**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*
com base em marcadores rep-PCR e AFLP e construção de *primers* específicos
para diagnose**

Carla de Freitas Munhoz

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.**

**Piracicaba
2009**

**Carla de Freitas Munhoz
Bióloga**

Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em marcadores rep-PCR e AFLP e construção de *primers* específicos para diagnose

**Orientadora:
Prof^ª Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.**

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Munhoz, Carla de Freitas

Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em marcadores rep-PCR e AFLP e construção de *primers* específicos para diagnose / Carla de Freitas Munhoz. - - Piracicaba, 2009.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Bacteriose vegetal 3. Maracujá 4. Marcador molecular
5. Sequenciamento genético 6. Variação genética I. Título

CDD 634.425
M966d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedicatória

À Deus, pela graça da vida,
à minha mãe, Vanja,
ao meu irmão, Bruno,
ao meu namorado, Cícero,
aos meus familiares
e a todos amigos que me apoiaram,
com amor dedico este trabalho.

Agradecimentos

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ / USP) e ao Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, pela possibilidade de realizar o curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Professora Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira pela orientação, apoio, confiança e oportunidades concedidas durante toda a minha permanência no laboratório e durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria Imaculada Zucchi, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela amizade e valiosa colaboração nas análises dos dados moleculares.

À Professora Dra. Maria Helena P. Fungaro, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela amizade, pelas valiosas sugestões e colaboração nas etapas de seqüenciamento e desenho dos *primers*.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos conhecimentos compartilhados; em especial ao Professor Dr. Roland Venovsky, que gentilmente ofereceu valiosos conselhos.

Ao graduando Bruno Weiss, pelo grande apoio durante todo o trabalho da dissertação.

Ao Dr. Luiz Ricardo Hanai, pelo auxílio e valiosas sugestões durante a realização do trabalho.

Ao Carlos Alberto de Oliveira, pela amizade e auxílio técnico durante a realização do trabalho.

Aos produtores de maracujá e funcionários das Casas de Agricultura que atenciosamente possibilitaram as coletas em campo dos isolados.

Aos funcionários do Departamento de Genética pelo convívio amigável e pela colaboração durante a execução do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, da UEL, André, Roberta e Francine, pelo seqüenciamento das minhas amostras.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microorganismos, da ESALQ/USP, Joelma, Anderson, Francisco, Carlos, Rodrigo, Fernanda e Danice, pela disponibilidade e atenção nos momentos de dúvidas.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas, Luciane, Hanai, Helen, Alessandra, Anselmo, Endson, Larissa, Luciano, Taislene, Marcelo e Bruno.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A cultura do maracujazeiro.....	12
2.2 O gênero <i>Xanthomonas</i>	13
2.3 A bacteriose do maracujazeiro	15
2.4 Diversidade genética de bactérias fitopatogênicas e uso de marcadores moleculares	16
2.4.1 Análises biométricas aplicadas ao estudo de diversidade genética	19
2.5 Detecção de fitopatobactérias por métodos moleculares.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material genético	23
3.2 Formação da coleção dos isolados	23
3.3 Coleta de isolados.....	23
3.4 Isolamento das bactérias.....	24
3.5 Extração e quantificação de DNA	24
3.6 Desenvolvimento da técnica rep-PCR.....	25
3.7 Desenvolvimento da técnica AFLP	26
Digestão do DNA genômico.....	27
Ligação dos adaptadores.....	27
Amplificação dos fragmentos.....	27
Eletroforese em gel de poliacrilamida	28
Revelação dos géis.....	29
3.8 Análise biométrica dos dados	29
3.9 Sequenciamento de fragmentos gerados por AFLP	30
3.10 Sequenciamento da região intergênica 16S-23S rRNA.....	32
3.11 Construção de <i>primers</i> específicos para <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	33
3.12 Teste de validação dos <i>primers</i>	35
3.13 Diagnose utilizando os <i>primers</i> desenhados.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

4.1 Coleta de isolados.....	39
Coleção de isolados	42
4.2 Isolamento das bactérias	44
4.3 Rep-PCR.....	46
4.4 AFLP	47
4.5 Sequenciamento de fragmentos gerados por AFLP e da região intergênica 16S-23S rRNA..	54
4.6 Construção de primers específicos para <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> e teste de validação .	58
4.7 Diagnose utilizando os <i>primers</i> desenhados.....	63
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

RESUMO

Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em marcadores rep-PCR e AFLP e construção de *primers* específicos para diagnose

O patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* causa a mancha oleosa ou bacteriose do maracujazeiro, uma doença que acarreta prejuízos à cultura em decorrência da baixa produção de frutos, podendo causar a morte das plantas. Uma coleção de 87 isolados deste patovar, oriundos de 22 cidades dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná e do Distrito Federal, foi usada para estudar a diversidade genética por rep-PCR e AFLP. Nove isolados de outros patovares foram incluídos nas análises genéticas. A técnica rep-PCR revelou pouca diversidade entre os isolados do patovar *passiflorae*, mas diferenciou, claramente, os diferentes patovares. Todavia, a técnica AFLP revelou considerável diversidade genética entre os isolados do patovar *passiflorae*. A análise molecular da variância mostrou que a maior parte da diversidade (49,4%) se encontra entre as cidades de coleta. O agrupamento gerado com base nos coeficientes de similaridade e os resultados do teste de atribuição pelo programa *Structure* revelaram *clusters* genotípicos homogêneos. Isto evidencia que a variação está mais associada à geografia, ou seja, às cidades de coleta, e que o fluxo desses isolados é pequeno. Cinco conjuntos de *primers* foram desenhados para a detecção do patógeno em plantas. Desses, um conjunto de *primers* foi desenhado a partir da sequência intergênica 16S-23S rRNA e se mostrou específico para o patovar *passiflorae*. Nenhum amplicon foi detectado nos patovares controles. O restante dos *primers* foi desenhado a partir do seqüenciamento de locos de AFLP, monomórficos para o patovar *passiflorae* e ausentes nos demais patovares. Estes *primers* não foram totalmente específicos; no entanto, todos podem ser recomendados para o diagnóstico da mancha oleosa, uma vez que não há registros de outras *Xanthomonas* em pomares de maracujá.

Palavras-chave: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; Diversidade genética; rep-PCR; AFLP; Programa *Structure*; Diagnose molecular

ABSTRACT

Genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* isolates based on rep-PCR and AFLP markers and the construction of specific primers for diagnosis

The pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* is responsible for the bacterial leaf spot of passion fruits, a disease that provokes commercial losses due to low levels of fruit production and even plant death. A group of 87 isolates of this pathovar, collected from 22 localities of São Paulo, Minas Gerais and Paraná States as in the Federal District was used to evaluate the genetic diversity based on rep-PCR and AFLP. Isolates from other nine pathovars were included in the genetic analyses. Low level of genetic diversity was revealed by the rep-PCR technique, which clearly distinguished the different pathovars. However, considerable diversity between isolates of the pathovar *passiflorae* was revealed by the AFLP technique. The analysis of molecular variance showed that differences between localities contributed to most part of the variance (49.4%). Groups generated based on similarity coefficients as well as results produced by the software *Structure* assigning isolates to groups, revealed homogeneous genotypic clusters. This confirms that variance is associated with geographic origin e.g. sampling localities, and that flow of isolates is restricted among localities. Five primer sets were designed for pathogen detection in plants; a primer set was designed for PCR amplification of the intergenic sequence 16-23S rRNA, which was shown to be specific to the pathovar *passiflorae*. No amplicons were detected in the controls. The remaining primers were designed after sequencing AFLP bands that were monomorphic within the pathovar *passiflorae* but absent in the other pathovars. These primers were not absolutely specific but all could be recommended for diagnosis of leaf spot as there is no report on the occurrence of other *Xanthomonas* species in passion fruit orchards.

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; Genetic diversity, rep-PCR; AFLP; Software *Structure*; Molecular diagnosis

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, sendo o maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a espécie de *Passiflora* de maior expressão comercial dentre as cultivadas. Além da importância econômica devida à produção de frutos e de suco industrializado, o cultivo de espécies de *Passiflora* se presta à produção de flores para o setor ornamental e de folhas e ramos para a extração da passiflorina, um calmante natural, usado na indústria farmacêutica (SOUZA; MELETTI, 1997; AGUIAR; SANTOS, 2001; SILVA; RUA, 2007).

As monoculturas de maracujazeiro enfrentam problemas fitossanitários, como doenças causadas por fungos, vírus e bactérias (SANTOS FILHO et al., 2004). Dentre elas, a bacteriose do maracujazeiro é uma das mais severas, dada à dificuldade de controle, principalmente, controle químico eficiente. Daí a necessidade de pesquisas que visem buscar novas variedades resistentes.

O patovar *passiflorae* da bactéria *Xanthomonas axonopodis*, causadora da bacteriose do maracujazeiro, é patógeno específico do gênero *Passiflora* (LIBERATO, 2002). A doença ataca a parte aérea da planta e se torna mais grave quando as plantas são expostas a altas temperaturas e umidade elevada. Os sintomas foliares se iniciam no limbo e a infecção pode avançar através das nervuras, evoluindo para o pecíolo, até atingir os vasos dos caules mais finos, o que provoca caneluras longitudinais e a seca dos órgãos. Conseqüentemente, ocorre intensa desfolha e a morte prematura da planta. A bactéria é introduzida no pomar através de mudas contaminadas e se dissemina pela água da chuva, pelos instrumentos de poda e colheita, ou pelo próprio homem (SANTOS FILHO et al., 2004; KIMATI et al., 2005).

A importância das bactérias como patógenos de plantas se dá pela severidade das doenças que provocam em culturas de grande interesse econômico, pela sua rápida disseminação e pelas dificuldades que se tem em controlá-las (ROMEIRO, 2005). Estes atributos estão associados à diversidade genética encontrada nos microrganismos. Por isso, o estudo da diversidade genética de bactérias fitopatogênicas tem várias e importantes finalidades. Por exemplo, ao se estudar a estrutura de populações de patógenos de plantas, pode-se mensurar a diversidade genética dentro da população e estabelecer as relações genéticas existentes dentro e entre subpopulações, procedendo a uma subdivisão da variação, e mesmo comparar populações de isolados.

Para tais estudos, dois tipos de marcadores moleculares têm sido muito usados: análise de seqüências repetitivas baseadas em PCR (rep-PCR) e AFLP (RESTRESPO; VÉLEZ; VERDIER, 2000). A técnica rep-PCR é baseada no uso de *primers* complementares às seqüências de DNA repetitivas altamente conservadas, presentes em múltiplas cópias nos genomas bacterianos. Estas seqüências são encontradas em posições intergênicas diferentes, amplificando-se assim, via PCR, regiões genômicas distintas, localizadas entre os elementos repetitivos (ALVES et al., 2003).

A técnica *Amplified Frangment Length Polymorphism* (AFLP), desenvolvida por Vos et al. (1995), se baseia em amplificações, via PCR, de fragmentos obtidos pela digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição sendo, necessariamente, uma de corte raro e outra de corte freqüente. É uma técnica que detecta um grande número de locos por gel, apresentando custos reduzidos por informação genética (LOPES et al., 2002).

A PCR é um método rápido, específico e sensível que permite detectar e amplificar seqüências de DNA. A técnica oferece vantagens para diagnosticar patógenos de plantas se comparada àqueles procedimentos tradicionais, dispensando, inclusive o cultivo microbiano (HARTUNG; DANIEL; PRUVOST, 1993; HENSON; FRENCH, 1993). Dispondo-se, então, de *primers* desenhados especificamente para uma espécie, patovar ou linhagem patogênica, é possível detectar e quantificar o patógeno em uma planta hospedeira, mesmo antes que provoque a doença e os sintomas sejam visíveis.

O seqüenciamento da região entre os genes ribossomais, 16S e 23S, tem sido realizado para discriminar isolados microbianos de diferentes hospedeiros ou patovares, inclusive de *Xanthomonas* (HENDSON et al., 2001; CUBERO; GRAHAM, 2002; GONÇALVES; ROSATO, 2002). Por isto, esta região apresenta-se propícia para o desenho de *primers* que possam ser usados para detectar um determinado patógeno.

Com base nas informações acima apresentadas, o presente trabalho teve como objetivo: (i) estabelecer uma coleção de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, oriundos de áreas produtoras da fruta nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná e no Distrito Federal; (ii) de quantificar a diversidade genética entre tais isolados, usando os marcadores rep-PCR e AFLP; (iii) entender se há migração de isolados e conseqüentemente da doença; (iv) construir *primers* específicos, a partir de fragmentos de AFLP e de seqüências intergênicas de rRNA 16S e 23S, para uso em diagnóstico precoce do patógeno em pomares comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do maracujazeiro

Maracujá é um termo indígena usado para se referir ao fruto (*cuia*) de plantas pertencentes ao gênero *Passiflora*, o qual possui cerca de 150 espécies no Brasil. Parte delas, cerca de 50 espécies, apresenta importância para os setores alimentício, medicinal e ornamental (CUNHA; BARBOSA; FARIA, 2004). As espécies mais cultivadas no Brasil são o maracujá azedo, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, o maracujá roxo, *Passiflora edulis*, e o maracujá doce, *Passiflora alata* (SOUZA; MELETTI, 1997; VIEIRA; CARNEIRO, 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial da fruta (AGUIAR; SANTOS, 2001; LIMA et al., 2006), sendo o maracujá azedo a espécie mais expressiva comercialmente dentre as cultivadas. Seu cultivo aumentou significativamente a partir de meados da década de 80 e, na década de 90, houve um importante crescimento na exportação de suco concentrado (AGUIAR; SANTOS, 2001; SILVA; RUA, 2007). No ano de 2006, a produção foi de 615.196 toneladas em uma área de 44.363 hectares, segundo dados do Agrianual (2009). No entanto, a maior parte do cultivo do maracujá ainda é conduzido com baixo nível tecnológico (LIMA et al., 2006) e, conseqüentemente, seu potencial genético não é totalmente explorado (SILVA; RUA, 2007).

O maracujá azedo é comercializado na forma de fruta fresca para consumo “in natura” e na forma de suco (AGUIAR; SANTOS, 2001). A maior parte da produção mundial de maracujá é destinada à produção do suco, sendo o Brasil um dos principais exportadores, destina sua produção à União Européia (VIEIRA; CARNEIRO, 2005; SILVA; RUA, 2007).

Já o maracujá doce tem sua produção totalmente voltada para o mercado de frutas frescas, pois seu preço mais elevado é atrativo para os produtores. Também, a espécie tem outras finalidades comerciais como a produção de flores para o setor ornamental e de folhas e ramos para a extração da passiflorina, utilizada na indústria farmacêutica (SILVA; RUA, 2007).

Com a considerável demanda por frutos de maracujá e conseqüente aumento da área plantada, houve maior incidência de doenças e pragas nos pomares. As doenças são causadas por fungos, vírus e bactérias. Tais problemas acarretam redução do tempo de exploração comercial dos pomares e, até mesmo, impossibilitam seu plantio em algumas regiões, o que exige esforços

para que as perdas diminuam e se impeça a disseminação das doenças (SANTOS FILHO et al., 2004).

Uma das doenças dos maracujazeiros que se tem maior dificuldade em controlar é a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, por não se dispor de um controle químico eficiente. Por isso, se torna importante o uso de variedades resistentes, o que realça a necessidade de pesquisas que visem buscar essas novas variedades. Para tal, podem-se buscar genótipos dentro da espécie que apresentem resistência ou algum grau de tolerância, ou mesmo, introduzir genes de resistência de espécies próximas (MELETTI; BRUCKNER, 2001).

2.2 O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* é composto quase exclusivamente por espécies fitopatogênicas, que têm como habitat as lesões que se formam nas plantas afetadas. As espécies de *Xanthomonas* infectam plantas em todo o planeta, sendo que representantes dos principais vegetais superiores sofrem de um ou mais tipos de doenças causadas por estas bactérias, com baixa até alta importância econômica (STARR, 1983).

