..G....	..T..C...		
GroEL317	...C....	..G....		...C..C..	...C....	
	901	911	921	931	941	950
GroEL911	GCGATCGAGT	CGCGCGTCGG	CCAGATCAAG	ACCCAGATCG	AAGACACCTC	
GroEL929	A..	G..				
GroEL441	A.....AG	..C....T..				
GroEL978	A.....AG	..C....T..				
GroEL925						
GroEL317	A.....AG	..C....T..				
	951	961				
GroEL911	GTCCGACTAC	GACCGC				
GroEL929	T...					
GroEL441	T...					
GroEL978	T...	A..				
GroEL925	T...	T				
GroEL317	T...					

Figura 3.18. Sequências de *groEL* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) XV441, IBSBF 317, IBSBF 925, IBSBF 978 e *X. vesicatoria* LMG 911.

Os sítios de enzimas de restrição e posições polimórficas encontram-se destacados: *Hae* III em azul, *Msp* I em amarelo e *Rsa* I em cinza.

A análise filogenética das sequências de *groEL* das linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão, realizadas pelo método de *maximum likelihood* (DNA ML), resultou em uma árvore filogenética esparsa, apresentada na Figura 3.19.

A linhagem *X. vesicatoria* LMG 911 foi alocada próxima ao organismo atípico *X. campestris* pv. *vesicatoria* IBSBF 925. A linhagem *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 foi colocada em um *cluster* separado dos demais (Figura 3.19).

Os organismos atípicos de *X. campestris* pv. *vesicatoria* IBSBF 317 e IBSBF 978 mostraram-se bastante próximos, com pouca variação nas sequências de *groEL*, mostrando-se relacionadas à linhagem atípica *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV441.

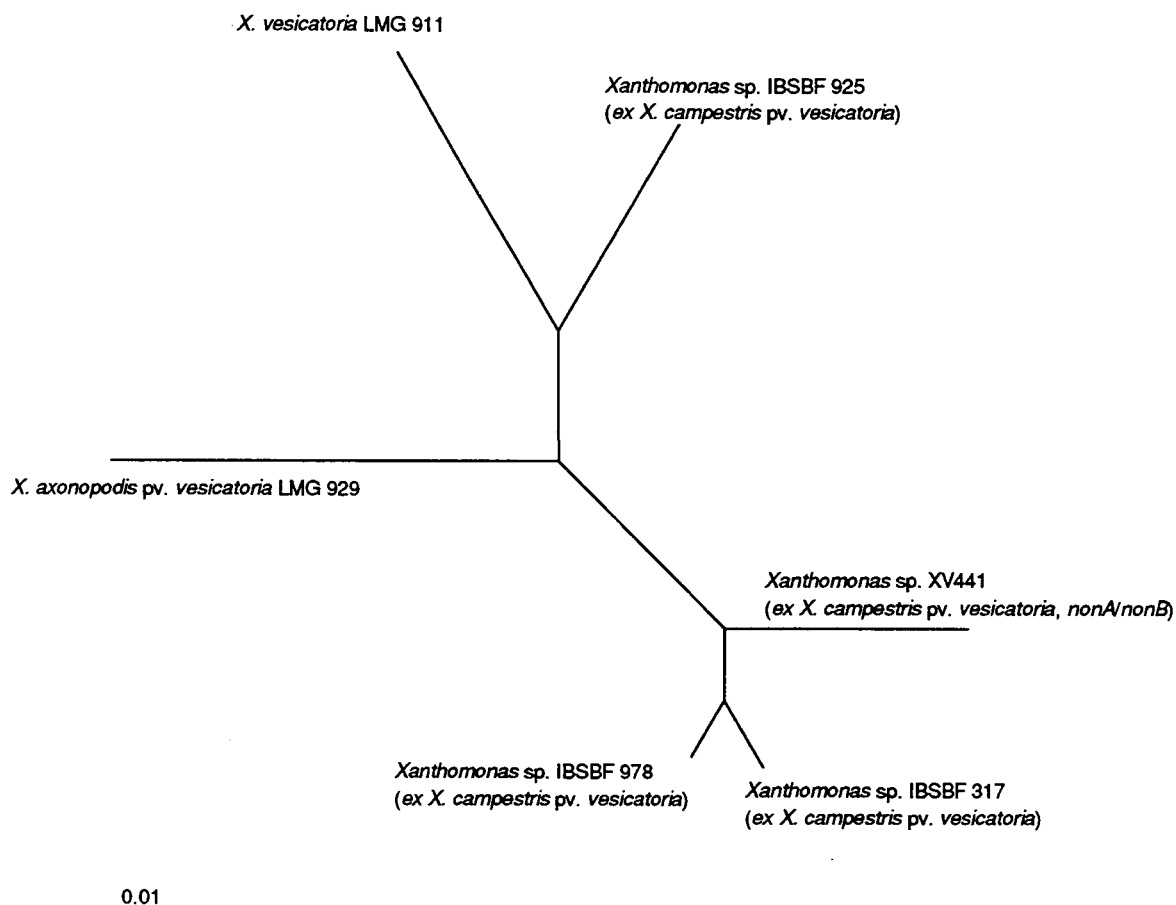


Figura 3.19. Árvore filogenética obtida a partir da análise por DNA-ML de sequências de *groEL* de linhagens de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão e linhagens atípicas.

3.4.3. Análise de sequências de *groEL* de linhagens-tipo de diferentes espécies de *Xanthomonas* spp.

Foram determinadas as sequências parciais (360 a 600 pb) de *groEL* de 15 linhagens representantes de espécies-tipo de *Xanthomonas*, incluindo: *X. albilineans*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria* (dados adicionais sobre as linhagens encontram-se apresentadas na Tabela 2.1). A análise filogenética das sequências parciais de *groEL* estão apresentadas na Figura 3.20.

A árvore filogenética obtida na análise de Jukes-Cantor/*neighbour joining* das sequências parciais do gene *groEL* (360 pares de base), evidenciou o agrupamento das linhagens de *Xanthomonas* estudadas em quatro *clusters* principais.

A linhagem atípica de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria* IBSBF 925) e a linhagem-tipo *X. vesicatoria* LMG 911^T foram alocadas a um mesmo *cluster*, próximas a *X. bromi*, *X. cucurbitae* e *X. pisi*.

Em um segundo *cluster*, encontram-se as linhagens atípicas de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317 e IBSBF 978 e a linhagem-tipo de *X. arboricola*. Este grupo inclui também as linhagens-tipo de *X. campestris* e *X. fragariae*, e a linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV441.

Um terceiro *cluster* compreendeu o agrupamento de *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. sacchari*, *X. theicola* e *X. translucens*, próximas a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, localizada na vizinhança do grupo.

As linhagens de *X. codiae*, *X. oryzae* e *X. vasicola* formaram um grupo distinto dos demais.

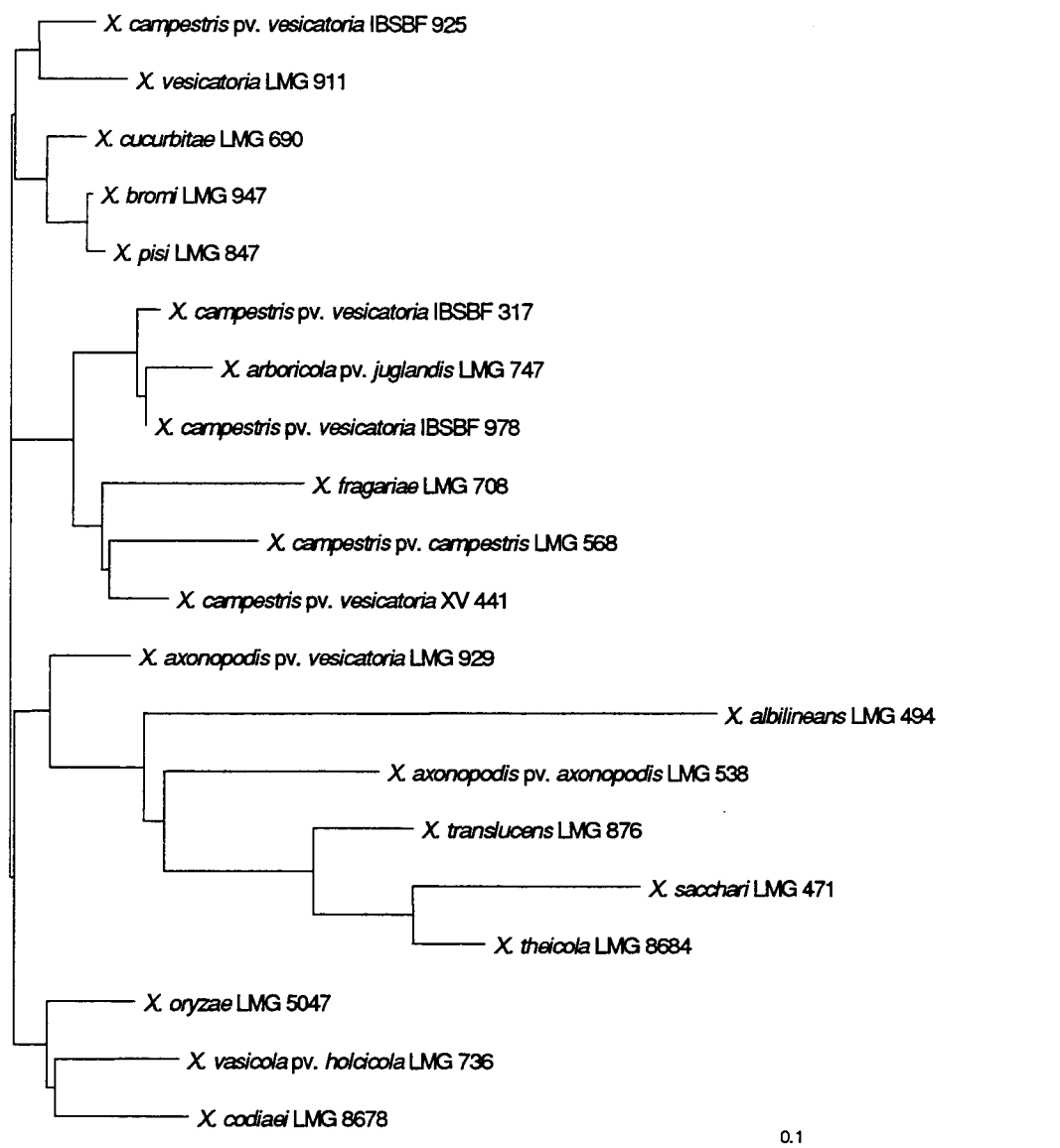


Figura 3.20 Árvore filogenética obtida a partir da análise por Jukes e Cantor/*Neighbor-Joining* de sequências parciais de *groEL* de linhagens-referência de *Xanthomonas* e isolados atípicos.

