

ANÁLISE ESTRUTURAL E COMPARATIVA DO GENOMA DE
Leifsonia xyli subsp. *xyli*

PAULO ROBERTO GAGLIARDI

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto – 2003

ANÁLISE ESTRUTURAL E COMPARATIVA DO GENOMA DE
Leifsonia xyli subsp. *xyli*

PAULO ROBERTO GAGLIARDI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Gagliardi, Paulo Roberto

Análise estrutural e comparativa do genoma de *Leifsonia xyli* subsp.
xyli / Paulo Roberto Gagliardi. - - Piracicaba, 2003.
61 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Bactéria Gram-Positiva 3. Cromossomos vegetais
DNA 5. Genoma 6. Mapeamento genético 7. Microscopia eletrônica de
varredura 8. Raquitismo da soqueira 9. Variação genética em plantas l.
Título

CDD 633.61

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

Aos meus pais pelo incessante apoio,

À minha tia e meu irmão

À Patrícia Loffredo Arantes

com amor

DEDICO

À Maria Tereza Manfredini Loffredo

Com carinho

OFEREÇO

*Em memória de meu amigo Luiz Gustavo Martins,
com carinho
OFEREÇO.*

*“As pessoas influenciam-nos, as vozes comovem-nos,
os livros convencem-nos, os feitos entusiasmam-nos”*

(John Henry Newman)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela valiosa orientação, estímulo e profissionalismo.

Agradeço especialmente a Dra. Claudia Barros Monteiro-Vitorello pelos ensinamentos, carinho e compreensão.

Aos Professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular Alice, Kátia, Mariana, Adriane, Daniela, Viviane, Maria Cristina, Jaqueline, Ana, Rodrigo, Vanoli, Jorge, Ademir, Osmar, Camila, Flávia, Júlia, Carol, Laise, Rafaeli e muitos outros que tanto alegraram nosso dia-a-dia.

Ao Dr. Éder Antonio Giglioti pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos Hermman, Marcos, Alfredo, Miguel, Luis, Gianini, Josivaldo, Yodiro, Sizuo, Paulo Beskow, Norberto, Sebastião e Rubismar, Rolim pelos ensinamentos, estímulo e amizade.

À Dra. Maricela Diaz Rodrigues do Censa/Cuba pelo estímulo e carinho.

À Andressa pela incessante ajuda e pelo carinho.

Às amigas Alessandra, Célia e Fláviana.

Aos amigos Raul, André, Adriano e Fernando da bioinformática pelo valioso auxílio na editoração desta dissertação.

Os amigos Paulo de Tarso, Leonardo e Cândido.

Aos amigos do Setor de Fitopatologia Rodolfo, Fernanda e Heloísa pela amizade e carinho.

Aos amigos Christian Davis, Jose Segundo, Silvio, Luis Fernando, Marissonia, Ana Paula Amaral,

Aos amigos de Santa Rita, Paulo Junqueira e Juliana, Élio, Amoroso e Fernanda, Cássio, Vitor, Carlos Palma, Jéferson e Douglas Lioni, Cláudio e Raquel, José Luís de Araujo, Divaldinho e Luciana, Joaquim, Marcelo, Edson, Fernando Carniato que mesmo distante estavam sempre presentes.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

À Copersucar, especialmente aos amigos Vicente e Marcos Casagrande pelo apoio e amizade.

E à todos aqueles que por esquecimento não citei, mas que de alguma forma também contribuíram em mais esta etapa de minha vida, agradeço.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE QUADROS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Raquitismo-da-soqueira.....	3
2.1.1 História e distribuição.....	3
2.1.2 Etiologia do agente causal do raquitismo-da-soqueira.....	4
2.1.3 Sintomas.....	5
2.1.4 Transmissão.....	5
2.1.5 Diagnose.....	6
2.1.6 Métodos de controle.....	7
2.2 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>	7
2.3 O Projeto Genoma <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	8
2.4 Mapas físicos gerados por PFGE.....	8
2.5 Digestão eletrônica e Southern eletrônico.....	10
2.6 Rep-PCR.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Manutenção do isolado de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	14
3.1.2 Obtenção do DN A genômico.....	14

3.2 Confirmação da identidade do isolado de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	15
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	15
3.2.3 PCR-específico.....	16
3.3 Estimativa do tamanho do genoma de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> utilizando PFGE	17
3.3.1 Preparo do DNA genômico	17
3.3.2 Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição.....	18
3.3.3 Separação dos fragmentos cromossômicos através de PFGE	18
3.4 Análise de seqüências repetidas através de hibridização.....	19
3.4.1 Escolha e preparo das sondas.....	19
3.4.2 Southern Blot.....	21
3.4.3 Hibridização e revelação.....	22
3.5 Variabilidade genética determinada por rep-PCR.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Confirmação da identidade do isolado CTC B07	25
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
4.1.2 Testes sorológicos de microaglutinação.....	28
4.1.3 PCR específico.....	28
4.2 Estimativa do tamanho do genoma de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> e comparação com a montagem obtida pelo seqüenciamento	29
4.3 Análise de seqüências repetidas.....	33
4.4 Variabilidade genética determinada por rep-PCR.....	43
5 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICE.....	59

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Microscopia eletrônica de varredura da bactéria *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07. Setas apontam para o formato corineforme característico da bactéria quando cultivada em meio de cultura. 25
- 2 Microscopia eletrônica de varredura de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 em meio de cultura. Em (a), aglomerado de bactérias formando um emaranhado, (aumento de 15.000 X). Em (b), detalhe da célula bacteriana, aumento de 20.000 X. A seta aponta para o formato corineforme característico da bactéria quando cultivada em meio de cultura. Em ambos os casos não se observam flagelos. 26
- 3 Microscopia eletrônica de varredura de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 presente em fluido do xilema, (aumento de 17.000 X). Nas fotos, observa-se a morfologia característica desta bactéria e a ausência de flagelo. 27
- 4 Microscopia eletrônica de varredura de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 presente em vasos do xilema de cana-de-açúcar com sintomas internos e externos de raquitismo-da-soqueira. Em a, corte transversal dos vasos: metaxilema (MX); elemento do xilema (EX), lacuna (LAC) e floema (FL) com aumento de 500 X. Em b, c, d e e, detalhes da bactéria colonizando os vasos, aumentos de 5.000 e 20.000 X. Em f, a bactéria isolada com aumento de 20.000 X. 27
- 5 Eletroforese em gel de agarose 15 dos produtos amplificados por PCR específico da região 23S do rRNA. M - marcador molecular de 100 pb (Promega); 1 - *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 2 - *L. xyli* subsp. *xyli*

	CTC B07; 3 - PCR usando fluido do xilema de planta sintomática, 4 - controle negativo com <i>Xanthomonas albilineans</i> ; 5 - controle negativo sem DNA.	29
6	PFGE de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07: 1 e 2 - digestões com <i>Xba</i> I; M ₁ e M ₂ - Marcadores moleculares <i>Low Range PFG</i> e <i>Lambda</i> , respectivamente.	30
7	PFGE de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07: 1 e 2 - digestões com <i>Spe</i> I; M ₁ e M ₂ - Marcadores moleculares <i>Mid Range PFG II</i> e <i>Low Range PFG</i> , respectivamente.	30
8	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR utilizados como sondas: 1 - fragmento amplificado com o par de iniciadores R1/R2, 2 - fragmento amplificado com o par de iniciadores R3/R4 e, 3 - fragmento amplificado com o par de iniciadores R5/R6. M - marcador molecular 1kb (PROMEGA).	33
9	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR dos insertos plasmidiais: 1 - 0335F07 e; 2 - 1240C04, M - marcador molecular 1kb (PROMEGA).	33
10	Auto-radiografia - sonda obtida pela amplificação da seqüência flanqueada pelos iniciadores R1 e R2: 1, 6, 11 e 16 <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07; 2, 7, 12 e 17 <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (isolado australiano); 3, 8, 13 e 18 <i>L. xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> ; 4, 9, 14 e 19 <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> e 5, 10, 15 e 20 <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	35
11	Auto-radiografia - sonda obtida pela amplificação da seqüência flanqueada pelos iniciadores R3 e R4: 1, 6, 11 e 16 <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07; 2, 7, 12 e 17 <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (isolado australiano); 3, 8, 13 e 18 <i>L. xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> ; 4, 9, 14 e 19 <i>C. michiganensis</i> subsp. e 5, 10, 15 e 20 <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	37
12	Auto-radiografia - sonda obtida pela amplificação da seqüência flanqueada pelos iniciadores R5 e R6: 1, 6, 11 e 16 <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07; 2, 7, 12 e 17 <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (isolado australiano); 3, 8, 13 e 18 <i>L. xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> ; 4, 9, 14 e 19 <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> e 5, 10, 15 e 20 <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	39

- 13 Auto-radiografia - sonda Lxx1 (Transposon Tn 5564 de *Corynebacterium striatum*): 1, 6 e 11 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7 e 12 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3, 8 e 13 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9 e 14 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e; 5, 10 e 15 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 42
- 14 Auto-radiografia - sonda LXX2 (seqüência similar a IS1237 de *L. xyli* subsp. *cynodontis*): 1, 6 e 11 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7 e 12 *L. xyli* subsp. *xyli* australiana; 3, 8 e 13 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9 e 14 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e; 5, 10 e 15 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. A seta aponta para uma banda resultante do acúmulo de fragmentos de aproximadamente 500 pb..... 41
- 15 Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR com os iniciadores ERIC: M = Marcador molecular 1 kb (PROMEGA); 1 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 5 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*..... 44
- 16 Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR com os iniciadores REP: M = Marcador molecular 1 kb (PROMEGA); 1 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 5 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*..... 44
- 17 Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR com o iniciador BOX: M = Marcador molecular 1 kb (PROMEGA); 1 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 5 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*..... 45
- 18 Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard dos cinco isolados, obtido pelos iniciadores ERIC, REP e BOX. 45

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão experimental e "eletrônica" do genoma de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07 com a enzima de restrição <i>Xba</i> I,.....	31
2 Número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão experimental e "eletrônica" do genoma de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTC B07 com a enzima de restrição <i>Spe</i> I	32

LISTA DE QUADROS

	Página
1	Fragmentos gerados pela hibridização do DNA genômico de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> com a sonda R1/R2 após digestão eletrônica com as enzimas <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV e <i>Pst</i> I. Fragmentos marcados com “X” correspondem àqueles que também foram visualizados na hibridização do DNA genômico com a mesma sonda..... 37
2	Fragmentos gerados pela hibridização do DNA genômico de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> com a sonda R3/R4 após digestão eletrônica com as enzimas <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV e <i>Pst</i> I. Fragmentos marcados com “X” correspondem àqueles que também foram visualizados na hibridização do DNA genômico com a mesma sonda..... 39
3	Fragmentos gerados pela hibridização do DNA genômico de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> com a sonda R5/R6 após digestão eletrônica com as enzimas <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV e <i>Pst</i> I. Fragmentos marcados com “X” correspondem àqueles que também foram visualizados na hibridização do DNA genômico com a mesma sonda..... 41

ANÁLISE ESTRUTURAL E COMPARATIVA DO GENOMA DE
Leifsonia xyli* subsp. *xyli

Autor: PAULO ROBERTO GAGLIARDI

Orientador: Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

RESUMO

Leifsonia xyli subsp. *xyli* (Davis et al.; 1984; Evtushenko et al.; 2000) é agente causal de uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar: o raquitismo-da-soqueira (Gillaspie Jr. & Davis, 1992; Davis et al.; 1994). O presente trabalho teve como objetivo principal usar métodos de análise cromossômica para corroborar o mapa genômico da estirpe CTC B07 de *L. xyli* subsp. *xyli* obtido através do seqüenciamento por “shotgun”, realizado pelo grupo de seqüenciamento de Genomas Agrônômicos e do Meio-ambiente (AEG) da rede ONSA-FAPESP. A identidade do isolado foi confirmada com a amplificação e seqüenciamento da região 23S do rRNA bem como por meio de testes sorológicos de microaglutinação com antissoro específico. Além destes, foram realizados testes de microscopia eletrônica de varredura da bactéria cultivada em meio líquido para confirmar a pureza do isolado. O tamanho do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* foi estimado com base na análise de fragmentos de restrição gerados por digestões com as enzimas de restrição *Xba*I e *Spe*I e eletroforese de campo pulsado (PFGE). As estimativas de 2.540 kb e 2.530 kb com *Xba*I e *Spe*I respectivamente ficaram próximas

ao valor obtido pelo sequenciamento genômico (2.596.959 pb). Em adição, o número de seqüências repetidas e de genes ribossomais identificados pelo projeto genoma foram confirmados por meio de hibridizações com sondas apropriadas. Comparações genômicas de *L. xyli* subsp. *xyli*, *L. xyli* subsp. *cynodontis* e duas espécies de *Clavibacter* também foram objetivos deste trabalho. As comparações foram baseadas em análise de RFLPs após a hibridização do DNA genômico utilizando como sondas elementos genéticos móveis presentes no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*. As estimativas dos números estimado de cópias destes elementos no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* obtidas por hibridizações concordam com aquelas obtidas pelo sequenciamento, considerando fragmentos RFLPs menores que 9 kb. Informações referentes à fragmentos maiores não foram obtidas uma vez que estes não foram adequadamente resolvidos na corrida eletroforética. Finalmente, comparações através de análise de RFLP e rep-PCR mostraram diferenças entre *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* bem como entre estas e espécies de *Clavibacter*. Não foram verificadas diferenças entre a estirpe CTC B07 de *L. xyli* subsp. *xyli* e a estirpe australiana.

STRUCTURAL AND COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GENOME OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Author: PAULO ROBERTO GAGLIARDI

Adviser: Prof. Dr. LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO

SUMMARY

Leifsonia xyli subsp. *xyli* (Davis et al.; 1984; Evtushenko et al.; 2000) is the causal agent of one of the most economically important disease of sugarcane worldwide, i.e, ratoon stunting disease (Gillaspie Jr. & Davis, 1992; Davis et al.; 1994). The main objective of this study was to confirm the assembly of the genome of *L. xyli* subsp. *xyli* obtained after shotgun sequencing by the Agronomic and Enviromental Genomes group of the ONSA/FAPESP network. The identity of the strain was confirmed by amplification and sequencing of the 23S rRNA region as well as by microagglutination serological tests with specific antiserum. Besides this, scanning electron microscopic analysis was used to assess the purity of the strain culture. The size of the genome of *L. xyli* subsp. *xyli* was estimated based on restriction analysis after digestion of genomic DNA with *SpeI* and *XbaI* followed by pulsed-field gel electrophoresis. The estimates of 2,530 kb and 2,540 kb, respectively for *SpeI* and *XbaI*, are in agreement with the one obtained by whole genome sequencing (2,596 kb). In addition, the number of repeated sequences and ribossomal genes predicted by thesequencing project was confirmed by

hybridization experiments with the appropriate probes. Genomic comparisons of *L. xyli* subsp. *xyli*, *L. xyli* subsp. *cynodontis* and two *Clavibacter* species comprised a second objective of this study. Comparisons were based on RFLP analysis after hybridization of digested genomic DNA using mobile genetic elements present in the genome of *L. xyli* subsp. *xyli* as probes. The estimates of number of copies of these elements in the genome of *L. xyli* subsp. *xyli* obtained by this approach agreed with the ones obtained by sequencing if RFLP fragments smaller than 9 kb are considered. Data from larger fragments were not obtained since they were not adequately resolved by electrophoresis. Finally, RFLP and rep-PCR comparisons unveiled differences between *L. xyli* subsp. *xyli* and *L. xyli* subsp. *cynodontis* as well as between these and *Clavibacter*. No differences were found between strain CTC B07 of *L. xyli* subsp. *xyli* and an Australian strain.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar está entre os produtos de origem agrícola destinados à alimentação que, ao longo dos séculos, foi alvo de disputas e conquistas, mobilizando homens e nações. Cristóvão Colombo introduziu a cultura na América, em sua segunda viagem ao continente, em 1493, onde hoje é a República Dominicana. Oficialmente, foi Martim Affonso de Souza que, em 1532, trouxe a primeira muda de cana-de-açúcar ao Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente, onde construiu o primeiro engenho de açúcar.