As espécies que constituem o gênero *Xanthomonas* são Gram-negativas, o comprimento de suas células é variável, mesmo dentro da mesma estirpe, e muitas células possuem grânulos intracelulares e são envolvidas por um polissacarídeo extracelular, EPS, conhecido como goma xantana. Muitas espécies produzem um pigmento amarelo insolúvel em água, a xantomonadina, quando em condições normais de crescimento, o que tipifica o gênero por apresentar colônias de cor amarelada (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

As *Xanthomonas* penetram na planta hospedeira apenas através de ferimentos ou por aberturas naturais, como estômatos, hidatódios, lenticelas ou nectários. Quando são depositadas sobre a superfície das folhas por respingos d'água ou aerossóis, as bactérias podem desaparecer se não forem capazes de crescer epifiticamente ou encontrarem uma abertura para adentrar na planta. O quimiotaxismo (ou aerotaxismo), a rápida multiplicação na cavidade subestomatal ou o ingresso passivo pelo o fluído da gutação são mecanismos que facilitam a penetração da bactéria na planta. A penetração da bactéria também é favorecida por condições externas, especialmente, pela disponibilidade de água e pela estrutura e estado das aberturas naturais da planta (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

Em contraste com sua uniformidade fenotípica, esse gênero é notável por sua diversidade fitopatogênica, o que tem impedido uma classificação taxonômica segura por um longo tempo. No entanto, vários estudos recentes, baseados em hibridização de DNA, análise de seqüências repetitivas via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e *fingerprints* de AFLP (*Amplified Frangment Length Polymorphism*) têm revelado, claramente, a diversidade genética presente nas *Xanthomonas* e as relações intraespecíficas (VAUTERIN; RADEMAKER; SWINGS, 2000).

Trabalhos de seqüenciamento de genomas completos de algumas espécies de *Xanthomonas* também vêm sendo realizados. No trabalho de Silva et al. (2002), foi feito o seqüenciamento e a comparação do genoma completo das espécies *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris*, as quais provocam doenças distintas em diferentes hospedeiros; no entanto, há um alto grau de similaridade genética entre essas duas espécies e pôde-se identificar grupos de genes específicos para os respectivos patovares, possibilitando entender os mecanismos que explicam a especificidade a hospedeiros e os processos fitopatogênicos. No genoma completo da espécie *X. oryzae* pv. *oryzae* (LEE et al., 2005) foram identificados genes dos quais 80% são ortólogos aos de *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* e 245 aparentemente específicos para *X. oryzae* pv. *oryzae*. Dentre os genes identificados que, possivelmente, estão associados à patogenicidade, há oito que mostram similaridade com genes de avirulência (*avr*), um conjunto de genes para reação de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*), genes para a produção de exopolissacarídeos e genes que codificam enzimas extracelulares que degradam a parede celular das plantas.

A espécie *X. campestris* pv. *vesicatoria* também teve seu genoma completo seqüenciado, apresentando uma ordem gênica similar à das espécies *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* e uma estrutura completamente diferente à da espécie *X. oryzae* pv. *oryzae*. Um total de 548 seqüências codantes únicas foram identificadas em *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Quando este genoma foi comparado com outros genomas de patógenos de plantas completamente seqüenciados, puderam-se detectar seis novas proteínas efetoras do tipo III, relacionadas à patogenicidade, e vários outros fatores de virulência (THIEME et al., 2005).

2.3 A bacteriose do maracujazeiro

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye foi identificada por Pereira (1969), na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo; este autor a denominou *Xanthomonas passiflorae*. No trabalho de Dye et al. (1980), esta bactéria sofreu nova classificação, passando a ser denominada *X. campestris* pv. *passiflorae*. No entanto, Gonçalves e Rosato (2000) propuseram uma nova classificação, a qual foi adotada neste trabalho, pois estes autores constataram, pela técnica de hibridização DNA-DNA, que esta bactéria tinha homologia com o grupo de isolados de vários patovares da espécie *Xanthomonas axonopodis*.

Xanthomonas axonopodis pv. *passiflorae* é específica do gênero *Passiflora* (LIBERATO, 2002), causa a bacteriose dos maracujazeiros ou crestamento bacteriano, doença também conhecida por mancha oleosa dos frutos. Ela pode ser encontrada nos pomares das espécies *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, o maracujá azedo, *Passiflora alata*, o maracujá doce, *Passiflora cincinnata*, *Passiflora nítida*, *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora amethystina*, *Passiflora setacea* e *Passiflora edulis* f. *edulis* (JUNQUEIRA et al., 2005).

A doença ataca a parte aérea da planta, apresentando formas de infecção localizada ou sistêmica, que podem ou não ocorrerem associadas. A infecção se torna mais grave quando a planta está exposta a altas temperaturas e umidades, principalmente quando acontece de forma localizada, a qual atinge as folhas mais novas. Porém, quando a infecção é sistêmica, a bactéria pode se disseminar independente da condição ambiental (SANTOS FILHO et al., 2004; KIMATI et al., 2005).

Os sintomas foliares se iniciam no limbo com manchas angulares, translúcidas, de coloração verde-escura e aspecto encharcado que evoluem para uma coloração pardacenta e seca, envoltas por um halo amarelo. Se a umidade permanecer superior a 80%, as lesões aumentam de tamanho, atingindo todo o limbo e ocasionando a seca e a queda das folhas. A infecção pode avançar através das nervuras, evoluir para o pecíolo até atingir os vasos dos caules mais finos, o que provoca caneluras longitudinais e a seca dos órgãos, conseqüentemente ocorre intensa desfolha e a morte prematura da planta. Nos frutos maduros, provoca lesões oleosas de coloração verde-escura a marrom, podendo chegar até as sementes, o que pode causar a queda dos frutos e inviabilizar o seu comércio (SANTOS FILHO et al., 2004; KIMATI et al., 2005).

A bactéria é introduzida no pomar através de mudas contaminadas e se dissemina pela água da chuva, pelos instrumentos de poda e colheita, ou pelo próprio homem (SANTOS FILHO et al., 2004). Por isso, para controlá-la, recomenda-se o uso de sementes e mudas saudáveis, o tratamento de sementes em água à temperatura de 50°C durante 15 minutos e a poda das partes infectadas das plantas com ferramentas descontaminadas (KIMATI et al., 2005). Outros procedimentos também podem ser feitos, tal como, corrigir o pH do solo para 6,2 a 6,8 com calcário antes do plantio, não adicionar nitrogênio em excesso durante as adubações, utilizar fertilizantes foliares à base de ferro e cobre e impedir que herbicidas atinjam as folhas durante a aplicação, o que favorece o desenvolvimento das plantas, deixando-as menos susceptíveis a doenças (JUNQUEIRA et al., 2005).

A resistência à bacteriose é controlada por oligogenes, porém não há variedades selecionadas para expressar os alelos favoráveis detectados na população segregante estudada por Lopes et al. (2006).

2.4 Diversidade genética de bactérias fitopatogênicas e uso de marcadores moleculares

A importância das bactérias como patógenos de plantas se dá pela gravidade das doenças que provocam em culturas de grande interesse econômico, pela sua rápida disseminação e pelas dificuldades que se têm em controlá-las. Estes fatos se devem à grande adaptabilidade que as bactérias apresentam, capacitando sua sobrevivência em diversas condições ambientais, tais quais: diferentes climas, estágios fenológicos de hospedeiro e capacidade em desenvolver resistência a defensivos usados em seu controle (ROMEIRO, 2005).

Em microrganismos, a diversidade genética é originada e mantida devido a fatores genéticos e ecológicos (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000). As principais estratégias genéticas responsáveis pelo surgimento e ampliação da diversidade genética são mutação, recombinação e aquisição de seqüências de DNA de outros organismos, as chamadas transferências horizontais gênicas (ARBER, 2000). Os fatores ecológicos estão ligados à oportunidade em colonizar um hospedeiro e à competição entre isolados (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000).

Assim, o estudo da diversidade genética de bactérias fitopatogênicas tem várias e importantes finalidades, dentre as quais, distinguir e classificar isolados, proceder estudos

taxonômicos, relacionar a distribuição geográfica com a heterogeneidade do patógeno, gerar informações que auxiliem em estudos fitopatológicos e no controle de doenças, entender a história evolutiva da espécie e estudar a estrutura de populações de patógenos.

Ao se estudar a estrutura de populações de patógenos vegetais, pode-se mensurar a quantidade de diversidade genética dentro de uma população de isolados, estabelecer relações genéticas dentro e entre subpopulações e proceder a subdivisão da variação. Para isso, duas técnicas têm sido muito usadas: análise de seqüências repetitivas baseadas em PCR (rep-PCR) e AFLP (RESTRESPO; VÉLEZ; VERDIER, 2000).

A técnica rep-PCR é baseada no uso de *primers* complementares às seqüências de DNA repetitivas, altamente conservadas, e presentes em múltiplas cópias nos genomas bacterianos. Segundo revisão de Alves et al. (2003), há três famílias de seqüências repetitivas: seqüência REP (“*Repetitive Extragenic Palindromic*”) de 35 a 40 pb, seqüência ERIC (“*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*”) de 124 a 127 pb, e o elemento BOX de 154 pb. Estas seqüências são encontradas em posições intergênicas diferentes, amplificando-se assim, via PCR, regiões genômicas distintas localizadas entre os elementos repetitivos.

O protocolo da técnica rep-PCR é rápido, prático e a metodologia é muito simplificada, gerando resultados de fácil visualização (VALVERDE et al., 2007). A rep-PCR é, por isso, uma importante ferramenta para a caracterização molecular de bactérias fitopatogênicas, especialmente ao nível de patovar (LOUWS et al, 1994). Scortichini, Marchesi e Di Próspero (2001) estudaram a variabilidade genética entre os isolados de *Xanthomonas arbuticola* pv. *juglandis*, oriundos de diferentes áreas geográficas, usando o marcador rep-PCR, e detectaram um alto grau de polimorfismo. A análise de agrupamento mostrou a formação de três grandes grupos, indicando que para cada área de cultivo da planta hospedeira existia uma população distinta do patógeno. Isso se deve ao cultivo da noqueira, planta hospedeira desse patógeno, ser, principalmente, baseado em ecótipos ou mudas locais adaptadas a ambientes específicos, permitindo a seleção de diferentes populações do patógeno.

No entanto, no trabalho de Qin et al. (2001) não se detectou polimorfismo entre isolados de *Xylella fastidiosa*, coletados do mesmo hospedeiro, usando rep-PCR, mas se observou um alto grau de diversidade entre isolados de hospedeiros diferentes. Com estes dados, juntamente com dados de outros marcadores, os autores identificaram quatro grupos de isolados oriundos de diferentes hospedeiros e regiões, concluindo que as metodologias empregadas podem ser

aplicadas em estudos epidemiológicos e etiológicos. Também, Barak e Gilbertson (2003), analisando isolados de *X. campestris* pv. *vitians*, patógeno de alface, por rep-PCR, relataram que os perfis moleculares destes isolados eram idênticos, mas distintos dos perfis de isolados de outros patovares de *X. campestris*. Estes autores acessaram a diversidade genética desses isolados com marcadores RFLP e concluíram que os marcadores rep-PCR podem ser úteis para diferenciar patovares de *X. campestris*, uma vez que os elementos repetitivos se apresentaram altamente conservados dentro dos patovares em estudo.

O AFLP, desenvolvido por Vos et al. (1995), se baseia em amplificações, via PCR, de fragmentos obtidos pela digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrições das quais, necessariamente, uma tem sítio de corte raro e a outra de corte freqüente. Tais enzimas possuem a propriedade de produzir extremidades coesivas, as quais podem ser ligadas a adaptadores de seqüências conhecidas, o que capacita a construção de *primers* complementares às seqüências dos adaptadores, permitindo que os fragmentos gerados sejam amplificados. É uma técnica que detecta um grande número de locos por gel, apresentando custos reduzidos por informação genética (LOPES et al., 2002).

As marcas de AFLP são amplamente dispersas no genoma e consideradas anônimas e neutras, pois representam áreas genômicas que podem ou não estarem sujeitas à pressão de seleção. Assim, com estas marcas, podem-se acessar os diferentes *backgrounds* genéticos de linhagens bacterianas (RESTRESPO et al., 1999).

Markell e Milus (2008) estudaram a diversidade genética entre isolados de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, patógeno de trigo, coletados no leste dos Estados Unidos em duas épocas diferentes, com marcadores moleculares AFLP. O agrupamento dos dados arranhou os isolados em três grupos, mostrando alto nível de similaridade dentro dos grupos comparativamente à similaridade entre grupos. Os autores concluíram que os isolados mais recentes (coletados depois de 2000) foram distintos dos isolados antigos (coletados antes de 2000), e que as populações anteriores podem ter sido substituídas pelas mais novas.

Loreti et al. (2001) encontraram considerável variabilidade genética entre os isolados de *Xanthomonas arbuticola* pv. *juglandis*, que provoca severa doença em nogueiras (*Juglandis regia* L.), usando marcadores AFLP. A técnica também foi sensível para distinguir o patógeno de outros patovares e espécies do gênero. Pôde-se concluir que a localização geográfica dos isolados

está associada com a diversidade genética, no entanto, essa diversidade pode ser também influenciada pela troca de material vegetal entre diferentes países.

Outra metodologia molecular que tem ganho destaque nos estudos de diversidade de bactérias fitopatogênicas é a análise da região entre os genes ribossomais 16S e 23S, conhecida como ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Esta região do operon ribossomal sofreu uma pressão de seleção menos intensa e pode ser considerada dez vezes mais variável que o gene 16S rRNA (LEBLOND-BOURGET, et al., 1996).

Muitos dados dessas seqüências ITS são depositados em banco de dados (*National Center for Biotechnology Information*, por exemplo), sendo que o alinhamento dessas moléculas mostra que não existem regiões altamente conservadas, o que possibilita usá-las para detectar considerável variação entre as espécies, tanto no tamanho como na seqüência de bases (GÜRTLER; STANISICH, 1996). Gonçalves e Rosato (2000) usaram PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região ITS para estudar várias espécies do gênero *Xanthomonas* e detectaram um considerável grau de variação entre as mesmas.

A região ITS pode ser usada de várias maneiras, dependendo do objetivo do estudo. No trabalho de Corrêa et al. (2007), esta região foi utilizada para diferenciar dois patógenos de orquídeas, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, através do seqüenciamento e alinhamento dos fragmentos, para a construção de uma árvore filogenética. Como resultado, os autores obtiveram um agrupamento que distinguiu as linhagens dos gêneros *Acidovorax* e *Burkholderia*. Com isso, concluíram que a análise desta região se presta para distinguir os dois gêneros. Com base nas informações citadas, decidiu-se, no presente trabalho, proceder ao seqüenciamento da região intergênica 16S-23S rRNA para avaliar o polimorfismo entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e de isolados de outros patógenos da espécie, visando um possível desenho de *primers* específicos.

2.4.1 Análises biométricas aplicadas ao estudo de diversidade genética

A partir de uma matriz de caracteres binários, obtida da leitura de dados moleculares (presença e a ausência de bandas), pode-se medir a similaridade ou dissimilaridade genética, observando, por exemplo, o quanto os indivíduos de uma população estão relacionados. Para isso, são utilizados coeficientes de similaridade, sendo o “Coeficiente de Jaccard” um dos mais

utilizados. Este coeficiente não considera o número de coincidências negativas, assim, a similaridade entre os dois genótipos é dada por $S_{ij} = a / (a+b+c)$, sendo que a representa a presença do caractere em ambos os genótipos, b representa presença do caractere no genótipo i e ausência no j e c representa presença do caractere no genótipo j e ausência no i (DUNN; EVERITT, 1982).

Juntamente com as medidas de similaridade (ou dissimilaridade) pode-se usar métodos de agrupamento que visam agrupar o objeto de estudo em classes (isolados, acessos, linhagens, etc), fazendo com que aqueles que se apresentem “semelhantes” se juntem na mesma classe e separando os grupos dissimilares (MANLY, 1994).

Para materiais biológicos, os métodos de agrupamento seqüenciais, aglomerativos, hierárquicos, sem sobreposição ou “SAHN methods” (*Seqüencial, Agglomerative, Hierarchic, Nonoverlapping clustering methods*) são os mais usados. Eles consideram, em cada passo do agrupamento, se é necessário recalculiar o coeficiente de similaridade (ou dissimilaridade) entre os novos grupos estabelecidos e quais elementos podem ser admitidos no grupo, bem como o critério de admissão de novos membros aos grupos pré-estabelecidos. Dentre esses métodos, o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean*) é o mais empregado, sendo que ele calcula a similaridade (ou dissimilaridade) média do objeto que poderá ser incluído ao grupo existente, fornecendo, a cada objeto do grupo, pesos iguais, sem considerar a estrutura de subdivisão do grupo (SNEATH; SOKAL, 1973).