3.5. Caracterização Fenotípica de Atividade Enzimática de Linhagens-Tipo e Isolados Atípicos de *Xanthomonas* spp. Patogênicas para Tomate e Pimentão

As linhagens-referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *X. vesicatoria* LMG 911, linhagens atípicas de *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*, grupo *nonA/nonB*) XV441 e isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 433, IBSBF 486, IBSBF 925 e IBSBF 978, foram analisadas quanto à atividade das enzimas extracelulares: amilase, celulase, pectinase e protease. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.7.

As linhagens *X. vesicatoria* LMG 911 e *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 433 promoveram a degradação de amido após 24 horas de incubação, o mesmo acontecendo com as linhagens IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978, fortemente positivas após 24 horas. As linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 486 e XV440 e XV441, mostraram-se amilase negativas após 48 horas de incubação.

O teste de atividade celulolítica revelou que todas as linhagens testadas apresentavam atividade de degradação de celulose. As linhagens do grupo A, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 486 mostraram-se fracamente positivas após 48 h, enquanto as linhagens atípicas *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978 apresentaram atividade intensa de degradação de celulose após 24 h de incubação. As linhagens *X. vesicatoria* LMG 911 e *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 433, do grupo B, e XV440 e XV441, apresentaram atividade de celulase após 48 horas (Tabela 3.7).

A avaliação da atividade de pectinase mostrou que linhagens do grupo A, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 486 e XV440 e XV441, são pectinase-negativas, enquanto que as linhagens do grupo B, *X. vesicatoria* LMG 911 e *Xanthomonas* sp. (*ex*

X. campestris pv. *vesicatoria*) IBSBF 433 são positivas. As linhagens brasileiras atípicas *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978 mostraram-se fortemente positivas, apresentando atividade significativamente mais intensa do que as linhagens do grupo B em 24 e 48 horas.

No teste de atividade de protease, os resultados mostraram que as linhagens de *X. vesicatoria* do grupo B, incluindo *X. vesicatoria* LMG 911 e *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 433, e as linhagens atípicas *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978 foram protease-positivas. As linhagens atípicas *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) XV440 e XV441, e as linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 486 não apresentaram atividade de degradação de proteínas, mesmo após 48 horas (Tabela 3.7).

Tabela 3.7. Atividade de enzimas extracelulares de linhagens de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão.

Linhagem	Amilase	Celulase	Pectinase	Protease
<i>X. vesicatoria</i> LMG 911	+ /+++*	-/+	-/+	-/+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> LMG 929	-/-	-/f	-/-	-/-
<i>Xanthomonas</i> sp. XV440	-/-	f/f	-/-	-/-
<i>Xanthomonas</i> sp. XV441	-/-	-/f	-/-	-/-
<i>Xanthomonas</i> sp. IBSBF 317	+ /+++	++ /+++	+ /++	+ /++
<i>Xanthomonas</i> sp. IBSBF 925	++ /+++	+ /+++	+ /++	+ /++
<i>Xanthomonas</i> sp. IBSBF 978	+ /+++	+ /+++	+ /++	+ /++
<i>Xanthomonas</i> sp. IBSBF 433	+ /++	+ /+	+ /+	- /+
<i>Xanthomonas</i> sp. IBSBF 486	-/-	+ /+	-/-	-/-

*Resultados em após 24h/48h de incubação, sendo + = atividade enzimática pouco intensa; ++ = atividade intensa; +++ = atividade muito intensa, - = ausência de atividade enzimática; f = atividade enzimática muito fraca.

4. Discussão

4.1. Análises de RFLP de Região Espaçadora rDNA 16S-23S e do Gene *groEL*

A aplicação dos métodos moleculares propostos neste trabalho, notadamente a caracterização de polimorfismos e análise filogenética de seqüências de fragmentos da região espaçadora rDNA 16S-23S e *groEL*, no estudo da diversidade de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão, foi bastante eficiente. Os resultados experimentais obtidos permitiram a diferenciação entre espécies de *Xanthomonas* deste grupo, com grande potencial de aplicação na diferenciação de outras espécies do gênero.

Análises de polimorfismo de região espaçadora de rDNA 16S-23S vêm sendo utilizadas com sucesso na diferenciação e identificação de várias espécies de bactérias (Gürtler & Stanisich, 1996). Vários autores reportaram a diferenciação entre espécies e/ou linhagens com base na variação de tamanho da região espaçadora em grupos diversos de bactérias, incluindo microrganismos de importância clínica, como *Staphylococcus* spp. (Mendoza *et al.*, 1998) e *Legionella* spp. (Riffard *et al.*, 1998), bem como organismos de importância ambiental, como *Nitrosomonas* spp. e *Nitrospira* spp., bactérias que promovem oxidação de amônia (Aakra *et al.*, 1999).

Em *Xanthomonas*, Honeycutt *et al.* (1995) descreveram um par de *primers* capaz de detectar variações no tamanho das seqüências espaçadoras de rDNA 16S-23S de *X. albilineans* e outras espécies e patovares de *Xanthomonas*, enquanto Maes *et al.* (1996) descreveram a obtenção de *primers* para amplificação específica da região espaçadora de rDNA 16S-23S para *Xanthomonas* de cereais. No primeiro caso, a metodologia descrita foi eficaz como método de detecção para fitopatógenos do grupo *X. albilineans*.

No presente estudo, as regiões espaçadoras 16S-23S de linhagens-tipo de espécies de *Xanthomonas* e linhagens-tipo e referência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*, foram amplificadas por PCR utilizando um dos *primers* de Honeycutt *et al.* (1995), gerando um fragmento de 1 Kb, de

tamanho semelhante aos produtos de amplificação de *X. albilineans* (Honeycutt *et al.*, 1995).

Nas análises de amplificação de região espaçadora do rDNA 16S-23S de espécies de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão realizadas, não foram detectadas variações de tamanho nos produtos de amplificação obtidos. Entretanto, foi possível a diferenciação entre os grupos de *Xanthomonas* spp. através de análises de RFLP dos fragmentos amplificados, o que tem sido descrito para outras espécies de bactérias (Manceau & Horvais, 1997; Riffard *et al.*, 1998).

No presente estudo, análises de PCR/RFLP de região espaçadora de rDNA 16S-23S das linhagens patogênicas para tomate e pimentão com as enzimas *Alu* I, *Dde* I e *Hinf* I confirmaram dados de literatura (Vauterin *et al.*, 1991; Stall *et al.*, 1994, Bouzar *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995), diferenciando as linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em dois grupos principais: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*.

Foram analisadas todas as linhagens disponíveis de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* descritas na literatura dentro da nova classificação do grupo (Vauterin *et al.*, 1995), demonstrando que os dados de polimorfismo de região espaçadora de rDNA 16S-23S permitem a clara distinção entre as linhagens dos dois grupos, consistentemente. Os resultados obtidos permitiram ainda a detecção de linhagens atípicas entre isolados brasileiros do antigo grupo *X. campestris* pv. *vesicatoria* e entre linhagens atípicas do grupo aqui referido como *nonA/nonB*, descrito por Bouzar *et al.* (1994).

No estudo realizado, foram identificadas linhagens com padrão de polimorfismo idênticos aos de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ou de *X. vesicatoria* dentre os isolados brasileiros do antigo grupo *X. campestris* pv. *vesicatoria* analisados. Em análises de RFLP de região espaçadora de rDNA 16S-23S, os resultados demonstraram que dentre as 32 linhagens brasileiras de *X. campestris* pv. *vesicatoria* isoladas no estado de São Paulo, 16 agruparam com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (ex-grupo A), enquanto que 16 apresentaram perfil de *X. vesicatoria* (ex-grupo B). Foi observada uma forte correlação entre as

linhagens do grupo B e hospedeiro de origem, sendo todas provenientes de plantas de tomate, exceto a linhagem IBSBF 317, que foi isolada de tabaco. As linhagens do grupo A foram isoladas predominantemente de pimentão (14 dos 16 organismos analisados), com exceção das linhagens IBSBF 483 e IBSBF 486, isoladas de tomate.

Dados de literatura levantados através da análise de históricos de linhagens depositadas em coleções de cultura (LMG) indicam que organismos do grupo A são predominantemente associados a pimentão, corroborando os dados levantados neste estudo. Dados para organismos do grupo B, no entanto, sugerem que estes são associados a tomate, o que também foi confirmado neste trabalho. Todas as seis linhagens de *X. vesicatoria* obtidas junto à LMG foram isoladas de tomate.

A análise de linhagens atípicas de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão com o marcador de região espaçadora rDNA 16S-23S confirmou a variabilidade fenotípica e genotípica detectada por outros autores, que descreveram a ocorrência de pelo menos duas populações diferenciadas entre linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Bouzar *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1995). Bouzar *et al.* (1994) descreveram um grupo de 21 linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* que não puderam ser alocadas nos grupos A ou B, mostrando características de ambos, com base principalmente em análises fenotípicas, incluindo produção de enzimas extracelulares, presença de banda de proteína característica e dados de patogenicidade.

