



Identificação de nova espécie bacteriana de *Xanthomonas* patogênica ao jenipapeiro (*Genipa americana* L.) por meio de caracterização bioquímica, fisiológica, patogênica e molecular

THAIS MASSANET

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Prof^a. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Identificação de nova espécie bacteriana de *Xanthomonas* patogênica ao jenipapeiro (*Genipa americana* L.) por meio de caracterização bioquímica, fisiológica, patogênica e molecular

THAIS MASSANET

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema
Orientadora: Prof^a. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Massanet, Thais.

Identificação de nova espécie bacteriana de *Xanthomonas* patogênica ao jenipapeiro (*Genipa americana* L.) por meio de caracterização bioquímica, fisiológica, patogênica e molecular. / Thais Massanet. – São Paulo, 2015.
112 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema**.
Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Suzete Aparecida Lanza Destéfano.

Versão do título para o inglês: Identification of a new bacterial species of *Xanthomonas* pathogenic to genipap (*Genipa americana* L.) by characterization biochemistry, physiological, pathogenic and molecular.

1. Gene ribossomal 16S 2. Fitobactéria 3. Geneshousekeeping 4. MLSA 5.
Hibridização DNA-DNA I. Massanet, Thais II. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza III.
Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



INSTITUTO BIOLÓGICO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da candidata: Thais Massanet

Título: Identificação de nova espécie bacteriana de *Xanthomonas* patogênica ao jenipapeiro (*Genipa americana* L.) por meio de caracterização bioquímica, fisiológica, patogênica e molecular

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof^ª. Dra.: Suzete Aparecida Lanza Destéfano

*Instituição: Instituto Biológico - IB

Assinatura:

*Prof^ª. Dra.: Fabiana Fantinatti-Garboggini

*Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Assinatura:

*Prof. Dr.: Ricardo Harakava

*Instituição: Instituto Biológico – IB

Ao meu marido Ricardo, pelo companheirismo, paciência, apoio e incentivo constante na realização dos meus projetos.

Aos meus filhos Cassiano e Raphael, que mudaram a minha vida de uma hora pra outra e se tornaram razão do meu viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, pela oportunidade e confiança, me acolhendo em seu laboratório e acreditando no meu potencial para desenvolver um projeto junto a sua equipe, pelos ensinamentos e apoio.

À M.^a Irene Maria Gatti de Almeida, pela relação sincera de amizade criada, por sempre me incentivar na busca do conhecimento, pela atenção e preocupação com o desenvolvimento desta pesquisa, sendo extremamente exigente e detalhista nas correções e sugestões dadas. Sua competência, persistência e determinação servirão de exemplo para minha carreira.

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, pela colaboração, sugestões e conselhos dados.

Ao Prof. Dr. Márcio Jose da Silva, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG/UNICAMP), pelo sequenciamento das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal: Mari, Lu, Rê, Tchela, Dani, Dê, Alex, Mari T., Soninha, Beriam por compartilharem comigo momentos de vitórias e angústias e fazerem com que minhas estadias em Campinas fossem mais alegres e divertidas.

À Dra. Mariana Ferreira Tonin, pela amizade sincera, pela atenção dada, pelo apoio de todas as horas dentro e fora do laboratório, pelas palavras de carinho e conforto, pelos ensinamentos, por me acolher em sua casa e me fazer sentir como parte de sua família. Obrigada por tudo!

À M.^a Lucilene Lopes dos Santos, pelo vínculo de amizade criado, por ser sempre tão atenciosa comigo, pelos ensinamentos e ajuda constante, por me acolher em sua casa por diversas vezes e dividir comigo momentos muito diferentes de alegrias e tristezas durante esse período que passamos juntas.

À M.^a Renata Comparoni, pela amizade, atenção e carinho de todas as horas.

À Dra. Daniele Bussioli Alves Corrêa, pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento do projeto, pela atenção e preocupação comigo.

À M.^a Denise Salomão, por entender o processo que estava passando após o nascimento dos meus filhos e se colocar a disposição de me ajudar para que conseguisse concluir minha dissertação.

Aos professores Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini (CPQBA/DRM – UNICAMP) e Dr. Ricardo Harakava (Laboratório de Bioquímica Fitopatológica – Instituto Biológico), pela participação na banca de defesa da dissertação.

À Dra. Dagmar Santos Roveratti, professora que me acompanhou durante a graduação e se tornou uma grande amiga. Pelo incentivo a dar continuidade na minha formação buscando uma pós-graduação e abrindo portas para que isso pudesse ser realizado.

Aos meus pais Ana e Enilson, exemplos de amor incondicional, apoio, carinho e dedicação, sempre presentes na vida dos filhos e aos meus irmãos Luana e Thiago (*in memoriam*), por ser parte essencial da minha vida.

A minha sogra, Maria da Conceição, por cuidar dos meus filhos com todo amor e carinho por diversas vezes para que eu pudesse concluir essa dissertação de mestrado

Ao meu marido Ricardo, por estar sempre ao meu lado e ser tão especial! Obrigada por ouvir meus desabafos, respeitar o meu silêncio e me proporcionar forças para que eu pudesse atingir meus objetivos sem desistir do que buscava para minha vida. Sem você nada disso seria possível!