Utilizando dos cálculos de similaridade e métodos de agrupamentos descritos acima, Kosawang et al. (2006) estudaram a diversidade genética entre 30 isolados de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, de diferentes áreas produtoras de arroz do norte da Tailândia, através de dados de AFLP. Com a análise de agrupamento, os autores obtiveram a formação seis grupos, considerando um valor de similaridade acima de 85%, concluindo que se tratava de seis linhagens bacterianas. Com as análises, puderam inferir que a ampla distribuição das linhagens se devia à alocação das sementes e ao intercâmbio de germoplasma da planta hospedeira.

Em plantas e animais, para se analisar a estrutura genética de populações, a partir de dados moleculares, uma nova metodologia, o teste de atribuição, que utiliza a estatística Bayesiana, está sendo muito empregada e requer o uso do programa *Structure 2.2* (PRITCHARD; MATTHEW; DONNELLY, 2000). Esta análise permite a observação de indivíduos migrantes, ou pertencentes a mais de uma região geográfica ou a zonas híbridas,

permitindo atribuir indivíduos a *clusters*, a partir do seu genótipo multiloco (BALDONI et al., 2006). Assim, por exemplo, utilizando-se dessa estratégia, Baldoni et al. (2006) estudaram, com dados de AFLP, a diferenciação genética de oliveiras em uma micro-escala regional, sendo uma região continental e duas regiões insulares, e chegaram a conclusão que as oliveiras sofreram diferentes processos de seleção ou domesticação nessas regiões.

Não há registros do uso do *teste de atribuição* para o estudo da diversidade genética de isolados de bactérias patogênicas de plantas, como é o caso do presente trabalho. A adequação desta abordagem no estudo da diversidade de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* será abordada adiante, no item Resultados & Discussão.

Com dados moleculares obtidos em estudos sobre diversidade genética de populações ou grupos de organismos, pode-se também, a partir da variância genética molecular total, estimar os componentes da variância, segundo as causas da sua variação. A análise molecular da variância (AMOVA) analisa a diversidade genética com base em locos marcadores, a partir de distâncias quadráticas, utilizando a distância Euclidiana métrica de Excoffier, Smouse e Quattro (1992). Restrepo, Vélez e Verdier (2000) utilizaram a AMOVA para estimar os componentes de variância entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, subdividindo a variação entre isolados, dentro e entre as zonas edafoclimáticas, concluindo que 50% da variação era devido a diferenças entre as zonas edafoclimáticas e cerca de 19% e 30%, respectivamente, era devido a diferenças dentro das zonas e entre os isolados.

2.5 Detecção de fitopatobactérias por métodos moleculares

Detectar seqüências de DNA, via PCR, é um método rápido, específico e sensível. A técnica oferece maiores vantagens para diagnosticar patógenos de plantas se comparada àqueles procedimentos tradicionais, dispensando, inclusive o seu cultivo em meio de cultura. A PCR pode ter uma seletividade baixa ou alta, dependendo dos *primers*, podendo se detectar um único patógeno ou vários membros de um grupo de patógenos relacionados (HARTUNG; DANIEL; PRUVOST, 1993; HENSON; FRENCH, 1993).

Dispondo-se, então, de *primers* desenhados especificamente para um patógeno, é possível detectá-lo e quantificá-lo em uma planta, antes até que provoque a doença e os sintomas sejam visíveis. Cubero e Graham (2002) desenvolveram dois pares de *primers* para identificar e

diferenciar patótipos de *Xanthomonas* que causam o cancro cítrico, sendo um dos pares desenhados a partir da sequência do gene de virulência *pthA*, com a finalidade de identificar todas as linhagens que causam o cancro, e o outro a partir da sequência da região intergênica ribossomal, para identificar apenas isolados da linhagem tipo A, que é a forma asiática deste patógeno. Os *primers* foram testados em uma ampla coleção de isolados de *Xanthomonas*, provenientes de citros, e se mostraram eficientes.

Trindade et al. (2007) construíram dois pares de *primers* específicos para detecção de isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, baseados na sequência parcial do gene *hrpB*, o qual faz parte de um conjunto de genes denominados *hrp* presentes em bactérias fitopatogênicas e que atuam em reações de hipersensibilidade e patogenicidade. Os autores obtiveram sucesso nos testes de especificidade e sensibilidade dos dois pares de *primers*, pois estes foram capazes de detectar o patógeno alvo, amplificando o fragmento específico em todos os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* testados e não amplificaram o mesmo fragmento nos controles negativos.

Tatineni et al. (2008) dispuseram de *primers* específicos, desenhados a partir da sequência do gene que codifica para a DNA polimerase e de sondas para o gene ribossomal 16S do patógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associado ao *greening* dos citros, a fim de examinar a distribuição e a movimentação da bactéria em plantas infectadas. Os autores relataram que a combinação da PCR convencional com a Real-Time PCR foi eficiente, pois se detectou e quantificou o patógeno em todas as partes florais e no fruto. A Real-Time PCR é uma variação da PCR tradicional e que visa quantificar o número de fragmentos amplificados durante os ciclos da PCR.

Estes trabalhos mostram que certas regiões genômicas de bactérias fitopatogênicas apresentam-se conservadas em nível de patovar, permitindo o desenho de *primers* específicos para determinados patógenos. Tais *primers* são capazes de detectar o patógeno na planta, facilitando sua identificação (diagnóstico) e auxiliando em trabalhos sobre o controle da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Foi utilizado, no presente trabalho, uma coleção de 87 isolados da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e um conjunto de 9 isolados de *X. axonopodis* de 8 diferentes patovares.

3.2 Formação da coleção dos isolados

A coleção de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi formada por isolados pertencentes ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP; por isolados cedidos pelo Instituto Biológico de Campinas, pertencentes à Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF); e por isolados obtidos de folhas de maracujazeiro contaminadas, coletadas em regiões produtoras da fruta.

O conjunto de isolados de *X. axonopodis* de diferentes patovares foram cedidos pelo Instituto Biológico de Campinas, pertencentes à Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), e pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), os quais estão registrados no CPD de Fitossanidade do mesmo Instituto.

3.3 Coleta de isolados

As coletas foram realizadas em cidades do Estado de São Paulo, em propriedades produtoras de maracujá. Em cada propriedade visitada, foram coletadas folhas que apresentavam os sintomas da bacteriose. Tomou-se o cuidado de retirar folhas de várias regiões do pomar e identificá-las como também o de anotar as características gerais de cada pomar.

Após as coletas, as folhas eram embrulhadas em papel jornal e mantidas sob refrigeração até o momento do isolamento.

Alguns isolados foram obtidos de folhas contaminadas que foram enviadas ao laboratório pelos produtores, sem que fosse feita visita até o local.

3.4 Isolamento das bactérias

O isolamento das bactérias foi feito a partir das folhas de maracujazeiro infectadas, seguindo-se o protocolo proposto por Romeiro (2001) com algumas adaptações. As folhas foram lavadas e secas em papel; com auxílio de uma lâmina, foi cortada a parte da folha entre o ferimento e o tecido intacto (borda do ferimento), local onde se encontra o maior número de bactérias em proliferação; em câmara de fluxo laminar, esses fragmentos foliares foram colocados durante 2 min. em cada uma das seguintes soluções: álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e água destilada esterilizada por três vezes; terminados os banhos, os fragmentos foram colocados numa placa esterilizada, na qual foi gotejado 0,5 mL de água, para, então, macerar os fragmentos com um bisturi flambado. Após 30 min., tempo necessário para que as bactérias presentes no tecido migrassem para a água, foi gotejado 0,2 mL dessa água em meio de cultura sólido (NA) e espalhado com espátula de Drigalsky.

As placas foram incubadas a 28°C por 48 h. As colônias amarelas, típicas de *X. axonopodis*, obtidas a partir dos isolamentos, foram cultivadas em meio nutriente líquido (NL) e preservadas em glicerol 60% a -80°C.

3.5 Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA bacteriano foi baseada no protocolo de Ausubel et al. (1992), com algumas adaptações. Primeiramente, obteve-se uma suspensão bacteriana em 5 mL de meio NL, mantida sob agitação por 12 h a 28°C. Uma alíquota de 1,5 mL dessa suspensão foi colocada em um tubo apropriado e centrifugada por 2 min. a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1,0 mL de água destilada. Nova centrifugação por 2 min. e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em uma solução contendo 567 µL de T.E., 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL) e, em seguida,

incubado durante 1 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB (10 %) / NaCl (0,7 M) e os tubos incubados por 10 min. a 65°C. Foram adicionados 780 µL de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) e os tubos centrifugados por 5 min. a 13.000 rpm. Então, transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e a ele adicionaram-se 10 µL de RNase (1 mg/mL) para cada mL de solução a ser tratada. Incubaram-se os tubos por 60 min. a 37°C. Acrescentou-se igual volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando-se por 10 min. a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Adicionaram-se 300 µL de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) e centrifugaram-se os tubos por 10 min. a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado 0,6 do volume de isopropanol. Incubaram-se os tubos por 10 min. a -80°C e centrifugou-se por 20 min. a 13.000 rpm. O sobrenadante foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugando-se por 10 min. a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Depois de seco, o *pellet* foi ressuscitado em 150 µL de T.E.

Para quantificação, uma alíquota do DNA ressuscitado foi diluída (10 X) em água ultrapura Milli-Q®. Do DNA diluído, foram aplicados 5 µL em gel de agarose 1% (p/v) juntamente com 5 µL de corante azul de bromofenol. Para avaliar a intensidade das bandas, foi aplicado DNA do fago λ (lambda) íntegro a 50, 100 e 150 ng no início dos poços, visando à comparação visual da fluorescência, emitida sob luz UV, após a eletroforese e coloração do gel com brometo de etídeo. A concentração de DNA da banda foi estimada e o valor dividido pelo volume de DNA aplicado no gel, obtendo-se a concentração do DNA no tubo em ng/µL. Os géis foram fotodocumentados em um sistema de imagem digital MultiDoc-It - UVP®.

3.6 Desenvolvimento da técnica rep-PCR

A técnica rep-PCR consiste em uma PCR utilizando-se o DNA total e *primers* que amplificam cada família de elementos repetitivos presentes no genoma bacteriano sob estudo. Os *primers* utilizados neste trabalho foram sintetizados conforme as seqüências publicadas em Louws et al. (1994). Inicialmente, as concentrações de reagentes utilizadas foram as seguintes para os três conjuntos de *primers*, tomando-se por base as concentrações de uma PCR padrão: 1X de tampão de reação, 0,3 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1,5 U de Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 20 ng de DNA e água ultra-pura esterilizada para um volume final

de 20 µL. Como não foi obtido sucesso neste primeiro teste, diferentes concentrações dos reagentes foram testadas até se obter as concentrações ideais para cada família de *primers*.

Para a família REP, as seqüências dos *primers* utilizados foram REP1R-I [5'-IIICGICGICATCIGGC-3'] e REP2-I [5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3']. As concentrações dos reagentes utilizadas para esta PCR foram: 1X de tampão de reação, 1,2 µM de cada *primer*, 0,4 mM de dNTP, 4 mM de MgCl₂, 1,5 U de Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 50 ng de DNA e água ultra-pura esterilizada para um volume final de 20 µL.

Para a família ERIC, as seqüências dos *primers* utilizados foram ERIC1R [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'] e ERIC2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']. As concentrações dos reagentes foram as mesmas das utilizadas para a PCR com o *primer* REP.

Para a subunidade BOXA do elemento BOX, a seqüência do *primer* usado foi BOXA1R [5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3']. Para esta PCR foram utilizadas as seguintes concentrações dos reagentes: 1X de tampão de reação, 2,0 µM de *primer*, 0,5 mM de dNTP, 4 mM de MgCl₂, 2 U de Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 50 ng de DNA e água ultra-pura esterilizada para um volume final de 20 µL.

As amplificações dos fragmentos de DNA foram feitas em termociclador, marca Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 9700. As condições de amplificação foram baseadas em Louws et al. (1994) com algumas adaptações: 1X 95°C durante 7 min., 30X [94°C por 1 min., (44, 52 ou 53°C para os *primers* REP, ERIC e BOX, respectivamente) por 1 min. e 72°C por 1,5 min.] e 1X 72°C durante 15 min.

A separação dos fragmentos foi feita por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,4% (p/v), coloração com solução de brometo de etídeo e fotodocumentação sob luz ultravioleta em um sistema de imagem digital MultiDoc-It - UVP®.

3.7 Desenvolvimento da técnica AFLP

A técnica AFLP consiste de três passos principais: 1. Digestão do DNA genômico com duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro e outra de corte freqüente; 2. Ligação de adaptadores específicos aos terminais clivados; 3. PCR com *primers* complementares aos

adaptadores, contendo nucleotídeos arbitrários, para selecionar determinados fragmentos (LOPES et al., 2002).

Digestão do DNA genômico

Baseado no protocolo utilizado por Lopes et al. (2006), modificado de Vos et al. (1995), na etapa de hidrólise enzimática foi feita uma dupla digestão, ou seja, uma reação com as duas enzimas de restrição simultaneamente. Na reação, foram usados 250 ng de DNA, 1X de tampão *One Phor All* Amersham[®], 1X de BSA N.E. Biolabs[®], 6 U da enzima *MseI* N.E. Biolabs[®] (corte freqüente), 6 U da enzima *EcoRI* Promega[®] (corte raro) e água ultra-pura esterilizada para completar o volume final de 20 µL. Os tubos com os reagentes foram mantidos por 4 h a 37°C, para que a reação ocorresse e, em seguida, por 20 min. a 65°C, para bloquear a ação das enzimas.

Ligação dos adaptadores

Para ligação dos adaptadores, foram acrescentados ao material digerido um mix contendo: 1X de tampão para enzima ligase, 2,5 µM de adaptador *EcoRI*, 25 µM de adaptador *MseI*, 67 U da enzima T4 DNA ligase N.E. Biolabs[®] e água ultra-pura esterilizada para completar o volume final de 20 µL. Para que a reação ocorresse, os tubos foram mantidos por 14 h a 16°C e, em seguida, por 20 min. a 65°C, para bloquear a ação da enzima.

Amplificação dos fragmentos

Devido ao genoma bacteriano ser pequeno, o número de fragmentos obtidos por dupla digestão é reduzido. Assim, a etapa de amplificação dos fragmentos constou de apenas uma PCR. Assim sendo, combinações de *primers* específicos para as extremidades com adaptadores *EcoRI* e *MseI* contendo zero, uma ou duas bases seletivas foram usadas. Estes *primers* foram representados, para as enzimas *EcoRI* e *MseI*, respectivamente, por E+N e M+N, sendo N o(s) nucleotídeo(s) seletivo adicionado a extremidade 3' do oligonucleotídeo (Quadro 1). Para esta PCR, foram utilizados: 1X de tampão de reação, 0,25 µM de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase, 5 µL do DNA digerido e ligado (diluído 4X) e água ultra-pura esterilizada para completar o volume final de 20 µL.

As amplificações foram feitas em termociclador, marca Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR System 9700, com o seguinte programa: 1X 94°C por 2 min., 26X (94°C por 1 min., 56°C por 1 min. e 72°C por 1 min.) e 1X 72°C durante 5 min.

Adaptadores e <i>primers</i>	Seqüência
Adaptador <i>EcoRI</i>	5' – CTCGTAGACTGCGTACC – 3' 3' – CATCTGACGCATGGTTAA – 5'
<i>Primer E+N</i>	5' – GACTGCGTACCAATTC <u>N</u> – 3'
Adapador <i>MseI</i>	5' – GACGATGAGTCCTGAG – 3' 3' – TACTCAGGACTCAT – 5'
<i>Primer M+N</i>	5' – GATGAGTCCTGAGTA <u>N</u> – 3'

Quadro 1- Seqüência dos adaptadores e *primers* utilizados nas reações de ligação e amplificação da técnica AFLP

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação dos fragmentos foi feita em gel de poliacrilamida 5% (acrilamida/bisacrilamida 19:1, uréia 7,5 M, tampão TEB 1 X), em um sistema “Sequi-Gen GT” (Bio Rad®), à potência de 80 W, durante 4 horas.

Cada gel foi preparado utilizando-se 90 mL da solução de poliacrilamida a 5%, 90 µl de solução de persulfato de amônio a 25% e 90 µl de Temed. O persulfato de amônio e o Temed são catalisadores que promovem a polimerização da solução de poliacrilamida, por isso foram adicionados momentos antes da solução ser vertida na placa.