Atualmente, o Brasil lidera a lista dos 80 países produtores. Estima-se, em 2003, que a área plantada atingirá o recorde de 5,16 milhões de hectares, ultrapassando a média de 282 milhões de toneladas obtidas na safra 2001/2002, matéria prima para produção de 19,5 milhões de toneladas de açúcar e 11,4 bilhões de litros de álcool, que atende aos mercados interno e externo (FNP Consultoria & Comércio, 2002). O setor é ainda responsável por cerca de 1 milhão de empregos diretos na área rural e outros 300 mil diretos e indiretos na área industrial. Há 350 unidades industriais, todas privadas, e cerca de 50 mil produtores independentes. No Estado de São Paulo, a cana-de-açúcar se destaca como o primeiro produto agrícola com 176 milhões de toneladas na safra 2001/2002, representando mais de 60% da produção nacional.

A exemplo de diversas outras culturas, a cana-de-açúcar é hospedeira de uma série de patógenos que podem limitar sua produção. Dentre estes, destaca-se a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causadora do raquitismo-da-soqueira (RSD). A doença causa danos à cultura nas principais regiões do mundo onde a agroindústria sucroalcooleira está presente (Gillaspie Jr. & Davis, 1992; Davis et al,

1994). No Estado de São Paulo, segundo Giglioti (1998), o raquistismo-da-soqueira acarretou uma perda estimada de mais de 2 bilhões de dólares nos últimos 30 anos.

A espécie *Leifsonia xyli* compreende duas subespécies: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*. *L. xyli* subsp. *xyli*, além de causar o raquitismo-da-soqueira, também causa doença semelhante quando infecta gramíneas do gênero *Cynodon*, ao passo que *L. xyli* subsp. *cynodontis*, embora patogênica a *Cynodon*, é capaz de colonizar o xilema de cana-de-açúcar sem, no entanto, causar doença (Davis et al.; 1980). Apesar desta diferença, *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* são altamente relacionadas do ponto de vista filogenético (Davis et al., 1984; Lee et al., 1997; Evtushenko et al., 2000).

A identidade do isolado de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* CTC B07 foi confirmada utilizando testes sorológicos de microaglutinação com antissoro específico, além de análise de microscopia eletrônica de varredura e reação de polimerase em cadeia (PCR) com iniciadores específicos à região 23S do rRNA desta bactéria.

Com vistas a corroborar os resultados do projeto de seqüenciamento genômico da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, realizado pelo Grupo de Seqüenciamento de Genomas Agronômicos e do Meio-Ambiente (AEG) da rede ONSA-FAPESP, o presente estudo visou também confrontar o mapa físico gerado pela “digestão eletrônica” da seqüência genômica obtido pelo projeto com aquele gerado pela digestão enzimática do DNA genômico de *L. xyli* subsp. *xyli* com as enzimas de restrição *XbaI* e *SpeI*. Com o mesmo objetivo, o estudo visou confirmar o número de seqüências repetidas de genes ribossomais, por meio de digestões enzimáticas do DNA genômico de *L. xyli* subsp. *xyli* e hibridizações com sondas apropriadas. Finalmente, este estudo também permitiu estabelecer comparações entre o genoma da estirpe CTC B07 de *L. xyli* subsp. *xyli* e de outros isolados, tanto de *L. xyli* subsp. *xyli* como de *L. xyli* subsp. *cynodontis* e espécies de *Clavibacter*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Raquitismo-da-soqueira

2.1.1 História e distribuição

O raquitismo-da-soqueira (RSD) é uma das mais importantes doenças da cana-de-açúcar e é causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Davis et al., 1980). Primeiramente descrito em Queensland na Austrália, em 1944, o RSD foi notado quando, durante uma primavera bastante seca, algumas plantas da variedade Q28 exibiram um retardamento anormal e descoloração vascular (James, 1996). Por muitos anos, acreditou-se que a doença estava associada a um vírus, devido à dificuldade em conseguir cultivar o agente causal (Matsuoka, 1972; James, 1996). O uso de hospedeiro indicador foi um método seguro de identificação da doença, até quando o agente causal foi descrito em 1984, como sendo *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Davis et al.; 1984), hoje denominada *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Evtushenko et al., 2000). Diagnósticos da doença atualmente são baseados na detecção da bactéria por inúmeras técnicas diferentes, incluindo a microscopia de contraste de fase (Steindl, 1976), sorologia (Gillaspie, 1978) e mais recentemente, PCR (Pan et al., 1998).

Em 1989, a doença já havia sido relatada em 61 países (Tokeshi, 1997). Hoje, é encontrada na maioria das áreas cultivadas com cana-de-açúcar, podendo causar perdas acima de 50% em variedades suscetíveis e não tolerantes, conforme relatos de Gillaspie & Teakle (1989). Adicionalmente, os mesmos autores relataram que incrementos na incidência podem contribuir para o declínio sucessivo durante o cultivo no campo. As perdas na agroindústria devido à doença têm sido provavelmente bem acima daquelas causadas por outras doenças nos últimos quarenta anos (James, 1996). Dean & Davis

(1989) estimaram perdas anuais variando de 5 a 15% em plantios na Flórida (EUA), o que representou cerca de U\$ 36.8 milhões na safra 1988-89. Na Austrália, a doença é responsável por perdas anuais de U\$ 11 milhões no setor agroindustrial (Fegan et al., 1998). As perdas no Brasil provavelmente são ainda maiores, onde aproximadamente cinco milhões de hectares são cultivados com cana-de-açúcar (FNP Consultoria & Comércio, 2002). No Estado de São Paulo, o RSD acarretou uma perda estimada de mais de U\$ 2 bilhões nos últimos 30 anos (Giglioti, 1998). O agente causal do RSD encontra-se distribuído por todas as regiões canavieiras do país, atacando diferentes genótipos da planta, sob as mais diversas condições ambientais.

2.1.2 Etiologia do agente causal do raquitismo-da-soqueira

Leifsonia xyli subsp. *xyli* (Davis et al., 1984; Evtushenko et al., 2000) é uma bactéria gram-positiva, fastidiosa, corineforme, não móvel, aeróbia obrigatória e restrita ao xilema das plantas. Suas células são geralmente baciliformes e medem de 0,25-0,5 µm por 1-4 µm, com forma reta ou levemente curva e, ocasionalmente, inchada na ponta ou no meio (Teakle et al., 1979). As colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm em meio de cultura SC (Davis et al.; 1984). A exemplo de outros membros deste gênero, a bactéria não forma esporos e é caracterizada pela presença de ácido 2,4 diaminobutírico (L-DAB e D-DAB em igual proporção) em sua parede celular e predominância de metaquinonas com 9 a 10 cadeias de carbono e fosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol como principais fosfolipídios (Davis et al., 1984; Davis, 1986; Young et al., 1992, Evtushenko et al., 2000). Os mesmos autores descrevem também, a ausência de ácidos micólicos na parede celular, fato que foi confirmado pelo sequenciamento devido a ausência de genes *cmaA / B, C e D*, presentes em micobactérias, como relatado por Cole et al.(2001).

O conteúdo de G+C de *L. xyli* subsp. *xyli* é 66-73 mol % (Evtushenko et al., 2000; Monteiro-Vitorello, comunicação pessoal). O extrato de ácidos graxos totais possui de 17 a 24, de 5 a 14 e de 62 a 72% dos ácidos 15:0 anteiso, 16:0 iso e 17:0 anteiso, respectivamente (Gillaspie Jr. & Davis, 1992). Trabalhos publicados por Davis e colaboradores relataram que não foram identificadas variações em patogenicidade e

virulência entre isolados de *L. xyli* subsp. *xyli*, sendo os isolados de diferentes regiões do mundo muito similares quando comparados quanto à morfologia, sorologia e bioquímica (Davis et al., 1980; Davis et al., 1984).

2.1.3 Sintomas

Os sintomas mais comuns são crescimento irregular, subdesenvolvimento e encurtamento dos colmos de plantas de cana-de-açúcar. Algumas variedades, porém, podem exibir alto nível de infecção sem, no entanto, apresentar sintomas externos. Isso ocorre em função da influência do ambiente na expressão da doença, sendo mascarados pela disponibilidade de água para a planta (Gillaspie Jr. & Teakle, 1989; Gillaspie Jr. & Davis, 1992; Tokeshi, 1997). Genótipos suscetíveis podem apresentar crescimento retardado e, em condições extremas, aspecto de murcha, necrose nas pontas e bordas das folhas, seguida de morte da planta (Steindl, 1961; Tokeshi, 1997). Os sintomas externos são evidenciados por outros fatores, como ano agrícola com pluviosidade desfavorável e/ou práticas culturais inadequadas, que determinam à planta uma condição de estresse, tais como a presença de plantas invasoras, compactação do solo, acúmulo ou falta de adubos, corretivos e herbicidas e ocorrência de outras doenças (Giglioti, 1997).

Sintomas internos são caracterizados pela presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas, decorrentes da deposição de gomas ou formação de tiloses nos feixes do xilema e pela coloração rosa nos tecidos meristemáticos de plantas jovens, localizados na região inferior do nó (Steindl, 1961). Contudo, os sintomas internos são difíceis de serem visualizados após o envelhecimento da planta, devido ao escurecimento e seca dos tecidos (Gillaspie Jr. & Davis, 1992). Além disso, estes sintomas não são específicos do RSD, ocorrendo também em função de ataques de outros patógenos, como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *X. campestris* pv. *vasculorum* e *Erwinia herbicola* (Ricaud, 1974; Tokeshi, 1980).

2.1.4 Transmissão

L. xyli subsp. *xyli* é transmitida por estacas ou colmos-sementes provenientes de plantas doentes. Este mecanismo de disseminação tem sido de extrema importância,

pois havendo cultivo com material infectado, a doença será facilmente disseminada. Uma vez que os sintomas não são muito evidentes, a disseminação do RSD através do plantio de material infectado é facilitada. Além disso, plantas saudáveis são facilmente infectadas com o patógeno por inoculação mecânica com extratos de canas doentes. A transmissão ocorre quando facões cortam plantas saudáveis depois de terem cortado plantas doentes. Da mesma forma, colheitadeiras e plantadoras de cana-de-açúcar também são responsáveis pela transmissão da bactéria (Gillaspie & Teakle, 1989).

James (1996) cita em sua revisão que trabalhos desenvolvidos por Bayley & Tought, em 1992, na África do Sul, indicaram a possível sobrevivência de *L. xyli* subsp. *xyli* no solo. O patógeno aparentemente permanece viável por mais de três meses em restos de cultura. Estes mesmos autores relatam que a bactéria pode sobreviver por longos períodos e, como consequência, pode infectar novos plantios. Desta forma, faz-se necessário um período de pelo menos seis meses entre plantios. Não há relatos de transmissão do patógeno por insetos.

2.1.5 Diagnose

O êxito no cultivo de *L. xyli* subsp. *xyli* em meio de cultivo (Davis et al.; 1980) possibilitou a produção específica de anticorpos úteis para sua detecção. Desde os anos 70, quando a bactéria foi descrita como agente causal da doença, técnicas de microscopia de contraste de fase ou imunofluorescência (James, 1996) têm sido utilizadas para o diagnóstico de material para seleção.

Daquela época até os dias de hoje, técnicas adicionais têm sido utilizadas para a diagnose, tais como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), EB-EIA (evaporative-binding enzyme-linked immunoassay) e PCR (Louws et al., 1995; James, 1996; Louws et al., 1998), esta última utilizando iniciadores específicos derivados da região 16S e 23S do rRNA (Fegan et al., 1998). A técnica de PCR permite a análise não só de DNA puro da bactéria, como também de células de extratos de planta, conteúdo líquido dos vasos condutores e colônias em placa ou meio de cultura líquido (Schneider & deBruijn, 1996).

2.1.6 Métodos de controle

Devido à forma de transmissão, o controle desta importante doença tem sido realizado através de métodos de exclusão, baseados no uso de material sadio para plantio. Facções devem ser desinfestados, especialmente quando usados em campos de propagação de material. A desinfestação pode ser realizada através do calor (chama, vapor ou água quente) ou produtos químicos como amônia quaternária, solução de ácido cresílico e etanol 50% (Steindl, 1961; Teakle, 1983; Gillaspie Jr. & Teakle, 1989).

O tratamento térmico com calor (vapor ou água quente) a 52°C por 30 minutos é também usado em estacas ou colmos-sementes (Sanguino, 1989) para produzir material sadio a ser utilizado no estabelecimento de viveiros livres da doença e de campos comerciais. No entanto, é indispensável associar à termoterapia a prática de “roqing”, que consiste em eliminar plantas doentes (Tokeshi, 1997).

Embora, atualmente, o uso de variedades resistentes seja de importância secundária, segundo Giglioti (1997), a maioria dos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar está envolvida, ou ao menos preocupada, com a execução de atividades de rotina para a identificação de genótipos resistentes ou tolerantes ao RSD.

2.2 *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*

A espécie *Leifsonia xyli* compreende duas subespécies: *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis*. Estas duas subespécies foram recentemente removidas do gênero *Clavibacter* para o novo gênero *Leifsonia*, baseado em dados filogenéticos e similaridade de características quimiotaxonômicas (Evtushenko et al., 2000). *L. xyli* subsp. *xyli*, além de causar o raquitismo-da-soqueira, também causa doença semelhante quando infecta gramíneas do gênero *Cynodon*, ao passo que *L. xyli* subsp. *cynodontis*, embora seja patogênica a *Cynodon*, é capaz de colonizar o xilema de cana-de-açúcar sem, no entanto, causar doença (Davis et al., 1980). Quando inoculada artificialmente, *L. xyli* subsp. *cynodontis* é capaz de colonizar o xilema de muitas outras plantas incluindo milho, arroz e cana-de-açúcar (Haapalainen et al., 2000). Apesar destas diferenças, *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* são altamente relacionadas do ponto de vista

filogenético, considerando-se a região 16S rRNA e a composição química da parede celular (Davis et al., 1984; Lee et al., 1997; Evtushenko et al., 2000).

L. xyli subsp. *cynodontis* é gram-positiva, aeróbia obrigatória, não esporulante, geralmente mede 0,4 por 3-4 µm. As colônias exibem cor amarelada quando cultivadas em meio de cultura SC, podendo ser isoladas de folhas de *Cynodon dactylon* (capim bermuda ou grama-seda) e observadas entre 5 e 7 dias quando incubadas a temperatura de 28°C. A bactéria não forma esporos e é caracterizada pela predominância de metaquinonas MK-11 e MK-12 (Suzuki et al., 1999). *L. xyli* subsp. *cynodontis*, assim como a *L. xyli* subsp. *xyli*, também possui alto conteúdo de G+C (69 mol%) em seu genoma e uma única cópia na região 16S rRNA que é 89,9% idêntica às espécies do gênero *Streptomyces* (Davis et al., 1980; Sathyamoorthy et al., 1991).

2.3 O Projeto Genoma *L. xyli* subsp. *xyli*

O Projeto Genoma *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é parte integrante de um projeto interacadêmico denominado “Agronomical and Environmental Genomes”, cuja finalidade é o de seqüenciar todo o genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* e compará-lo às seqüências publicadas de outros organismos, na tentativa de identificar genes. Esta identificação preliminar dá-se através da comparação das seqüências de genes putativos com seqüências já conhecidas de genes existentes em bancos de dados. O projeto de seqüenciamento do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* fornecerá informações filogenéticas deste tão pouco estudado microorganismo, que servirão de ponto de partida para inúmeras linhas de pesquisa. Por exemplo, permitirá identificar genes putativos que controlam agressividade ou patogenicidade. Resultado preliminar do Projeto Genoma revelou a presença de 2.596.959 pares de nucleotídeos sendo 67% composto por G+C, além de uma gama de transposons e genes com alta identidade com organismos pouco relacionados a esta bactéria.