Aos meus filhos Cassiano e Raphael, por tornarem minha vida mais completa e me proporcionarem a oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro do projeto (Proc. 2011/50813-2) e concessão da bolsa de Mestrado (Proc. 2012/11760-3).

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

MASSANET, T. IDENTIFICAÇÃO DE NOVA ESPÉCIE BACTERIANA DE *Xanthomonas* PATOGÊNICA AO JENIPAPEIRO (*Genipa americana* L.) POR MEIO DE CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico.

RESUMO

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma árvore nativa brasileira pertencente à família Rubiaceae que ocorre de forma espontânea, desde o estado do Amazonas até São Paulo, em diversas formações vegetais. Frutífera de produção restrita, ainda é explorada de forma extrativista e cultivada em pequena escala em algumas regiões do país, com destaque para a região Nordeste, onde possui grande importância econômica, social e cultural. A escassez de trabalhos desenvolvidos com essa cultura associada à ocorrência de pragas e doenças torna esta espécie vegetal bastante vulnerável, com risco de perdas de genótipos com características econômicas importantes. Em 2007, folhas de jenipapeiro apresentando extensas lesões necróticas foram coletadas em plantios da região de Ilha Solteira/SP, evidenciando tratar-se de doença bacteriana. Nove isolados foram obtidos e identificados por meio de sequenciamento do gene ribossomal 16S como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Embora os isolados apresentassem características do gênero como colônias lisas, mucoides, de coloração amarelada e com produção de xantomadina, foram observadas diferenças relacionadas ao tempo de crescimento em meio de cultura e exigência nutricional. Desse modo, cinco diferentes meios de cultivo foram testados a fim de se avaliar o crescimento desses isolados de jenipapeiro, sendo o meio YS acrescido de glicose o que apresentou o maior número de colônias bacterianas. Testes bioquímicos e fisiológicos apresentaram resultados que corresponderam aos descritos na literatura para bactérias pertencentes ao gênero. Análises de MLSA realizadas com os genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD* indicaram que o agente causal da doença bacteriana do jenipapeiro pertence à espécie *Xanthomonas axonopodis*. Experimentos de hibridização DNA-DNA utilizando-se como sonda a linhagem Tipo da espécie *X. axonopodis* revelaram valores de homologia superiores a 74% entre essa espécie e seus patovares e valores de 80 a 90% com todas as linhagens isoladas de jenipapeiro, indicando que essas linhagens pertencem à essa espécie bacteriana. Nos testes de patogenicidade realizados em diversas espécies de plantas da família Rubiaceae e em plantas sem nenhuma relação com esta família, não

foram observados sintomas da doença após os 21 dias de inoculação, exceto para as plantas de jenipapeiro.

Palavras-chaves: gene ribossomal 16S, fitobactéria, genes *housekeeping*, MLSA, hibridização DNA-DNA

MASSANET, T. IDENTIFICATION OF A NEW BACTERIAL SPECIES *Xanthomonas* PATHOGENIC TO GENIPAP (*Genipa americana* L.) BY CHARACTERIZATION BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGICAL, PATHOGENIC AND MOLECULAR. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio – Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Instituto Biológico.

ABSTRACT

Genipap (*Genipa americana* L.) is a native Brazilian tree belonging to the Rubiaceae family that occurs spontaneously, from the state of Amazonas to São Paulo, in different vegetation types. It is a tree with limited fruit production, still explored in an extractive manner and cultivated on a small scale in some regions, mainly in the northeast of Brazil, where it has economic, social, and cultural importance. The lack of studies on this culture associated with the occurrence of pests and diseases make this species vulnerable to loss of genotypes with important economic features. In 2007, genipap leaves showing extensive necrotic lesions resembling bacterial infection were collected in groves in the municipality of Ilha Solteira, in the state of São Paulo. Nine bacterial isolates were obtained from these leaves and shown to belong to the *Xanthomonas* genus by 16S rRNA gene sequencing. Although the isolates presented culture characteristics typical of the genus such as smooth and mucoid colonies and yellowish color due to xanthomonadin production, differences in growth rate and nutritional requirements were observed. Five media were evaluated in order to compare the growth rate of the isolates, resulting in YS medium supplemented with glucose as the one supporting fastest growth. Biochemical and physiological tests results were in agreement to those previously reported for the genus. Multilocus sequence analysis carried out with *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, and *rpoD* genes indicated that the causal agent of the disease belong to the species *Xanthomonas axonopodis*. DNA-DNA hybridization experiments using as a probe genomic DNA of the type strain of *X. axonopodis* (pv. *axonopodis*), showed homology levels above 74% to other pathovars of the species and from 73% to 90% to the genipap isolates, confirming the species identity of these isolates. Pathogenicity tests on several plant species of the Rubiaceae family and on other species unrelated to this family, resulted in disease symptoms 21 days after inoculation only in the genipap plants.