Nove das linhagens atípicas descritas por Bouzar *et al.* (1994) foram analisadas através dos marcadores taxonômicos definidos neste trabalho. Nas análises de polimorfismo de região espaçadora rDNA 16S-23S, as linhagens de *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV440 e XV441 apresentaram padrões de restrição diferenciados das demais, agrupando com linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* em análises de RFLP com as enzimas *Alu* I e *Dra* I, e com linhagens de *X. vesicatoria* em análises com *Dde* I, *Hae* III e *Hinf* I (Tabela 4.1). Esses organismos são de mesma origem geográfica, isolados na Costa Rica, e

apresentaram perfis de proteínas totais muito similares (dados não apresentados), diferenciando-se nitidamente das demais linhagens analisadas.

Em análises de REP-, ERIC- e BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995), a linhagem *X. campestris* pv. *vesicatoria* XV441 apresentou perfil distinto de linhagens dos grupos A e B. Nestes estudos, os autores destacaram a existência de pelo menos quatro grupos genotípicos em 83 *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão analisadas, um dos quais corresponde à linhagem XV441. Dados de atividade enzimática também evidenciaram a diferenciação das linhagens XV440 e XV441, as quais não apresentaram atividade de amilase, pectinase ou protease, e apresentaram fraca atividade celulolítica. Este perfil é contrastante com características de linhagens do grupo B, que são positivas para todas as enzimas citadas acima, e apresenta maiores semelhanças com o perfil de linhagens do grupo A.

Recentemente, Jones *et al.* (1998) e Bouzar *et al.* (1999) demonstraram, através de taxonomia polifásica e hibridização DNA:DNA, que XV440 e XV441 representam uma terceira espécie de patógenos de tomate e pimentão, identificadas como "*X. gardneri*".

Os resultados das análises de polimorfismo de região espaçadora apresentados neste trabalho permitiram a diferenciação de XV440 e XV441 das linhagens dos grupos A e B, sugerindo que esta metodologia permite a diferenciação dos três principais grupos de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão atualmente descritos na literatura: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A), "*X. gardneri*" (grupo D) e *X. vesicatoria* (grupo B). As linhagens de "*X. gardneri*" XV440 e XV441 apresentaram perfis de restrição idênticos aos de linhagens do grupo A e B, dependendo da enzima de restrição analisada.

As quatro linhagens atípicas de *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) isoladas de Barbados, XV330, XV334, XV338 e XV343, agruparam sempre com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* nas análises de polimorfismo de região espaçadora rDNA 16S-23S (Tabela 4.1), apesar de não apresentarem uma banda de cerca de 75 pb característica dos perfis de restrição gerados com *Dde* I.

Contudo, estes organismos apresentaram resultados de caracterização de atividade de enzimas extracelulares (dados não apresentados) semelhantes aos de linhagens do grupo B, *X. vesicatoria*. Essas linhagens são correlacionadas a organismos atípicos inicialmente isolados no México, identificados como *X. campestris* pv. *vesicatoria* grupo A, que apresentaram forte atividade amilolítica (Bouzar *et al.*, 1996), os quais foram também isolados em Ohio (Sahin & Miller, 1996). Algumas dessas linhagens foram recentemente classificadas como um sub-grupo de A, denominado Amy-A, apresentando padrões de restrição genômica semelhantes em análises de eletroforese de campo pulsado e homologia elevada em experimentos de DNA-DNA com linhagens do grupo A (Jones *et al.*, 1998). Os dados de polimorfismo de restrição de região espaçadora com *Dde* I permitiram a diferenciação dos organismos do grupo A1, sugerindo que esta metodologia também pode ser aplicada na detecção de variação infra-específica em *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão.

As demais linhagens atípicas analisadas agruparam sempre com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

A abordagem desenvolvida neste trabalho representa uma alternativa rápida e relativamente simples para a identificação de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão quando comparada a métodos que vêm sendo utilizados para diferenciação entre essas espécies, notadamente caracterização da utilização de diferentes fontes de carbono, produção de enzimas extracelulares e perfil de proteínas totais (Beaulieu *et al.*, 1991; Stall *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 1991; Bouzar *et al.*, 1994b). Estes métodos podem ser susceptíveis a variações linhagem-específicas ou interferências de fatores ambientais e condições de crescimento, uma vez que constituem metodologias baseadas na avaliação do fenótipo das linhagens.

Outros métodos descritos na literatura para diferenciação entre *Xanthomonas* spp. patogênicas incluem: hibridização DNA:DNA, (Stall *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995), determinação de perfis de amplificação baseados na utilização de *primers* com seqüência-alvo conhecida (REP-, ERIC- e BOX-PCR,

Louws *et al.*, 1995; Bouzar *et al.*, 1999) ou não (RAPD, Ferreira *et al.*, 1997), e utilização de sondas moleculares grupo-específicas (Kuflu & Cuppels, 1997). A hibridização DNA:DNA apresenta elevado grau de resolução, mas é uma técnica trabalhosa para ser aplicada na análise de rotina de um grande número de amostras. As técnicas baseadas no perfil de amplificação gerados por rep-PCR são bastante eficazes no agrupamento de linhagens de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão, detectando, inclusive, variações infra-específicas. Este método, porém, é bastante sensível às condições utilizadas nas reações de PCR, incluindo a concentração de DNA utilizada como molde e *primers*, *Taq* polimerase utilizada, concentração de sais na reação e condições do ciclo de amplificação. Estas variáveis acarretam, muitas vezes, dificuldades na reprodução de padrões em análises realizadas em diferentes laboratórios, o que foi confirmado por outros autores (Jones, 1999, comunicação pessoal; Louws, 1999, comunicação pessoal). A técnica de RAPD apresenta limitação análoga às apresentadas pela técnica de rep-PCR.

Kuflu e Cuppels (1997) apresentaram um método diagnóstico para *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*. Os autores identificaram um fragmento de 1,75 Kb, obtido através de hibridização subtrativa, que se mostrou útil na identificação de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* em experimentos de hibridização. Esse fragmento permite a diferenciação entre linhagens desses grupos e linhagens de *Xanthomonas* não-patogênicas, encontradas muitas vezes em associação epifítica com plantas de tomate e pimentão. Contudo, a sonda descrita não permite a separação entre linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*.

A aplicação de métodos de caracterização baseados em hibridização com sondas moleculares, além de envolver técnicas trabalhosas, pode ser um fator limitante na análise de grande número de amostras. Alternativamente, Dianne Cuppels (1999, comunicação pessoal), desenvolveu um par de *primers* específicos para amplificação de um fragmento de 1,75 Kb diagnóstico para linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) e *X. vesicatoria* (grupo B) (Kuflu & Cuppels, 1997), o que permitiu agilizar a análise de amostras

em laboratórios de rotina. Contudo, a limitação quanto à diferenciação entre organismos dos grupos A e B não foi superada com a utilização do método de PCR.

Análises de polimorfismo do gene *groEL* vêm sendo utilizadas para a identificação e diferenciação de espécies bacterianas diversas, incluindo patógenos importantes, como *Mycobacterium* spp. e *Nocardia* spp. (Lungu *et al.*, 1994), *Haemophilus ducreyi* (Parsons *et al.*, 1995), e *Mycobacterium* spp. do complexo *avium-intracellulare* (MAC), fornecendo, neste último caso, informações para classificação de linhagens em nível específico e infra-específico (Swanson *et al.*, 1997).

Análises filogenéticas baseadas em seqüências de GroEL têm ajudado a esclarecer relações taxonômicas controversas ou não-evidentes através da comparação de seqüências de rDNA 16S (Viale *et al.*, 1994). Dados de análises de PCR e comparação de seqüências de *groESL* de espécies de *Ehrlichia* confirmaram as relações filogenéticas estabelecidas em análises de seqüências de rDNA 16S, além de demonstrar que seqüências de *groEL* são menos conservadas que seqüências de rDNA 16S (Sumner *et al.*, 1997). Esta molécula tem se mostrado, portanto, uma alternativa viável para estudos filogenéticos em casos onde a molécula de rDNA 16S não apresenta variabilidade e resolução adequada.

No grupo *Xanthomonas*, comparação de seqüências de 16S demonstraram que este gene não é um bom marcador para estudos taxonômicos e filogenéticos, devido à alta similaridade encontrada entre as seqüências de organismos distintos (Hauben *et al.*, 1997). Estes resultados foram corroborados pela investigação realizada no presente trabalho, direcionada para detecção de diferenças entre rDNA 16S de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão, que pudessem confirmar os dados de polimorfismo de região espaçadora rDNA 16S-23S. Conforme esperado, não foi detectado qualquer polimorfismo de restrição para as enzimas testadas (Figura 3.8), sendo que todas as amostras do grupo *nonA/nonB* analisadas, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929 e *X. vesicatoria* LMG 911

apresentaram perfis de restrição idênticos, confirmando o alto grau de conservação dessa molécula entre espécies do grupo *Xanthomonas*.

Análises de PCR/RFLP de fragmentos do gene *groEL* de *Xanthomonas* patogênicas para tomate e pimentão com *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I confirmaram dados de literatura, agrupando linhagens de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) em dois grupos principais: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* (Vauterin *et al.*, 1991; Stall *et al.*, 1994; Bouzar *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995), além de permitir a diferenciação de linhagens atípicas do grupo *nonA/nonB* (Bouzar *et al.*, 1994a).

Os dados obtidos no presente trabalho nas análises de PCR-RFLP de *groEL* corroboram os resultados obtidos nas análises de RFLP de região espaçadora de rDNA 16S-23S para todas as linhagens-padrão utilizadas neste estudo, e para 29 dos 32 isolados brasileiros analisados, agrupando-os consistentemente como linhagens dos grupos A, B ou atípicas.