2.4 Mapas físicos gerados por PFGE

Nas últimas décadas, grandes avanços foram conseguidos no estudo de genomas bacterianos com a utilização de várias combinações experimentais, tornando

possível a construção detalhada de mapas físicos e genéticos com auxílio de eletroforese de campo pulsado (Cole & Saint Giron, 1992; Fonstein & Haselkorn, 1995).

A estratégia da utilização de mapas físicos tem sido desenvolvida para verificar e acelerar a montagem de projetos de seqüenciamento (Weinel et al., 2001), uma vez que a montagem de genomas com base em informação de seqüências nucleotídicas *per se* é suscetível a falhas. Assim, mapas físicos podem ser utilizados para confirmar a correta montagem das seqüências, comparando-se o mapa de restrição gerado por PFGE com um mapa de restrição “eletrônico” da seqüência final do genoma sob estudo, a exemplo do que foi feito no projeto genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Silva et al., 2002). Além disso, estes mapas permitem comparações estruturais amplas entre genomas, indicando a presença ou ausência de rearranjos cromossômicos (Correia et al., 1994; Sullivan & Ronson, 1998).

Um mapa físico pode ser obtido pela clivagem da molécula de DNA em pontos definidos. Estas clivagens específicas são possíveis devido à capacidade que as enzimas de restrição têm de reconhecer seqüências definidas bastante curtas de DNA de fita dupla como sítios de clivagem (Lewin, 2000). No final dos anos 80, foram publicados, com o uso dessa técnica, mapas físicos de *Clostridium perfringens* (Canard et al., 1992), *Pseudomonas aeruginosa* (Fonstein & Haselkorn, 1995) e duas espécies do gênero *Haemophilus*: *H. influenzae* estirpe Rd (Lee et al., 1989; Kauc et al., 1989) e *H. parainfluenzae* (Kauc & Goodgal, 1989). Correia et al. (1994) relataram o tamanho estimado do cromossomo de *Brevibacterium lactofermentum*, *B. linens* e *Corynebacterium glutamicum* utilizando enzimas de restrição *Swa* I e *Pac* I. O genoma de *Rhizobium galegae* foi estimado em 5.852 Kb (+/- 198 Kb) utilizando enzima de restrição *Spe*I separada por PFGE (Huber & Selenskapobell, 1994). Através do uso desta técnica, pôde-se estimar o tamanho de *C. glutamicum* e sua espécie mais próxima *B. lactofermentum* em 2960 e 3060 Kb, respectivamente, que aparentemente tinham genomas de iguais tamanhos. A utilização de PFGE permitiu a construção do mapa físico de *Mycobacterium tuberculosis* (Philipp et al., 1996) e a análise do genoma de *Xyllela fastidiosa* (Frohme, et al., 2000). O tamanho do genoma circular de *Clostridium sacchaobutylicum* NPC 262 foi estimado em 5,3 Mb com uma média de resolução

aproximada em 140 kb a partir de fragmentos gerados por enzimas de restrição, separados por PFGE (Keis et al., 2001).

2.5 Digestão eletrônica e *Southern* eletrônico

Digestão e *Southern* eletrônicos são ferramentas da bioinformática que foram desenvolvidas para sistema operacional Red Hat Linux 6.2 (Adriano Gheller Bruschi, comunicação pessoal) que simulam a digestão enzimática de uma dada seqüência por enzimas de restrição. As seqüências das enzimas são digitadas num campo específico e o programa se encarrega de localizá-las na seqüência, simulando uma digestão enzimática. Seqüências de sondas também podem ser adicionadas e “hibridizadas” aos fragmentos de seqüências resultantes da digestão. Se a montagem da seqüência estiver correta, os resultados de *Southern* eletrônico devem coincidir com os resultados experimentais *in vitro*. O programa está disponível no site <http://lgm.esalq.usp.br/serviços>.

2.6 Elementos Genéticos Móveis (IS e *transposons*)

Elementos de Transposição ou *Transposons* constituem-se num conjunto de segmentos lineares de DNA, capazes de mudar de posição dentro do genoma de bactérias, fungos, plantas e animais, independentemente de homologia entre região genômica onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam (Regner, 1996). Estes elementos genéticos móveis, na maioria das vezes, são dotados de algumas características comuns que lhes são peculiares e que permitem diagnosticá-los: 1) possuem seqüências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades (chamadas de repetições terminais); 2) carregam genes que codificam enzimas capazes de transportá-los; 3) criam, ao se inserir no DNA (como fruto do seu mecanismo de transposição), pequenas duplicações no sítio alvo da inserção, chamadas repetições diretas do DNA alvo; e 4) existem em cópias múltiplas no genoma.

Os *transposons* ainda podem ser divididos em dois grandes grupos: aqueles que se deslocam como seqüências de DNA (comumente conhecidos por *transposons*) e, para tal, codificam uma *transposase* (enzima que catalisa sua inserção em novos sítios);

e aqueles exclusivos de genomas de eucariotos que se movem via RNA e, para tanto, codificam transcriptases reversas (chamados de retrotransposons).

Em bactérias, são conhecidas duas classes principais de elementos móveis: as seqüências de inserção, ou IS (do inglês, *insertion sequences*), e os *transposons* propriamente ditos, ou Tn, distintos com base no tamanho e na quantidade de informações que contêm. As seqüências de inserção constituem-se de seqüências de DNA geralmente pequenas (700 a 2.500 pb) que carregam informações genéticas relacionadas com seus *transposons* e sua regulação. Já foram descritas mais de 500 ISs de 80 bactérias de 160 espécies diferentes (Mahillon & Chandler, 1998; Chen et al., 1999; Schneider, 2002). As ISs são amplamente distribuídas ao longo do genoma de bactérias e suas atividades causam mutações, promovem diversidade genética e algumas vezes adaptações (Schneider et al., 2002). Podem acarretar vários tipos de rearranjos de DNA como transposição, inversão, deleção e co-integração (Chen et al., 1998).

Algumas ISs, no entanto, mediante mutações, demonstram ser benéficas. Estes elementos podem, num balanço, serem vistos como parasitas genômicos ou como agentes que promovem evolução adaptativa (Chao & McBroom, 1985; Cooper et al., 2000). Podem, de certa forma, atuar como importantes agentes de transferência gênica horizontal. Assim, através de análises de seqüências de genomas inteiros, é possível comparar a distribuição dos elementos IS em diferentes estirpes de uma mesma espécie (Schneider et al., 2002). Trabalhos deste tipo já foram objetos de estudo de Laine et al. (1994) utilizando a IS 1237 encontrada em *L. xyli* subsp. *cynodontis*. Estes pesquisadores encontraram similaridades desta IS com outros elementos móveis entre grupos de bactérias gram-positivas e gram-negativas, evidenciando uma possível transferência horizontal entre estes dois grandes grupos de bactérias.

A comparação do número e distribuição de IS entre bactérias pode ser útil para análises epidemiológicas. Zuerner & Bolin (1997), por exemplo, estudaram a variabilidade genética de serovares de *Leptospira interrogans* através de hibridizações com IS em ensaios utilizando hibridizações e a técnica de *Southern blot*. O trabalho utilizou sondas de uma seqüência de inserção denominada IS 1500, desta forma diferenciando serovares pela presença, número e distribuição destes elementos no

genoma. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Devalckenaere et al., (1999) que caracterizaram duas espécies de bactérias do gênero *Yersinia* (*Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*), a partir do uso de uma sequência de inserção denominada IS 1541, naquela época descoberta em *Yersinia pestis*.

Talch et al. (1998) utilizaram o transposon Tn 5564 de *Corynebacterium striatum* em estudos da análise genética do Rplasmídeo pTP10, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. O gene de resistência a este antibiótico foi localizado no mapa físico deste plasmídeo e, subsequentemente, clonado em vetores para sua utilização. A técnica de *Southern blot* foi utilizada com hibridizações ao DNA de *C. glutamicum* mutante digerido com a enzima de restrição *Nco* I. Os resultados indicaram uma estrutura molecular pouco comum que muito provavelmente derivou da transposição da IS 1513 em uma suposta transposase de um elemento ancestral. Muitos dos genes de resistência a antibióticos de *C. striatum* caracterizados foram localizados em elementos móveis. Os transposons, desta forma, também são importantes ferramentas para análises genéticas e manipulação de genomas bacterianos, podendo ser utilizados para mapear genes em cromossomos e marcar genes de interesse, como por exemplo genes de resistência a antibióticos.

2.6 Rep-PCR

Todos os organismos estudados apresentam famílias de sequências repetitivas em seu genoma, as quais podem ser amplificadas mediante PCR (Versalovic et al., 1991; De Bruijn, 1992; Louws et al., 1994). Sequências repetidas em genomas bacterianos têm sido utilizadas na caracterização e subdivisão de espécies em nível específico (Lows, 1995). Três famílias são utilizadas com frequência: a família REP (“repetitive extragenic palindromic”), com sequências de 35-40 pb (Higgins et al., 1982; Gilson et al., 1984), ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”) com 124-127 pb (Hulton et al., 1991; Kamoun & Kadu, 1990) e a mais recente denominada elemento BOX (“box element”), com aproximadamente 154 pb (Martin et al., 1992; Koeuth et al., 1995). A amplificação dessas sequências por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) permite uma rápida avaliação da variabilidade genética em

populações (Louws et al., 1994). Comparações dos perfis eletroforéticos obtidos pela amplificação do DNA com estes iniciadores, fizeram dessa técnica uma importante ferramenta no estudo de populações devido a sua simplicidade e potencialidade na análise de um grande número de amostras a partir de uma pequena quantidade de DNA (de Bruijn, 1992; Louws et al., 1994; Opgenorth et al., 1996; Pooler et al., 1996).

Isolados de *L. xyli* subsp. *xyli* de diferentes regiões e variedades mostram poucas variações morfológicas, fisiológicas ou patogênicas. De acordo com Saroop et al. (1997), análises de DNA têm sugerido apenas variabilidade genética intraespecífica para *L. xyli* subsp. *xyli*. A análise de 14 isolados exibiu um único padrão de bandas de RAPD para cada um deles (Pillay et al., 1998). A complexidade do padrão de bandas variou com os diferentes iniciadores, com todos eles produzindo múltiplas bandas. Este tipo de estudo foi realizado para outras espécies e subespécies do gênero *Clavibacter* (gênero que englobava o patógeno do RSD), utilizando-se como ferramenta tanto RAPD (Patrik & Rainey, 1999) como rep-PCR (Louws et al., 1998). Os padrões de fragmentos de DNA gerados pela técnica rep-PCR permitiram a identificação de pelo menos quatro tipos (A, B, C e D) de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, com base no polimorfismo observado. A técnica rep-PCR utilizada em análises genômicas de diferentes gêneros de bactérias permitiu uma rápida identificação de bactérias associadas a doenças de plantas, incluindo as fitobactérias gram-negativas, tais como: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (Egel et al., 1991; Jones & Stal, 1998; Little et al., 1998; Jaunet & Wang, 1999; Bouzar et al., 1999), e as gram-positivas, principalmente do gênero *Clavibacter*, tais como: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* e *C. michiganensis* subsp. *insidiosum* (Louws et al., 1995; Louws et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção do isolado de *L. xyli* subsp. *xyli*

Foi utilizada a estirpe CTC B07 de *L. xyli* subsp. *xyli* fornecida pela Copersucar que é rotineiramente utilizada em testes de patogenicidade. Esta estirpe é a mesma utilizada pelo projeto genoma e foi depositada na coleção do banco de bactérias do Instituto Biológico sob o número IBSBF 1853. A bactéria foi cultivada por 10 dias em meio de cultura *MSCnew* descrito por Davis et al. (1984). Para o preparo de um litro do meio de cultura sólido, foram utilizados 17 g de ágar de milho - Difco, 4,0 g de ágar bacteriológico, 8,0 g de peptona de soja (Biobrás), 30 mL de solução 0,1% de hemina bovina - Sigma Tipo I em NaOH 0,05 N, MgSO₄.7H₂O 0,01 M, 13 mL de K₂HPO₄ (0,1M), 87 mL de KH₂PO₄ (0,1 M) e 800 mL de água destilada deionizada. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH e a mistura foi autoclavada. Depois que o conteúdo autoclavado atingiu a temperatura próxima de 50 °C, foram adicionados 100 mL de uma solução contendo 5,0 g de glucose, 0,5 g de cisteína – Sigma e 2,0 g de albumina bovina Sigma - fração V; esterilizada em filtro 0,2 µm. As colônias foram mantidas em placas de Petri em meio sólido e repicadas em meio líquido, quando necessário, para a extração do DNA genômico.

3.1.2 Obtenção do DNA genômico

Colônias repicadas em meio líquido S8 (*MSCNew* sem ágar de milho e ágar bacteriológico) foram incubadas a 28 °C por cerca de 10 dias, sob agitação (130 rpm), em incubadora refrigerada MA830 com agitador orbital (Marconi, Piracicaba, SP). A extração do DNA genômico foi realizada segundo protocolo descrito por Pospiech &

Neuman (1996), modificado: foram centrifugados 75 mL de meio de cultura e as células foram lavadas por 3 vezes com solução de NaCl 1M e tampão T₁₀E₁₀ (10 mM tris 10 mM EDTA - pH 8,0). As células foram ressuspensas em 12,5 mL de solução SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, tris-base 20 mM - pH 7,5) acrescentado de 1 mg/mL de lisozima e incubadas a 37 °C por 2 horas. 1/10 volume de SDS + 0,5 mg/mL de proteinase K foram adicionados e incubados a 55 °C por mais 2 horas. Após este processo, foram adicionados 1/3 do volume de NaCl 5 M e 1 volume de cloroformio, incubando o conteúdo a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido para um tubo novo e o DNA foi precipitado adicionando 1 volume de isopropanol. Por fim, o DNA foi ressuspensado em 100 µL de tampão TE pH 8,0 adicionado de 0,5 µg/µL de RNase com 1 hora de incubação a 37 °C.

3.2 Confirmação da identidade do isolado de *L. xyli* subsp. *xyli*

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O isolado CTC B07 foi repicado para meio líquido S8 e incubado a 28 °C por 10 dias sob agitação a 130 rpm. Uma lamínula de microscópio óptico comum foi coberta com uma película de acetato de poliestireno onde foi aplicada uma pequena alíquota (aproximadamente 5 µL) da suspensão de bactérias. O mesmo procedimento foi realizado usando fluido de xilema, extraído por centrifugação de colmos de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1078, que apresentavam sintomas internos de RSD. A análise microscópica da bactéria presente em fluido do xilema foi realizada com o objetivo de verificar diferenças morfológicas entre a bactéria cultivada e a não cultivada. O material vegetal proveniente destes colmos, tais como as regiões do nó e entrenó, foi analisado com o propósito de avaliar possíveis degradações dos vasos do xilema, ocasionadas pela colonização bacteriana.

O material vegetal e as películas foram colocados por 1 hora em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001 M). Em seguida, foram lavados com tampão cacodilato 0,05 M (3 vezes por 10 minutos) e imersos em uma solução de tetróxido de

ósmio 1% (1 parte da solução estoque a 2% e 1 parte de tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2). Esse procedimento foi realizado em capela, onde as amostras ficaram no fixador por 1 hora a temperatura ambiente. Após a fixação na solução de ósmio, as amostras foram lavadas com água destilada e, em seguida, imersas em soluções de concentrações crescentes de álcool (10, 50, 70, 90 e 100%) para as amostras de bactérias, e acetona, nas mesmas proporções e por 10 minutos, no caso das amostras de material vegetal. As amostras foram secas ao ponto crítico para eliminar o álcool/acetona. O material vegetal foi criofraturado utilizando nitrogênio líquido. Tal processo é utilizado com o objetivo de não danificar o material, o que geralmente ocorre quando se utilizam lâminas ou bisturis. Após estes procedimentos, as amostras foram metalizadas com ouro (MED 010 BALZERS) e visualizadas em microscópio de varredura (ZEISS DSM 940 A).