Para aplicação das amostras no gel, foi adicionado um tampão de carregamento (*loading buffer*) na proporção de uma parte de reação para uma parte de tampão. Este tampão possui formamida que contribui para a manutenção do DNA em fita simples durante a eletroforese. As amostras foram então levadas ao termociclador para uma desnaturação por 5 minutos a 95°C, sendo em seguida, imediatamente colocadas sobre gelo.

Revelação dos géis

Após a eletroforese, a placa na qual o gel fica aderido sofreu uma série de lavagens para impregnação com o nitrato de prata e oxidação para visualização dos fragmentos de DNA. De acordo com Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001), primeiramente, o gel foi tratado durante 15 minutos em uma solução de fixação (etanol absoluto 10% e ácido acético 1%). Fez-se uma lavagem com água deionizada por 1 min. e tratou-se o gel com solução de ácido nítrico 1,5%. Em seguida, foi feita uma nova lavagem com água deionizada por 1 min. e procedeu-se à impregnação com solução de nitrato de prata a 0,2 %, mantendo-se o gel, durante esta etapa, no escuro. Após a impregnação, fez-se duas lavagens com água deionizada durante 30 s. cada, para, em seguida, revelar o gel com solução de carbonato de sódio 3% acrescido formaldeído 0,1%. Depois de revelado os fragmentos de DNA, o gel passou por uma solução de bloqueio (ácido acético 5%) durante 5 min. e uma última lavagem com água deionizada por 1 min.

Durante todo o procedimento, a placa com o gel ficou acondicionada em uma bandeja, sob um agitador orbital, para que as soluções lavassem o gel de modo homogêneo. Em seguida, o gel foi disposto verticalmente sobre a bancada para a secagem por um dia. A qualidade da água utilizada é de fundamental importância para que o gel fique bem claro e sem manchas. Depois de seco, os géis foram analisados sobre um transluminador de luz branca.

3.8 Análise biométrica dos dados

A genotipagem dos 87 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi feita com base nos locos polimórficos dos perfis gerados pelas técnicas rep-PCR e AFLP. Com estes dados, uma matriz binária foi construída considerando a presença (1) e a ausência (0) de bandas. Para a análise de agrupamento, utilizou-se o critério SAHN (*Sequential, Agglomerative, Hierarchic, Nonoverlapping clustering methods*), usando médias aritméticas, conforme o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean*), e o programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 2000). O coeficiente de similaridade usado em tal procedimento foi o de Jaccard ($a / a + b + c$), o qual exclui a ausência de bandas do cálculo da similaridade. Para verificar a consistência do dendrograma gerado, foi feito um *bootstrapping*, usando-se o programa Winboot

(YAP; NELSON, 1996), o qual consiste em uma amostragem, com reposição, a partir da matriz original dos dados, o que gera diversas matrizes e, em consequência, um conjunto de dendrogramas; o dendrograma consenso indica quais os agrupamentos mais freqüentes dentre os dendrogramas obtidos por *bootstrapping*. Valores de agrupamentos maiores que 50 foram adicionados ao dendrograma gerado pelo programa NTSYS. Também realizou-se, através do programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 2000), uma análise de correlação cofenética, que correlaciona as distâncias ou dissimilaridades reais com as obtidas pelo agrupamento.

Com os dados gerados pelo AFLP, procedeu-se uma análise molecular da variância (AMOVA), a qual foi usada para estimar os componentes da variância. A variância total entre os isolados foi subdividida em variância entre os quatro Estados, os quais pertencem as cidades de coleta, entre as cidades dentro de Estados e dentro de cidades, utilizando-se o programa *Arlequin* (SCHNEIDER et al., 2000).

Foi realizado, também, um teste de atribuição, pelo programa *Structure* 2.2 (PRITCHARD; MATTHEW; DONNELLY, 2000). Este programa utiliza uma estratégia a qual identifica populações geneticamente homogêneas dentro de um grupo de organismos de origens geográficas distintas, assim, ele aloca organismos em *K clusters*, representados por cores diferentes, os quais possuem marcas com freqüências distintas. O número de *clusters* foi definido de $K=1$ a $K=22$, conforme o número de cidades onde foram coletados os isolados. Foram feitas 10 interações para cada *K* usando o modelo “admixture model” e freqüências alélicas correlacionadas, utilizando um período de “burn-in” de 200.000 e 300.000 pelo algoritmo MCMC (*Markov chain Monte Carlo*). Esta estatística revela uma mudança na probabilidade do log, de acordo com o número de *K* proposto por Evano, Regnaut e Goudet (2005), ΔK , que foi usado como uma predição do número real de *clusters*.

3.9 Seqüenciamento de fragmentos gerados por AFLP

Para desenhar *primers* com a intenção de amplificar via PCR um fragmento de DNA específico para *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, fragmentos monomórficos de AFLP foram isolados e seqüenciados para a escolha daqueles mais adequados para o desenho dos *primers*. Os procedimentos utilizados nesta etapa estão descritos a seguir.

Locos monomórficos de AFLP, ou seja, que mostraram presença da banda em todos os isolados do patovar *passiflorae* e ausência em todos os isolados dos demais patovares, foram usados para posterior construção dos pares de *primers*. Para isso, tais fragmentos foram retirados dos géis de poliacrilamida, raspando-se com o auxílio de um estilete. Os mesmos foram submersos em uma solução aquosa para que se desprendessem da matriz do gel, durante 24 h, sob temperatura ambiente e, em seguida, a solução foi filtrada.

Com a solução contendo os fragmentos isolados, foi feita uma PCR para aumentar a quantidade de DNA, utilizando-se os *primers* M+0 e E+0 que são complementares às extremidades dos fragmentos de AFLP. O produto desta PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para confirmação do seu tamanho e posterior purificação com o kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen®).

Os fragmentos purificados foram então clonados utilizando-se o kit pGEM-T-Easy (Promega®). A ligação dos fragmentos de interesse no vetor se deu num volume final de 20 µL, contendo 25 ng do vetor, tampão de ligação 1X, 80 U de enzima T4 DNA ligase N.E. Biolabs®, 100 ng do produto da amplificação e água purificada para completar o volume final. A reação foi incubada *overnight* por 4°C. A transformação foi feita em células super-competentes XL1-Blue, através de choque térmico. Do produto da transformação, 80 µL foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB, 60 µL de X-Gal 2% (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) e 60 µL de IPTG 20% (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) as quais foram incubadas a 37 °C por 14 horas.

Após o crescimento, foram selecionadas as colônias brancas contendo os insertos (fragmentos) clonados. Tais colônias foram coletadas com auxílio de um palito estéril, sendo mergulhadas em placas de Elisa contendo meio LB líquido com ampicilina a 50 µg/mL. Após o crescimento das colônias no meio líquido, foi feita a extração dos plasmídeos (miniprep) pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

O produto da miniprep foi quantificado e amplificado com os *primers* universais M13 *forward* e *reverse* para confirmação da clonagem. Tais produtos foram submetidos à eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,0% (p/v), colorados com solução de brometo de etídeo e fotodocumentados sob luz ultravioleta em um sistema de imagem digital MultiDoc-It - UVP®.

Os clones foram seqüenciados conforme reação descrita por Sanger et al. (1977), utilizando-se o kit DYEnamic™ET (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.), com os *primers*

universais M13 *forward* e *reverse*. A reação foi purificada e as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em seqüenciador do tipo “MegaBace™ 1000 *Molecular Dynamics*” (Amershan, Pharmacia Biotech). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, sob supervisão da Profª Maria Helena P. Fungaro.

3.10 Seqüenciamento da região intergênica 16S-23S rRNA.

Fragmentos correspondentes à região intergênica 16S-23S rRNA de quatro isolados do patovar *passiflorae* (LP1-1a, Br5d, Abj20-4 e PA6-1) e de oito isolados dos patovares controles (IBSBF1387, IBSBF1478, IBSBF1553, IBSBF1770, IBSBF1954, IBSBF1994, IBSBF2008 e IAC13755) foram amplificados e seqüenciados.

Baseando-se na metodologia utilizada por Oliveira et al. (2005), para a reação de amplificação foram utilizados os *primers* pHr [5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3'] (MASSOL-DEYA et al., 1995) e p23Suni322anti [5'-GGTTCTTTTCACCTTTCCTC-3'] (HONEYCUTT; SOBRAL; MCCLELLAND, 1995), e as seguintes concentrações de reagentes: 1X de tampão de reação, 0,6 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 1 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 10 ng de DNA e água ultra-pura esterilizada para um volume final de 25 µL.

As amplificações dos fragmentos de DNA foram feitas em termociclador, marca MJ Reserch, Inc, modelo PTC-100, nas seguintes condições de amplificação: 1X 92°C durante 4 min., 35X (92°C por 40 seg., 57°C por 1,5 min. e 72°C por 2 min.) e 1X 72°C durante 5 min. Após a amplificação, as amostras foram analisadas através de eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,0% (p/v). Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo e fotografados em fotodocumentador Digi Doc.

A reação de seqüenciamento foi realizada pelo método de Sanger et al. (1977), com um volume final de 10 µL, contendo 200 ng de DNA da amostra, 0,6 µM de cada *primer*, 4,0 µL do kit “DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing” (Amershan, Pharmacia Biotech) e água ultra-pura para completar o volume final. A reação foi submetida a um termociclador “Mastercycler gradient” (Eppendorf), com o seguinte programa: 1X 95°C durante 1 min., 35X (95°C por 20 seg., 55°C por 15 seg. e 60°C por 1 min.).

Após a amplificação, foi realizada a lavagem da reação de seqüenciamento e, em seguida, esta foi submetida à leitura em sequenciador do tipo “MegaBace™ 1000 *Molecular Dynamics*” (Amersham, Pharmacia Biotech). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 60 segundos. A condição de eletroforese foi de 6 Kv por 230 minutos.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, sob supervisão da Profª Maria Helena P. Fungaro.

A qualidade das seqüências foi analisada com auxílio do pacote computacional “Phred/Phrap/Consed” (EWING et al., 1998) e estas alinhadas com o auxílio do programa de alinhamento múltiplo *Clustal X* (THOMPSON et al., 1997a).

3.11 Construção de *primers* específicos para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Para desenhar os *primers*, todas as seqüências, inclusive as da região ITS, foram analisadas quanto à qualidade dos eletroforegramas nos programas *Chromas* v. 2.31 (MCCARTHY, 1996), o qual apresenta um pico para cada base, devendo este ser alto, estreito e único para ser considerado aceitável, e *Phred/Phrap/Consed* (EWING et al., 1998), o qual indica valores para cada base, sendo aceitáveis os maiores que 20, pois representam, no mínimo, 99% de acurácia na determinação das bases.

Após a limpeza, ou seja, a retirada das extremidades referentes ao vetor e de regiões de baixa qualidade de seqüenciamento, as seqüências obtidas dos fragmentos de AFLP foram comparadas em bancos de dados de seqüências de livre acesso, como o BLASTn do *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências para as quais se obteve coincidência com organismos próximos foram alinhadas, com o auxílio do programa de alinhamento múltiplo *Clustal X* (THOMPSON et al., 1997a), visando identificar bases não coincidentes entre as mesmas para o desenho dos *primers*, sendo uma seqüência *forward* e outra *reverse* para cada fragmento. As seqüências dos *primers* desenhados foram analisadas quanto à formação de estruturas secundárias, como *hairpins*, dímeros e *loops*, utilizando-se o programa *Gene Runner* (THOMPSON et al., 1997b).

Para o desenho dos *primers* na região intergênica 16S-23S rRNA, primeiramente, fez-se o alinhamento com as 12 seqüências, através do programa *Clustal X* (THOMPSON et al., 1997a),

para detecção de regiões polimórficas entre as seqüências do patovar *passiflorae* e as dos demais patovares, ou seja, regiões onde as bases das seqüências do patovar *passiflorae* fossem idênticas, mas totalmente diferentes das bases correspondentes nos patovares controles. Um polimorfismo desta natureza, ou seja, um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), foi detectado, o que possibilitou a utilização de uma metodologia, proposta por Ye et al. (2001), conforme descrita a seguir.

Ye et al. (2001) propuseram uma metodologia para genotipagem de SNPs na qual desenha-se *primers* introduzindo-se um erro na base da posição -2 da região 3' terminal correspondente ao SNP. Este erro causa uma desestabilização extra, aumentando a especificidade do *primer*. Nesta metodologia, para genotipar SNPs em uma população, desenham-se dois *primers* externos, em sentidos opostos e distâncias diferentes do SNP, sendo um *foward* e outro *reverse*, e dois *primers* internos, um *foward* e outro *reverse*, ambos com a terminação 3' no SNP e com a troca da base da posição -2. Portanto, o fragmento amplificado entre os dois *primers* externos é o controle positivo da reação. O fragmento amplificado entre um *primer* externo e um interno representa um alelo, possibilitando a discriminação entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos para o determinado SNP.

Tal metodologia possibilitou o desenho de um *primer* interno, *reverse*, específico para o patovar *passiflorae*, para isso, a extremidade 3' foi posicionada na base polimórfica entre o patovar *passiflorae* e os demais patovares e a base da posição -2 foi substituída. Outros dois *primers* externos à região do polimorfismo, um *foward* e outro *reverse* também foram desenhados para permitir a produção dos amplicons. Assim, os fragmentos amplificados pelos *primers* externos representam o controle positivo da reação e devem ser produzidos em todas as reações, tanto dos isolados do patovar *passiflorae* quanto dos isolados controles. O fragmento amplificado entre o *primer* interno e o *primer* externo *foward* é o fragmento específico que deve ser produzido apenas nas reações com os DNAs dos isolados do patovar *passiflorae*, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Esquema mostrando o local de desenho do *primer* interno, específico para *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e dos *primers* externos. Produtos gerados pela PCR com os *primers* e a representação dos fragmentos separados em um gel de agarose. *, base alterada na posição -2 da região 3' terminal do *primer*. Esquema baseado na metodologia proposta por Ye et al. (2001)

As seqüências desses *primers* também foram analisadas quanto à formação de estruturas secundárias, como *hairpins*, dímeros e *loops*, utilizando-se o programa *Gene Runner* (THOMPSON et al., 1997b).

Todos os *primers* desenhados foram sintetizados por empresas especializadas.

3.12 Teste de validação dos *primers*

As PCRs com os *primers* desenhados foram feitas utilizando-se 16 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* de diferentes cidades e os nove isolados controles. Também foram utilizados, como controle negativo, outros dois isolados de outras espécies do gênero

Xanthomonas, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. albilineans*, cedidos por dois laboratórios da ESALQ/USP.

Para as reações com os *primers* desenhados a partir dos fragmentos de AFLP, foram usados: 1X de tampão de reação, 0,45 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 U de “Go Taq Flexi” Promega®, 20 ng de DNA e água ultra-pura esterilizada para um volume final de 20 µL. As amplificações foram feitas em termociclador, marca Applied Biosystems® modelo Gene Amp PCR System 9700, com a seguinte programação: 1x 94°C durante 3 min., 30x (94°C por 40 seg., 60°C por 40 seg. e 72°C por 50 seg.) e 1x 72°C durante 5 min.

Já para as reações com os *primers* desenhados a partir da região intergênica 16S-23S rRNA foram utilizados: 1X de tampão de reação, 0,45 µM do *primer* interno, 0,45 µM do *primer* externo *reverse*, 0,90 µM do *primer* externo *forward*, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 U de “Go Taq Flexi” Promega®, 40 ng de DNA e água ultra-pura esterilizada para um volume final de 20 µL. As amplificações foram feitas em termociclador, marca Applied Biosystems® modelo Gene Amp PCR System 9700, com a seguinte programação: 1x 94°C durante 3 min., 30x (94°C por 40 seg., 58°C por 40 seg. e 72°C por 40 seg.) e 1x 72°C durante 5 min.

Os produtos das PCRs foram separados por eletroforese (3 V/cm) em géis de agarose 1,2% (p/v), corados com o corante de DNA SYBR Safe® (0,5 x) e visualizados sob luz ultravioleta. A fotodocumentação foi feita através do sistema MultiDoc-It UVP®.