A região do gene *groEL* utilizada nas análises de RFLP neste estudo mostrou-se mais variável que a região espaçadora rDNA 16S-23S, permitindo a detecção de três linhagens, *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978 entre os isolados brasileiros estudados, com polimorfismo diferenciado, as quais não foram detectadas nas análises com aquele marcador (Tabela 4.1).

Os dados de polimorfismo de *groEL* das nove linhagens *nonA/nonB* analisadas corroboraram a classificação obtida com análises de RFLP de região espaçadora. As linhagens "*X. gardneri*" XV440 e XV441 foram novamente diferenciadas das demais, agrupando com linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* quando o fragmento de *groEL* foi digerido com *Msp* I, e com *X. vesicatoria* nas análises de restrição com *Hae* III e *Rsa* I (Tabela 4.1). Estas linhagens foram as únicas que apresentaram esse tipo de polimorfismo para os dois marcadores estudados, corroborando dados de REP- e ERIC-PCR (Louws *et al.*, 1995) e dados de caracterização polifásica de Jones *et al.* (1998) e Bouzar *et*

al. (1999), que alocaram essas linhagens como uma terceira espécie de patógenos de tomate e pimentão, "*X. gardneri*".

As quatro linhagens provenientes de Barbados, *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*), XV330, XV334, XV338 e XV343, mostraram-se sempre idênticas às linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* nas análises de *groEL*. Não foi detectada qualquer variação entre os perfis de restrição para as enzimas testadas, em contraste com os resultados das análises de RFLP de região espaçadora rDNA 16S-23S, as quais foram mais sensíveis na detecção de variação infra-específica neste grupo de organismos.

As demais linhagens, *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) XV560 e XV655, foram agrupadas com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, e a linhagem *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) BV5-4a foi consistentemente agrupada com *X. vesicatoria* nas análises de RFLP dos dois marcadores (Tabela 4.1).

Na análise das linhagens brasileiras de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*), a linhagem IBSBF 317 apresentou padrão de restrição distinto das demais linhagens quando analisada com a enzima *Rsa* I (Figura 3.13). Quando analisada com *Msp* I, IBSBF 317 agrupou com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Figura 3.12), o que difere dos dados obtidos com o marcador molecular de região espaçadora de rDNA 16S-23S, onde esta linhagem foi agrupada consistentemente com *X. vesicatoria*. Contudo, na análise de restrição de *groEL* com *Hae* III (Figura 3.11) este organismo apresentou padrão de polimorfismo idêntico ao de linhagens de *X. vesicatoria* (Tabela 4.1). Cabe ressaltar que esta linhagem é atípica para o grupo, pois foi isolada de *Nicotiana tabacum*, o qual não é um hospedeiro usual para *Xanthomonas* deste grupo. As discrepâncias encontradas tanto na caracterização de polimorfismo de região espaçadora como de *groEL* sugerem a realização de estudos adicionais para elucidar a classificação deste organismo.

A linhagem *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 925 apresentou polimorfismo diferenciado das linhagens dos grupos A e B para duas das enzimas utilizadas. Quando digerida com *Msp* I, a linhagem apresentou um

perfil semelhante ao de linhagens do grupo A (Figura 3.12). Digestão com *Hae* III gerou perfil de bandas semelhante ao de linhagens do grupo B, embora com ausência de algumas bandas (Figura 3.11). A enzima *Rsa* I agrupou a linhagem com *X. vesicatoria* (Figura 3.13). Os dados de *groEL* diferem dos resultados obtidos com o marcador rDNA 16S-23S, pelos quais a linhagem foi consistentemente agrupada com linhagens de *X. vesicatoria* (Tabela 4.1).

O isolado de *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 978 apresentou perfil de polimorfismo semelhante ao das linhagens “*X. gardneri*” XV440 e XV441 para o gene *groEL*, sendo agrupado com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* quando digerido com *Msp* I e com *X. vesicatoria* quando digerido com *Hae* III ou *Rsa* I (Figuras 3.12, 3.11 e 3.13, respectivamente).

Os resultados obtidos na caracterização de polimorfismo de *groEL* permitiram a separação das linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e “*X. gardneri*”, além da detecção de organismos atípicos entre isolados brasileiros *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*). A análise conjunta dos dados de caracterização das linhagens de *Xanthomonas* com os dois marcadores permitiu a alocação dos organismos em grupos, de acordo com o perfil de polimorfismo obtido (Tabela 4.1).

Através destes dados, será proposta a alocação dos isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) às espécies *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) e *X. vesicatoria* (grupo B), exceto para três linhagens atípicas, que foram consistentemente diferenciadas nas análises de polimorfismo de *groEL*, *Xanthomonas* sp. (*ex X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978, as quais necessitam de caracterização taxonômica polifásica para posterior identificação.

Tabela 4.1. Classificação de linhagens de *Xanthomonas* spp. patogênicas para tomate e pimentão através de análises de RFLP de região espaçadora 16S-23S e RFLP de uma região do gene *groEL*.

Linhagem	Hospedeiro/fonte	Espécie	Padrão de RFLP					
			rDNA 16S-23S			<i>groEL</i>		
			<i>Alu</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
LMG 667	Tomate	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 668	Pimentão/ Ilhas Cook	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 906	n.d.*	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 909	Pimentão/ C. Marfim	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 910	Pimentão/ Marrocos	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 911 ^T	Tomate/ N.Zelândia	Xv	B	B	B	B	B	B
LMG 913	Pimentão/ Senegal	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 914	Tomate/ Senegal	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 916	Tomate/ N.Zelândia	Xv	B	B	B	B	B	B
LMG 917	Tomate/ N.Zelândia	Xv	B	B	B	B	B	B
LMG 919	Tomate/ Rodésia	Xv	B	B	B	B	B	B
LMG 920	Tomate/ Itália	Xv	B	B	B	B	B	B
LMG 922	Pimentão/ EUA	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 929 ^{ref}	Tomate/ EUA	Xav	A	A	A	A	A	A
LMG 935	Tomate/ Hungria	Xv	B	B	B	B	B	B
IBSBF 251	Tomate/ Brasil	Xv	B	B	B	B	B	B
IBSBF317*	Tabaco/ Brasil	X. sp.	B	B	B	B	A	A'
IBSBF 331	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 332	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 345	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 346	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 400	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 401	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 407	Tomate/ Brasil	Xv (<i>ex</i> Xcv)	B	B	B	B	B	B
IBSBF 411	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 411	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 412	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 414	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A
IBSBF 415	Pimentão/ Brasil	Xav (<i>ex</i> Xcv)	A	A	A	A	A	A

Tabela 4.1. Continuação.

Linhagem	Hospedeiro/fonte	Espécie	Padrão de RFLP					
			rDNA 16S-23S			groEL		
			<i>Alu</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
IBSBF 418	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 419	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 420	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 427	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 433	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 465	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 478	Pimentão/ Brasil	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
IBSBF 479	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 483	Tomate/ Brasil	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
IBSBF 484	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 486	Tomate/ Brasil	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
IBSBF 646	Pimentão/ Brasil	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
IBSBF 925*	Tomate/ Brasil	X. sp.	B	B	B	B'	A'	B'
IBSBF 948	Pimentão/ Brasil	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
IBSBF 978*	Tomate/ Brasil	X. sp.)	B	B	B	B	A	B
IBSBF 1145	Pimentão/ Brasil	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
IBSBF 1165	Tomate/ Brasil	<i>Xv (ex Xcv)</i>	B	B	B	B	B	B
IBSBF 1196	Tomate/ Brasil	<i>Xv</i>	B	B	B	B	B	B
BV5-4b	Tomate/ Argentina	<i>Xv</i>	n.d.	n.d.	B	B	B	B
XV330	Pimentão/ Barbados	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A*	A	A	A	A
XV334	Pimentão/ Barbados	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A*	A	A	A	A
XV338	Pimentão/ Barbados	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A*	A	A	A	A
XV343	Pimentão/ Barbados	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A*	A	A	A	A
XV440	Tomate/ Costa Rica	Xg (ex Xcv)	A	B	B	B	A	B
XV441	Tomate/ Costa Rica	Xg (ex Xcv)	A	B	B	B	A	B
XV560	Tomate/ Guatemala	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A
XV655	Pimentão/ Porto Rico	<i>Xav (ex Xcv)</i>	A	A	A	A	A	A

*Linhagens apresentando padrão de restrição diferentes dos grupo A and B; A'e B': padrões de restrição descritos como A' e B', de acordo com similaridade com padrões A ou B. *Xav* = *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; *Xcv* = *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; *Xg* = "*X. gardneri*"; *X. sp.* = *Xanthomonas* sp.; *Xv* = *Xanthomonas vesicatoria*; n.d.= não determinado.

Dados de atividade de enzimas extracelulares corroboraram a diferenciação das linhagens *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978. Estes organismos apresentaram atividade amilolítica, celulolítica, pectolítica e proteolítica mais intensa que qualquer outra linhagem testada. As linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* não apresentam atividade para as enzimas citadas, exceto celulase, o mesmo acontecendo com as linhagens de "*X. gardneri*". Com base nessa característica, portanto, as linhagens atípicas citadas acima estão mais relacionadas às linhagens do grupo B. Isso também se confirma através de análises de perfil de proteínas totais (dados não apresentados). As linhagens IBSBF 317 e IBSBF 978 apresentaram padrões de proteínas celulares semelhantes ao de linhagens do grupo B. O padrão de proteínas celulares da linhagem IBSBF 925 foi distinto dos demais. Os dados obtidos para as linhagens *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978 reforçam a necessidade da realização de estudos complementares para elucidar a classificação destes organismos.

A análise do polimorfismo de restrição de *groEL* para diferentes espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. albilineans*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola*, *X. vesicatoria*, sugere que este marcador pode ser utilizado para diferenciação entre espécies do gênero. Os polimorfismos mais informativos nestas análises foram gerados com *Hae* III, resultando em perfis distintos para quase todas as linhagens estudadas (Figura 3.15-A). A inclusão de um maior número de linhagens representativas de cada espécie analisada, para avaliação da resolução deste método na diferenciação específica de bactérias do gênero *Xanthomonas*, necessita ainda ser realizada.