3.2.2 Sorologia de microaglutinação

Testes sorológicos de microaglutinação com antissoro específico para *L. xyli* subsp. *xyli* são comumente utilizados para determinar a presença desta bactéria em fluidos xilemáticos, extratos de plantas ou suspensões de células. A técnica é baseada no método sorológico de “dot-blot enzyme immunoassay” (Harrison & Davis, 1990). O antissoro específico utilizado foi fornecido pelo Censa/Havana/Cuba (Centro Nacional de Sanidade de Havana) e o teste foi realizado adicionando suspensões de células em contato com o antissoro, em iguais volumes (100 µL), em lâminas de vidro e observados em estereomicroscópio. Um teste controle, utilizando *Xanthomonas albilineans*, uma bactéria gram-negativa que também coloniza vasos do xilema e que causa escaldadura das folhas em cana-de-açúcar, foi utilizado para comparação.

3.2.3 PCR-específico

A confirmação da identidade do isolado utilizando PCR-específico foi realizada através do sequenciamento da região 23S, segundo trabalhos descritos por Pan et al. (1998) modificado: foram adicionados 2 µL de DNA (aproximadamente 100 ng) em microtubos contendo tampão de amplificação (1X), 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM dos iniciadores LX23SF (5'-ACCTCCTTTCTAAGGAGC-3') e LX23SR (5'-

TGAATTGATCGGCTCACC-3'), desenhados a partir da região 23S do RNA ribossômico, e 1 U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, EUA) utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação à 95 °C por 30 segundos, hibridização à 57 °C por 1 minuto e extensão à 72 °C por 1,5 minuto, e um ciclo final de extensão à 72 °C por 3 minutos. Parte do produto amplificado (8-10 µL) foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5X (tris-base 50 mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM - pH 8,5) por 3 horas a 5 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídio (5 µg/mL) e fotografado em fotodocumentador ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV. Os pesos moleculares dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparações com marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

O produto de PCR também foi seqüenciado segundo o protocolo "DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing Kit" da Amersham Pharmacia Biotech. As seqüências foram comparadas às seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al.; 1990) para a confirmação de similaridade com *L. xyli* subsp. *xyli*.

3.3 Estimativa do tamanho do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* utilizando PFGE

3.3.1 Preparo do DNA genômico

O preparo do DNA genômico foi realizado segundo Chang & Chui (1998). Para cada 100 µL de suspensão de células ($6,4 \times 10^8$ UFC) em tris 12 mM pH 7,6 foram adicionados 10 µL de lisozima (10mg/mL). Esta suspensão foi transferida imediatamente a 1 mL de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (1,5% de agarose em tampão TE), incubada a 50 °C em banho-maria e aplicada em moldes para o preparo dos blocos que, em seguida, permaneceram por 10 minutos a 4 °C para a sua total solidificação. Os blocos (células+agarose) foram transferidos para solução de lise (1 mg/mL de lisozima, 0,2%

de deoxyclorato de sódio e 0,5% de laurilsarcosinato de sódio em tampão TE) e incubados à 37 °C por 30 minutos. A solução de lise foi trocada por 1 mL de solução ESP (EDTA 0,25 M pH 9,5; 1% de laurilsarcosinato de sódio e 0,5 mg/mL de proteinase K) e os blocos incubados a 50 °C por mais 30 minutos.

3.3.2 Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição

A digestão do DNA genômico com enzimas de restrição foi realizada cortando os blocos contendo células da bactéria em pequenas secções de 1-2 mm e colocando-os em microtubos de 1,5 mL, onde foram incubados por duas vezes em 1mL de solução PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride 0,1 M) por 15 minutos a temperatura ambiente. As secções foram em seguida lavadas 3 vezes com tampão TE por 15 minutos a temperatura ambiente. O tampão TE foi removido e substituído por 100 µL do tampão 10X, específico de cada enzima, e os blocos incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. O tampão foi trocado por igual volume do mesmo tampão novo, só que desta vez contendo 30 unidades das enzimas *XbaI* e *SpeI*. As digestões ocorreram em banho-maria a 37 °C por 1,5 h.

3.3.3 Separação dos fragmentos cromossômicos através de PFGE

As secções foram acondicionadas em poços em gel de agarose a 1% preparados com tampão TBE 0,5X (tris-base 50 mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 1 mM - pH 8,5). Um aparelho CHEF Dr II Bio-Rad, que apresenta um campo elétrico uniforme e um ângulo de 120° de pulsos alternados, foi utilizado para a separação dos fragmentos de restrição. O gel foi então colocado na cuba contendo TBE 0,5X e o aparelho foi programado para uma corrida total de 30 horas, sendo um regime de pulso de 1 segundo para 12 segundos a 6 V/cm por 10 horas e outro de 1 segundo para 25 segundos a 6V/cm por 20 horas. Marcadores moleculares *Mid Range* II PFG Marker, *Low Range* PFG Marker e *Lambda* Marker (New England BioLabs) foram utilizados nesta etapa do trabalho.

Após este processo, o gel foi corado em brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA)

sob luz UV. Os fragmentos foram comparados àqueles gerados por digestão eletrônica. Esse processo consistiu em localizar os sítios de reconhecimento de cada enzima de restrição estudada na seqüência do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*. Desta forma, foi estimada a quantidade e o peso molecular dos fragmentos gerados e, assim, comparados à digestão experimental.

3.4 Análise de seqüências repetidas através de hibridização

O número e a distribuição das seqüências repetidas no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* foram estimados mediante a hibridização do DNA genômico digerido destas bactérias com sondas marcadas por quimioluminescência (sistema ECL, Amersham Pharmacia) obtidas a partir da amplificação por PCR das ditas seqüências, conforme descrito a seguir.

3.4.1 Escolha e preparo das sondas

Os fragmentos de DNA repetidos no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* foram analisados eletronicamente quanto a sua distribuição. Três tipos de repetições foram escolhidas de acordo com a sua freqüência. Foram sintetizados os pares de iniciadores R1 (5'-GATCAGTCGAGAGATTCG-3') e R2 (5'-GGACTCCTTCGCCAATAC-3'), R3 (5'-GTGTCCCACGTTAACGCT-3') e R4 (5'-GACGAAGTTCGGCAACAT-3') e, R5 (5'-AAACACTGACGGAGAAG-3') e R6 (5'-GGTCAAGATTCAAACAG-3'), desenhados a partir destas repetições. A seqüência amplificada pelos iniciadores R1 e R2 é similar a uma transposase de *C. glutamicum* e a uma transposase de *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*; o par R3 e R4 amplifica um fragmento similar a uma transposase de *Corynebacterium striatum* e uma seqüência de inserção denominada IS1652 descrita em *Streptomyces coelicolor* e, finalmente, a seqüência amplificada por R5 e R6 é similar a uma seqüência de inserção denominada ISTB descrita em *Mycobacterium bovis*. As amplificações foram realizadas em termociclador utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial a 97 °C por 3 minutos; 25 ciclos de desnaturação à 97 °C por 1 minuto, hibridização à 50 °C por 1 minuto e extensão à 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de extensão à 72 °C por 4 minutos. Uma alíquota de 8 µL do produto foi separada por

eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, por 3 horas a 5 V/cm. O gel foi corado em brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador ImageMaster[®] VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV. Outra alíquota do produto amplificado por PCR foi utilizada como sonda preparada conforme os itens 3.3.5 e 3.3.6.

Duas outras sondas, a Lxx1 e Lxx2, utilizadas com o mesmo propósito, foram preparadas a partir de seqüências repetidas do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* que foram utilizadas no projeto de seqüenciamento (plasmídios 1844A08 e 0335F07). Neste caso, os insertos clonados foram amplificados com os iniciadores localizados no vetor e utilizados como sonda. A seqüência Lxx1 corresponde a uma transposase similar ao transposon Tn5564 de *Corynebacterium striatum* e a Lxx2 é similar a IS1237, uma seqüência de inserção primeiramente descrita do genoma de *L. xyli* subsp. *cynodontis*. Colônias de *Escherichia coli* contendo os plasmídios foram transferidas de placas contendo meio CG sólido (CG, ágar-agar e ampicilina) para 3 mL de meio líquido CG + ampicilina e incubadas a 37 °C durante 12 horas em microtubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados, adicionados de 100 µL de GET (20% glicose, EDTA 0,5 M pH 8,0, tris-HCl 1 M pH 7,4) e agitados. Após 20 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de NaOH/SDS (NaOH 0,2 M, 1% SDS) em cada microtubo e, em seguida, misturado delicadamente. Os microtubos foram colocados em gelo onde permaneceram por 10 minutos. Um volume de 150 µL da solução de acetato de potássio 3 M (60 mL de KOAc 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 de água estéril totalizando 100 mL) foi adicionado e misturado delicadamente. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante transferido para um tubo novo. Igual volume de clorofórmio saturado (0,3 mL de acetato de sódio ou de potássio tris 10 mM pH 7,0) foi adicionado, misturado e centrifugado 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado de igual volume de fenol equilibrado (USB, Cleveland, Ohio, EUA). A solução foi centrifugada a 13.000 rpm e novamente o sobrenadante transferido para um tubo novo, desta vez, adicionado de 1 mL de álcool etílico absoluto. O conteúdo foi misturado por inversão várias vezes e resfriado durante 10 minutos em *freezer* (-20 °C). Em seguida, foi centrifugado por 10

minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. O DNA foi ressuspensionado em 100 μ L de água estéril e tratado com 0,5 μ g/mL de RNase a 37 °C por 2 horas.

Para a amplificação dos insertos foram adicionados 2 μ L de DNA (aproximadamente 100 ng) em microtubos contendo tampão de amplificação (1X), 200 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M dos iniciadores M13F (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') e (M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') e 1 U de *Taq* DNA polimerase. A reação foi realizada em termociclador utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 95 °C por 3 minutos; 25 ciclos de desnaturação à 95 °C por 30 segundos, hibridização à 55 °C por 30 segundos com extensão à 74 °C por 1 minuto e um ciclo final de extensão à 74 °C por 10 minutos. Uma alíquota de 8 μ L do produto foi separada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, por 3 horas a 5 V/cm. O gel foi corado em brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador ImageMaster[®] VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV. Outra alíquota do produto amplificado foi novamente sequenciada para confirmar a sua autenticidade. Finalmente, uma outra alíquota de 10 μ L do mesmo produto de PCR foi utilizada como sonda.

3.4.2 Southern Blot

A digestão do DNA genômico foi realizada utilizando 10 μ L de DNA de concentração 50 ng/ μ L adicionados de 6 μ L de água pura estéril, 2 μ L de tampão 10X e 2 μ L (10 U/ μ L) das respectivas enzimas de restrição (*Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV e *Pst*I), totalizando 20 μ L de reação. O conteúdo da reação foi incubado em banho-maria a 37 °C por 24 horas. Todo o produto da reação foi separado em eletroforese convencional, em gel de agarose 0,8% por 12 horas a 50 volts. O gel foi em seguida corado em brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador ImageMaster[®] VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV, colocando-se uma régua graduada ao lado do marcador para posteriormente servir de base na identificação dos pesos moleculares.

O gel foi então tratado com 300 mL de HCl 0,25 M por 10 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M, NaOH

0,5 M) duas vezes por 15 minutos. Por fim, o gel foi tratado em solução de neutralização (NaCl 1,5 M, TRIS-base 0,5 M pH 7,5) também duas vezes por 15 minutos.

O DNA foi transferido a uma membrana de náilon (HybondTM-N+ - Amersham Life Science) por meio de capilaridade, utilizando 4 papéis de filtro previamente umedecidos na solução SSC 5X (NaCl 3 M, Citrato de Sódio 0,3 M pH 7,0), papéis absorventes secos e por fim um peso sobre a pilha de papéis. A transferência deu-se por 12 horas a temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi retirada, os poços onde estavam o DNA foram devidamente marcados e o DNA foi fixado na membrana com a exposição à luz UV em Crosslinker (Amersham Life Science) a 700 nm por 30 segundos (Southern, 1975). Nestes ensaios, DNAs de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* foram incluídos para efeitos comparativos.

3.4.3 Hibridização e revelação

A membrana foi pré-hibridizada em aparelho hibridizador HyRollerTM (Owl Scientific, Woburn, MA, USA) por 4 horas à 42 °C com uma solução de pré-hibridização (NaCl 0,5 M + Gold Buffer-ECL + reagente blocking-ECL 5% p/v). A sonda foi preparada a partir de 10 µL do produto de PCR (100 ng), 10 µL de *Labelling reagent*-ECL e 10 µL de glutaraldeído-ECL de acordo com o protocolo do fabricante (Amersham Biosciences UK Limited). Em seguida, a sonda foi adicionada e hibridizada à 42 °C, por aproximadamente 12 horas.

O processo de detecção foi realizado segundo o protocolo do fabricante do Kit ECLTM *Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences UK Limited) da seguinte forma: a membrana foi lavada com SSC 5X (100 mL) a temperatura ambiente por 5 minutos e depois com solução primária (uréia 6 M, SDS 0,4%, SSC 0,5X), aquecendo antes de usar, (100 mL) à 40 °C por 20 minutos e duas vezes (50 mL) a 40°C por 10 minutos cada. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 100 mL de solução secundária (SSC 2X) a temperatura ambiente por 5 minutos cada. Foram misturados iguais volumes (3 mL + 3 mL) dos reagentes de detecção ECL 1 e 2. O excesso da solução de lavagem foi drenado e, em seguida,

adicionada a solução de detecção (6 mL), que ficou reagindo por 1 minuto. O conteúdo líquido foi novamente drenado e a membrana foi acondicionada em um plástico, selada e colocada num cassete para a exposição a um filme (Lumi-film Chemiluminescent Detection - Roche Diagnostics Corporation) durante 15 minutos. Em seguida, o filme foi retirado do cassete e mergulhado na solução reveladora. O excesso de solução foi retirado mergulhando o filme por alguns minutos em água e, por fim, o filme foi colocado em solução fixadora.

Os padrões de bandeamento dos fragmentos RFLPs de *L. xyli* subsp. *xyli* foram comparados aos fragmentos gerados pela “hibridização eletrônica” das seqüências estudadas com a seqüência genômica de *L. xyli* subsp. *xyli* após sua “digestão eletrônica”.

3.5 Variabilidade genética determinada por rep-PCR

As ampliações com os iniciadores ERIC (ERIC1R [5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC -3'] e ERIC2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']), BOX (BOXA1R [5'-CTACGGCAA-GGCGACGCCTGACG-3']) e REP (REP1R-I [5'-IIICGICGICATCIGGC-3'] e REP2-I [5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3']) foram realizadas adicionando 1 µL de DNA (aproximadamente 50 ng) em microtubos contendo tampão de amplificação (1X), 50 nM dos iniciadores, 1 U de *Taq* DNA polimerase de acordo com as condições descritas por de Bruijn (1992). A concentração final de dNTP foi ajustada a 625 µM (Vera Cruz, 1996). A amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research, EUA) utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial à 95 °C por 7 minutos; 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 minuto, hibridização à 44, 52 e 53 °C por 1 minuto com iniciadores REP, ERIC e BOX, respectivamente, e extensão à 65 °C por 8 minutos com um ciclo final de extensão à 65°C por 15 minutos. O produto amplificado por PCR foi guardado à 4°C e uma porção de 5 a 8 µL do produto foi separada por eletroforese à 4 °C com gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X, por 6 horas à 5 V/cm. O gel foi corado em brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EUA) sob luz UV.