Keywords: 16S rRNA, phytoacteria, *housekeeping* genes, MLSA, DNA-DNA hybridization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vinte grupos genômicos de <i>Xanthomonas</i> reconhecidos por Vauterin et al. (1995) atualmente aceitos como espécie.....	08
Tabela 2 - Linhagens de <i>Xanthomonas</i> utilizadas neste estudo.....	19
Tabela 3 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados neste estudo.....	30
Tabela 4 - Pares de <i>primers</i> , regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos de PCR.....	31
Tabela 5 - Características bioquímicas e fisiológicas das linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	48
Tabela 6 - Valores de homologia (%) obtidos nos experimentos de hibridização DNA-DNA com diferentes linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp. utilizando-se como sonda a linhagem Tipo da espécie <i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> (IBSBF 1444 ¹).....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema utilizado para a avaliação da patogenicidade em diferentes plantas hospedeiras inoculadas artificialmente em casa-de-vegetação.....	37
Figura 2 - Crescimento bacteriano das linhagens de jenipapeiro em diferentes meios de cultura. (A) YSG; (B) GYCA e (C) YDC.....	38
Figura 3 - Crescimento bacteriano das linhagens de jenipapeiro em diferentes meios de cultura. (A) DYGS e (B) 523.....	39
Figura 4 - Reação de catalase: desprendimento de bolhas formadas pelo oxigênio molecular liberado na reação, indicando resultado positivo.....	39
Figura 5 - Produção de oxidase: ausência de mudança de cor do esfregaço em contato com N-N-dimetil-p-fenilenediamino para vermelho escuro após 15 segundos, indicando resultado negativo.....	40
Figura 6 - Produção de gás sulfídrico: escurecimento do papel de filtro (seta) indicando resultado positivo para este teste.....	41
Figura 7 - Produção de acetoina: resultado negativo indicado pela não alteração da cor do meio de cultura de amarelada para avermelhada.....	41
Figura 8 - Teste de redução de nitrato a nitrito realizado para as linhagens de <i>Xanthomonas</i> patogênicas ao jenipapeiro.....	42
Figura 9 - Produção de urease: alcalinização do meio (tubo à direita) pela degradação da ureia.....	43
Figura 10 - Formação de halo após adição da solução de lugol em linhagens de <i>Xanthomonas</i> patogênicas ao jenipapeiro.....	43
Figura 11 - Produção de ácidos a partir de carboidratos: acidificação do meio C, através da mudança de cor do corante indicador de pH de violeta para amarelo.....	44
Figura 12 - Utilização de sais de ácido orgânico: Indicação de alcalinização no meio OAA resultante da mudança de cor de verde-oliváceo (tubo da esquerda) para azul (tubos do meio e da direita).....	45
Figura 13 - Alcalinização do meio OAA resultante da utilização de aminoácidos. Tubo à esquerda com a coloração verde-olivácea original (pH 6,8); os dois tubos à direita, com coloração azul, resultante da alcalinização.....	46
Figura 14 - Crescimento bacteriano em diferentes temperaturas das linhagens de <i>Xanthomonas</i> isoladas de jenipapeiro utilizadas neste estudo.....	46
Figura 15 - Amplificação do gene ribossomal 16S de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	52

Figura 16 - Amplificação do gene ribossomal 16S de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	52
Figura 17 - Amplificação de parte do gene <i>atpA</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	53
Figura 18 - Amplificação de parte do gene <i>atpA</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	53
Figura 19 - Amplificação de parte do gene <i>dnaK</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	54
Figura 20 - Amplificação de parte do gene <i>dnaK</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	54
Figura 21 - Amplificação de parte do gene <i>gyrB</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	55
Figura 22 - Amplificação de parte do gene <i>gyrB</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	55
Figura 23 - Amplificação de parte do gene <i>recA</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	56
Figura 24 - Amplificação de parte do gene <i>recA</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	56
Figura 25 - Amplificação de parte do gene <i>rpoA</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	57
Figura 26 - Amplificação de parte do gene <i>rpoA</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	57
Figura 27 - Amplificação de parte do gene <i>rpoB</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	58
Figura 28 - Amplificação de parte do gene <i>rpoB</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	58
Figura 29 - Amplificação de parte do gene <i>rpoD</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	59
Figura 30 - Amplificação de parte do gene <i>rpoD</i> de linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	59
Figura 31 - Membranas obtidas nos experimentos de hibridização DNA-DNA.....	60
Figura 32 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene ribossomal 16S de linhagens do gênero <i>Xanthomonas</i> , utilizando o método Neighbor-joining.....	64
Figura 33 - Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes <i>atpA</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> e <i>rpoD</i> de linhagens do gênero <i>Xanthomonas</i> , utilizando o método Neighbor-joining.....	67

Figura 34 -	Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes <i>atpA</i> , <i>dnaK</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> e <i>rpoD</i> de linhagens do gênero <i>Xanthomonas</i> , utilizando o método Neighbor-joining.....	68
Figura 35 -	Teste de patogenicidade em mudas de tomateiro, em condições de casa de vegetação.....	69
Figura 36 -	Teste de patogenicidade em mudas de morangueiro, em condições de casa de vegetação.....	70
Figura 37-	Teste de patogenicidade em mudas de <i>Ixora</i> , em condições de casa de vegetação.....	70
Figura 38 -	Teste de patogenicidade em mudas de gardênia, em condições de casa de vegetação.....	71
Figura 39 -	Teste de patogenicidade em mudas de jenipapeiro, em condições de casa de vegetação.....	71