4.2. Análise Filogenética de Sequências de Região Espaçadora 16S-23S e Gene *groEL* de *Xanthomonas* spp.

As análises filogenéticas das seqüências de *groEL* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* LMG 929, *X. vesicatoria* LMG 911 e “*X. gardneri*” XV441, e das três linhagens atípicas *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) IBSBF 317, IBSBF 925 e IBSBF 978, permitiram a diferenciação entre todos os organismos analisados (Figura 3.19). Os dados sugerem que as linhagens IBSBF 317 e IBSBF 978 são relacionadas entre si, sendo alocadas próximas a “*X. gardneri*”. A linhagem IBSBF 925 foi agrupada com *X. vesicatoria*, porém apresentou maior divergência de seqüência em comparação ao grupo IBSBF 317, IBSBF 978 e “*X. gardneri*” (Figura 3.19).

As análises filogenéticas preliminares de seqüências parciais de *groEL* de 15 espécies válidas de *Xanthomonas*, incluindo *X. albilineans*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*, demonstraram que *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* pode ser diferenciada dos demais organismos, inclusive da espécie-tipo *X. axonopodis* pv. *axonopodis*. Os dados de análise filogenética demonstraram que *X. axonopodis* é um grupo bastante heterogêneo, confirmando observações anteriores (Jones *et al.*, 1998; Lacy *et al.*, 1997).

A relação filogenética entre “*X. gardneri*” XV441 e os organismos atípicos representados pelas linhagens IBSBF 317 e IBSBF 978 foram corroboradas nas análises realizadas com um maior número de seqüências representativas da diversidade de espécies de *Xanthomonas*, sendo estes organismos colocados em um *cluster* que inclui *X. arboricola* nestas análises. A classificação filogenética das linhagens IBSBF 317 e IBSBF 978, próxima de “*X. gardneri*”, discorda, no entanto, dos resultados de classificação baseados nos perfis de restrição da região espaçadora rDNA 16S-23S, nas quais estes organismos agrupam consistentemente com linhagens do grupo B. Dados de caracterização fenotípica e perfil de proteínas totais não auxiliaram na elucidação da relação taxonômica

destes organismos, e não corroboram a afiliação filogenética com "*X. gardneri*". A posição taxonômica destes isolados é, portanto, ainda incerta até o momento.

A linhagem atípica IBSBF 925 foi recuperada em um mesmo *cluster* com *X. vesicatoria* LMG 911, distinto dos demais grupos na classificação filogenética baseada em seqüências parciais de *groEL*. Os dados obtidos nas análises filogenéticas, reforçam, mais uma vez, a necessidade de estudos complementares para a elucidação da relação taxonômica entre estes organismos.

Nesse mesmo *cluster*, o agrupamento de *X. pisi*, *X. bromi* e *X. cucurbitae* em um mesmo grupo corrobora, conforme esperado, os dados de análises de RFLP de *groEL* obtidos para estas linhagens. *X. pisi* e *X. bromi* apresentaram perfis idênticos de polimorfismo de *groEL* com 4 enzimas testadas, incluindo *Ava* II, *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I.

As análises filogenéticas das seqüências do outro marcador avaliado neste estudo, região espaçadora rDNA16S-23S, incluindo as linhagens-referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e "*X. gardneri*" XV441, em comparação com as seqüências de outras linhagens de *Xanthomonas* disponíveis em banco de dados, novamente levou à separação de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, "*X. gardneri*" e *X. vesicatoria* em grupos diferentes.

O agrupamento formado por *X. cucurbitae* e *X. pisi*, próximas a *X. vesicatoria* LMG 911, também confirma os dados derivados de análises de polimorfismo de *groEL*.

No grupo que inclui linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* está também presente uma linhagem do subgrupo A1, ou amy-A, representado pela linhagem XV338, conforme o esperado, de acordo com os dados de homologia DNA:DNA para esse grupo (Bouzar *et al.*, 1999). Os resultados obtidos com RFLP de *groEL* e de região espaçadora, agrupando a linhagem XV338 sempre com as linhagens-referência de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, confirmam essa correlação.

As linhagens de *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* e *X. campestris* pv. *physalidicola*, este último um patógeno de Solanáceas, também foram recuperadas no *cluster* de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Em análises de RFLP de

região espaçadora da linhagem de referência do patovar *X. campestris* pv. *physalidicola* LMG 845 com *Hinf* I, realizadas neste trabalho (dados não apresentados), este foi agrupado com linhagens de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, o que sustenta a associação entre organismos desses patovares.

A linhagem “*X. gardneri*” XV441 agrupou claramente com outra linhagem de “*X. gardneri*”, cuja seqüência foi obtida em banco de dados, em um *cluster* relativamente distante de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria*, comprovando que essa linhagem atípica é uma terceira espécie de patógenos de tomate e pimentão. *X. arboricola* pv. *pruni* foi agrupada próximo a “*X. gardneri*” nestas análises, corroborando resultados obtidos com as análises filogenéticas de seqüências parciais de *groEL*.

O agrupamento obtido nas análises filogenéticas de seqüências parciais de *groEL* corroboram parcialmente os grupos recuperados em análises de seqüências de rDNA 16S, apresentando, entretanto, maior resolução na diferenciação de alguns grupos. Hauben *et al.* (1997) descreveram três *clusters* para as 20 espécies de *Xanthomonas* analisadas. Um deles, denominado *cluster* 3, inclui as linhagens de *X. albilineans*, *X. translucens*, *X. hyacinthi* e *X. theicola*, enquanto o *cluster* 2 inclui apenas *X. sacchari*, recuperado na proximidade do *cluster* 3. O *cluster* 1 abrange todas as demais espécies válidas de *Xanthomonas*.

Nas análises filogenéticas resultantes de seqüências de *groEL* apresentadas neste trabalho, foi recuperado um grupo muito similar ao *cluster* 3 de Hauben *et al.* (1997), incluindo *X. albilineans*, *X. translucens* e *X. theicola*, além de *X. sacchari* e *X. axonopodis*, as quais agruparam próximas ao *cluster* 3 nas análises filogenéticas de seqüências de rDNA 16S.

X. codiae, *X. oryzae* e *X. vasicola* foram recuperadas em posições próximas no *cluster* 1 de rDNA 16S, o que foi confirmado na árvore filogenética derivada das seqüências de *groEL*. A proximidade filogenética entre *X. bromi* e *X. pisi* descrita por Hauben *et al.* (1997) foi igualmente confirmada por resultados de análises filogenéticas de seqüências de *groEL*.

Outras relações filogenéticas não podem ser inferidas ou comparadas devido à ausência de informações disponíveis quanto às seqüências de *groEL* das demais espécies de *Xanthomonas* e à quantidade limitada de seqüências de regiões espaçadoras disponíveis em bases de dados. Os dados de análises filogenéticas preliminares de região espaçadora sugerem que esse marcador possa ser uma alternativa viável para contornar as limitações de resolução do rDNA 16S como marcador filogenético no gênero *Xanthomonas*.

As análises de seqüências parciais de *groEL* sugerem que este é um bom marcador filogenético para o gênero *Xanthomonas*. Análises complementares da seqüência completa do gene, bem como a comparação das seqüências das proteínas GroEL, poderão fornecer dados mais elucidativos para análises de filogenia e evolução de espécies de *Xanthomonas*.

A análise filogenética de seqüências de região espaçadora de rDNA e *groEL* de um maior número de linhagens de cada espécie de *Xanthomonas*, e análises de representantes dos diversos patovares alocados em diversas das espécies, seria interessante para elucidar as relações evolutivas entre os organismos deste gênero.

5. Conclusões

As análises de RFLP de região espaçadora de rDNA 16S-23S e do gene *groEL* (chaperonina) demonstraram a eficiência desses marcadores na diferenciação entre linhagens dos grupos de *Xanthomonas* associadas a tomate e pimentão, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, "*X. gardneri*" e *X. vesicatoria*, de modo rápido e preciso, consistindo em ferramenta útil para a identificação desses patógenos.

As análises de restrição para os dois marcadores testados apresentaram polimorfismo diferenciado para duas das linhagens do grupo *nonA/nonB*, XV440 e XV441, confirmando dados de literatura que recentemente agruparam essas linhagens na espécie "*X. gardneri*" (Bouzar *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos com o marcador *groEL* corroboram os dados obtidos com o marcador de rDNA 16S-23S para as linhagens padrão analisadas, para as linhagens do grupo *nonA/nonB* e para a maioria dos isolados brasileiros analisados. O gene *groEL*, entretanto, mostrou-se mais sensível na detecção de variabilidade infra-específica.

Análises com *groEL* permitiram a identificação de 3 linhagens atípicas dentre os 32 isolados brasileiros de *Xanthomonas* sp. (ex *X. campestris* pv. *vesicatoria*) testados. Essas linhagens, IBSBF 317, 925 e 978 apresentaram padrões de restrição distintos das linhagens dos grupos A ou B, ou de "*X. gardneri*". A comparação dos resultados das análises dessas linhagens quanto ao polimorfismo dos dois marcadores testados e testes fisiológicos preliminares, incluindo perfis de proteínas totais e atividade de enzimas extracelulares, confirmaram a diferenciação das mesmas dos demais grupos citados.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a existência de grupos polimórficos genotípicos dentre as linhagens do grupo previamente denominado *X. campestris* pv. *vesicatoria*, conforme sugerido através de análises fenotípicas e quimiotaxonômicas (Bouzar *et al.*, 1994) e de análises de REP, ERIC e BOX PCR (Louws *et al.*, 1995) e demonstram, ainda, a ocorrência de linhagens atípicas entre

os isolados do estado de São Paulo. Essas linhagens não encontram paralelo descrito na literatura.