Um dendrograma foi construído utilizando o pacote computacional NTSYS-pc (versão 1,70; Exeter Software, Setaukaat, NY, EUA) para comparar a similaridade entre os isolados estudados. Os dados foram calculados baseados no coeficiente de similaridades de Jaccard, a partir da conversão dos dados de restrição em dados binários (1 para presença e 0 para ausência do fragmento).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Confirmação da identidade do isolado CTC B07

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise por microscopia eletrônica de varredura teve por objetivo confirmar a pureza da estirpe em estudo. A Figura 1 mostra um padrão morfológico homogêneo da bactéria, com células baciliformes, às vezes levemente curvas (corineformes) e ocasionalmente inchadas em uma das pontas ou no meio, indicado pelas setas. O tamanho, entre 0,25 e 0,5 μm de diâmetro por 1-4 μm de comprimento, corrobora com a informação de Teakle et al. (1979) e James (1996).



Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura da bactéria *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07. Setas apontam para o formato corineforme característico da bactéria quando cultivada em meio de cultura

A partir da anotação preliminar do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*, que identificou a presença de um *operon* possivelmente associado à produção de flagelo, os experimentos utilizando microscopia eletrônica de varredura incluíram ainda verificar a presença ou ausência desta estrutura. As observações não evidenciaram a presença de flagelo tanto em células cultivadas (Figura 2) como em células presentes em fluido xilemático (Figura 3), o que também está de acordo com Teakle et al., (1979). Esta observação, portanto, confirma que a não-funcionalidade de alguns genes deste *operon*, apontada pelas análises bioinformáticas do projeto genoma, pode estar relacionada à ausência desta estrutura.

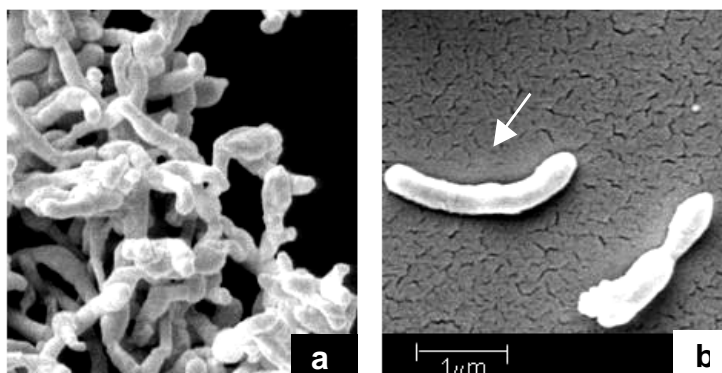


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 em meio de cultura. Em (a), aglomerado de bactérias formando um emaranhado, (aumento de 15.000 X). Em (b), detalhe da célula bacteriana, aumento de 20.000 X. A seta aponta para o formato corineforme característico da bactéria quando cultivada em meio de cultura. Em ambos os casos não se observam flagelos

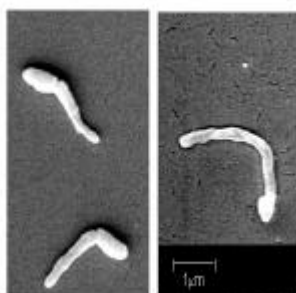


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 presente em fluido do xilema, (aumento de 17.000 X). Nas fotos observa-se a morfologia característica desta bactéria e a ausência de flagelo

Na análise de material vegetal colonizado por *L. xyli* subsp. *xyli*, não foram identificadas extensas degradações dos vasos (Figura 4), indicando que o genoma desta bactéria não deve conter um número significativo de enzimas degradadoras da parede celular.

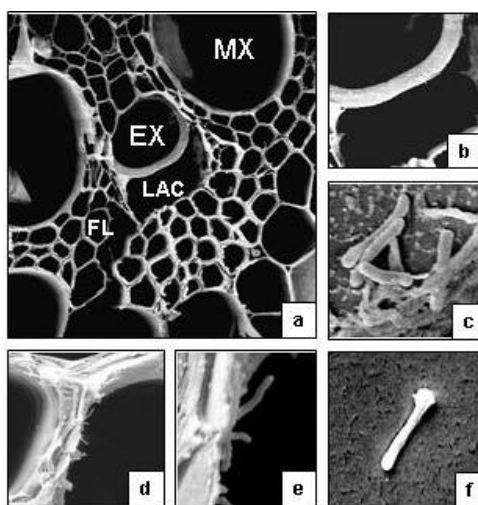


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 presente em vasos do xilema de cana-de-açúcar com sintomas internos e externos de raquitismo-da-soqueira. Em a, corte transversal dos vasos: metaxilema (MX); elemento do xilema (EX), lacuna (LAC) e floema (FL) com aumento de 500 X. Em b, c, d e e, detalhes da bactéria colonizando os vasos, aumentos de 5.000 e 20.000 X. Em f, a bactéria isolada com aumento de 20.000 X

4.1.2 Testes sorológicos de microaglutinação

O resultado do teste sorológico de aglutinação foi positivo para *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07, pois o contato da suspensão de células com o antissoro apresentou reação de aglutinação e agregação das células (dados não apresentados). O teste controle utilizando *Xanthomonas albilineans*, como esperado, foi negativo.

4.1.3 PCR específico

O peso molecular dos fragmentos gerados pela amplificação por PCR do gene ribossomal de *L. xyli* subsp. *xyli* foi igual ao previsto (Figura 5). O sequenciamento do fragmento amplificado apresentou 100% de similaridade com a seqüência de *L. xyli* subsp. *xyli* depositada no banco sob o número GI 4104592 (dados não apresentados), confirmando assim a identidade do isolado. Fluidos do xilema de colmos de cana-de-açúcar com sintomas da doença também foram analisados e os resultados mostraram os mesmos padrões de bandas. A exemplo de trabalhos realizados por Fegan et al. (1998), relativos a detecção desta bactéria em fluidos de xilema de cana-de-açúcar, os iniciadores utilizados neste trabalho, além de terem sido úteis na confirmação da identidade do isolado, também podem ser utilizados para o desenvolvimento de testes diagnósticos do patógeno. Outros trabalhos de diagnose com doença de Fiji, vírus do mosaico da cana-de-açúcar (Smith & Van de Velde, 1994) e *Xanthomonas albilineans* (Honeycutt et al.; 1994) também foram bem sucedidos utilizando a técnica de PCR.

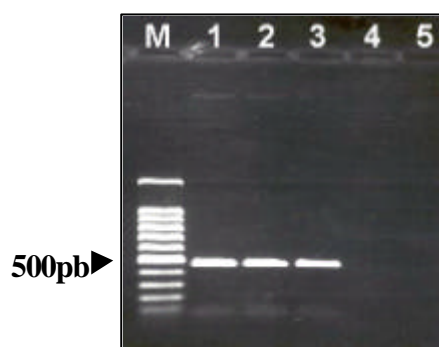


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR específico da região 23S do rRNA. M - marcador molecular de 100 pb (Promega); 1 - *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 2 - *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 3 - PCR usando fluido do xilema de planta sintomática, 4 - controle negativo com *Xanthomonas albilineans*; 5 - controle negativo sem DNA

4.2 Estimativa do tamanho do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* e comparação com a montagem obtida pelo seqüenciamento

Digestões eletrônicas utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *SpeI* resultaram em 32 e 24 cortes, respectivamente. Experimentalmente, estas enzimas geraram fragmentos semelhantes em número e tamanho (Figuras 6 e 7). As Tabelas 1 e 2 mostram a estimativa do número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão do DNA genômico com as enzimas *XbaI* e *SpeI* e pela “digestão eletrônica” da montagem do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*. As letras associadas aos números de alguns fragmentos representam fragmentos que não puderam ser visualizados no gel de eletroforese devido à proximidade dos seus tamanhos. É importante observar que os fragmentos de maior tamanho, gerados por PFGE, correspondem àqueles obtidos pela “digestão eletrônica”. As estimativas do tamanho do genoma utilizando a técnica de eletroforese de campo pulsado com as enzimas de restrição *XbaI* e *SpeI* foram de 2.540 kb e 2.536 kb, respectivamente, ficando bastante próxima do número de nucleotídeos determinado pelo seqüenciamento genômico da bactéria (2.596,959 kb).

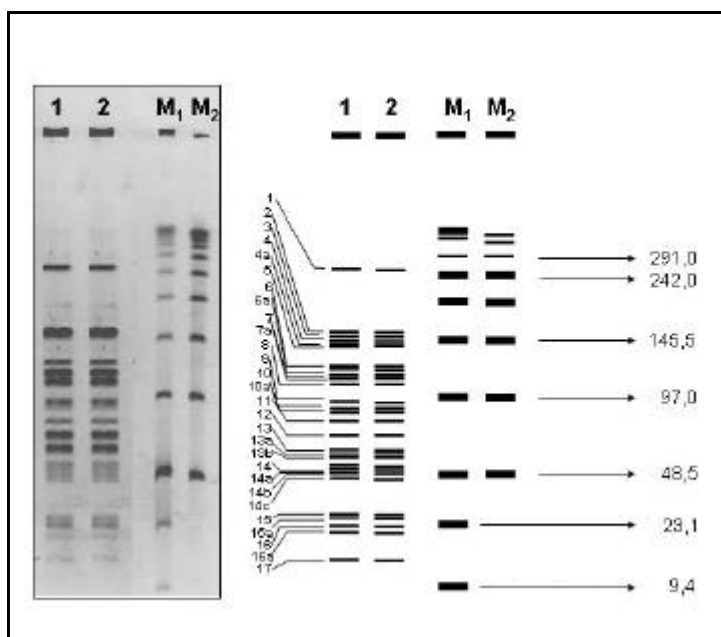


Figura 6 - PFGE de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07: 1 e 2 - digestões com *Xba*I; M₁ e M₂ - Marcadores moleculares *Low Range PFG* e *Lambda*, respectivamente

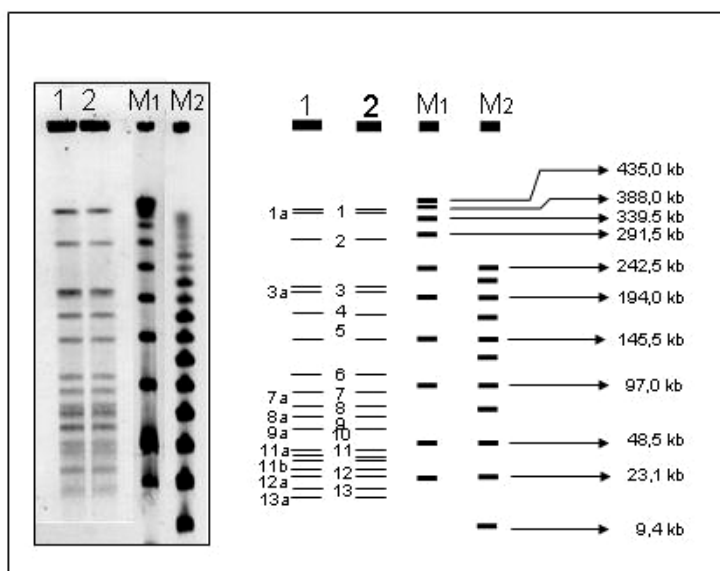


Figura 7 - PFGE de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07: 1 e 2 - digestões com *Spe*I; M₁ e M₂ - Marcadores moleculares *Mid Range PFG II* e *Low Range PFG*, respectivamente

Tabela 1. Número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão experimental e eletrônica do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 com a enzima de restrição *Xba*I

Digestão experimental		Digestão eletrônica	
Fragmento	Peso molecular aproximado (kb)	Fragmento	Peso molecular estimado (kb)
1	265	1	265,025
2	160	2	165,674
3	155	3	157,130
4	150	4	155,705
4a	150	5	155,206
5	130	6	129,535
6	120	7	120,098
6a	120	8	119,683
7	110	9	114,449
7a	110	10	110,101
8	100	11	100,707
9	95	12	96,847
10	85	13	86,298
10a	85	14	80,355
11	80	15	78,604
12	75	16	75,432
13	70	17	71,781
13a	70	18	70,110
13b	70	19	68,429
14	55	20	62,178
14a	55	21	56,690
14b	55	22	54,833
14c	55	23	36,996
15	30	24	33,693
15a	30	25	33,524
16	22	26	32,652
16a	21	27	28,817
17	17	28	19,564
-	-	29	8,729
-	-	30	3,507
-	-	31	2,557
-	-	32	2,050
TOTAL	2.540,0 kb		2.596,959 kb

Tabela 2. Número e tamanho dos fragmentos gerados pela digestão experimental e eletrônica do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 com a enzima de restrição *SpeI*

Digestão experimental		Digestão eletrônica	
Fragmento	Peso molecular aproximado (kb)	Fragmento	Peso molecular estimado (kb)
1	418,0	1	417,691
1a	400,0	2	412,771
2	285,0	3	283,256
3	200,0	4	198,039
3a	195,0	5	191,550
4	170,0	6	167,026
5	140,0	7	137,531
6	100,0	8	100,778
7	85,0	9	87,438
7a	85,0	10	75,991
8	72,0	11	71,808
8a	72,0	12	68,767
9	55,0	13	61,228
9a	55,0	14	58,950
10	42,0	15	48,257
11	38,0	16	43,654
11a	32,0	17	39,409
11b	30,0	18	32,464
12	25,0	19	30,827
12a	20,0	20	21,906
13	18,0	21	18,930
13a	18,0	22	18,548
-	-	23	5,451
-	-	24	4,689
TOTAL	2.536,0 kb		2.596,959 kb

4.3 Análise de seqüências repetidas

4.3.1 Obtenção das sondas

As seqüências dos produtos amplificados com cada par de iniciadores confirmaram a identidade destas (dados não apresentados). As figuras 8 e 9 apresentam o resultado das reações de amplificações com os pares de iniciadores R1/R2, R3/R4 e R5/R6, e com os insertos 0335F07 e 1240C04.

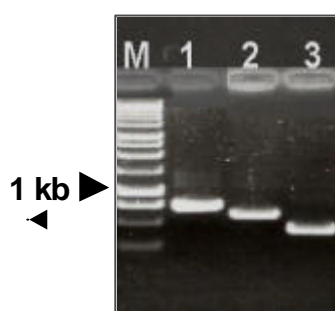


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR utilizados como sondas: 1 - fragmento amplificado com o par de iniciadores R1/R2, 2 - fragmento amplificado com o par de iniciadores R3/R4 e, 3 - fragmento amplificado com o par de iniciadores R5/R6. M - marcador molecular 1kb (PROMEGA)

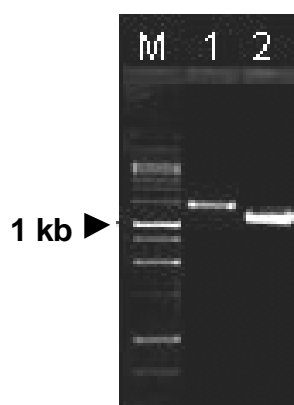


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR dos insertos plasmidiais: 1 - 0335F07 e; 2 - 1240C04, M - marcador molecular 1kb (PROMEGA)

4.3.1.2 Hibridização

As figuras 10, 11 e 12 mostram os resultados das hibridizações do DNA genômico das bactérias *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07, *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano), *L. xyli* subsp. *cynodontis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV e *Pst*I com as sondas R1/R2, R3/R4 e R5/R6, respectivamente.