ANEXOS

Anexo A - Meios de cultura utilizados para o crescimento bacteriano.....	81
Anexo B - Meios de cultura utilizados na realização dos testes bioquímicos e fisiológicos.....	83

SUMÁRIO

RESUMO		viii
ABSTRACT		x
LISTA DE TABELAS		xi
LISTA DE FIGURAS		xii
ANEXOS		xv
1. INTRODUÇÃO		01
2. OBJETIVOS		04
2.1 Objetivo geral.....		04
2.2 Objetivos específicos.....		04
3. REVISÃO DE LITERATURA		05
3.1 O jenipapeiro (<i>Genipa americana</i> L.).....		05
3.2 Aspectos gerais sobre o gênero <i>Xanthomonas</i>		06
3.3 <i>Xanthomonas axonopodis</i>		09
3.4 Taxonomia de procariotos.....		10
3.4.1 Métodos de classificação bacteriana.....		12
3.4.2 Hibridização DNA-DNA.....		13
3.5 Análise do gene ribossomal16S.....		14
3.6 Análise de multilocus – MLST e MLSA.....		15
4. MATERIAL E MÉTODOS		19
4.1 Linhagens bacterianas.....		19
4.2 Reativação das linhagens bacterianas.....		20
4.3 Meios de cultura e condições de cultivo.....		21
4.4 Caracterização bioquímica e fisiológica.....		21
4.4.1 Produção de catalase.....		21
4.4.2 Teste de oxidase.....		22
4.4.3 Produção de gás sulfídrico (H ₂ S) a partir de cisteína.....		22
4.4.4 Produção de acetoina.....		23
4.4.5 Redução de nitrato a nitrito.....		23
4.4.6 Produção de urease.....		24

4.4.7	Hidrólise de amido.....	24
4.4.8	Hidrólise de gelatina.....	25
4.4.9	Produção de ácidos a partir de carboidratos e fontes de carbono relacionadas.....	25
4.4.10	Utilização de sais de ácidos orgânicos.....	26
4.4.11	Utilização de aminoácidos.....	26
4.5	Crescimento em meio de cultura com diferentes condições de temperatura.....	26
4.6	Crescimento em meio de cultura com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH 4,0; 7,0; 8,0 ou 9,0).....	27
4.7	Crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl).....	27
4.8	Extração de DNA cromossômico.....	28
4.9	Amplificação por PCR dos diferentes genes.....	29
4.10	Sequenciamento dos marcadores moleculares analisados.....	32
4.11	Hibridização DNA-DNA.....	32
4.11.1	Formato Slot-blotting.....	32
4.11.2	Marcação não radioativa da sonda.....	33
4.11.3	Hibridização.....	33
4.11.4	Detecção.....	34
4.11.5	Análise dos resultados.....	34
4.12	Análise das sequências por MLSA.....	35
4.13	Avaliação da patogenicidade em diferentes espécies de plantas hospedeiras.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Avaliação de crescimento das linhagens de jenipapeiro em diferentes meios de cultura....	38
5.2	Caracterização bioquímica e fisiológica.....	39
5.2.1	Produção de catalase.....	39
5.2.2	Teste de oxidase.....	40
5.2.3	Produção de gás sulfídrico (H ₂ S) a partir de cisteína.....	40
5.2.4	Produção de acetoína.....	41
5.2.5	Redução de nitrato a nitrito.....	42
5.2.6	Produção de urease.....	42

5.2.7	Hidrólise de amido.....	43
5.2.8	Hidrólise de gelatina.....	44
5.2.9	Produção de ácidos a partir de carboidratos e fontes de carbono relacionadas.....	44
5.2.10	Utilização de sais de ácidos orgânicos.....	45
5.2.11	Utilização de aminoácidos.....	45
5.3	Crescimento em meio de cultura com diferentes condições de temperatura.....	46
5.4	Crescimento em meio de cultura com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH 4,0; 7,0; 8,0 ou 9,0).....	47
5.5	Crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl).....	47
5.6	Caracterização molecular.....	52
5.6.1	Amplificação do gene ribossomal 16S.....	52
5.6.2	Análise de multilocus utilizando-se os genes <i>atpA</i> , <i>dnaK</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> e <i>rpoD</i>	53
5.6.2.1	Amplificação de parte do gene <i>atpA</i>	53
5.6.2.2	Amplificação de parte do gene <i>dnaK</i>	54
5.6.2.3	Amplificação de parte do gene <i>gyrB</i>	55
5.6.2.4	Amplificação de parte do gene <i>recA</i>	56
5.6.2.5	Amplificação de parte do gene <i>rpoA</i>	57
5.6.2.6	Amplificação de parte do gene <i>rpoB</i>	58
5.6.2.7	Amplificação de parte do gene <i>rpoD</i>	59
5.7	Hibridização DNA-DNA.....	60
5.8	Análise filogenética.....	63
5.9	Avaliação da patogenicidade em diferentes espécies de plantas hospedeiras.....	69
6.	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	APÊNDICES	85

APÊNDICE 1 – Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>atpA</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	85
APÊNDICE 2– Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>dnaK</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	86
APÊNDICE 3 – Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>gyrB</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	87
APÊNDICE 4 – Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>recA</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	88
APÊNDICE 5 – Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>rpoA</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	89
APÊNDICE 6 – Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>rpoB</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	90
APÊNDICE 7 – Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>rpoD</i> (Neighbor joining – Kimura 2).....	91

1 INTRODUÇÃO

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) é uma frutífera pertencente à família Rubiaceae originária do norte da América do Sul e atualmente encontra-se distribuída desde o México até o norte da Argentina. No Brasil ocorre de forma espontânea, do Estado de São Paulo até o Amazonas, principalmente na região litorânea, estando presente em todos os biomas, exceto nos campos sulinos (MUNIZ; SILVA JUNIOR, 2009; RIZZINI; MORS, 1995).