Os resultados observados para os isolados brasileiros analisados confirmam a existência de uma correlação entre as espécies *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* e a planta hospedeira. As linhagens classificadas como *X. vesicatoria* foram todas isoladas de plantas de tomate, exceto por uma linhagem, IBSBF 317, isolada de tabaco, a qual eventualmente foi identificada como atípica. As linhagens que agruparam com *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) foram predominantemente associadas a pimentão (14 entre 16).

As análises de polimorfismo do gene *groEL* de diferentes espécies de *Xanthomonas* indicam que este marcador pode ser utilizado para diferenciação entre espécies do gênero de modo relativamente rápido, através de comparação de perfis de bandas polimórficas em análises de PCR/RFLP.

As análises filogenéticas de seqüências de região espaçadora de rDNA 16S-23S e da região do gene *groEL* considerada neste estudo devem ser avaliadas mais detalhadamente como alternativas de marcadores filogenéticos para o gênero *Xanthomonas*, podendo auxiliar na elucidação das relações evolutivas entre os organismos deste gênero.

6. Perspectivas

As análises taxonômicas e filogenéticas realizadas com os marcadores moleculares definidos neste trabalho sugerem que o seqüenciamento da região espaçadora e da seqüência completa do gene *groEL* de todas as espécies de *Xanthomonas* seria importante para estudos filogenéticos de organismos desse gênero. Além disso, a análise das seqüências permitiria a identificação de possíveis seqüências específicas de cada grupo ou espécie (seqüências-assinatura) e posterior desenho de sondas e/ou *primers* específicos, podendo levar à definição de novas estratégias diagnósticas para fitopatógenos do gênero *Xanthomonas*.

A caracterização taxonômica polifásica das linhagens atípicas identificadas neste estudo, seria importante, podendo definir se estas consistem em nova(s) espécie(s), patovares ou subgrupos de *Xanthomonas* associadas a tomate e/ou pimentão (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, "*X. gardneri*", *X. vesicatoria*), ou a outras espécies de *Xanthomonas*. Para este propósito, poderiam ser realizados análises de homologia DNA:DNA.

A utilização dos marcadores definidos neste estudo abre a possibilidade de realização de análises mais abrangentes da diversidade do grupo de patógenos associados a tomate e pimentão, incluindo grande número de isolados de todo o Brasil, para mapeamento da diversidade desses grupos no país. A inclusão de outros grupos de *Xanthomonas* spp. de taxonomia controversa, como xantomonas associadas a frutas cítricas (grupo citri) ou ao grupo, provavelmente polifilético, de *Xanthomonas axonopodis*, nesse tipo de análise, seria de grande interesse.

A avaliação do gene *groEL* de espécies de *Xanthomonas* por PCR/RFLP sugere o seu potencial como marcador taxonômico na diferenciação de espécies do gênero. Análises incluindo um maior número de linhagens representativas de cada espécie seriam necessárias, para avaliação da resolução e consistência deste método na diferenciação das espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*, bem como avaliação da resolução do marcador na detecção de variabilidade em nível infra-específico.

As análises de seqüências parciais de *groEL* sugerem que este é um bom marcador filogenético para o gênero *Xanthomonas* e análises da seqüência completa do gene *groEL*, bem como a comparação das seqüências das proteínas GroEL, poderão fornecer dados mais elucidativos para análises de filogenia e evolução de espécies de *Xanthomonas*. Concomitantemente, a análise de outros marcadores moleculares em estudos de taxonomia e filogenia de *Xanthomonas*, incluindo moléculas conservadas como as chaperoninas *dnaK* e *dnaJ*, o gene *recA* e genes ligados à fitopatogenicidade, como *avr* e *hrp*, seria extremamente desejável.

7. Referências Bibliográficas

- AAKRA, A., UTAKER, J.B., NES, I.F. 1999. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 123-130.
- AGRIOS, G.N. 1989. *Plant Pathology*. 3rd Ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- ALIPPI, A.M. 1992. Histopatologia de hojas de tomate inoculadas con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Agronomie* 12: 115-122.
- ALVAREZ, A.M., BENEDICT, A.A., MIZUMOTO, C.Y., HUNTER, J.E. & GABRIEL, D.W. 1994. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84: 1449-1457.
- AULING, G., BUSSE, H.J., PILZ, F., WEBB, L., KNEIFEL, H. & CLAUS, D. 1991. Rapid differentiation analysis, of *Xanthomonas* strains from phytopathogenic pseudomonads and other members of the class *Proteobacteria* interacting with plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 223-228.
- BEAULIEU, C., MINSAVAGE, G.V., CANTEROS, B.I. & STALL, R.E. 1991. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 4: 81-88.
- BENEDICT, A.A.; ALVAREZ, A.M. & POLLARD, L.W. 1990. Pathovar-specific antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *perlargonii* detected with monoclonal antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 572-574.
- BERTHIER, Y.; VERDIER, V.; GUESDON, J.-L.; CHEVRIER, D.; DENIS, J.-B.; DECOUX, G. & LEMATTRE, M. 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 851-859.

- BERTHIER-BAYLE, Y.; NARCY, J.P. & LEMATTRE, M. 1990. DAS ELISA to detect *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in *Anthurium* propagative material. In: KLEMENTZ, Z. (Ed.). *Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. p. 925-933. Budapest, Hungary.
- BOCARRA, M., DIOLEZ, A., ROUVE, M. & KOTOUJANSKI, A. 1988. The role of individual pectate-lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity of saintpaulia plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 95-104.
- BOUZAR, H., JONES, J.B., MINSAVAGE, G.V., STALL, R.E. & SCOTT, J.W. 1994a. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* 84: 39-44.
- BOUZAR, H., JONES, J.B., SOMODI, G.C., STALL, R.E., DAOUZLI, N., LAMBE, R.C., FELIX-GASTELUM, R. & TRINIDAD-CORREA, R. 1996. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 75 - 77.
- BOUZAR, H., JONES, J.B., STALL, R.E., HODGE, N.C., MINSAVAGE, G.V., BENEDICT, A.A. & ALVAREZ, A.M. 1994b. Physiological, chemical, serological and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* 84: 663-671.
- BOUZAR, H., JONES, J.B., STALL, R.E., LOUWS, F. J., SCHNEIDER, M., RADEMAKER, J.L.W., DE BRUJIN, F.J. & JACKSON, L.E. 1999. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot diseases on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89: 328 -335.
- BRADBURY, J.F. 1984. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. I. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

- BRYAN, M.K. 1926. Bacterial leafspot on hubbard squash. *Science* 63: 165.
- BURKHOLDER, W.H. 1957. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. In BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. (Ed.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th Ed. p. 152-183. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BURKHOLDER, W.H. & STARR, M.P. 1948. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 38: 494-502.
- BUSSE, H.J., DENNER, E.B.M & 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.
- BUSTARD, K. & GUPTA, R.S. 1997. The sequences of heat shock protein 40 (DnaJ) homologs provide evidence for a close evolutionary relationship between the *Deinococcus-Thermus* group and cyanobacteria. *J. Mol. Evol.* 45: 193-205.
- CHASE, A.R.; STALL, R.E.; HODGE, N.C. & JONES, J.B. 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analyses. *Phytopathology* 82: 754-759.
- DALE, C.J., MOSES, E.K., ONG, C.C., MORROW, C.J., REED, M.B., HASSE, D. & STRUGNELL, R.A. 1998. Identification and sequencing of the *groE* operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: use in phylogeny. *Microbiology* 144: 2073-2084.
- DE BRUIJN, F.J. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187.
- DePARASIS, J. & ROTH, D.A. 1990. Nucleic acid probes for identification of genus-specific 16S rDNA sequences. *Phytopathology* 80: 618-621.

- DE VOS, P. & DE LEY, J. 1983. Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 618-621.
- DOIDGE, E.M. 1920. A tomato cancer. *J. Dep. Agric. Union S. Afr.* 1: 718-721.
- DOOLITTLE, W.F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284: 2124 – 2128.
- DOWSON, W.J. 1939. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Hyg. Abt.* 2 100: 177-193.
- DUMLER, J.S., CHEN, S.M., ASANOVICH, K., TRIGIANI, E., POPOV, V.L. & WALKER, D.H. 1995. Isolation and characterization of a new strain of *Ehrlichia chaffeensis* from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1704-1711.
- DYE, D.W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand J. Sci.* 5: 393-416.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOTT, R.A. & SCHROTH, M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59: 153-168.
- DYE, D.W. & LELLIOTT, R.A. 1974. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (Ed.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th Ed. p. 243-249. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- EISEN, J.A. 1995. The RecA protein as a model form molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J. Mol. Evol.* 41: 1105-1123.
- EVERETT, K.D.E. & ANDERSEN, A.A. 1997. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 461-473.

- FALAH, M. & GUPTA, R.S. 1994. Cloning of *hsp70* (*dnaK*) genes from *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas cepacia*: phylogenetic analyses of mitochondrial origin based on a highly conserved protein sequence. *J. Bacteriol.* 176: 7748-7753.
- FELSENSTEIN, J. 1993. *PHYLIP: Phylogenetic Inference Package*. Seattle, WA: Univ. Wash.
- FERREIRA, H., BERIAM, L.O.S., GONÇALVES, E.R. & ROSATO, Y.B. 1997. Characterization of Brazilian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by ribotyping and RAPD. *Fitopatol. Bras.* 22: 178-185.
- FISHER, S.G. & LERMAN, L.S. 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1579-1583.
- GABRIEL, D.W., KINGSLEY, M.T., HUNTER, J.E. & GOTTWALD, T. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 14-22.
- GAGNEVIN, L., LEACH, J.E. & PRUVOST, O. 1997. Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae*, agent of mango bacterial black spot. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 246-253.
- GIOVANONNI, S.J., RAPPÉ, M.S., GORDON, D., URBACH, E., SUZUKI, M. & FIELD, K.G. 1996. Ribosomal RNA and the Evolution of Bacterial Diversity. In: *Evolution of Microbial Life*. Roberts, D. McL., Sharp, P., Alderson, G. & Collins, M. (Eds). Cambridge University Press, Great Britain, UK.
- GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G. 1994. Chemosystematics: current state and future prospects. In: *Chemical methods in prokaryotic systematics*. GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G. (Eds.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester (UK).