A sonda R1/R2 apresenta 44% de identidade com uma transposase de *Corynebacterium glutamicum* (Bathe et al.; 1996) e 45% de identidade com a transposase da IS1086 presente em uma cópia no plasmídio pMO128, que confere resistência a metais pesados, e em duas cópias no cromossomo de *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) (Dong et al.; 1992). Estas duas ISs pertencem a família IS30 (Mahillon & Chandler, 1998). Na figura 10 é possível observar pelo menos 10 fragmentos de DNA que hibridizaram com esta seqüência no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* clivado com a enzima *Bam*HI. Estes valores são próximos aos obtidos na hibridização eletrônica da seqüência do genoma, que apresentou 15 fragmentos. A discrepância se deve àqueles fragmentos de alto peso molecular (acima de 10.000 pb) que provavelmente não foram separados pela corrida de eletroforese, mas que também foram hibridizados à sonda. Utilizando as enzimas de restrição *Eco*RI, *Eco*RV e *Pst*I, os números e pesos moleculares dos fragmentos gerados pela hibridização experimental também coincidiram, de modo geral, com aqueles obtidos nas análises eletrônicas (Quadro 1). Os resultados das hibridizações também revelaram que elemento semelhante a este está presente em pelo menos três cópias no genoma de *L. xyli* subsp. *cynodontis*. Nos genomas das bactérias do gênero *Clavibacter*, no entanto, não foram observadas cópias desta seqüência em nenhum dos casos.

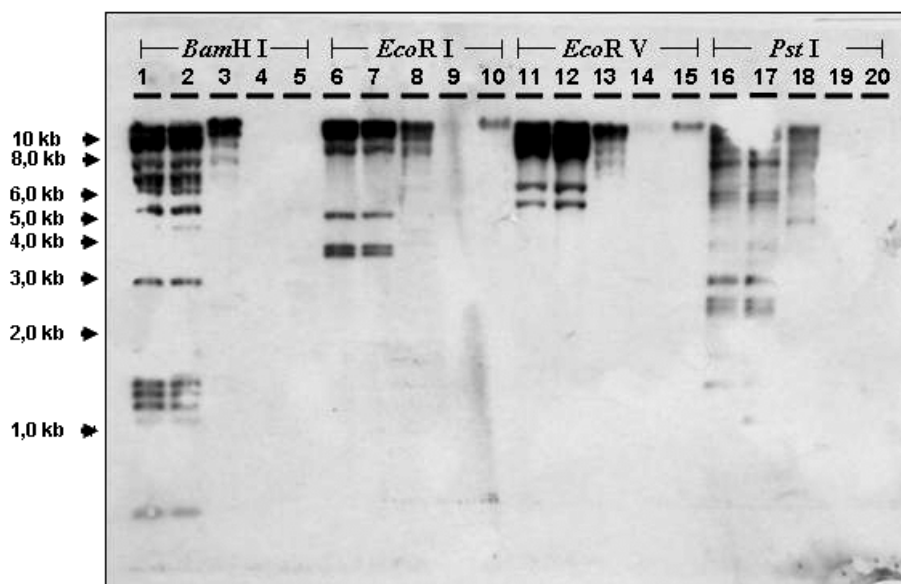


Figura 10 - Auto-radiografia - sonda obtida pela amplificação da seqüência flanqueada pelos iniciadores R1 e R2: 1, 6, 11 e 16 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7, 12 e 17 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3, 8, 13 e 18 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9, 14 e 19 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e 5, 10, 15 e 20 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fragmentos (pb)							
<i>Bam</i> HI		<i>Eco</i> RI		<i>Eco</i> RV		<i>Pst</i> I	
1.235	X	3.391	X	5.048	X	1.220	X
1.360	X	3.562	X	6.038	X	1.261	X
1.454	X	4.521	X	10.442		1.540	X
1.541	X	10.635		10.545		2.410	X
1.614	X	15.582		11.804		2.528	X
1.846	X	17.946		12.014		2.834	X
4.923	X	19.231		13.071		2.901	X
6.103	X	19.974		14.364		2.901	X
6.700	X	22.701		14.403		5.036	X
8.208	X	22.790		16.283		5.333	X
9.586		30.920		16.859		5.749	X
14.477		31.471		18.034		8.472	X
16.614		37.240		20.599		8.773	X
17.651		50.020		31.158		10.125	
24.595		50.889		31.776		10.495	
		51.765		56.528		11.314	

Quadro 1 – Fragmentos gerados pela hibridização do DNA genômico de *L. xyli* subsp. *xyli* com a sonda R1/R2 após digestão eletrônica com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV e *Pst*I. Fragmentos marcados com “X” correspondem àqueles que também foram visualizados na hibridização do DNA genômico com a mesma sonda

A sonda R3/R4 apresenta 56% de identidade a uma transposase presente no transposon Tn5564 de *Corynebacterium striatum* (Tauch et al; 1998) e 40% a IS1652 de *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al; 2002). A hibridização eletrônica realizada com a seqüência do genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* revelou a presença de 30 cópias desta

seqüência. É possível observar na figura 11 pelo menos 8 cópias deste elemento, que correspondem aos fragmentos de baixo peso molecular (<8,4 kb) àqueles obtidos pela hibridização eletrônica (Quadro 2). Nenhuma cópia desta seqüência foi observada nos genomas de *L. xyli* subsp. *cynodontis* e das bactérias do gênero *Clavibacter*. Em *Corynebacterium striatum*, o Tn5432 foi localizado no plasmídeo pTP10 em oito cópias. Esta IS também apresenta um alto grau de identidade a elementos localizados: 1) no plasmídeo que confere resistência a eritromicina de *Corynebacterium diphtheriae*, 2) no cromossomo de *Mycobacterium tuberculosis*, 3) no plasmídeo que confere resistência a cloranfenicol de *Corynebacterium glutamicum*, 4) nos cromossomos de bactérias fitopatogênicas como *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Erwinia*, e 5) no plasmídeo de *Pasteurella piscicida*, bactéria gram-negativa responsável por uma doença em peixes. A análise da seqüência completa do plasmídeo pTP10 apresentou evidências da participação de elementos de transposição na disseminação de resistência a antibióticos (Tauch et al.; 2000).

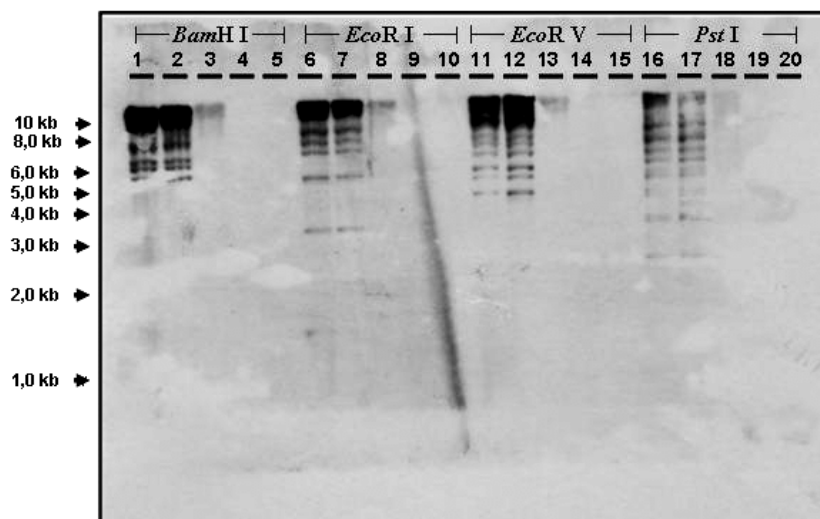


Figura 11 - Auto-radiografia - sonda obtida pela amplificação da seqüência flanqueada pelos iniciadores R3 e R4: 1, 6, 11 e 16 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7, 12 e 17 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3, 8, 13 e 18 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9, 14 e 19 *C. michiganensis* subsp. e 5, 10, 15 e 20 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fragmentos (pb)							
<i>Bam</i> HI		<i>Eco</i> RI		<i>Eco</i> RV		<i>Pst</i> I	
4.785	X	1.351	X	3.759	X	2.161	X
5.364	X	2.856	X	4.344	X	2.891	X
5.860	X	4.539	X	4.740	X	2.982	X
7.330	X	6.095	X	4.777	X	3.446	X
7.836	X	6.993	X	5.641	X	3.688	X
9.253		7.257	X	6.462	X	4.204	X
13.248		8.311	X	7.310		4.938	X
14.394		8.906		9.040		4.988	X
14.752		9.154		9.654		5.412	X
14.844		13.875		10.653		5.615	X
15.499		15.291		10.687		5.749	X
16.003		15.485		10.770		6.025	X
16.158		15.812		11.266		6.447	X
16.531		17.946		13.469		6.555	X
21.852		19.324		14.043		6.670	X
22.601		20.533		15.459		6.929	X
23.986		22.701		16.859		8.105	X
24.595		22.977		18.756		8.449	X
24.615		24.416		18.990		8.461	
24.625		26.329		19.211		8.968	
26.866		27.923		25.161		9.831	
27.221		30.870		26.834		10.313	
27.518		30.920		30.622		11.149	
30.376		35.231		31.158		14.342	
30.684		35.783		32.969		15.694	
30.959		37.875		34.675		17.378	
31.902		40.264		37.010		18.009	
34.107		50.020		37.853		19.295	
40.479		50.889		38.700		21.021	
41.992		51.765		56.528		33.453	

Quadro 2 – Fragmentos gerados pela hibridização virtual do DNA genômico de *L. xyli* subsp. *xyli* com a sonda R3/R4 após digestão eletrônica com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV e *Pst*I. Os fragmentos marcados com “X” correspondem àqueles que também foram visualizados na hibridização do DNA genômico com a mesma sonda

A sonda R5/R6 apresenta 52% de identidade a ISTB de *Mycobacterium bovis* (Lefèvre et al., 1999) e revelou 5 cópias desta seqüência quando hibridizadas ao DNA genômico clivado com as mesmas enzimas de restrição (Figura 12). O tamanho dos fragmentos gerados pela hibridização também coincide com aqueles obtidos nas análises eletrônicas com *Bam*HI que também apresentou 5 cópias (Quadro 3). Nos genomas das bactérias *L. xyli* subsp. *cynodontis* e do gênero *Clavibacter* não foram observadas cópias desta seqüência. Em *M. bovis*, a IS 21, similar a esta representada pela sonda R5/R6, está presente em uma única cópia. Outras ISs localizadas nos genomas de *Mycobacterium tuberculosis* e *M. avium* apresentam 70% e 52% de identidade a IS21, respectivamente, e também estão presentes em uma única cópia nestes genomas. Segundo os mesmos autores. Nenhum elemento como este foi localizado nos genomas de espécies de *Corynebacterium* e de outras espécies de *Mycobacterium* testadas.

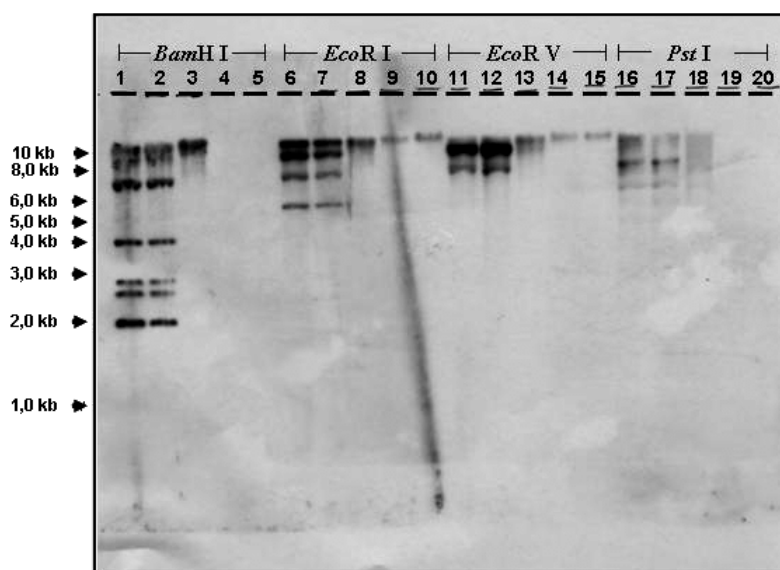


Figura 12 - Auto-radiografia - sonda obtida pela amplificação da seqüência flanqueada pelos iniciadores R5 e R6: 1, 6, 11 e 16 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7, 12 e 17 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3, 8, 13 e 18 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9, 14 e 19 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e, 5, 10, 15 e 20 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fragmentos (pb)							
<i>Bam</i> HI		<i>Eco</i> RI		<i>Eco</i> RV		<i>Pst</i> I	
2.135	X	5.202	X	8.810	X	6.181	X
2.622	X	7.669	X	14.885		8.914	X
2.853	X	13.514		16.283		12.855	
3.861	X	30.870		16.729		15.836	
7.582	X	35.783		18.831		21.021	

Quadro 3 – Fragmentos gerados pela hibridização virtual do DNA genômico de *L. xyli* subsp. *xyli* com a sonda R5/R6 após digestão eletrônica com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV e *Pst*I. Os fragmentos marcados com “X” correspondem àqueles que também foram visualizados na hibridização do DNA genômico com a mesma sonda

De acordo com os resultados e alinhamentos da seqüência Lxx1 com seqüências depositadas no *GenBank*, esta apresenta 67% de identidade com a transposase presente no transposon Tn5564 de *Corynebacterium striatum*. Este transposon está localizado em um plasmídio que confere resistência a cloranfenicol (*cmx*). Além disso, este plasmídio carrega ainda uma segunda transposase similar a presente em *Anthrobacter nicotinovorans* e *Bordetella pertussis*, a IS1513 da família das IS30 (Tauch et al., 1998). A seqüência Lxx1 possui 1120 nucleotídeos e é flanqueada por uma pequena seqüência (27 pb) repetida e invertida. Uma hibridização eletrônica foi realizada com a montagem do genoma e revelou 30 cópias desta seqüência. É possível observar na figura 13 pelo menos 12 dessas cópias, com pesos moleculares que correspondem àqueles obtidos na hibridização eletrônica. Em *L. xyli* subsp. *cynodontis* os fragmentos correspondentes a estas cópias aparecem em menor quantidade, cerca de 10, com distribuição diferente. Além disso, não há ocorrência dessas cópias nos genomas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Estes resultados confirmam mais uma vez a baixa diversidade entre os isolados de *L. xyli* subsp. *xyli* e sua proximidade com *L. xyli* subsp. *cynodontis*. Considerando-se a proximidade entre as duas subespécies, análises des seqüências de

inserção podem ser utilizadas para a diferenciação de *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis*.

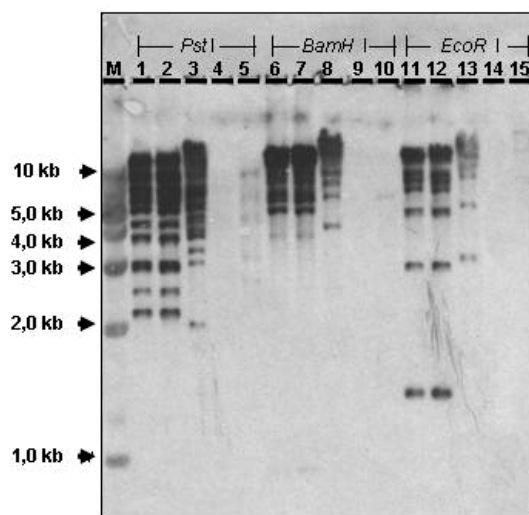


Figura 13 - Auto-radiografia - sonda Lxx1: 1, 6 e 11 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7 e 12 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3, 8 e 13 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9 e 14 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e; 5, 10 e 15 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

A auto-radiografia representada na figura 14 correspondente à hibridização com a sonda Lxx2. Esta seqüência, similar a IS1237 descrita no genoma de *L. xyli* subsp. *cynodontis*, apresenta menor número de cópias no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*. A IS1237 possui 905 nucleotídeos e é flanqueada por uma seqüência de 19 pb repetida e invertida e 3 pb repetida diretamente e está presente em pelo menos 16 cópias no genoma de *L. xyli* subsp. *cynodontis* (Laine et al., 1994).