Considerada uma espécie vegetal de importância econômica tanto pela sua essência florestal (madeira utilizada na construção civil, naval e marcenaria) quanto pela utilização de seus frutos na produção de alimentos, o jenipapeiro ainda é explorado de forma extrativista e cultivado em pequena escala em diferentes regiões, sendo seus frutos (consumidos “*in natura*” ou como sucos, compotas e licores) utilizados na alimentação de todo o país, com destaque para a região Nordeste, onde possui também grande importância social e cultural (SILVA et al., 2009; MUNIZ; SILVA JUNIOR, 2009).

Além do jenipapeiro, plantas da família Rubiaceae contêm várias outras espécies economicamente importantes cultivadas em muitos países, sendo algumas com expressivo retorno econômico como, por exemplo, o cafeeiro e plantas ornamentais. O cultivo dessas plantas, entretanto, pode ser limitado devido à ocorrência de pragas e doenças.

A presença de pragas no campo e o conseqüente desenvolvimento de doenças são fatores que podem diminuir drasticamente os valores finais da produção de uma dada cultura. Bactérias são importantes patógenos de plantas não somente pela gravidade das enfermidades que causam em culturas exploradas economicamente, mas também pela alta incidência, facilidade de disseminação e dificuldades encontradas para o seu controle (BALANI, 2009).

Atualmente são reconhecidos 32 gêneros de bactérias fitopatogênicas, sendo que representantes de muitos desses gêneros já foram assinalados em nosso país como responsáveis por graves prejuízos econômicos, chegando a constituir fator limitante à exploração comercial de diversas culturas de importância econômica.

As fitobactérias estão separadas de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas e a avaliação da diversidade microbiana tem sido fortemente influenciada pelo uso de técnicas moleculares, como o sequenciamento do DNA, hibridização DNA-DNA,

análise de multilocus e outras que levam em consideração, por exemplo, eletroforese de proteínas totais, perfil de ácidos graxos, sorologia entre outros (VANDAMME et al., 1996), as quais promoveram recentemente profundas alterações na taxonomia de alguns desses organismos, inclusive com a criação de novos gêneros e espécies bacterianas.

Com relação às pragas e doenças que incidem no jenipapeiro, a literatura menciona alguns fungos como fitopatogênicos nessa espécie, como *Cercospora genipae*, *Deslandesia paulensis*, *Sphaceloma genipa* e *Phyllosticta* sp. (em sementes), ocorrendo principalmente nas regiões norte e nordeste do país (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2012). Dentre as plantas da família Rubiaceae que são conhecidas como hospedeiras de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, encontram-se as espécies *Gardênia* sp. e *Ixora coccinea*, ambas hospedeiras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae* (ARK; BARRET, 1946; MILLER, 1970). A escassez de trabalhos desenvolvidos com essa cultura associada à ocorrência de pragas e doenças torna a espécie vegetal bastante vulnerável, com risco de perdas de genótipos com características econômicas importantes.

Em 2007, folhas exibindo extensas lesões necróticas foram observadas em plantios de jenipapeiro localizados na região de Ilha Solteira/SP, evidenciando tratar-se de doença bacteriana. Linhagens obtidas por isolamento reproduziram os sintomas observados no campo quando inoculadas artificialmente em mudas de jenipapeiro. Testes moleculares preliminares de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S com a utilização de nove enzimas de restrição, além de testes bioquímicos e fisiológicos indicaram a possibilidade de tratar-se de espécie bacteriana do gênero *Xanthomonas*. Embora os isolados apresentassem colônias lisas, mucoides, de coloração amarelada e com produção de xantomonadina, característica única para espécies do gênero, características culturais pouco comuns foram observadas, como crescimento lento em meio de cultura (5 -7 dias) e exigência nutricional.

Nesse sentido, nove linhagens de *Xanthomonas* sp. patogênicas ao jenipapeiro foram investigadas, uma vez que evidências diretas indicaram a possibilidade de tratar-se de nova espécie bacteriana e/ou patovar dentro do gênero.

Somente a identificação do agente etiológico de uma enfermidade ou, como no caso, de um determinado patógeno bacteriano por meio de plantas infectadas pode aumentar as chances de controle de tal doença. O pouco conhecimento sobre esta espécie vegetal aliado à busca de maiores informações sobre os patógenos existentes na cultura motivaram este estudo.