3.13 Diagnose utilizando os *primers* desenhados.

Para testar se os *primers* desenhados eram capazes de detectar a bactéria na planta contaminada, foram inoculadas plantas de maracujá doce (*Passiflora alata*) com o isolado Abj5-3. Tais plantas eram clones de indivíduos de uma população segregante com a finalidade de construir um mapa de ligação em nosso Laboratório. Três plantas com 120 dias tiveram, cada uma, três folhas inoculadas através de corte de 2 cm com tesoura submersa na suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana foi padronizada, através de diluições, em espectrofotômetro (Hitachi U-2000) a OD₆₀₀=0,3, o que corresponde a uma concentração aproximada de 100 milhões de unidades formadoras de colônia por mililitro (10⁸ UFC/mL). Uma quarta planta, testemunha, teve três folhas inoculadas com solução salina (NaCl 0,85%).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação telada, coberta com plástico, e protegidas da irrigação automática. As plantas foram irrigadas manualmente, para não molhar as folhas, uma vez ao dia. A umidade do ambiente foi mantida devido às diversas irrigações automáticas ocorridas durante o dia. Juntos às plantas, foi alocado um termômetro para medir as temperaturas máximas e mínimas de cada dia. Também dispunha-se de um termômetro que também media a umidade relativa mínima e máxima do ambiente.

As folhas foram coletadas 5, 12 e 19 dias após a inoculação. Uma parte de cada folha foi utilizada para o isolamento e a quantificação da bactéria, baseando-se na metodologia proposta por Araújo et al. (2002) conforme a seguir: do tecido foliar fez-se fragmentos de 0,2 g. Em câmara de fluxo laminar, os fragmentos foliares foram colocados durante 2 min. em cada uma das seguintes soluções: álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e água destilada esterilizada por três vezes; terminados os banhos, os fragmentos foram macerados juntamente com 3 mL de solução salina. Com 100 μ L do produto macerado foram feitas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Para as avaliações com 5 dias foram plaqueadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ; as de 12 dias foram plaqueadas as diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} ; e para as de 19 dias, as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Para cada diluição foram plaqueados 100 μ L da solução em meio nutriente ágar (NA) e foram feitas três repetições. As placas foram incubadas a 28°C durante três dias para posterior contagem das colônias. Com as folhas das plantas testemunhas procedeu-se também ao isolamento, no entanto, o macerado foi plaqueado sem diluições.

Para calcular a concentração das bactérias no tecido foliar, conforme proposto por Araújo et al. (2002), procedeu-se da seguinte forma: Primeiramente fez-se uma média das colônias das placas observadas em cada diluição e fez-se a média de todas as diluições, para cada planta, por dia de avaliação. Esta média representa o número de colônias contidas nos 100 μ L plaqueados, portanto, este valor foi multiplicado por 10 para representar o número de colônias por mL. Em seguida, o resultado anterior foi multiplicado por 3, pois o tecido foliar foi macerado em 3 mL, e dividido por 0,2, que se refere aos 0,2 g de tecido utilizado. O valor final é referente, então, ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) em cada grama de tecido.

Com a outra parte da folha foi feita a extração do DNA, baseando-se no método CTAB (DELLAPORTA; WOOD; KICKS, 1983). Para a extração de DNA, a parte da folha foi subdividida em outros dois fragmentos, um próximo ao local da inoculação e outro distante, para detectar a migração da bactéria durante os diferentes períodos.

As PCRs com os DNAs de marcuja doce utilizando-se os *primers* desenhados foram feitas nas mesmas condições descritas no item 3.12, tendo uma única modificação, i. é, 60 ng do DNA vegetal. Nestas reações foram empregados os DNAs das folhas inoculadas com as bactérias e das folhas testemunhas. Como controle positivo, foi usado uma solução com colônias da mesma bactéria obtidas no isolamento.

Os produtos das PCRs foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,2% (p/v), corados com o corante de DNA SYBR Safe® (0,5 x) e visualizados sob luz ultra-violeta. A fotodocumentação foi feita através do sistema MultiDoc-It UVP®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta de isolados

As visitas aos pomares do Estado de São Paulo foram, inicialmente, intermediadas pelo engenheiro agrônomo Riosuki Kavati, da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI, EDR de Lins. Por seu intermédio, foram visitados dois pomares, um pomar de maracujá doce em Lins, o qual estava abandonado, e um pomar de maracujá azedo em Guaimbê. Ambos os pomares não apresentavam plantas com bacteriose. Já outro pomar de maracujá azedo, localizado na cidade de Bauru, também indicado pelo Sr. Kavati, estava afetado pela doença, possibilitando coleta de isolados de folhas contaminadas.

O proprietário do pomar de Bauru indicou uma associação de produtores de frutas, *Bauru Frutas*, da qual vários produtores de maracujá azedo da região são associados. Por intermédio do representante da *Bauru Frutas*, foram visitados pomares nas cidades de Lençóis Paulista, Piratininga, Avaí e Fernão. Em Lençóis Paulista, foi visitada a propriedade *Estância Esplanada*, cujo pomar, com 3.000 plantas de maracujá azedo, estava no 2º ano de produção. As mudas foram plantadas com semente Top Sid Premium (Redondo Amarelo) Agristar, e o pomar possuía quebra-vento formado por capim-napier (*Pennisetum purpureum*). Nesta propriedade, todo o pomar estava tomado por bacteriose, onde foram coletadas folhas contaminadas.

Na cidade de Piratininga, foi visitado o Sítio *Água do Taquaral* que possuía um pomar de maracujá azedo com menos de um ano, constituído por 1.500 plantas das variedades Afruvec e Maguary. O proprietário pulverizava extrato de própolis e cobre, pois o pomar estava tomado por bacteriose, as folhas haviam caído e os frutos queimaram com o sol. O pomar foi recuperado, continuou com uma boa produção e, na época da visita, havia poucos sintomas de bacteriose. Segundo o produtor, um pomar vizinho foi destruído pela doença. Foram, então, coletadas folhas contaminadas apenas das plantas da variedade Afruvec, pois as da variedade Maguary eram muito novas e não apresentavam sintomas da doença.

Em Avaí, foram visitados dois pomares de maracujá azedo. Na *Fazenda Bom Jesus*, o pomar com 7 meses tinha 3.500 plantas, sendo constituído por 27 ruas de uma variedade de Minas Gerais (não identificada pelo produtor) e 14 ruas da variedade Maguary. Havia pouca

incidência de bacteriose, a doença tinha surgido há dois meses na rua 15 e se espalhou. As plantas da variedade Maguary não apresentavam doença e possuíam folhas e frutos menores. O pomar era cercado por quebra-vento de napiê. Na *Fazenda Contorno*, o pomar estava com 6 meses, possuía 3.600 plantas e estava completamente atacado por bacteriose. Em ambas as propriedades foram coletadas folhas contaminadas para o isolamento da bactéria.

Na cidade de Fernão, foram visitados três pomares de maracujá azedo. Na *Estância Primavera*, o pomar de um ano tinha 800 plantas e estava abandonado. No *Sítio Santo Antônio*, vizinho do anterior, o pomar com 400 plantas estava com 6 meses. No *Sítio Nossa Sra. Aparecida*, distante 1 km dos demais, estava com 1 ano e tinha 2.000 pés. Os três proprietários obtiveram as mudas de um viveiro da cidade, sem registro da variedade e os pomares estavam muito atacados por bacteriose. Nas três propriedades, foram coletadas folhas contaminadas.

Por intermédio dos agrônomos das Casas de Agricultura, foram visitadas outras quatro propriedades nas cidades de Analândia e Corumbataí. Em Analândia, um dos pomares possuía 900 plantas. Parte delas estava na primeira safra e outra no segundo ano de produção. Outro pomar tinha 350 plantas produzindo, todas na primeira safra. Em Corumbataí, um pomar com três anos estava abandonado e as plantas estavam sem folhas; já o último pomar visitado era pequeno, apenas para o consumo dos proprietários. Em todos os pomares visitados, não foi detectada nenhuma planta com sintomas de bacteriose.

Por intermédio da Casa de Agricultura de Corumbataí, encontrou-se uma propriedade na cidade de Limeira, na qual havia um pomar de maracujá azedo com 2.500 plantas, sendo as mudas originárias da variedade IAC 277. O pomar tinha um ano e estava muito atacado por bacteriose e ácaros. Na época da visita, as plantas estavam sendo eliminadas, restando uma pequena porção da qual foram coletadas folhas contaminadas. No final do pomar, havia algumas plantas de maracujá doce com sintomas da doença, sendo coletadas algumas dessas folhas sintomáticas.

No Vale do Ribeira, foi detectada uma grande produção de maracujás, amarelo e doce. Nesta região, foram visitadas propriedades em duas cidades vizinhas, Cajati e Jacupiranga. Em Cajati, segundo informações fornecidas pelo agrônomo da Casa de Agricultura, havia, aproximadamente, 50 pequenos produtores de maracujá, sendo 60% de maracujá doce. Nesta cidade, foram visitadas duas propriedades que plantavam tanto maracujá doce como amarelo. Nos pomares, se observavam plantas com diferentes idades e épocas de produção e com

diferentes tipos de doenças, sendo poucas em estado grave, no entanto, não foi observada nenhuma planta com sintomas de bacteriose. Nas estradas percorridas até chegar aos pomares de destino, se observavam muitos outros pomares que também não apresentavam plantas atacadas pela bacteriose. Em Jacupiranga, foram visitados quatro pomares de maracujá azedo. Um deles, com dois anos, estava abandonado e as plantas apresentavam muitas doenças, porém não foi detectado qualquer sintoma de bacteriose. Os demais pomares apresentavam plantas saudáveis e estavam produzindo.

No Vale do Ribeira, por se tratar de uma região serrana, muitos pomares de maracujá são plantados nas encostas. A ausência de bacteriose nessa região pode ser explicada pelo clima que, apesar de úmido, não apresenta temperaturas muito elevadas, necessárias para o desenvolvimento da doença. Através de contato pessoal, o Sr. Riosuki Kavati já havia nos informado que era possível encontrar maracujazeiros contaminados com *X. axonopodis* pv. *passilforae*, porém, a doença não se manifestava nos pomares durante nossa visita.

Isolados de outras localidades produtoras de maracujá foram obtidos de folhas contaminadas enviadas ao nosso Laboratório. De Planaltina e Distrito Federal, foram obtidas folhas de maracujá doce contaminadas, oriundas da Estação Experimental da Embrapa Cerrados, e folhas contaminadas de maracujá azedo oriundas da propriedade *Núcleo Rural Rio Preto*, todas enviadas pela Embrapa Cerrados.

Do *Viveiros Flora Brasil*, Araguari, MG, foram enviados ramos de mudas de maracujá azedo com sintomas de bacteriose. Estas mudas, oriundas de uma propriedade de Carmo do Paranaíba, MG, foram produzidas via semente ao lado de um pomar em produção. Também, foram enviadas ao Laboratório, pelo Eng. Agrônomo Daniel Nakano, folhas de maracujá azedo contaminadas, de três diferentes cultivares, oriundas de uma propriedade da cidade de São Miguel Arcanjo, SP.

Fotos tiradas durante as visitas aos pomares, de plantas e de folhas contaminadas estão apresentadas na figura 2.

Figura 2 – Plantas e folhas contaminadas com o patógeno que causa a bacteriose dos maracujazeiros: A, pomar de uma propriedade da cidade de Limeira; B, pomar da *Fazenda Bom Jesus* na cidade de Avaí; C, pomar da cidade de Lençóis Paulista; D, pomar da *Fazenda Contorno* na cidade de Avaí; E, folhas oriundas da cidade de São Miguel Arcanjo, enviadas pelo proprietário; F, folhas oriundas da cidade de Carmo do Paranaíba, enviadas por *Viveiros Flora Brasil*

Coleção de isolados

A coleção de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi formada pelos isolados coletados, por isolados cedidos à nossa pesquisa e por aqueles já pertencentes ao Laboratório. Os 87 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e os nove isolados de outros patovares de *X.*

axonopodis bem como o código atribuído, o local de origem e o hospedeiro, estão listados na tabela 1. Os isolados do patovar *passiflorae* são oriundos de 22 cidades pertencentes aos Estados do São Paulo, Minas Gerais e Paraná e ao Distrito Federal e as localizações geográficas das cidades onde foi feita a coleta estão ilustradas na figura 3.

Tabela 1 - Isolados bacterianos usados no estudo: patovares aos quais pertencem, nomenclatura, origem geográfica e hospedeiro

<i>Patovar</i>	<i>Isolado</i>	<i>Local de origem</i>	<i>Hospedeiro</i>
<i>X.a. pv. passiflorae</i>	Abj5-3; Abj5-4; Abj14-2; Abj15-3;	Avaí – SP	Maracujá azedo
	Abj20-4; Abj24-2; Ac1-3; Ac2-2; Ac6-4		
	FDsa1-1; FDsa6-1; FDsa14-2; FDsa16-2; FDns6; FDns20; FDe2-4; FDe5-2; FDe10-1	Fernão – SP	Maracujá azedo
	LP1-1a; LP2-3; LP12-4; LP14-2b; LP16-3; LP32-2; LP35-1	Lençóis Paulista – SP	Maracujá azedo
	SMA1a; SMA3a; SMA4a; SMA5a; SMA1b; SMA2b; SMA1c	São Miguel Arcanjo – SP	Maracujá azedo
	AP302	Adamantina – SP	Maracujá azedo
	B1; B2; B4; B6; B8; B10; B11; B15	Bauru – SP	Maracujá azedo
	PA1-2; PA6-1; PA8-2; PA8-4; PA11-3; PA16-1; PA20-1; PA20-2	Piratiniga – SP	Maracujá azedo
	LM2a; LM4a; LM6a; LM9a; LM12a	Limeira – SP	Maracujá azedo
	LM2d	Limeira – SP	Maracujá doce
	IBSBF941	Vera Cruz – SP	Maracujá azedo
	IBSBF996	Tupã – SP	Maracujá azedo
	M110; M111; M129	Araguari – MG	Maracujá azedo
	M89; M116	Araxá –MG	Maracujá azedo
	M113	Patrocínio – MG	Maracujá azedo
	M144	Pedrinópolis – MG	Maracujá azedo
	M92; M94; M117; M145	Perdizes – MG	Maracujá azedo
	M81	Sacramento – MG	Maracujá azedo
	M83	Uberaba – MG	Maracujá azedo
	Mudas	Uberlândia – MG	Maracujá azedo
	M115; AP1; AP2; AP3; AP4; AP5; AP6	Carmo do Paranaíba – MG	Maracujá azedo
	IBSBF1257	S. Sebastião da Amoreira – PR	Maracujá azedo
	Br5d; Br6d; Br8d; Br10d; Br11d	Planaltina – DF	Maracujá doce
	Br12a; Br13a	Planaltina – DF	Maracujá azedo
	IBSBF1325	Vicente Pires – DF	Maracujá doce
	IBSBF1387	Brasilândia – MG	Pimenta
	IBSBF1478	Arujá – SP	Antúrio
	IBSBF1553	Biritiba Mirim – SP	Alface
	IBSBF1770	Estado de São Paulo	Cebola
	IBSBF1954	Primavera do Leste – MT	Algodão
	IBSBF1994	Valinhos – SP	Mandioca
	IBSBF2008	Jaú – SP	Cana de açúcar
	IAC11280	Cosmópolis – SP	Feijão
	IAC13755	Mococa – SP	Feijão
<i>X.a. pv. vesicatoria</i>			
<i>X.a. pv. dieffenbachiae</i>			
<i>X.a. pv. vitians</i>			
<i>X.a. pv. allii</i>			
<i>X.a. pv. malvacearum</i>			
<i>X.a. pv. manihotis</i>			
<i>X.a. pv. vasculorum</i>			
<i>X.a. pv. phaseoli</i>			
<i>X.a. pv. phaseoli</i>

Figura 3 – Mapa dos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná para a visualização da localização geográfica das cidades de origem ou coleta dos 87 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* utilizados no estudo

4.2 Isolamento das bactérias

Do isolamento feito com o material vegetal coletado, citado no item 4.1, que possuíam a lesão típica da bacteriose, foram obtidas placas repletas de colônias amarelas, típicas do gênero *Xanthomonas* (figura 4). Do total das amostras obtiveram-se 89% de aproveitamento no isolamento, ou seja, apenas 11% das placas apresentaram contaminantes, colônias que não eram fenotipicamente idênticas às de *Xanthomonas* ou não apresentaram crescimento. Com as amostras de São Miguel Arcanjo e Piratininga obtiveram-se 100% de aproveitamento no

isolamento. Das amostras coletadas nas demais cidades, houve poucas perdas ou alguma colônia contaminante junto com as colônias de *Xanthomonas*, que apareceu em um reduzido número de placas. As amostras de Planaltina foram as que produziram o menor índice de aproveitamento, 68%, sendo que a maioria das placas com *Xanthomonas* apresentou também outros tipos de colônias, as quais, provavelmente, eram de bactérias decompositoras, presentes nas lesões causadas pelas *Xanthomonas*, pois o período entre a coleta das folhas até o isolamento foi de três dias, sem refrigeração adequada, o que pode ter favorecido a proliferação das mesmas.