Nesta análise, foi possível observar pelo menos 15 cópias dos fragmentos hibridizados com esta sonda no genoma de *L. xyli* subsp. *cynodontis*. Estes resultados corroboram aqueles descritos por Laine et al. (1994). Em *L. xyli* subsp. *xyli* este número é menor, próximo de 5, com apenas uma banda intensa, ou seja com hibridização específica. De acordo com o *Southern* “eletrônico” esta seqüência aparece apenas uma vez no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*. Neste caso em particular, quando hibridizada com o mesmo genoma, esta seqüência aparece mais vezes. Isto ocorre porque parte deste

fragmento é 95% idêntico à seqüência de outras IS presentes no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli*. Nos genomas das bactérias *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* estas cópias não ocorrem. É importante observar que tanto no genoma de *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 como no isolado australiano, o padrão de bandas dos fragmentos hibridizados é igual, indicando a baixa ou nenhuma variabilidade genética entre estes dois isolados, tal como em todas as análises anteriores. Na análise da digestão do DNA total com a enzima de restrição *Bam*HI e hibridização com esta mesma sonda, verificou-se a presença de uma banda de aproximadamente 500 pb com marcação intensa diferente das demais (veja a banda com seta apresentado na figura 14). Isso acontece pois, internamente à sonda Lxx2, existem dois sítios de restrição para essa enzima. Neste caso, então, todas as cópias presentes no genoma liberam um fragmento de 500 pb que se acumulam naquela posição do gel. *Bam*HI, portanto, não é uma enzima adequada para análises que pretendem estimar o número de cópias desta IS.

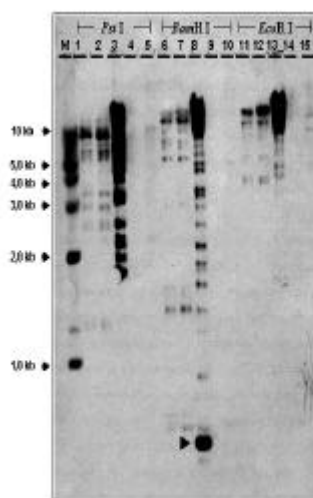


Figura 14 - Auto-radiografia - sonda Lxx2 (seqüência similar a IS1237 de *L. xyli* subsp. *cynodontis*) : 1, 6 e 11 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2, 7 e 12 *L. xyli* subsp. *xyli* australiana; 3, 8 e 13 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4, 9 e 14 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e; 5, 10 e 15 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. A seta aponta para uma banda resultante do acúmulo de fragmentos de aproximadamente 500 pb

4.4 Variabilidade genética determinada por rep-PCR

As comparações dos padrões de bandamento dos fragmentos de DNA genômico amplificados por rep-PCR, estão representados nas Figuras 15, 16 e 17. Nos três casos, é evidente a semelhança dos padrões de bandas entre os isolados brasileiro e australiano. Embora taxonomicamente diferenciada apenas em nível de subespécie, os padrões de bandas de *L. xyli* subsp. *cynodontis* são bastante polimórficos quando comparados com as estirpes de *L. xyli* subsp. *xyli* e as espécies do gênero *Clavibacter*. Estas, por sua vez, diferenciam-se tanto entre si como dos demais isolados.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos publicados por Pillay et al. (1998), que encontraram um único padrão de bandas ao analisarem 14 isolados de *L. xyli* subsp. *xyli*, utilizando a técnica de rep-PCR. A estirpe *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07 não apresentou variabilidade quando comparada ao isolado australiano, confirmando os resultados desses autores e de trabalhos ainda não publicados (S. Brumbley, comunicação pessoal) que indicam a baixa diversidade genética entre isolados de regiões geográficas distintas. A baixa variabilidade de *L. xyli* subsp. *xyli* está em flagrante oposição à alta variabilidade entre espécies do gênero *Clavibacter*, fato já demonstrado por Louws et al. (1994), segundo os quais a técnica de rep-PCR permitiu a identificação de pelo menos quatro tipos (A, B, C e D) de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* com base no polimorfismo.

Na figura 18, o dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, determinado pelos iniciadores ERIC, REP e BOX demonstrou 100% de similaridade entre as duas estirpes de *L. xyli* subsp. *xyli*. *L. xyli* subsp. *cynodontis*, embora altamente relacionada do ponto de vista filogenético (Davis et al.; 1984; Lee et al.; 1997; Evtushenko et al.; 2000), apresentou similaridade próxima a 65% quando comparada a *L. xyli* subsp. *xyli*. As espécies do gênero *Clavibacter*, no entanto, apresentaram-se bem distintas quando comparadas a todas as outras bactérias estudadas, com similaridade abaixo de 25%.

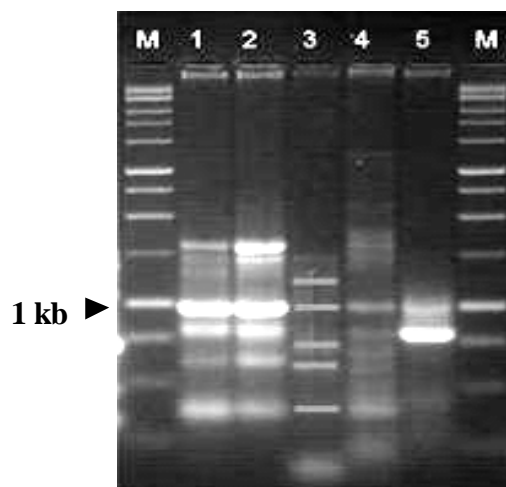


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR com os iniciadores ERIC: M = Marcador molecular 1 kb (PROMEGA); 1 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 5 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

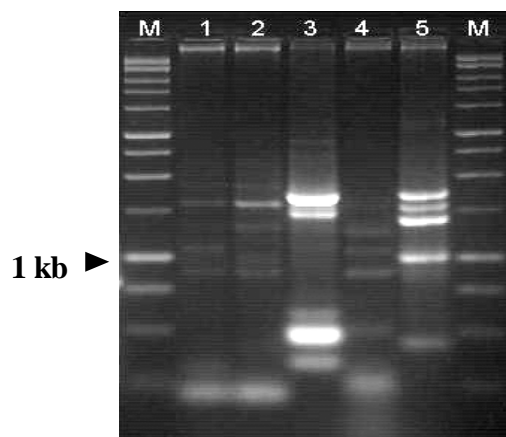


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR com os iniciadores REP: M = Marcador molecular 1 kb (PROMEGA); 1 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 5 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

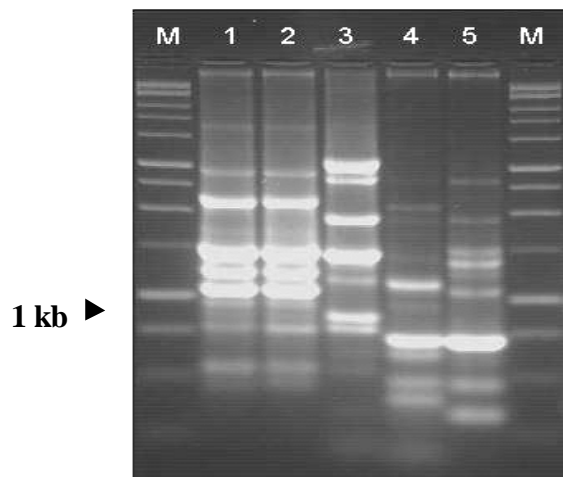


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR com o iniciador BOX: M = Marcador molecular 1 kb (PROMEGA); 1 *L. xyli* subsp. *xyli* CTC B07; 2 *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano); 3 *L. xyli* subsp. *cynodontis*; 4 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 5 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

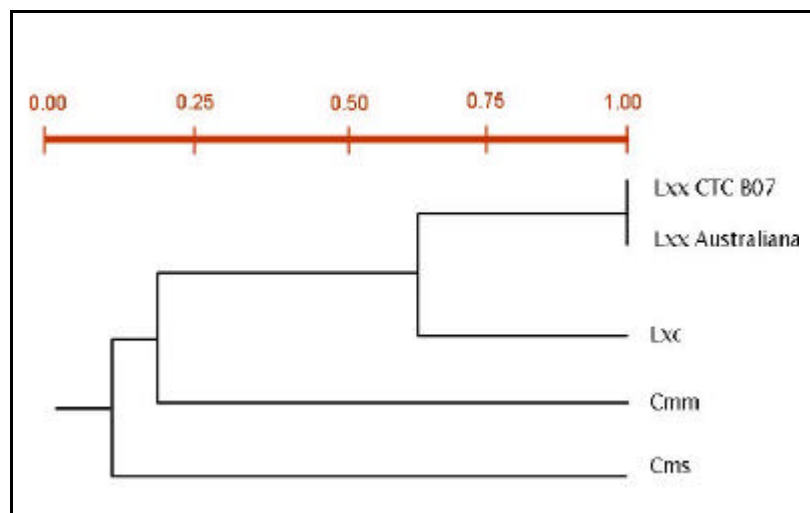


Figura 18 - Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard dos cinco isolados obtidos pelos iniciadores ERIC, REP e BOX.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que:

- 1 – Através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, sorologia de microaglutinação e pcr-específico, a identidade do isolado CTC B07 foi confirmada como sendo *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*;
- 2 - Não foi verificada a ocorrência de flagelo na bactéria quando cultivada em meio de cultura e, tampouco, quando isolada de fluido de xilema de cana-de-açúcar. Também não foi notada extensa degradação dos vasos do xilema nas amostras analisadas por microscopia eletrônica de varredura;
- 3 - O tamanho do genoma estimado experimentalmente pela técnica de PFGE com as enzimas de restrição *XbaI* e *SpeI* está bastante próximo daquele obtido pelo projeto genoma desta bactéria;
- 4 – O resultado da hibridização com sondas utilizando elementos móveis concordam com aqueles obtidos pelo seqüenciamento contribuindo, portanto, para corroborar a correta montagem do genoma;
- 5 - Não ocorreu diversidade genética entre *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* CTC B07 e *L. xyli* subsp. *xyli* (isolado australiano) utilizando a técnica de rep-PCR, ao passo que, entre *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis*, a diversidade genética foi de 35%. Estas, por sua vez, quando comparadas com as bactérias do gênero *Clavibacter*, apresentaram diversidade genética de mais de 75%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- BATHE, B.; KALINOWSKI, J.; PÜHLER, A. A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13031 chromosome. **Molecular General Genetics**, v.252, p.255-265, 1996.
- BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDENO-TARRAGA, A. M. et al Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v.417, p.141-147, 2002.
- BOUZAR, H.; JONES, J. B.; STALL, R. E. et al. Multiphasic analysis of *Xanthomonas* causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v.89, p. 328-335, 1999.
- BUTLER, P. D.; MOXON, E. R. A physical map of the genome of *Haemophilus influenzae* type b. **Journal of General Microbiology**, v.136, p. 2333-2342, 1990.
- CAMPBELL, A. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 55-83, 1981.

- CANARD, B.; SAINT GIRON, I. B.; COLE, S. T. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*. **Molecular Microbiology**, v.6, p. 1421-1429, 1992.
- CHANG, N.; CHUI, L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v.31, p. 275-279, 1998.
- CHEN, J-H.; HSINEH, Y-Y.; HSIAU, S-L. et al. Characterization of insertion of IS476 and two newly identified insertion sequences, IS1478 and IS1479, in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.4, p.1220-1228, 1999.
- CLARK, C. A.; CHEN, C.; WARD-RAINEY, N. et al. Diversity within *Streptomyces ipomoeae* based on inhibitory interactions, rep-PCR, and plasmid profiles. **Phytopathology**, v. 88, p.1179-1186, 1998.
- COLE S. T.; GIRON, S. Bacterial genomics. **FEMS Microbiology Review**, v.2, n.14, p.139-160, 1994.
- COLE S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v.409, p.1007-1011, 2001.
- CORREIA A.; MARTINS J. F.; CASTRO J. M. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. **Microbiology**, v.140, p.2841-2847, 1994.
- DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C. et al. Comparison of the genomes of two *xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.6887, n.417, p.459-463, 2002.

- DAVIS, M. J. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.115-140, 1986.
- DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p.425-429, 1980.
- DAVIS, M. J; DEAN, J. L.; MILLER, J. D. et al. A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. **Sugar Cane**, v.6, p.9-16, 1994.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. et al. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov. subsp. nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp.nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.107-117, 1984.
- DEAN, J. L.; DAVIS, M. J. Yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **Journal of the American Society of Sugarcane Technologists**, v.10, p.66-72, 1989.
- DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v 58, p.2180-2187, 1992.
- DEVALCKENAERE, A.; ODAERT, M.; TRIEU-CUOT, P. et al. Characterization of IS1541-like elements in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.176, p.229-233, 1999.

- DONG, Q.; SADOUK, A.; VAN DER LELIE, D. et al. Cloning and sequencing of IS1086, an *Alcaligenes eutrophus* insertion element related to IS30 and IS4351. **Journal of Bacteriology**, v.24, n.174, p.8133-8138, 1992.
- ENGEL, W. R. The P family of transposable elements in *Drosophila*. **Annual Review of Genetics**, v.17, p. 315-344. 1983.
- EVTUSHENKO, L. I.; DOROFEEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A. et al. *Leifsonia poae* gen. nov.; sp. nov.; isolated from nematode galls on *Poa Annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov.; nom. rev.; comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov.; comb. nov. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, v.50, p.371-380, 2000.
- FEGAN, M.; CROFT, B. J.; TEAKLE, D. S. et al. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyliu*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, v.4, n.47, p.495-504, 1998.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agriannual 2002**: anuário da agricultura brasileira São Paulo, 2002. 536p.
- FONSTEIN, M.; HASELKORN, R. Physical mapping of bacterial genomes: minireview. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.3361-3369, 1995.
- FROHME, M.; CAMARGO, A. A.; HEBER, S et al. Mapping analysis of the *Xylella fastidiosa* genome. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.16, p.3100-3104, 2000.

- GIGLIOTI, E. A. RSD impact on sugar industries – Brazil In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7., Edinbug, 1998. Edimburg: s.ed., 1998. p.9-16.
- GILLASPIE, A. G., Ratoon stunting disease of sugarcane: serology. **Phytopathology**, v.68, p.529-532, 1978.
- GILLASPIE JR.; A. G.; TEAKLE, D. S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JUNIOR, A.G. et al. **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p.59-80.
- GILSON, E.; CLEMENTE, J. M.; BRUTLAG, D. et al. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO Journal**, v.3, p.1417-1421, 1984.
- HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n56, p. 147-155, 2000.
- HIGGINS, C. F.; AMES, G. F. L.; BARNES, W. M. et al. A novel intersitronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v.298, p. 760-762, 1982.
- HONEYCUTT, R. J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. **Journal of Bacteriology**, n.175, p. 6945-6952, 1993.
- HUBER I.; SELENSKAPOBELL S. Pulsed-field gel electrophoresis-fingerprinting, genome size estimation and rrr loci number of *Rhizobium-galegae*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.5, n.77, p.528-533,1994.

- HULTON, C. S. ; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.
- JAMES, G. A review of ratton stunting disease. **International Sugar Journal**, v.98, n. 1174, p.532-541, 1996.
- KAMOUN S.; KADO C. I. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas-campestris*. **Applied And Environmental Microbiology**, v.12, n.56, p.3855-3860, 1990.
- KAUC L.; GOODGAL S. H. The size and a physical map of the chromosome of hemophilus-parainfluenzae. **Gene**, v.2, n.83, p.377-380, 1989.
- KAUC L.; MITCHELL M.; GOODGAL S. H. Size and physical map of the chromosome of hemophilus-influenzae. **Journal of Bacteriology**, v.5, n.171, p.2474-2479,1989.
- KEIS, S.; SULLIVAN, J. T.; JONES, D. T. Physical and genetic map of the Clostridium saccharobutylicum (formerly Clostridium acetobutylicum) NCP 262 chromosome. **Microbiology**, v.147, p. 1909-1922, 2001.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacterias. **Genome**. v.5, p.408-418, 1995.
- LAINE, J. M.; ZHANG, Y. P.; METZLER, M. C. IS1237, a repetitive chromosomal element from *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, is related to insertion sequences from gram-negative and gram-positive bacteria. **Plasmid**, v.32, p.270-279, 1994.