Com a descoberta de novas doenças que incidem no jenipapeiro será possível fornecer subsídios para melhorar a eficiência da produção e uso dessa espécie vegetal pouco explorada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo caracterizar o agente causal responsável por doença bacteriana em jenipapeiro por meio de testes bioquímicos, fisiológicos, moleculares e de patogenicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as linhagens de *Xanthomonas* sp. isoladas de jenipapeiro por meio de testes bioquímicos e fisiológicos;
- Caracterizar molecularmente essas linhagens por meio da técnica de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) utilizando-se os genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoD* e o gene ribossomal 16S;
- Avaliar a patogenicidade das linhagens em diferentes espécies de plantas da família Rubiaceae como café, ixora e gardênia e outras plantas sem relação botânica com essa família por meio de inoculações artificiais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O jenipapeiro (*Genipa americana* L.)

O jenipapeiro é uma árvore nativa brasileira que produz grandes bagas sucosas muito apreciadas em algumas regiões na preparação de licores e compotas, sendo empregada há séculos como corante pelas comunidades indígenas para pintura corporal e tingimento dos diversos tipos de artesanato por eles produzidos. O nome jenipapo, do tupi-guarani *nhandipab* ou *jandipa*, que quer dizer “fruto que serve para pintar” teve origem devido ao fato de que sementes do fruto verde e aberto, quando expostas ao ar, oxidam e tornam-se preto-azuladas, e quando maceradas dão origem a uma das principais tinturas utilizadas por indígenas brasileiros de diferentes etnias (SIBINELLI, 2006). Do jenipapeiro tudo se aproveita: o tronco liso de até 15 metros de altura fornece uma madeira branca de fácil manejo e boa qualidade para uso na fabricação de móveis e na construção civil; seu suco fermentado é utilizado no preparo de vinho e também licor; *in natura* ou nas mais variadas formas de consumo todas as partes desta planta são empregadas na medicina caseira (LORENZI; MATOS, 2008); suas folhas e frutos picados servem de alimento para caprinos, bovinos e suínos além de ser uma árvore indicada na recuperação de áreas degradadas por ser uma espécie que resiste bem aos alagamentos (SIBINELLI, 2006).

Com base na medicina popular, o chá da raiz do jenipapeiro é utilizado pelos povos amazônicos como purgativo; as folhas, em forma de decocção, são indicadas contra diarreia e sífilis e da casca se faz um emplastro para uso externo contra dores. Os indígenas aplicam a polpa do fruto verde no dente para tirar a dor, enquanto os nordestinos utilizam o xarope feito com o fruto para tosse, do qual acreditam aumentar a energia e o poder de atração com as mulheres (SIBINELLI, 2006).

O jenipapeiro é uma frutífera de produção restrita, sendo que a escassez de trabalhos desenvolvidos com essa cultura associada à exploração extrativista em pequenas áreas torna a espécie bastante vulnerável, com o risco de perdas de genótipos com características econômicas importantes (PINTO, 2009).

A preocupação com essa realidade tem gerado algumas iniciativas como o desenvolvimento de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Jenipapo pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracajú – SE), no intuito de buscar novas estratégias de coleta de recursos genéticos para atender às demandas da Rede Nacional de Recursos Genéticos e

conservação de germoplasmas disponível nos diferentes biomas de ocorrência da espécie para futuros programas de melhoramento genético (ALENCAR, 2010).

3.2 Aspectos gerais sobre o gênero *Xanthomonas*

Xanthomonas é um gênero na subdivisão gama Proteobacteria que contém um grande número de patógenos de plantas. Representa um dos mais importantes gêneros de bactérias fitopatogênicas que causam uma variedade de sintomas nas folhas, frutos e caules de diversas plantas de importância econômica, tornando-se um problema limitante para tais culturas ou mesmo causando sérios prejuízos econômicos (LEYNS et al., 1984). Apesar de apresentar uma vasta gama de hospedeiros, cada espécie e seus inúmeros patovares possui especificidade dos tecidos infectados e locais de entrada na planta, podendo penetrar por meio de aberturas naturais (estômatos, lenticelas e hidatódios) ou através de ferimentos causados por diversos fatores (CRUZ, 2009).

A diversidade patogênica do gênero *Xanthomonas* contrasta com sua uniformidade morfológica e fisiológica: as células Gram-negativas em forma de bastonetes móveis apresentam um único flagelo polar e dimensões que variam entre 0,7 μm e 2 μm de comprimento e entre 0,4 μm e 0,7 μm de largura; são estritamente aeróbias; apresentando, em sua maioria, colônias amareladas devido a presença do pigmento xantomadina, único para espécies do gênero, sendo altamente mucoides devido a produção de xantana, exopolissacarídeo essencial à sobrevivência das células e de grande utilização na indústria alimentícia e de cosméticos. Tal uniformidade, associada a sua enorme diversidade genômica, dificultou a evolução de um sistema de classificação estável dentro do gênero por um longo período de tempo (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

O gênero *Xanthomonas* foi proposto por Dowson (1939), que diferenciou 19 espécies dentro do gênero. Até 1974, a classificação das espécies pertencentes ao gênero era feita com base na patogenicidade. Aplicando o conceito de novo hospedeiro - nova espécie para classificar novos organismos, cada variante de hospedeiro ou diferença na sintomatologia produzida eram considerados como uma nova espécie bacteriana, o que resultou na formação de um gênero complexo com mais de 100 espécies distintas, indistinguíveis por testes fenotípicos (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