Figura 4 – Colônias de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* obtidas a partir do isolamento usando folhas de maracujazeiros com sintomas da doença. As folhas contaminadas foram coletadas em: A, Carmo do Paranaíba; B, Limeira; C, Planaltina; D, Lençóis Paulista

Estes resultados mostram que o método utilizado para o isolamento de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi eficiente. Não foram observadas bactérias endofíticas. Sabe-se que microorganismos endofíticos podem auxiliar no controle de microorganismos fitopatogênicos, porém, dependendo da interação entre os mesmos, este controle pode se tornar inviável (ARAÚJO et al., 2002). Pode-se deduzir, então, que o patógeno *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, quando coloniza a folha do maracujazeiro, impede ou inviabiliza a sua colonização por endofíticos.

4.3 Rep-PCR

A técnica rep-PCR gerou, para cada *primer* REP, ERIC e BOX, separadamente, um perfil molecular consistente para os isolados do patovar *passiflorae* e diferentes perfis para os demais patovares. Assim, os isolados do patovar *passiflorae* (figura 5, canaletas 1 a 10) puderam ser facilmente distinguidos dos isolados de outros patovares (figura 5, canaletas 11 a 19).

Figura 5 – Gel de agarose mostrando o *fingerprint* gerado por *Repetitive Extragenic Palindromic-PCR* (REP) utilizando-se o conjunto de *primers* REP. M, marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Amersham); Em sequência estão os isolados B4 (1), B6 (2), B8 (3), B10 (4), B11 (5), B15 (6), IBSBF941 (7), IBSBF996 (8), IBSBF1257 (9), IBSBF1325 (10), IBSBF1387 (11), IBSBF1478 (12), IBSBF1553 (13), IBSBF1770 (14), IBSBF1954 (15), IBSBF1994 (16), IBSBF2008 (17), IAC11280 (18), IAC13755 (19). Entre parênteses está indicado o número correspondente à canaleta. Os códigos referentes aos isolados estão na tabela 1

Considerando os três *primers*, foram obtidos 42 locos passíveis de leitura para os 87 isolados do patovar *passiflorae*. Destes 31 se mostraram polimórficos, sendo que tais fragmentos apresentaram tamanhos entre 110 e 2300 pares de bases (pb). Para o total dos 96 isolados, ou seja, analisando os perfis de todos os patovares, foram obtidos 95 locos passíveis de leitura, cujos fragmentos apresentaram tamanhos entre 110 e 2800 pb.

A quantidade de dados obtidos com esta técnica se mostrou insuficiente para um agrupamento consistente dos isolados do patovar *passiflorae*. Os valores de *bootstrap* (abaixo de

50%) não deram consistência ao agrupamento gerado (gráfico não apresentado). Esta inconsistência, possivelmente, ocorreu devido ao grande número de isolados analisados. E, também, por se ter um grupo muito homogêneo formado pelos isolados do patovar *passiflorae* e outro muito diverso, formado por um representante de cada um dos demais patovares. Através da técnica rep-PCR, Barak e Gilbertson (2003) não observaram polimorfismo entre isolados de *X. campestris* pv. *vitians*. Hendson et al. (2001), estudando diversos isolados de *Xylella fastidiosa*, de diferentes hospedeiros, observaram baixo grau de polimorfismo entre os isolados de um mesmo hospedeiro. Louws et al. (1994) estudaram diversos patovares de *Xanthomonas* e *Pseudomonas* e encontraram perfis moleculares homogêneos dentro de cada patovar. Pode-se concluir, então, que a distribuição dos elementos repetitivos se mostra, na maioria das vezes, bastante conservada no genoma de um patovar ou de grupos de isolados de um mesmo hospedeiro. O perfil é típico de um patovar, podendo ser usado para caracterizá-lo.

Tais exemplos mostram que a metodologia do rep-PCR apresenta uma certa limitação para detectar diversidade genética dentro de um patovar ou entre isolados de um mesmo hospedeiro. No entanto, ela é altamente eficiente para distinguir diferentes patovares de uma mesma espécie, gerando perfis moleculares específicos para cada patovar, mostrando que os elementos repetitivos são conservados dentro dos genomas. Isto foi confirmado por Louws et al. (1994), Hendson et al. (2001), Barak e Gilbertson (2003), inclusive pelo presente trabalho, quando se comparou os *fingerprints* gerados para os isolados do patovar *passiflorae* com outros patovares da mesma espécie. Esta foi a principal (e importante) contribuição desta análise.

4.4 AFLP

O marcador molecular AFLP tem como característica apresentar perfis multilocos por gerar muitas marcas gênomicas. Através das reações com as diversas combinações de *primers* seletivos, obtiveram-se perfis moleculares consistentes para os 87 isolados do patovar *passiflorae*, assim como foram gerados perfis moleculares distintos para cada isolado dos diferentes patovares controles. Pela técnica AFLP foi acessado um alto grau de variabilidade genética entre isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

A partir do produto de ligação resultante da restrição com o par de enzimas *EcoRI* e *MseI* foram feitas nove reações de amplificação com diferentes combinações de *primers*

complementares aos adaptadores ligados aos sítios das enzimas. Foram analisados 89 locos polimórficos para o patovar *passiflorae* que tiveram a seguinte distribuição entre as combinações de *primers*: M+G/E+A, 10 locos; M+AG/E+T, 9 locos; M+0/E+AA, 15 locos; M+A/E+G, 8 locos; M+CA/E+CG, 15 locos; M+T/E+G, 13 locos; M+G/E+T, 9 locos; M+C/E+A, 4 locos; M+T/E+C, 6 locos. Os fragmentos gerados apresentaram tamanhos entre 90 e 880 pares de bases (Figura 6).

O agrupamento dos dados obtidos dos *fingerprints* de AFLP, gerado pelo programa NTSYS, deu origem ao dendrograma mostrado na figura 7. A análise de agrupamento mostrou que a similaridade genética para os pares de isolados, com base no coeficiente de *Jaccard*, variou de 0,16 a 1,0. Considerando um valor de similaridade superior a 0,7, obteve-se a formação de 12 grupos. A correlação cofenética, ou seja, a correlação entre as distâncias ou dissimilaridades reais e as obtidas no agrupamento, também gerado pelo programa NTSYS, foi de 0,92551, o que demonstra que o dendrograma explica adequadamente os dados reais.

Dos 12 grupos com mais de 70% de similaridade, sete são formados por isolados de uma única cidade: grupo I de Avaí, III de Bauru, IV de Limeira, VI de Fernão, VII de Avaí, X de Carmo do Paranaíba e XII de Piratininga. Os isolados de Bauru, Limeira e Piratininga formaram grupos genotípicos consistentes, diferenciando-se dos demais, por representarem apenas um grupo de cada cidade, o que sugere que a população de isolados de cada uma dessas cidades originou-se de um mesmo isolado. Já os isolados das demais cidades possuem representantes em diferentes grupos sugerindo a migração do patógeno. Entre os isolados de Carmo do Paranaíba, o M115 pertence a um grupo diferente do X, que engloba todos os demais isolados desta cidade. Isto se deve ao fato de a coleta ter sido feita em época e propriedade distintas dos demais isolados do grupo X.

Restrepo, Vélez e Verdier (2000), utilizando-se da técnica AFLP, constataram que isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, coletados em campos de diferentes zonas edafoclimáticas, formaram grupos distintos relacionados à origem. No entanto, os autores também verificaram certa inconsistência dentro de cada grupo, sugerindo terem ocorrido permutas entre isolados de diferentes grupos ou a existência um ancestral comum para os isolados coletados em diferentes zonas edafoclimáticas.

Figura 6 – Gel de poliacrilamida mostrando uma reação de AFLP com a combinação M+T/E+G. L, mistura dos marcadores de peso molecular 100 pb e 25 pb (Invitrogen®); As canaletas 1 a 9 representam os isolados da cidade de Avai; 10 a 16, Planaltina; 17 a 25, Fernão; 26 a 32, Lençóis Paulista; 33 a 39, São Miguel Arcanjo; 40, Sacramento; 41, Uberaba; 42 e 49, Araxá; 43, 44, 50 e 53, Perdizes; 45, 46 e 51, Araguari; 47, Patrocínio; 48, 72 a 77, Carmo do Paranaíba; 55, Adamantina; 56 a 63, Bauru; 64 a 71, Piratininga; 78 a 83, Limeira; 84, Vera Cruz; 85, Tupã; 86, São Sebastião da Amoreira; 87, Vicente Pires; 88 a 96, os isolados dos patovares controles. Dentro de cada cidade os isolados estão na mesma ordem apresentada na tabela 1, bem como os isolados controles

Figura 7 – Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 87 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, usando locos polimórficos de AFLP. Os valores de *bootstrap* maiores que 50%, obtidos de 1000 reamostragens, estão indicados nos nós

No presente estudo, os dados foram arranjados de acordo com a cidade de origem, que totalizam 22 (A a V da figura 8), para proceder ao teste de atribuição, usando o programa *Structure* 2.2. O valor mais adequado de K , segundo a análise, foi de $K = 13$, conforme o modelo proposto por Evano, Regnaut e Goudet (2005), ou seja, os dados foram atribuídos em 13 *clusters* genotípicos, representados por diferentes cores na figura 8. Um *cluster* corresponde a um conjunto de isolados genotipicamente similares, como se fora um grupo gerado pela análise de agrupamento (figura 7). A coordenada Y , no gráfico da figura 8, mostra o coeficiente de participação do isolado (Q) no *cluster*.

As análises de atribuição mostraram que algumas cidades são representadas por *clusters* genotípicos homogêneos, ou seja, os isolados pertencentes a estas cidades são genotipicamente similares. Já em outras cidades há isolados que participam de vários *clusters*. Estes dados são consistentes com o agrupamento gerado com base nos coeficientes de similaridade, tal como mostra o dendrograma da figura 7. Conclui-se que há cidades onde há populações com grande diversidade genética, como as de Avaí (A), Fernão (B), Lençóis Paulista (C), Perdizes (O) e Araxá (L) e cidades onde há populações geneticamente homogêneas, como as de São Miguel Arcanjo (D), Bauru (F), Piratininga (G), Limeira (H) e Planaltina (U). Os isolados da cidade do Carmo do Paranaíba (S) também se apresentam homogêneos, com exceção do isolado M115 (72), conforme referido na análise de agrupamento. Dez cidades possuem apenas um isolado cada para representá-las (por exemplo, o isolado 57 é o único presente na cidade J), o que impossibilita, evidentemente, a análise da diversidade dentro de cidades. No entanto, o teste de atribuição mostra que desses dez isolados, oito fazem parte de vários *clusters*, ou seja, cada um desses isolados tem uma pequena participação em cada *cluster*, chegando a uma participação máxima em um *cluster* de 66%. Já os outros dois isolados apresentam Q elevado: o isolado 64, de Pedrinópolis (N) participa, praticamente, de um único *cluster* ($Q = 98,3\%$) assim como o isolado 87, de Vicente Pires (V) cujo Q é igual a 96,2%.

Figura 8 – Gráfico resultante do teste de atribuição, realizado pelo o *software* Structure 2.2. Cada barra vertical representa um isolado e cada cor representa um *cluster*. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no *cluster*. Os números de 1 a 87 correspondem aos isolados, na mesma seqüência apresentada na tabela 1. A, Avaí; B, Fernão; C, Lençóis Paulista; D, São Miguel Arcanjo; E, Adamantina; F, Bauru; G, Piratininga; H, Limeira; I, Vera Cruz; J, Tupã; K, Araguari; L, Araxá; M, Patrocínio; N, Pedrinópolis; O, Perdizes; P, Sacramento; Q, Uberaba; R, Uberlândia; S, Carmo do Paranaíba; T, São Sebastião da Amoreira; U, Planaltina; V, Vicente Pires

O teste de atribuição permite uma visualização mais adequada da estrutura genética das populações em estudo, pois permite identificar a participação de cada genótipo (no caso, isolados), pertencente a grupos de origens geográficas distintas, em determinado *cluster* genotípico. Neste trabalho, foi possível identificar quais cidades possuem isolados de genótipos similares ou distintos. O *cluster* genotípico presente em um maior número de cidades (*cluster* de cor azul claro na figura 8), engloba isolados de Avaí (A), Fernão (B), Lençóis Paulista (C), São Miguel Arcanjo (D), Limeira (H), Planaltina (U) e Vicente Pires (V). Isto sugere a migração do patógeno ou a sua introdução via mudas contaminadas, uma vez que as cidades de Planaltina e

Vicente Pires se encontram distantes das demais (figura 3). Outro *cluster* engloba isolados de todas as cidades de Minas Gerais, o que caracteriza uma origem comum dos isolados dentro do Estado (*cluster* de cor alaranjada na figura 8). O *cluster* que envolve todos os isolados de Piratininga (de cor verde na figura 8) está também presente em várias outras cidades, mas, em pequenas proporções. Outro *cluster* (de cor marron-avermelhado na figura 8), que engloba todos os isolados de Bauru (F) e a maioria dos isolados de Carmo do Paranaíba (S), também está presente em várias outras cidades de São Paulo e Minas Gerais, mas os respectivos isolados participam deste *cluster* com Q baixo. Já o isolado do Paraná (79), apresenta um coeficiente de participação de 66% neste *cluster*. Isto sugere que tais isolados possuem um ancestral comum ou que foram distribuídos por todos estes locais através de materiais vegetais contaminados.

Os isolados que participam de diversos *clusters* com valores de $Q < 60$ %, quais sejam FDsa16-2 (13), FDe2-4 (16), FDe10-1 (18), LP16-3 (23), AP₃02 (33), IBSBF941 (56), IBSBF996 (57), M89 (61) e Mudás (71) podem ter sofrido processos evolutivos recentes como a aquisição horizontal de genes, mutação ou recombinação, pois estes são os três principais mecanismos que geram variação genética (ARBER, 2000). Nas cidades onde há isolados com grande diversidade genética, como Avaí (A), Fernão (B), Lençóis Paulista (C), Perdizes (O) e Araxá (L), sugere-se que eles possuem origens distintas ou que esteja ocorrendo competição entre eles, bem como a ocorrência dos processos evolutivos recentes já citados. De acordo com Wickert, Machado e Lemos (2007), populações com grande diversidade genética, em nível de patovar ou de subespécie, possivelmente se adaptam melhor a diferentes condições ambientais, o que favorece a sua sobrevivência caso haja mudança nas condições ambientais ou na capacidade de defesa da planta hospedeira.

Estudos como o de Loreti et al. (2001), que encontraram considerável diversidade genética entre isolados de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, utilizando AFLP, sugeriram que a origem geográfica pode ser responsável pela diversidade genética. Kölliker et al. (2006) também concluíram que a diversidade genética observada entre os isolados de *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*, através de AFLP, foi significativamente influenciada pela sua origem geográfica.

A análise molecular da variância (AMOVA) mostrou que a maior parte da diversidade dos isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* se encontra entre as cidades dentro de Estados (49,41%), seguida por 36,56% de variação dentro das cidades e apenas 14,04 % entre os Estados.

O resultado da AMOVA vem corroborar o teste de atribuição, pois também mostra a formação de *clusters* de acordo com a variável “cidades”. Da mesma forma, o trabalho de Restrepo, Vélez e Verdier (2000) mostrou que a maior parte da variação entre os isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* (49,6%) encontrava-se entre as diferentes zonas edafoclimáticas, 18,8% se deviam aos campos de coleta e 31,6% encontravam-se dentro dos campos.