- GOTO, M. & OKABE, M. 1958. Bacterial plant diseases in Japan. IX. 1. Bacterial stem rot of pea. 2. Halo blight of bean. 3. Bacterial spot of physalis plant. *Rep. Fac. Agric. Shizuoka Univ.* 8: 33-49.
- GRAHAM, J.H.; HARTUNG, J.S.; STALL, R.E. & CHASE, A.R. 1990. Pathological, restriction fragment length polymorphism and fatty acid profile relationship between *Xanthomonas campestris* from citrus and non citrus hosts. *Phytopathology* 80: 829-836.
- GUPTA, R.S. 1995. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 15: 1-11.
- GUPTA, R.S. & GOLDING, G.B. 1993. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 37: 573-582.
- 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.
- HARTUNG, J.S. & CIVEROLO, E.L. 1987. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America, and Florida. *Phytopathology* 77:282-285.
- HARTUNG, J.S. & CIVEROLO, E.L. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c.* pv. *citri*. *Phytopathology* 79:793-799.
- HARTUNG, J.S.; DANIEL, J.F. & PRUVOST, O.P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1143-1148.
- 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.

- HILDEBRAND, D.C., PALLERONI, N.J. & SCHROTH, M.N. 1990. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 263-269.
- HONEYCUT, R.J.; SOBRAL, B.W.S. & McCLELLAND, M. 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology* 141: 3229-3239.
- HU, F.P., YOUNG, J.M., STEAD, D. & GOTO, M. 1997. Transfer of *Pseudomonas cissicola* (Takimoto 1939) Burkholder 1948 to the genus *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 228-230.
- HULTON, C.S.J., HIGGINS, C.F. & SHARP, P.M. 1991. ERIC sequences – a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molec. Microbiol.* 5: 825-834
- JANSSEN, P., COOPMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J., BLEEKER, M., VOS, P., ZABEAU, M., KERSTERS, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881-1893.
- JONES, J. B. & JONES, J.P. 1985. The effect of bactericides, tank mixing time and spray schedule on bacterial leaf spot of tomato. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 98: 244-247.
- JONES, J. B., JONES, J.P., STALL, R.E. & ZITTER, T.A. 1991. Bacterial spot. In: *Compendium of Tomato Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- JONES, J.B., MINSAVAGE, G.V., STALL, R.E. KELLY, R.O. & BOUZAR, H. 1993. Genetic analysis of a DNA region involved in expression of two epitopes associated with lipopolysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 83:551-556.

- JONES, J.B., SOMODI, G.C. & SCOTT, J.W. 1997. Increased ELISA sensitivity using a modified extraction buffer for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in leaf tissue. *J Appl. Microbiol.* 83: 397-401
- JONES, J.B., STALL, R.E., SCOTT, J.W., SOMODI, G.C., BOUZAR, H. and HODGES, N.C. 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Dis.* 79: 395-398.
- JONES, J.B., STALL, R.E. & BOUZAR, H. 1998. Diversity among xanthomonads pathogenic on tomato and pepper. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 41-48.
- JONES, L.R.; JOHNSON, A.G. & REDDY, C.S. 1917. Bacterial blight of barley. *J. Agric. Res.* 11: 625-644.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969 - 976.
- KUFLU, K.M. & CUPPELS, D.A. 1997. Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4462-4470.
- LACY, G.H., GHERNA, R. L., STROMBERG, V. K., TOTH, J., COTE, R. & JOHNSON, J. L. 1997. DNA homology groups among 122 ATCC xanthomonad strains. *Phytopathology* 87:S55.
- LAKE, J.A., RAVI, J & RIVERA, M.C. 1999. Mix and match in the tree of life. *Science* 283: 2027-2028.
- LANE, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In.*: STACKEBRANDT, E. & GOODFELLOW, M. (Eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. p. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- LAZO, G.R.; ROFFEY, R.R. & GABRIEL, D.W. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 214-221.

- LEITE, R.P. 1994. *Genetic and evolutionary characterization of plant pathogenic xanthomonads based on DNA sequences related to the hrp genes*. PhD thesis, Univ. FLA., Gainesville.
- LEITE , R.P., Jr., MINSAVAGE, G.V., BONAS, U. & STALL, R.E. 1994a. 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.
- LEITE , R.P., Jr., EGEL, D.S. & STALL, R.E. 1994b. Genetic analysis of hrp-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1078 - 1086.
- LELLIOTT, R.A. 1972. The genus *Xanthomonas*. In: Proceedings of the III International Conference of Plant Pathology and Bacteriology. p. 269-272. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.G. & DE LEY, J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botan. Rev.* 50: 308-356.
- LIN, N.& TSENG, Y. 1997. Sequence and copy number of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gene encoding 16S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136: 1136-1141.
- LOGAN, N.A. 1994. *Bacterial systematics*. Blackwell Scientific Publications. Oxford (UK).
- 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.
- LOUWS, F.J., FULLBRIGHT, 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., RADEMAKER, J.L.W., STROMBERG, V.K., GHERNA, R.L. , DE BRUIJN, F.J., LACY,G.H. 1997. Rep-PCR genomic fingerprinting of 123 ATCC xanthomonad strains. *Phytopathology* 87:S60.
- LUNGU, O., DELLA LATTA, P., WEITZMAN, I. & SILVERSTEIN,S. 1994. Differentiation of *Nocardia* from rapidly growing *Mycobacterium* species by PCR-RFLP analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 13-18.
- LUPSKI, J.R. & WEINSTOCK, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotes genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525-4529.
- MAES, M., GARBEVA, P. & KAMOEN, O. 1996. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leak streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 63-69.
- MAIDAK, B.L., COLE, J.R., PARKER Jr, C.T., GARRITY, G.M., LARSEN, N., LI, B., LILBURN, T.G., McCAUGHEY, M.J., OLSEN, G.J., OVERBEEK, R., PRAMANIK, S., SCHMIDT, T. M., TIEDJE, J. M. & WOESE, C.R. 1999. A new version of the RDP. *Nucleic Acids Res.* 27: 171-173.
- MANCEAU, C. & HORVAIS, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environm. Microbiol.* 63: 498-505.
- MANULIS, S., VALINSKY, L., LITCHER, A. & GABRIEL, D.W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4094-4099.
- MARSTON, E.L., SUMNER, J.W. & REGNERY, R.L. 1999. Evaluation of intraespecies genetic variation within the 60 kDa heat-shock protein gene (*groEL*) of *Bratonella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1015-1023.

- MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T. ANDREW, P., PRUDHOMME, M., ALLOING, G., HAKENBECK, R., *et al.* 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479-3483.
- MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F. & TIEDJE, J.M. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *In*: AKKERMANS, A.D.L.; van ELSAS, J.D. & de BRUIJIN, F.J. (Eds.). *Molecular microbial ecology manual*. p. 3.3.2/1-3.3.2/8. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands).
- MCCLELLAND, M., PETERSEN, C. & WELSH, J. 1992. Length polymorphisms in transfer RNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1499-1504.
- MENDOZA, M., MEUGNIER, H., BES, M., ETIENNE, J. & FRENEY, J. 1998. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1049-1055.
- MOORE, E.R.B., KRÜGER, A.S., HAUBEN, L., SEAL, S.E., DE BAERE, R., DE WACHTER, R., TIMMIS, K.N. & SWINGS, J. 1997. 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 145-153.
- MOREL, V. Microbiology's scarred revolutionary. *Science* 276: 699-702.
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C. & UITTERLINDEN, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environm. Microbiol.* 59: 695-700.
- MURATA, N. & STARR, M.P. 1973. A concept of the genus *Xanthomonas* and its species in the light of segmental homology of deoxyribonucleic acids. *Phytopathol. Z.* 77: 285-323.

- NEI, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Ann. Rev. Genet.* 30: 371-403.
- OJANEN, T., HELANDER, I.M., HAAHTELA, K., KORHONEN, T.K. & LAAKSO, T. 1993. Outer membrane proteins and lipopolysaccharides in pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environm. Microbiol.* 59: 4143-4151.
- 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.
- PALLERONI, N.J., HILDEBRAND, D.C., SCHROTH, M.N. & HENDSON, M. 1993. Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 441-446.
- PARSONS, L.M., WARING, A.L., OTIDO, J. & SHAYEGANI, M. 1995. Laboratory diagnosis of chancroid using species-specific primers from *Haemophilus ducreyi groEL* and the polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 89-98.
- PAUL, F.; MORIN, A. & MONSAN, P. 1986. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotech. Adv.* 4: 245-259.
- PERMAUL, K., PILLAY, D. & PILLAY, B. 1996. Random-amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows intraspecies differences among *Xanthomonas albilineans* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 307-311.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A. & OWEN, R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151-156.
- POOLER, M.R., RITCHIE, D.F., HARTUNG, J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl. Environm. Microbiol.* 62: 3121-3127.