- LEFÈVRE, P.; BRAIBANT, M.; CONTENT, J. et al. Characterization of a *Mycobacterium bovis* BCG insertion sequence related to the IS21 family. **FEMS Microbiology Letters**, v.178 p.211-217, 1999.
- LEE, I. M.; BARTOSZYK, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. et al. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2631-2636, 1997.
- LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001 p. 465-567: Transposons.
- LITTLE E. L.; BOSTOCK R. M.; KIRKPATRICK, C. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* strains from stone fruits in California. **Applied and Environmental Microbiology**, v.10, n.64, p.3818-3823. 1998.
- LOUWS, F. J.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C. M. et al. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, v.88, p.862-868, 1998.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2286-2295, 1994.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T. et al. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 85, p.528-536, 1995.
- MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology Molecular Biology**, v.3, n.62, p.725-774, 1998.

- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of streptococcus pneumoniae. **Nucleic Acid Research**, v.20, p.3479-3483, 1992.
- MATSUOKA, S. Raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o agente causal. Piracicaba, 1972 77p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Superior "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MCCLELLAND, M. R.; JONES, Y.; PATEL, N. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. **Nucleic Acid Research**, v.15, p.5985-6005, 1987.
- OPGENORTH, D.C.; SMART, C.D.; LOUWS, F.J. et al. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, v.80, p.868-873, 1996.
- PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER D. M. et al. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *calvibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease. **Plant Disease**, v.3, n.82, p.285- 290, 1998.
- PASTRIK, K. H.; RAINEY, F. A. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques **Journal of Phytopathology**, v.11, n.147, p.687-693, 1999.
- PHILIPP, W. J.; POULET, S. EIGLMEIER, K. et al. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. **Microbiology**, v.93, p. 3132-3137, 1996.

- PILLAY, D.; SAROOP, P.; BRUMBLEY, S. M. et al. Genetic differentiation of *Leifsonia xyli* subsp *xyli* strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7., Edinburg, 1998: s.ed., 1998. v.2, p102-109.
- POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.
- POSPIECH, A.; NEUMANN, B. **A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria.** <http://biomednet.com/cgi-bin/tto/pr> . (14 out. 1996)
- RICAUD, C. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v.15, p.241-248, 1974.
- SAROOP, P.; PILLAY, B.; PILLAY, D. *In vitro* cultivation and RAPD fingerprinting of *Leifsonia xyly* subsp *xyli*. In: ISSCT PATHOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, Umhlanga Rocks, 1997. Umhlanga Rocks: s.ed., 1997. p. 91-96.
- SATHYAMOORTHY, M. ALCORN, S. C.; LOHNAS, G. L. et al. Identification and characterization of the ribosomal RNA-encoding genes in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Gene**, v.108, p. 47-53, 1991.
- SCHNEIDER, D.; DUPERCHY, E.; DEPEYROT, J. et al. *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, v.2, n.18, p. 1471-1479, 2002.
- SCHNEIDER, M.; deBRUIJN F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology**, v.2, n.12, p. 163-174, 1996.

- SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulsed field gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.
- SMITH, G. VAN DE VELDE, R. Detection of sugarcane mosaic virus and fiji disease virus in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v.78, p. 557-561, 1994.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, n.98, p.503-517, 1975.
- STEINDL, D. R. L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J. P.; ABBOTT, E. V.; HUGUES, C. G. (Ed). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier, 1961. v.1, p. 433-459.
- STEINDL, D. R. L. The use of phase contrast microscopy in the identification of ratoon stunting disease. **Proceeding Queensland Society of Sugar Cane Technology**, v.43, p.71-72, 1976.
- SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.5145-5149, 1998.
- TAUCH, A.; KRIEFT, S.; KALINOWSKI, J. et al. The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate *Corynebacterium striatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. **Molecular Genes Genetic**, v.1, n.263, p.1-11, 2000.
- TAUCH, A.; ZENG, Z.; PÜHLER, A. et al. *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. **Plasmid**, v.40, p.126-139, 1998.

- TEAKLE, D. S. The sugarcane ratoon stunting disease bacterium. In: FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. (Ed.). **Plant bacterial diseases: a diagnostic guide**. North Ryde: Academic Press, 1983. cap. 11, p. 247-257.
- TEAKLE, D. S.; KONTZE, D.; APPLETON, J. M. A note on the diagnosis of ratoon stunting disease of sugarcane by negative-stain electron microscopy of associated bacterium. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 46, p.279-284, 1979.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap. 12, p.141-206.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, AL.; BERGAMIN FILKHO, A. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.207-225.
- VERA CRUZ, C. M.; ARDALES, E. Y.; SKINNER, D. Z. et al. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. **Phytopathology**, v.86, p.1352-1359, 1996.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.
- WEINEL, C.; TUMMLER, B.; HILBERT, H. et al. General method of rapid Smith/Birnstiel mapping adds for gap closure in shotgun microbial genome sequencing projects: application to *Pseudomonas putida* KT2440. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.29, p. 1021-1026, 2001.

YOUNG, J. M.; TOKIKAWA, Y.; GARDAN, L. et al. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.67-105, 1992.

ZUERNER, R. L.; BOLIN, C. A. Differentiaation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCD assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.10, p.2612-2617, 1997.

APÊNDICE

Seqüências das sondas

R1/R2

GACCTGACCAGGGCCGGCCTTTCGTTGTGTCGGGTGCGGGCCAAGCTTGGTCGCTCGGTGTCGAC**GATCAGTCGAGAG**
ATTCCGCCGAATCAGCTTCTGGAGAGGGCGGTACCATCCATACGTGGCGCATCGGAAAGCGGCCAGCCGCCACCG
 CGACCGAAAGCCACGAGGCTGGTCCGCAATCCGAGCTGCGCAGTTACGTTCAACGGAAGCTGACGCTACGTTGGTGC
 CCGGAGCAGATCAGCCGGTGCCTGATCCGCGAGTTCCCCGGCGATGCGGAGATGCGCGTGGCGCACGAGACGATCTAT
 CAAGCCTTCTACGTGCAGGGCCGTGGACAACCTCCGCCGCGAGCTCACGATGGTCTGCGGACCCGGCCGGGCAAGCGG
 AAACCGCATCGTTCTGGCGCCGCTCGCAGACATCGTTTCGCGGATCCGATGGTAATGATCTCCGACCGTCCCGCCGAA
 TCGAGGACCCGCGCCGTTCGCGACATTGGGAAGCGACCTCATCATCGGCGGACACCGCAACAGCGCCATCGGCACCC
 TCGTGGAACGCTCCACCCGGTTCGTGATGCTGATCCATCTCCCCATCGATCGCACCCGAGAATCCGTCCGGGACGGACT
 GATCAGCGCCGTCAAGACTCCCACGCGAACTCCGTGCTCGATCACCTGGGACCAGGGCTCGGAAATGGCAGCTCA
 CAAGTCGTTACGATAGCCACCGACATCCCGGTCTACTTCTGCGACCCCGCGAGTCCCTGGCAACGCGGCAGCAACGA
 GAACACCAACGGACTCCTTCGCCAATACTTCCCAAGGGAAAGGGAACAGACCTCGCCCGATTACCGCAACCGACC
 TGACGAACGTCGC

R3/R4

GTGTCCACGTTAACGCTGCTCTCACACCGCGGCTCGTCTGCGCCTTGCCAGGCTCATCGTCGAGGACCATTGGCTC
 GTCTCCGTGCGCAGCGAAGATGTTTATGGTCTCGCCCGTTACCGCGCGGAAATGGGCGGGGAGGTTCCGCGCCGAAGGC
 ACGGGAGGGATGACCGACCGGTCTAGCCGCCACGATCGATGCCAACCGGACGCGGTTGCCGTGCTCAAGCGGATC
 GTGCGGGCGAGGTGGCGACGACGCTGGGGCCGTGCGAGATCGCCGGCGAGCTTGGCCTTCCCGCCTCGACCGTCCAC
 GCCGTCTGGTGTGCTGCCGCATCAACCGGCTCTGCACCATGATCGGGTACGGGCGAGCCGATCCGTGCTACGAGC
 ACGACCACCCTGGATCGCTGATCCATGTCGACGT **GACGAAGTTCGGCAACAT**CCCCGACGGCGGGGCT

R5/R6

ATGCGAATCCGACCGCCCACTTCCCGCGCTCAAAC **ACTGACGGAGAAGC**GTCTCGGAACTCTTTCGGATGAGG
 TTCAACCTCGACCACCTCCCCAGCTCCGCAAAGACCTGCTAGCCCACCTGGCCACCTCGACCTTCGTCGCGAAGCAGG
 AGAACGTCATCTGCTCGGACCTCCCGGGATCGGGAAGACCCACCTTGGATCGGGCTGGGAGTCAAGGCCGCGCACG
 CCGGCTACTCGGTCTGTTTCGACACAGCGAACAACCTGGATCGCCACCTTGTCTCGCT CACCACCAGGGACAGCTCG/
 AGCGGAACTGAAGAAGATCCGCCGCTACAAGCTCATCATCGACGAGATCGGCTACATCCCCTTCGACACCGACTC
 CGCGAACCTGTTCTTCCAGCTCGTCGCCTCCCGTTACGGGCAGGGATCGATCATGGTACCAGCAACCTCCCGTTCGGC
 CGCTGGGGCAAACCTTCGGCGATGACGTCGTCGACCCGCGATATTGACCGGCTCGTTCACCATTGAGAGTCTCTCA
 CCTCAGCGGAGACTCTACCGCACACCGGGCGCCGACCTCATACCAAAGACCGCGCCGAGCAAAACTGACCCCC
 AAGGGGGTCAAGATTCAAACAGCACCAGAGGGTGA

Lxx1

CCGTCTCACCGCGCAACGCTCACCCGACCGTTTGCCTGGAAGCCGTGTGCGTCCGCTGCATCCGGGCGGTGGGTCTC
 GGAGACGAATACGCCGCCGATCGCCATGCATCGTAACCGGCAGCGGCTCACCTGAACGGCGCCGGTGGGTCTGCC
 CGCTGGGTCCGAACCGTGAGGGTGGCCCTTCGGCCCCCTCACACTCCCCACGCTGGCAGTCACTTGACGGTGAATCA
 TATGGTGCGGTCTCGCCCCCCCCGGGTAAACCCGGCCCTGTCGCTCCACGAAATTCCTCGACGCGGTGCTGAT
 GCTCCCTTACTTTCGCCGAAGAATTCGGTCCGCTTCGGCGTCCGGTTGACCCCTCTCCACCGCACCATCTGGTCC
 CGTATCAAGTAACTGCCAGAATAAGGGATGGTTTCAGTAGTTGGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 ATGCTGGTGGAGTGTCCGCGCTTGCCGAGGATCGGTTTCATTAAGGATACGTTGTGGGAGCGGTTGGAGTCGTTGATCC
 GTCGCGGCCGCCGGCGGTCAATGGGCGGACGGGGCAGCCTCGGGTTCCGGACCGGAAGGTGTTGCTGGGATCGTGT
 CGTGCTGTTGACAGGGATCCCGTGGAGGAAGCTTCCATCCGAGCTTGGGTACGGGTCTGGGATCACCTGCTGGCGGCGT
 CTGCTGAATGGTCCGAAGCGGGGTGTGGGACGCACTGCGGAGGATCTGCTCGATGAGTCTGGCCACGCAAAACGC
 TCGGTGGGAAACCCAGCCGAACGCCTCGTAAACTACTCGCCAGCTAATCGTCTGTTGCAACAACCACTGGAATC
 GCCCTGGACCTAACCCACGGATCGCGGAAACTCGGCACGAAGTACCATGTCTGACCGACCGCAACGGGATCCCGC
 TGCATGTCGAGATCTCCGGCGGAACCGACATGACTCCATGCTCGTGAACCCGTGTTGGACAACATCACCGCGATCA
 GGGTGTCCGCCGCGGTCCGCCGAGACGCCCGCGTTCATCTCCACGCCGACAAGGCCTACGACAACCGACGCTCCG
 CCGCTACCTGCGACGTCGTGGCATCAAGACGCGCATCGCAAGAATCGGAGTCAACTCCAAACAGCGACTCGGCAAACA
 CCGCTGGGTAGTCGAACACACCATGGCCTGGTCTCGACTCCGGAAACTCGCCACTAGTACGACCGCACCGCCCCA
 ACGATCACAAACGCTCGTCTTAGCAGTCGCGATCACAGCGCCCGCAAACCTACCAAAAACCAACTACTGAAACCAT
 CCCTTAGAGCGCG

Lxx2

ATTTTTCGACACAATCGAGGAGGCGAGTGTGGCAAGTTGATCGCAGTTATGGATATTCTGGACGATAGCCATGAGI
 TATGGAAAATTTAACACGGTGTTCGTGGGGTGTAGGTGTGATGTCCAGGGGGTGTGTTTCGGCGATACGGTCTGTGAC
 AGTTGAGGGGCGAGGGCCTCCGGTTGTGAAGTGGAGCTGTTCAAGTTCACCGCTTCACGATCCAGGAGGCCTTCGTGT
 CCACGTTAACGCTGCTCTCACACCGCGCGCTCGTCTGCGCCTTGCCAGGCTCATCGTCGAGGACCATTGGCTGGTCTCC
 GTCGACGGAAGATGTTTATGGTCTCGCCGTTACCGCGCGGAAATGGGCGGCGAGGTTCCGCGCCGAAGGCACGGGA
 GGGATGACCGACCGGTCTAGCCGCCACGATCGATGCCAACCGGACGCGGTTGCCCGTGTCAAGCGGATCGTGGCG
 GCGAGGTGGCGACGACGCTGGGGCCGGTGCAGATCGCCGGCGAGCTTGGCCTTCCCGCTCGACCGTCCACGCCGTC
 CTGGTGTGCTGCCGATCAACCGGCTCTGCACCATTTGATCGGGTACGGGCGAGCCGATCCGTCGCTACGAGCACGACC
 ACCCTGGATCGTGTATCCATGTCGACGTGACGAAGTTCGGCAACATCCCAACGGCGGCGGCTGACGATTCGTGGCC
 GCGTCCAGGGCGAACGCAACCGGGAAGCGACCGCCACCCGACGAAGAGCAGGAACCACCGCTACGACCCAGGTTG
 GGCACCGTGTTCGTCTACACGATCATCGACGACCACTCCCGCTCGCTACGCCGAGATCTGCTCCGACGAGAAGGCG
 GACACCGGATCGGTGTCTGCGGCGTGTGTGCTGGTTCGCCGACCGGGATGTCAGCGTCGAACTCGTCTCTCGG
 ACAACGGTCCGCTACAAGTCTACGCTGGCGAGACGCTGCACAGAGCTCGGGATCAGGGCGAAGAAGACCCGAC
 CATACCGACCACAGACCAACGGGAAGATCAAACGCTTCCACCGCACACTCGCCGACGGTGGGCTACGCCAGTTCT
 ATGGTTCAGAGGCCGAACGACGAGAAGCACTCCCGGCTGGCCCCACTTCTACAATCATCACAGCACCCTCCGCCA
 TCAGAGCCCCACCATTAGCAGAATCGACAACAACCTCACATCACAGTTAGGGTGTGTTGCTGCTGACGCTCATTG/
 GCAGCGCTCGACGATGTTGGGCGCTCGGTAACGGGTCCGTTGTCGTGGACCGAATTCGATCGGTGGGTCGATGGCGA
 CGGTGGGCGACCTGGTATCGAACTTTGAGATCGTCTGGCGATGCTCTGTCGACGACGCAAGCCCGCTGGTTGTGC
 GATTGTTGGTGAAGGATGTTGAGTCTGAACTTCTGGAGCTACGCTGAAACTCCA