Os resultados do teste de atribuição e da AMOVA revelaram como a diversidade genética do agente causal da bacteriose (pv. *passiflorae*) está distribuída no espaço geográfico e de que forma está estruturada nas diferentes cidades e entre elas. Em termos populacionais e de disseminação do patógeno, o que se verifica é que a maior variação se encontra entre cidades (49,4%). Dentro da maioria delas houve formação de grupos e *clusters* genotípicos homogêneos, com valores de *Q* elevados. Isto sugere que o fluxo de isolados é pequeno. Estes resultados são de extrema importância no estudo populacional deste patógeno, fornecendo subsídios para se entender sua disseminação e para o controle da doença.

4.5 Sequenciamento de fragmentos gerados por AFLP e da região intergênica 16S-23S rRNA

Seis fragmentos gerados por AFLP, denominados B1, B2, B3, B4, B5 e B6 foram sequenciados. Após a “limpeza” ou retirada de seqüências do vetor de clonagem, os *contigs* de cada fragmento apresentaram os seguintes tamanhos (em pares de bases): B1, 246; B3, 328; B4, 152 e B6, 255. As seqüências estão apresentadas na figura 9, com exceção daquelas dos fragmentos B2 e B5, que ficaram com baixa qualidade para a maioria das bases, com valores de *Phred/Phrap* menores que 20 e até mesmo iguais a zero. Isto é considerado inaceitável e não permitiu formação dos *contigs*. Picos irregulares foram visualizados através do programa *Chromas*, conforme mostrado na figura 10.

```

>B1
TAATGCATCAGTCCAGTGCCGGCGGCACGCTGCGCGCACTACGCAGTGTGTCGGTATCTCCATCGCGTCGCGGG
TATTCTTCTGCACCGCAACCGCACCAGACAGGCTCAGCGCGTAGGCCATTGCGTAAAACCCCTTTTCGCTCAGC
AACAGCGTGGCATTGATCAAGCCGATGGTCAGCAGACCAGCGCAACAATCAGCGAAAACCAGCAGATGGCGTA
ATACAAGCCGGTCACCGGAATTC

>B3
GAATTCCTTGCGGCGGAAGTCGGTGCGGTCTTCCAGGCGGTCTGTCGCCGGAGAAGTTGTTGTCGTCGTAGGCGT
AGTTGCCGGTCAGACCCAGCTCGGTGCCATCACCGAAGGTGTATTTGGTCGGCCAGTTTTCGATCGAGGTGGCT
GCATTGGCAGCGGCGGGCACGATGGCAGCAGCCAACGCCAGGACGAGCAGATTGAGGCGCATAGGTATGGTCTT
CGGCAATGAGAAGGGGCCGGGCGTCTGCCATGGCGGTGCAATGAATGTCTTCAGCAAGCGCGCAGGGTCCGG
ACGACGGCAGCACAGAAACGGTGTCTGCGTTA

>B4
GAATTCAAAGGCAACGATTTGCTTTCGATCTTGCAGTCGGCGCAAGATAAGTAGGGGCGGCCAGTGCGCTGAT
CCTGCATAGCCGAACGCTGCAGCAGTCCATATGCGTAAGCGGACCACGTGCTGGCTACCGGGTAACGGGATCGA
GTTA

>B6
GAATTCAAAGGCGGCTGCCTGGCATGCAGGCATCGGGCCGGCAACGCACTGCGCGCTGACCAACCCGCTTGCCAG
GCGCGCATCCGAGGCGTGCGCCGCGATGTGCGTGCCATCGCCTGTGAGATACGTTGCCATCCAAGCGCGATG
GTAAGGCCAAGCGTTTGCATCCGGCTGCATGACACGCCTCGCTCGGTGGAACGATGTGTGACGCAACAGGGTCG
CGGCCGATGCTGCAGTGCAAATTGACTTTGTTA

```

Figura 9– Sequências dos fragmentos B1, B3, B4 e B6 de AFLP. Em negrito, estão representadas as sequências dos primers desenhados

Figura 10 – Picos mostrados pelo programa *Chromas* das sequências dos fragmentos de AFLP B2 (A) e B5 (B) que apresentaram valores de *Phred/Phrap* baixos e bases inespecíficas

Na combinação E+CG/M+CA usada para gerar marcadores AFLP, houve a amplificação de cinco locos de tamanhos próximos que pareciam ser alelos de um mesmo loco, pois cada um dos 87 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* apresentava apenas um alelo dos cinco locos.

Para confirmar se os cinco locos eram, na verdade, cinco alelos de um mesmo loco, foram seqüenciados dois desses fragmentos. Com as duas seqüências alinhadas pôde-se constatar que se tratava realmente de alelos de um mesmo loco, devido à presença de um microsatélite. Este microsatélite tinha o motivo ‘GGGGAAT’ do tipo heptanucleotídeo, sendo que no fragmento maior o microsatélite tinha cinco repetições do motivo e no menor havia três repetições (figura 11). Em uma busca no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando a ferramenta BLAST, este microsatélite também pôde ser detectado em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, pois este patovar teve seu genoma completo seqüenciado.

Figura 11 – **A:** Fragmento de um gel de poliacrilamida mostrando locos de AFLP gerados com a combinação de *primers* E+CG/M+CA. Na figura estão indicados os cinco fragmentos (A1, A2, A3, A4 e A5) que são alelos de um mesmo loco, devido à presença de um microsatélite. **B:** A figura mostra uma parte das seqüências dos fragmentos A2 e A4 alinhadas, indicando em negrito o motivo repetido no microsatélite e a ausência de dois motivos no fragmento menor

O seqüenciamento da região ITS, ou seja, entre os genes que codificam rRNA das subunidades ribossomais 16S e 23S de 12 isolados, sendo quatro do patovar *passiflorae* (LP1-1a, Br5d, Abj20-4 e PA6-1) e oito dos demais patovares, ditos controles, (IBSBF1387, IBSBF1478, IBSBF1553, IBSBF1770, IBSBF1954, IBSBF1994, IBSBF2008 e IAC13755), possibilitou o alinhamento de fragmentos com 662 pb. Detectou-se nestas seqüências polimorfismo entre os isolados do patovar *passiflorae* e dos patovares controles (figura 12). Entre os quatro isolados de *passiflorae*, três se apresentaram totalmente idênticos (LP1-1a, Br5d e PA6-1), apenas no isolado Abj20-4 observou-se um polimorfismo de quatro bases comparativamente aos outros três isolados (figura 12, posições 3, 4, 15 e 104), havendo 99,2% de similaridade entre eles.

Figura 12 – Alinhamento, pelo programa *Clustal X*, de fragmentos de sequência da região intergênica 16S-23S rRNA de isolados do patovar *passiflorae*, LP1-1a, Br5d, Abj20-4 e PA6-1, e de isolados de outros patovares, IBSBF1387, IBSBF1478, IBSBF1553, IBSBF1770, IBSBF1954, IBSBF1994, IBSBF2008 e IAC13755. Na posição 520 há um SNP que diferencia o patovar *passiflorae* dos demais

O sequenciamento do gene ribossomal 16S é muito usado em análises filogenéticas ou de diversidade. No entanto, um estudo com espécies do gênero *Xanthomonas* mostrou que esta

região é altamente conservada (HAUBEN et al., 1997). Assim, diversos outros estudos com espécies de *Xanthomonas* usaram o seqüenciamento da região entre os genes ribossomais 16S e 23S para a detecção de variabilidade (HENDSON et al., 2001; CUBERO; GRAHAM, 2002; GONÇALVES; ROSATO, 2002), o que possibilitou discriminar isolados de diferentes hospedeiros ou patovares.

No presente trabalho, detectou-se polimorfismo em diversas bases nas seqüências dos diferentes patovares, na região intergênica 16S-23S rRNA, porém, este polimorfismo não foi quantificado, ou seja, a similaridade entre eles não foi calculada, pois *a priori* não era objetivo do trabalho fazer uma análise filogenética entre os isolados dos diversos patovares, e sim detectar polimorfismos entre eles que permitissem o desenho de *primers* específicos para o patovar *passiflorae*. Já Gonçalves e Rosato (2002) fizeram uma análise filogenética de 17 espécies do gênero *Xanthomonas* usando seqüências da região intergênica 16S-23S rRNA. Os autores obtiveram similaridades dentro do gênero entre 63 a 99%. Houve formação de seis grupos, sendo que cinco deles correspondiam a apenas uma espécie. O grupo restante englobou a maioria das espécies estudadas e dentre elas havia um representante de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Isto confirma que esta região é adequada para uma análise filogenética, pois existe polimorfismo entre espécies e entre patovares de uma mesma espécie, conforme foi detectado no presente trabalho.

Observou-se também que a região intergênica 16S-23S rRNA é conservada dentro do patovar *passiflorae*. Isto leva à conclusão de que na categoria patovar esta região se apresenta realmente mais conservada do que entre patovares ou espécies. Barak e Gilbertson (2003) também observaram seqüências intergênicas 16S-23S rRNA idênticas ao estudar 14 isolados de *X. campestris* pv. *vitians* e detectaram polimorfismos entre as seqüências de diversos outros patovares.

4.6 Construção de *primers* específicos para *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e teste de validação

A partir do alinhamento dos fragmentos seqüenciados, retirados dos géis de AFLP, com seqüências de outras *Xanthomonas*, foi possível, em quatro das seis seqüências, identificar regiões polimórficas adequadas para o desenho de *primers*; assim, foram desenhados quatro pares

de *primers*. As seqüências que permitiram o desenho dos *primers* foram comparadas apenas com seqüências de *Xanthomonas* depositadas no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), o que impossibilitou uma maior precisão ao se desenhar os *primers* (figura 13).

Fragmento B1 (pv. <i>passiflorae</i>)	CG- CGCACTACGCAGTGTGTCGGTGA ...CACCAGCGCAACAATCAGCGAAAACCAG
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	CG-CGCACTACGCAGTGTGTCGGTGA...CACCAGCGCAACAATCAGCGAAAACCAG
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	CG-CGTACTGCGCGGCGCGTCATTGA...CACCAGCGCAACAATCAGCGAAAACCAG
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	CG-CGTACTGCGCGGCGCGTCATTGA...CACCAGCGCAACAATCAGCGAAAACCAG
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CG-CGGATTGCGCGGTGCGTCATTGA...CACCAGCGCGGCGATTAGCGAAAACCAG
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CGGCGCACTG---ACCCGCGCGG-GC...CAACAGCGCGGCAATCAGCGAGAACCAG
Fragmento B3 (pv. <i>passiflorae</i>)	AAT TCCTTGCGGCGGAAGTCGGT GCG...GGAC GAGCAGATTGAGGCGCATAG GTAT
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	AATTCCTTGCGGCGGAAGTCGGTGC...GGACAAATAGATTGAGGCGCATAGGTAT
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	AATTCCTTGCGGCGGAAGTCGGTGC...GGACAAGCAGATTGAGGCGCATAGGTAT
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	AATTCCTTGCGGCGGAATCGTTGCG...GGACAAGCAGATTGAGGCGCATAGGTAT
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	AATTCCTTGCGGCGGAATCGTTGCG...GAACGAGCGGATTGAGGCGCATAGGAAT
Fragmento B4 (pv. <i>passiflorae</i>)	CTT GCACTCGGCGCAAGATAAGT AGG...CTAC CGGGTAACGGGATCGAGTTA
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	CTTGCCGGTGGCGCAAGGCAACAGG...CTAC-----
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	CTTGCCGGTGGCGCAAGGCAACAGG...CTAC-----
Fragmento B6 (pv. <i>passiflorae</i>)	CAACG CACTCGC-CGCTGACCAACCC ...TTG CA-TCCGGCTGCATGACACGC CTCG
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CAACGCGCTCGCAC-CTGACGAATCC...TTGCC-TATGGCGGCATGACACACCTGG
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	AAGCGCGGTGGCGC-CTGACGAATCC...TTGCA-CACGGATGCATGACACGCCTCG

Figura 13 – Parte do alinhamento das seqüências dos fragmentos B1, B3, B4 e B6 de AFLP com seqüências de outros patovares de *X. axonopodis* ou espécies de *Xanthomonas*, disponíveis no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Em negrito, estão as seqüências *forward* e *reverse*, respectivamente, dos *primers* desenhados

Feitas as PCRs, os quatro pares de *primers* foram capazes de amplificar os fragmentos de tamanho predito pelo seqüenciamento em 16 isolados do patovar *passiflorae*, oriundos de diferentes cidades. No entanto, cada par de *primers* também amplificou os fragmentos esperados em alguns patovares, além do *passiflorae*. Isto ocorreu porque não se dispunha da seqüência de todos os patovares utilizados. Provavelmente, as regiões dos *primers* desenhados para o patovar *passiflorae* eram idênticas ou muito parecidas às dos demais patovares, possibilitando o anelamento dos *primers* e, conseqüentemente, a produção do amplicon. Assim, além do patovar *passiflorae*, o *primer* Xap-B1 gerou um amplicon nos patovares *dieffenbachiae*, *vitians* e *phaseoli*, o *primer* Xap-B3 nos patovares *dieffenbachiae*, *vitians* e *phaseoli* e em *X. albilineans*, o *primer* Xap-B4 nos patovares *vitians* e *phaseoli* e o *primer* Xap-B6 nos patovares *dieffenbachiae*, *vitians*, *manihotis* e *phaseoli*, o que não os caracterizou específicos para o patovar *passiflorae* (figura 14, A a D). As seqüências dos pares de *primers*, denominados de Xap-B1, Xap-B3, Xap-B4 e Xap-B6, e o tamanho dos fragmentos amplificados estão apresentados na tabela 2.

No que concerne ao alinhamento de 662 pb das seqüências da região intergênica 16S-23S rRNA foi encontrado na posição 520, no sentido 5' - 3', um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os isolados do patovar *passiflorae* possuíam uma base “G” e os isolados dos demais patovares possuíam uma base “C” (figura 12 e 15). Em outros polimorfismos encontrados havia pelo menos um patovar com base idêntica, na mesma posição, à dos isolados do patovar *passiflorae*.

O SNP detectado não seria suficiente para garantir especificidade a um *primer*, conforme o objetivo deste trabalho. Porém, baseando-se na metodologia proposta por Ye et al. (2001), foi possível desenhar um *primer* específico para o patovar *passiflorae*, utilizando-se do SNP detectado. Para isto, desenhou-se um *primer* interno, *reverse*, cujo terminal 3' foi posicionado no SNP, ou seja, na base “G”. No entanto, de acordo com esta metodologia, a base da posição -2, ou seja, a base interna depois da “G”, uma “C”, foi substituída por uma “T” na seqüência do *primer*. Assim, este “erro” de base não permite que o *primer* anele nas duas últimas bases da região 3' em DNAs de isolados que não sejam do patovar *passiflorae*, impedindo a produção do amplicon. Para ocorrer a produção do amplicon, foram desenhados mais dois *primers* externos, *forward* e *reverse*, em regiões distantes ao *primer* interno, que se apresentaram idênticas para todos os patovares. Na PCR, a combinação do *primer* externo (*forward*) com o *primer* interno (*reverse*) produziu o amplicon específico para o patovar *passiflorae*. Já a combinação do *primer* externo (*forward*) com o *primer* externo (*reverse*) produziu um amplicon de tamanho maior que o anterior e presente em todos patovares. O conjunto de *primers* desenhado foi denominado XapITS e a seqüência do *primer* interno, específico, está ilustrada na figura 15.

Feitas as reações com esse conjunto de *primers*, os fragmentos entre os *primers* externos, que são controles positivos da PCR, foram amplificados em todos os isolados testados, exceto em *X. albilineans*, o que pode ser devido a polimorfismos na região de anelamento de algum dos *primers* externos. Já o fragmento entre o *primer* interno *reverse* e o externo *forward*, que é o fragmento específico para o patovar *passiflorae*, foi amplificado apenas nos 16 isolados do patovar *passiflorae*, conforme o esperado. Assim, os *primers* desenhados a partir da região intergênica 16S-23S rRNA podem ser considerados específicos para *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (tabela 2, figura 14 E).