Em 1978, Young e colaboradores adotaram a designação de patovar a espécies agrupadas em nível infra-específico de acordo com sua patogenicidade a hospedeiros

específicos e a espécie *Xanthomonas campestris* passou a agrupar mais de 140 patovares. Esta classificação baseada em um único recurso, apesar de prática, foi insuficiente para representar as diversidades e relações evolutivas dentro do gênero (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

Uma nova classificação utilizando uma abordagem polifásica, da qual dados fenotípicos e genotípicos se integravam, surgiu com a expansão das técnicas moleculares. Técnicas de genotipagem como hibridização DNA-DNA, PCR baseado em sequências repetitivas (rep-PCR) e genotipagem por polimorfismo de tamanhos de fragmentos amplificados (AFLP) permitiram a distinção entre linhagens de *Xanthomonas*. Vauterin e colaboradores (1995) reconheceram vinte grupos genômicos, que passaram a ser consideradas espécies, sendo a grande parte composto por ex- patovares de *Xanthomonas campestris* (Tabela 1). Outros subgrupos distintos de *Xanthomonas axonopodis* foram propostos como candidatos a espécies distintas em estudos desenvolvidos por Rademaker e colaboradores (2005). Ao mesmo tempo, distinções menores entre patovares diferentes eram feitas. Atualmente, o gênero *Xanthomonas* engloba diversas espécies subdivididas em patovares de acordo com o hospedeiro.

Tabela 1 – Vinte grupos genômicos de *Xanthomonas* reconhecidos por Vauterin e colaboradores (1995) e atualmente aceitos como espécies.

Grupos genômicos (espécies)
1) <i>X. albilineans</i>
2) <i>X. arboricola</i>
3) <i>X. axonopodis</i>
4) <i>X. bromi</i>
5) <i>X. campestris</i>
6) <i>X. cassavae</i>
7) <i>X. codiae</i>
8) <i>X. cucurbitae</i>
9) <i>X. fragariae</i>
10) <i>X. hortorum</i>
11) <i>X. hyacinthi</i>
12) <i>X. melonis</i>
13) <i>X. oryzae</i>
14) <i>X. pisi</i>
15) <i>X. populi</i>
16) <i>X. sacchari</i>
17) <i>X. theicola</i>
18) <i>X. translucens</i>
19) <i>X. vasicola</i>
20) <i>X. vesicatoria</i>

O impacto destes estudos aliado a sequenciamentos em curso de vários genomas oferecem oportunidades sem precedentes para realizar comparações entre os mais de 140 membros conhecidos do gênero com características de especificidade distintas de uma forma abrangente e conclusiva (MEYER; BOGDANOVE, 2009).

3.3 *Xanthomonas axonopodis*

A espécie *Xanthomonas axonopodis* foi proposta por Starr e Garcés (1950) e inclui diversos patovares definidos com base na sua patogenicidade a hospedeiros específicos em uma grande variedade de plantas hospedeiras (VAUTERIN et al., 1995). Em estudos realizados por Rademaker e colaboradores (2005), seis subgrupos distintos desta espécie (grupo genômico 9) foram propostos como candidatos a serem elevados a espécies distintas.

Para a descrição da espécie *Xanthomonas axonopodis* foram utilizadas características fisiológicas e bioquímicas, podendo ser distinguida de outras espécies pela presença de atividade metabólica sobre alguns substratos de carbono como dextrina, celobiose, gentiobiose, maltose, D-trealose, D-alanina, L-alanina e por falta de atividade sobre L-ramnose, L-fenilalanina e timina; por apresentar coloração de gram negativa, crescimento aeróbico, oxidase negativa, catalase positiva, ausência de crescimento a 40 °C, temperatura máxima de crescimento entre 35-37 °C, tolerância ao crescimento em NaCl de 1%, hidrólise de amido e esculina positiva, hidrólise de gelatina negativa e por não ser redutora de nitrato à nitrito (VAUTERIN et al., 1995; MAC FADDIN, 2000; HOLT et al., 1994).

Diversas culturas de interesse econômico são afetadas por doenças provocadas por esta espécie e seus patovares, sendo que perdas decorrentes de sua ação costumam ser relativamente altas. A bacteriose, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, por exemplo, é a doença de maior importância econômica na cultura da mandioca, podendo ocorrer com diferentes intensidades dependendo da variedade vegetal e da agressividade dos isolados, tendo potencial para reduzir a produção e inviabilizar novos cultivos. Pode afetar a cultura de forma sistêmica, quando a bactéria atinge os tecidos vasculares ou de forma localizada, quando há somente infecções dos tecidos foliares caracterizados inicialmente por manchas angulares necróticas de aspecto aquoso ou oleoso (PORTZ, 2003).

Xanthomonas axonopodis pv. *glycines* é o agente causador da pústula bacteriana em soja, uma doença grave que pode reduzir significativamente a produção. A doença geralmente ocorre nas folhas, podendo atacar também outros órgãos da planta como pecíolos, hastes e vagens. Apresentam sintomas de pequenas manchas de coloração verde-amarelada e com o centro elevado de cor amarelo-palha, dispostas de maneira

irregular na superfície da folha aumentando de tamanho com a evolução da doença (FERREIRA, 2001).