- QHOBELA, M.; LEACH, J.E.; CLAFLIN, L.E. & PEARSON, D.L. 1991. Characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* by PAGE of membrane proteins and by REA and RFLP of genomic DNA. *Plant Dis.*, 75: 32-36.
- REIFSCHNEIDER, G.J.B.; BONGLIOLO, N.A. & TAKATSU, A. 1985. Reappraisal of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains-their terminology and distributions. *Fitopatol. Bras.* 10: 201-204.
- RESTREPO, S., DUQUE, M., TOHME, J. & VERDIER, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology* 145: 107 - 114.
- 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.
- RIDÉ, M. & RIDÉ, S. 1992. *Xanthomonas populi* (ex Ridé 1958) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 652-653.
- RIFFARD, S., LO PRESTI, F., NORMAND, P., FOREY, F., REYROLLE, M., ETIENNE, J. & VANDENESCH, F. 1998. Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer PCR analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 723-730.
- ROBBS, C.F. & RODRIGUES NETO, J. 1993. Taxonomia de *Xanthomonas*, Vol. I. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M. & PICINI, E.C. (Eds.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. p. 143-164.
- ROBERTS, P.D., HODGE, N.C., BOUZAR, H., JONES, J.B., STALL, R.E., BERGER, R.D. & CHASE, A.R. 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analysis. *Appl. Environm. Microbiol.* 64: 3961-3965.

- ROMEIRO, R. S. 1985. Bactérias como fitopatógenos. *Inf. Agropec.* 11: 16-20.
- SAHIN, F. & MILLER, S.A. 1996. Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 80: 773-778.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F. *et al.* 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1530-1534.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SEGAL, G. & RON, E.Z. 1996. Regulation and organization of the *groEL* and *dnaK* operons in eubacteria. *FEBS Microbiol. Lett.* 138: 1-10.
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- STALL, R.E., BEAULIEU, C., EGEL, D., HODGE, N.C., LEITE, R.P., MINSVAGE, G.V., BOUZAR, H., JONES, J.B., ALVAREZ, A.M. & BENEDICT, A.A. 1994. Two genetically diverse groups of strains are clustered in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 47 -53.
- STALL, R.E. & SEYMOUR, C.P. 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. *Plant Dis.* 67: 581-585.
- STARR, M.P. & GARCÉS, O.C. 1950. El agente causante de la gomosis bacterial del pasto imperial en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellin* 12: 73-83.
- STARR, M.P. 1944. *Studies of phytopathogenic bacteria*. Cornell University, p. 349-350.

- STARR, M.P.; JENKINS, C.L.; BUSSEY, L.B. & ANDREWES, A.G. 1977. Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch. Mikrobiol.* 113: 1-9.
- STARR, M.P. & STEPHENS, W.L. 1964. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.* 87: 293-302.
- STEAD, D.E. 1989. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. *Bull. OEPP (Organ. Eur. Mediterr. Prot. Plant)/EPPO (Eur. Mediterr. Plant. Prot. Organ.) Bull.* 19: 57-68.
- STEAD, D.E. 1999. 1999 APS/CPS Joint Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 7-11 de agosto de 1999.
- STERN, M.J., AMES, G.F., SMITH, N.H., ROBINSON, E.C., HIGGINS, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37:1015-1026.
- SUMNER, J.W., NICHOLSON, W.L. & MASSUNG, R.F. 1997. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2087-2092.
- SUZUKI, K.; GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G. 1993. Cell envelopes and classification. In: GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.G. (Eds.). *Handbook of new bacterial systematics*. p. 195-250. Academic Press, London.
- SWANSON, D.S., KAPUR, V., STOCKBAUER, K., PAN, X., FROTHINGHAM, R. & MUSSER, J.M. 1997. Subspecific differentiation of *Mycobacterium avium* complex strains by automated sequencing of a region of the gene (*hsp65*) encoding a 65-kilodalton heat shock protein. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 723-730.
- 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.

- TANG, J.L., GOUGH, C., BARBER, C.E., DOW, J.M. & DANIELS, M.J. 1989. Molecular cloning of a protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* 210: 443-448.
- THAYER, P.L. & STALL, R.E. 1961. A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 75: 163-165.
- TIBAYRENC, M. 1996. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 401-429.
- TOTH, I.K., HYMAN, L.J., TAYLOR, R. & BIRCH, P.R.J. 1998. Pcr-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X.c.* pv. *phaseoli*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 327-336.
- TOWNER, K.J. & COCKAYNE, A. 1993. *Molecular methods for microbial identification and typing*. Chapman & Hall, London.
- TURNER, P.; BARBER, C. & DANIELS, M. 1984. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 195: 101-107.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K. & SWINGS, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- van den MOOTER, M. & SWINGS, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 348-369.
- VAN ZYL, E. & STEYN, P.L. 1992. Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maltophilia* and taxonomic criteria in this genus - request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 193-198.
- VAN ZYL, E. & STEYN, P.L. 1990. Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams. *System. Appl. Microbiol.* 13: 166 - 176.

- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
- VAUTERIN, L., HOSTE, B., YANG, P., ALVAREZ, A., KERSTERS, K. & SWINGS, J. 1993. Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*. SWINGS, J.G. & CIVEROLO, E.L., (Eds.). Chapman & Hall, London, UK.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J. & KERSTERS, K. 1991b. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1677-1687.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MEW, T.W.; SCHROTH, M.N.; PALLERONI, N.J.; HILDEBRAND, D.C.; STEAD, D.E.; CIVEROLO, E.L.; HAYWARD, A.C.; MARAITE, H.; STALL, R.E.; VIDAVER, A.K. & BRADBURY, J.F. 1990a. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 312-316.
- VAUTERIN, L., VANTOMME, R., POT, B., HOSTE, B., SWINGS, J. & KERSTERS, K. 1990b. Taxonomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* by means of phytopathological, phenotypic, protein eletrophoretic and DNA hybridization methods. *System. Appl. Microbiol.* 13: 166 - 176.
- VAUTERIN, L.; YANG, P. & SWINGS, J. 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 46: 298-304.
- VAUTERIN, L., YANG, P., HOSTE, B., POT, B., SWINGS, J. & KERSTERS, K. 1992. Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1467-1477.

- VAUTERIN, L.; YANG, P.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; CIVEROLO, E.L.; SWINGS, J. & KERSTERS, K. 1991a. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis, and DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 535-542.
- VERDIER, V., RESTREPO, S., MOSQUERA, G., DUQUE, M.C., GERSTL, A. & LABERRY, R. 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. *Plant Pathology* 47: 601-608.
- VERNIERE, C., HARTUNG, J.S., PRUVOST, O.P., CIVEROLO, E.L., ALVAREZ, A.M., MAESTRI, P. & LUISETTI, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European J. Plant Pathol.* 104: 477-487.
- VERNIERE, C., PRUVOST, O., CIVEROLO, E.L., GAMBIN, O., JACQUEMOUD-COLLET, J.P. & LUISETTI, J. 1993. Evaluation of the biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Appl. Environm. Microbiol.* 59: 243-249.
- 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.
- VIALE, A.M. & ARAKAKI, A.K. 1994a. The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *FEBS Lett.* 341: 146-151.
- VIALE, A.M.; ARAKAKI, A.K.; SONCINI, F.C. & FERREYRA, R.G. 1994b. Evolutionary relationships among eubacterial groups inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 527-533.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJNAS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FREITJERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Res.* 21: 4407-4414.
- WAKKER, J.H. 1883. Vorlanfige Mitteilungen uber Hyacinthenkrankheiten. *Bot. Zentralblat.*, 14: 315-317.

- WAYNE, L.G., BRENNER, R.R., COLWELL, R.R., GRIMONT, P.A.D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M.I., MOORE, L.H., MURRAY, R.G.E., STACKEBRANDT, E., STARR, M.P. & TRÚPER, H.G. 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol* 37: 463-464.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic. Acid Res.* 18: 7213-7218.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1991. Species-specific genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic. Acid Res.* 19: 861-866.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1992. PCR-amplified length polymorphisms in transfer RNA intergenic spacers for categorizing staphylococci. *Mol. Microbiol.* 6: 1673-1680.
- WIEHE, P.O. & DOWSON, W.J. 1953. A bacterial disease of cassava (*Manihot utilissima*) in Nyasaland. *Emp. J. Exp. Agric.* 21: 141-143.
- WILLEMS, A.; GILLIS, M.; KERSTERS, L.; van den BROECKE & DE LEY, J. 1987. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus *Xylophilus* gen. nov. as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 422-430.
- WINSLOW, C.E.A.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R.E.; KRUMWIEDE Jr., C.; ROGERS, L.A. & SMITH, G.H. 1917. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committees of the Soc. Am. Bacteriologist, on characterization and classification of bacterial types. *J. Bacteriol.* 2: 506-566.
- WOESE, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- WOESE, C.R., KANDLER, O. & WHEELIS, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576 – 4579.

- YANG, P., DE VOS, P., KERSTERS, K. & SWINGS, J. 1993a. Polyamine patterns as chemotaxonomic markers for the genus *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 43: 709-714.
- YANG, P.; VAUTERIN, L.; VANCANNEYT, M., SWINGS, J. & KERSTERS, K. 1993b. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 47-71.
- YASHITOLA, J., KRISHNAVENI, D., REDDY, A.P.K. & SONTI, R.V. 1997. Genetic diversity within the population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in India. *Phytopathology* 87: 760-765.
- YOUNG, J.M., BRADBURY, J. F., GARDAN, L., GVOZDYAK, R.I., STEAD, D.E., TAKIKAWA, Y. & VIDAVER, A.K. 1991. Comment on the reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse 1915) Gabriel *et al.* 1989 and *X. phaseoli* (ex Smith 1897) Gabriel *et al.* 1989: Indication of the need for minimal standards for the genus *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 172-177.
- YOUNG, J.M., DYE, D.W., BRADBURY, J.F., PANAPOULOS, C.G. & ROBBS, C.F. 1978a. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z.J. Agric. Res.* 21: 153-177.
- YOUNG, J.M., DYE, D.W., BRADBURY, J.F., PANAPOULOS, C.G. & ROBBS, C.F. 1978b. The use of the term "pathovar" in the classification of plant pathogenic bacteria. *In: IV International Conference Plant Pathological Bacteria*, Angers, Inst. Nat. de la Rech. Agronomique 359-363.
- ZEILSTRA-RYALLS, J.; FAYET, O. & GEORGOPOULOS, C. 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 301-325.