Figura 14 – Gel de agarose mostrando os amplicons resultantes das PCRs feitas com os pares de *primers* desenhados a partir de fragmentos de AFLP (A a D) e da sequência intergênica 16S-23S rRNA (E). **A**, *primer* Xap-B1; **B**, *primer* Xap-B3; **C**, *primer* Xap-B4; **D**, *primer* Xap-B6; **E**, *primer* XapITS; M, marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Invitrogen); canaleta 1, Abj5-3; 2, Br6d; 3, FDsa16-2; 4, LP2-3; 5, SMA1a; 6, M89; 7, M111; 8, AP₃02; 9, B6; 10, PA1-2; 11, AP2; 12, LM12a; 13, IBSBF941 *pv. passiflorae*; 14, IBSBF996 *pv. passiflorae*; 15, IBSBF1257 *pv. passiflorae*; 16, IBSBF1325 *pv. passiflorae*; 17, *pv. vesicatoria*; 18, *pv. dieffenbachiae*; 19, *pv. vitians*; 20, *pv. allii*; 21, *pv. malvacearum*; 22, *pv. manihotis*; 23, *pv. vasculorum*; 24, IAC11280 *pv. phaseoli*; 25, IAC13755 *pv. phaseoli*; 26, *X. campestris pv. campestris*; 27, *X. albilineans*; 28, reação em branco, sem DNA *template*. Em E a seta indica o fragmento específico do patovar *passiflorae*

Figura 15 – Alinhamento de parte das seqüências da região intergênica 16S-23S rRNA, na qual foi detectado um SNP entre os isolados do patovar *passiflorae*, Abj20-4, Br5d, LP1-1a e PA6-e e os demais patovares, *vesicatoria*, *dieffenbachiae*, *vitians*, *allii*, *malvacearum*, *manihotis*, *vasculorum* e *phaseoli*, mostrando o local em que foi desenhado o *primer* interno específico (XapITS)

Com o mesmo objetivo, Cubero e Graham (2002) desenharam dois pares de *primers* específicos para detecção e identificação de dois patógenos responsáveis pelo cancro cítrico, *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*. Amplicons em todos os isolados testados foram obtidos, exceto em um isolado do patovar *aurantifolii*. Os *primers* não produziram amplicons em outras espécies que colonizam os citros, mas foram obtidos amplicons para outras espécies de *Xanthomonas*, as quais não são encontradas em citros, o que não afetaria a diagnose do patógeno alvo.

Park et al. (2004) construíram um par de *primers* específicos para *X. campestris* pv. *campestris*, a partir da região do gene *hrpF* que está envolvido com reações de hipersensibilidade e patogenicidade. Os *primers* amplificaram o fragmento esperado em todos os isolados testados deste patovar e não produziram o amplicon em nenhum dos isolados de outras espécies e patovares de *Xanthomonas* e microorganismos de referência. Também, esses *primers* foram capazes de detectar o patógeno em plantas infectadas naturalmente.

Tabela 2 – Nomenclatura e sequência dos pares de *primers* desenhados para detecção de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

<i>Nome</i>	<i>Sequência Forward</i>	<i>Sequência Reverse</i>	<i>Fragmento</i>
Xap-B1	5'CGCACTACGCAGTGTGTCGG3'	5'GGTTTTTCGCTGATTGTTGCGC3'	176 pb
Xap-B3	5'TCCTTGCGGCGGAAGTCGG3'	5'CTATGCGCCTCAATCTGCTC3'	208 pb
Xap-B4	5'GCAGTCGGCGCAAGATAAGT3'	5'TAACTCGATCCCGTTACCCG3'	120 pb
Xap-B6	5'CACTCGCCGCTGACCAAC3'	5'GCGTGTCATGCAGCCGGAT3'	140 pb
XapITS	5'ATCCCGACAGGCTCCACC3'	5'TTCGCTTCCAGCAGCTATAC3'	520 pb
		(Primer interno, específico)	
XapITS	5'ATCCCGACAGGCTCCACC3'	5'TTCCAGATTGTTTTTCTAAAGC3'	641 pb
		(Primer externo, controle da reação)	

4.7 Diagnose utilizando os *primers* desenhados.

As plantas de maracujá doce inoculadas foram mantidas em casa de vegetação sob as seguintes condições ambientais durante o período de avaliação: temperatura mínima de 10 a 15°C e máxima de 28 a 33°C e umidade relativa mínima de 14 a 18% e máxima de 88 a 99%. Os sintomas de infecção bacteriana começaram a aparecer nas folhas após oito dias (figura 16).

As avaliações foram feitas com 5, 12 e 19 dias após a inoculação com o isolado Abj5-3. Em cada um desses dias, foi coletada uma folha de cada planta. Com uma parte de cada folha, foi feito o isolamento bacteriano e com outra foi feita a extração de DNA, porém, ao extrair o DNA, a parte da folha foi fragmentada em duas porções, uma próxima e outra distante do local de inoculação, para observar a possível migração da bactéria.

Figura 16 – A: Plantas de maracujá doce mantidas na casa de vegetação usadas para inocular *X. axonopodis* pv *passiflorae*. B: Folha de uma planta com sintomas de bacteriose, após 15 dias da inoculação. O isolado utilizado foi o Abj5-3

Nas avaliações com 5, 12 e 19 dias após a inoculação, obtiveram-se as seguintes concentrações bacterianas no tecido foliar, respectivamente: Planta 1, $0,56 \times 10^7$, $3,38 \times 10^7$ e $4,85 \times 10^7$ UFC/mL; Planta 2, $0,21 \times 10^7$, $6,38 \times 10^7$ e $10,85 \times 10^7$ UFC/mL; Planta 3, $1,02 \times 10^7$, $7,83 \times 10^7$ e $27,23 \times 10^7$ UFC/mL. A planta testemunha não apresentou sintomas da infecção nem se observou a formação de colônias.

PCRs foram feitas usando-se o DNA extraído das plantas e os cinco pares de *primers* desenhados. Todos os *primers* detectaram DNA bacteriano presente nas amostras de DNA das folhas inoculadas, nos três períodos de avaliação (figura 17). Com 5 dias de avaliação, só houve amplificação a partir da amostra da primeira porção da folha, sendo que os amplicons tinham uma intensidade mais fraca em relação aos amplicons produzidos nas amostras coletadas aos 12 e 19 dias de avaliação. Isto mostra que nesse período inicial a bactéria não havia migrado por todo o limbo foliar e sua concentração era muito baixa.

Aos 12 e 19 dias, os *primers* produziram amplicons de maior intensidade em amostras coletadas das duas porções da folha, das três plantas. Isto comprova, conforme indicado pelo cálculo das UFCs/mL, que a concentração da bactéria aumentou nesses períodos e que elas já haviam colonizado todo o limbo foliar. Todos os *primers* produziram amplicons mais fracos na porção distante da inoculação nas folhas da planta 2, nesses dois períodos, se comparados à intensidade dos amplicons da mesma porção das folhas das demais plantas. Isto pode ser devido a

uma migração mais lenta das bactéria, pois a o genótipo da planta pode ter apresentado um certo grau de tolerância ao patógeno. No DNA das plantas testemunhas não houve produção do amplicon em nenhum período de avaliação.

Conclui-se que *primers* desenhados podem ser recomendados para detecção e identificação do patógeno em plantas de viveiros (mudas) e pomares comerciais de maracujá, mesmo que não apresentem sintomas da doença. Os demais *primers* que detectaram outras espécies ou patovares de *Xanthomonas* além do pv. *passiflorae* não têm a sua eficiência comprometida, uma vez que *X. axonopodis* pv. *passiflorae* é o único patógeno desta espécie encontrado em maracujazeiros (LIBERATO, 2002; KIMATI et al. 2005).

Figura 17 – Gel de agarose mostrando os amplicons resultantes das PCRs feitas com os pares de *primers* desenhados a partir do DNA de folhas de maracujazeiro doce inoculadas com *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. **A**, *primer* Xap-B1; **B**, *primer* Xap-B3; **C**, *primer* Xap-B4; **D**, *primer* Xap-B6; **E**, *primer* XapITS; M, marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Invitrogen); As amostras estão agrupadas por dia de avaliação; Os números 1, 2 e 3 representam as três plantas inoculadas; T é a planta testemunha; **a** indica a porção da folha próxima ao ponto de inoculação e **b** indica a porção mais distante do ponto de inoculação; C, controle positivo utilizando-se uma colônia do inóculo como *template* na PCR; B, reação em branco, sem DNA *template*

5 CONCLUSÕES

Os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* apresentam alta diversidade genética, que está estruturada entre e dentro das cidades de coleta. A técnica AFLP é muito sensível e se presta para revelar a diversidade genética entre os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. A técnica rep-PCR se presta para distinguir os diferentes patovares de *Xanthomonas*. A região intergênica 16S-23S rRNA é conservada dentro do patovar *passiflorae* e variável entre os patovares da espécie *X. axonopodis*. É possível o diagnóstico molecular de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em plantas de maracujá infectadas com este patógeno, antes mesmo do aparecimento dos sintomas da doença.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 9-31.
- AGRIANUAL 2009. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP – Consultoria a Comércio, 2008. p. 331.
- ALVES, A.; HENRIQUES, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. **Tipagem genética de microrganismos**. Aveiro: Laboratório de Diversidade Microbiana, Depto. de Biologia, Universidade de Aveiro, 2003. 24 p.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, P.T. **Manual: isolamento de microorganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanism and impact on microbial evolution. **FESM Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 1-7, 2000.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Ed). **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 2.ed. New York: Greene Pub. Associates, 1992.
- BALDONI, L.; TOSTI, N.; RICCIOLINI, C.; BELAJ, A.; ARCIONI, S.; PANNELLI, G.; GERMANA, M.A.; MULAS, M.; PORCEDDU, A. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. **Annals of Botany**, London, v. 98, p. 935–942, 2006.
- BARAK, J.D.; GILBERTSON, R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leafspot of lettuce. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 596-603, 2003.
- CORRÊA, D.B.A.; FERREIRA, M.; BALANI, D.M.; RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S.A.L. Avaliação da região espaçadora 16S-23S DNAr como marcador molecular para diferenciação de *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* patogênicas de orquídeas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 233-238, 2007.
- CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J.H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1257–1264, 2002.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; FARIA, G.A. Botânica. In: LIMA, A.A; CUNHA, M.A.P. (Ed). **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 13-35.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; KICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, p. 19-20, 1983.

DUNN, G.; EVERITT, B.S. **An introduction to mathematical taxonomy**. New York: Cambridge University Press, 1982. 152 p.

DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, R.A.; SOHRO, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype stains. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 59, n. 4, p. 153-168, 1980.

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 175-185, 1998.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 479-491, 1992.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 811-821, 2000.

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

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

HARTUNG, J. S.; DANIEL, J. F.; PRUVOST, O. P. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1143-1148, 1993.

HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; MOORE, E.R.B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 2, p. 328-335, 1997.

HENDSON, M.; PURCELL, A.H.; CHEN, D.; SMART, C.; GUILHABERT, M.; KIRKPATRICK, B. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 895-903, 2001.

HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 3229-3239, 1995.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; JUNQUEIRA, L.P.; SHARMA, R.D. Principais doenças e pragas. In: MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I.M.; AGUIAR, J.L.P.; AZEVEDO, J.A. VASCONCELLOS, M.A.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed). **Maracujá-doce**. Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. 200 p.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. CARMARGO, L.E.A. (Ed). **Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. 4.ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2.

KÖLLIKER, R.; KRAEHENBUEHL, R.; BOLLER, B.; WIDMER, F. Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 109-119, 2006.

KOSAWANG, C.; SMITAMANA, P.; TOOJINDA, T.; NILPANIT, N.; SIRITHUNYA, P. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting differentiates genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from Northern Thailand. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 550-555, 2006.

LEBLOND-BOURGET, N.; PHILIPPE, H.; MANGIN, I.; DECARIS, B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 46, p. 102-111, 1996.

LEE, B.M.; PARK, Y.J.; PARK, D.S.; KANG, H.W.; KIM, J.G.; SONG, E.S.; PARK, I.C.; YOON, U.H.; HAHN, J.H.; KOO, B.S.; LEE, G.B.; KIM, H.; PARK, Y.S.; YOON, K.O.; KIM, J.H.; JUNG, C.H.; KOH, N.H.; SEO, J.S.; GO, S.J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 577-586, 2005.

LIBERATO, J.R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: Suprema, 2002. v. 2. p. 699-825.

LIMA, A.A.; CARDOSO, C.E.L.; SOUZA, J.S.; PIRES, M.M. **Comercialização do maracujazeiro**, 2006. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/>. Acesso em: 6 fev. 2009.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; CARNEIRO, M.S.; MATTA, F.P.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 1. p. 17-29, 2006.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (Rapl e Aflp). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 56-60, 2002.

LORETI, S.; GALLELLI, A.; BELISARIO, A.; WAJNBERG, E.; CORAZZA, L. Investigation of genomic variability of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* by AFLP analysis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 6, p. 583-591, 2001.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286–2295, July 1994.

MANLY, B.F.J. **Multivariate statistical methods**. A Primer. 2nd ed. London: Chapman, 1994. 215 p.

MARKELL, S.G.; MILUS, E.A. Emergence of a novel population of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Eastern United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. 632-639, 2008.

MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Ed). **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995, p. 1- 8.

MCCARTHY, C. Chromas, Version 1.2. Brisbane, Queensland, Australia: School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science and Technology, Griffith University.

MELETTI, M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; COUTINHO, H.L.C.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; ELSAS, J.D.V. A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 64, p. 366– 379, 2005.

PARK, Y.J.; LEE, B.M.; HO-HAHN, J.; LEE, G.B.; PARK, D.S. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species specific primers based on *hrpF* gene sequences. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, p. 419-423, 2004.

PEREIRA, A.L.G. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n. sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 163-174, 1969.

PRITCHARD, J.K.; MATTHEW, S.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 945-959, 2000.

QIN, X.; MIRANDA, V.S.; MACHADO, M.A.; LEMOS, E.G.M.; HARTUNG, J.S. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 6, p. 599-605, 2001.

RESTREPO, S.; VALLE, T.L.; DUQUE, M.C.; VERDIER, V. Assessing genetic variability among Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism analyses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 754-763, 1999.

RESTREPO, S.; VÉLEZ, C.M.; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 683-690, 2000.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Owner's manual.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.1.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J.C., HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, p. 687-695, 1977.

SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F.; SANTOS, C.C.F.; BARBOSA, C.J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A.A; CUNHA, M.A.P. (Ed). **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 239-280.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J. M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. ARLEQUIN version 2.0. A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SCORTICHINI, M.; MARCHESI, U.; DI PROSPERO, P. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 325-332, 2001.

SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; SLUYS, M.A.V.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.C.; AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.B.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, R.C.C.; FERRO, M.I.T.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.M.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.M.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.D.; SILVA, C.; SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.F.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, p. 459-463, 2002.

SILVA, C.S.; RUA, P.S. Aspectos econômicos: mercado nacional e internacional. In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A.C. (Org). **Maracujá-doce**. Aspectos técnicos e econômicos. São Paulo: Editora UNESP, 2007. p. 7-24.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1973. 573 p.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá**. Espécies, variedades, cultivo. Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiroz. Piracicaba: Fealq, 1997. v. 3.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 2345-2350, 2000.

STARR, M.P. The Genus *Xanthomonas*. In: STARR, M.P. (Ed). **Phytopathogenic bacteria**. Selections from the prokaryotes – a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. New York: Springer-Verlag, 1983. p. 742-763.

SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. 399 p.

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 5, p. 592-599, 2008.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; MCHARDY, A.C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D.H.; NIESBACH-KLÖSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S.C.; VORHÖLTER, F.J.; WEBER, E.; PÜHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D.; KAISER, O. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic

bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 21, p. 7254–7266, 2005.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, p. 4876-4882, 1997a.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. (1997). Disponível em: < <http://www.ib.usp.br/hennig/software.htm>>, b. Acesso em: 15 fev. 2007.

TRINDADE, L.C.; MARQUES, E.; LOPES, D.B.; FERREIRA, M.A.S.V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 1, p. 16-23, 2007.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 677-682, 2000.

VALVERDE, A.; HUBERT, T.; STOLOV, A.; DAGAR, A.; KOPELOWITZ, J.; BURDMAN, S. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 17-25, 2007.

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. passionfruit. In: LITZ, R.E. (Ed). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxford: CABI Publishing, 2005. p. 436-453.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WICKERT, E.; MACHADO, M. A.; LEMOS, E.G.M. Evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from citrus and coffee hosts by single-nucleotide polymorphism markers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p. 1543-1549, 2007.

YAP, I.; NELSON, R.J. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrogrammes. IRRI Discussion Paper Series n. 14. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

YE, S.; DHILLON, S.; KE, X.; COLLINS, A.R.; DAY, I.N.M. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 17, 2001. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/29/17/e88>. Acesso em: 9 set. 2008.