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (VAUTERIN et al., 1995) e a sua variante, o crestamento bacteriano fosco, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* são doenças que afetam as culturas de feijão.

Uma das principais doenças que atinge a cultura do maracujá é a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, ocorrendo de maneira generalizada no país e podendo limitar sua produção em algumas regiões, tendo em vista que o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, também conhecido como maracujá azedo (ISHIDA; HALFELD-VIEIRA, 2009). O patógeno induz pequenas lesões nas folhas que tornam-se encharcadas e necrosam, podendo causar também grandes lesões de grandes extensões nos frutos (VIANA et al., 2003).

3.4 Taxonomia de procariotos

A taxonomia de procariotos pode ser descrita como a ciência que determina a classificação (arranjo dos organismos em grupos taxonômicos), nomenclatura e identificação de organismos desconhecidos (VANDAMME et al., 1996). Disciplina essencial na área de biológicas é considerada como uma das mais antigas ciências que produziu um sistema estável altamente informativo e previsível, colaborando ainda para o avanço de vários outros ramos como a microbiologia, genômica, evolução e epidemiologia (ROSELLÓ-MORA, 2005).

Os primeiros sistemas de classificação de procariotos governaram por décadas a taxonomia bacteriana. Tais métodos utilizavam apenas algumas características fenotípicas, morfológicas e comportamentais para agrupar linhagens, sem levar em consideração qualquer afinidade evolutiva verdadeira, o que levou a sérios erros de classificação microbiana, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e artificiais (BOONE; CASTENHOLZ, 2001). Apesar disso, forneceram informação descritiva para a estruturação de diversos taxa bacterianos.

No decorrer dos anos, a taxonomia de procariotos sofreu grandes alterações em busca de um sistema que pudesse demonstrar as relações evolutivas entre organismos,

aproximando a classificação microbiana da realidade biológica. Colwell (1970) propôs então a integração da informação do nível molecular ao ecológico por meio do uso homologia DNA-DNA associada a uma variedade de características fenotípicas e genotípicas na classificação de micro-organismos, denominada de taxonomia polifásica.

A publicação do trabalho de Woese e Fox (1977) sobre o uso de sequências do gene ribossomal 16S para a reconstrução da árvore da vida e a subsequente demonstração de Woese (1987) da sua utilidade na afiliação de bactérias em espécies, gêneros e famílias mudou o rumo da taxonomia de procariotos.

A taxonomia polifásica surgiu com o objetivo de integrar diferentes tipos de informações (fenotípica, genotípica e filogenética) sobre os microrganismos indicando, essencialmente, um consenso da taxonomia (VANDAMME et al., 1996).

Uma correta classificação microbiana deve basear-se em uma abordagem polifásica. Classificações mais estáveis são realizadas por meio de comparação entre os taxa com aplicação de vários métodos de caracterização taxonômica independentes, baseada em um conjunto de dados que integram informações fenotípicas e genotípicas.

Segundo Vandamme e colaboradores (1996), a taxonomia polifásica é um consenso entre os sistematas e tem sido aplicada a vários grupos de bactérias a fim de se obter uma conformidade entre as diversas bases de dados disponíveis, sendo que nos últimos anos uma ampla análise vem sendo realizada e estudada. Neste contexto, diversas técnicas genômicas baseadas em padrões de banda (*fingerprints*) como AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e rep-PCR vêm sendo aplicadas em complementação a estudos preliminares de homologia DNA-DNA, verificando-se uma alta correlação entre a similaridade de padrões destas técnicas para diversos grupos taxonômicos modelo, entre eles *Rhizobium* (sin: *Agrobacterium*) (MOUGEL et al., 2002), *Bradyrhizobium* (WILLEMS; COOPMAN; GILLIS, 2001), *Burkholderia* (COENYE et al., 1999) e *Xanthomonas* (RADEMAKER et al., 2000).

Para que organismos possam ser agrupados numa mesma espécie de procariontes eles devem preencher três requisitos básicos: possuir certa similaridade de fenótipo; apresentar valores de hibridização DNA-DNA superiores a 70% e suas sequências do gene ribossomal16S deverão ser 97% idênticas, podendo ser diferentes para alguns grupos específicos. (GEVERS; COHAN; LAWRENCE, 2005).

3.4.1 Métodos de classificação bacteriana

Características morfológicas, culturais, metabólicas e de patogenicidade são tradicionalmente utilizadas na identificação, caracterização e classificação taxonômica de bactérias, sendo que mais recentemente, características genotípicas foram incluídas, já que para a descrição de novas espécies é necessário um maior número de abordagens e métodos, tanto convencionais quanto moleculares.

Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são resultado do avanço tecnológico da biologia molecular nas últimas décadas, servindo como base em estudos taxonômicos modernos (VANDAMME et al., 1996).

As bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* constituem um grande número de linhagens descritas por uma variedade de métodos de classificação fenotípica e genotípica, sendo um dos maiores grupos de bactérias caracterizadas filogeneticamente por estudos de homologia de DNA-DNA (RADEMAKER et al., 2000). Stackebrandt e colaboradores (2002) relataram que um dos principais problemas encontrados na taxonomia de procariotos, sob o ponto de vista metodológico, é a identificação das linhagens em nível de espécie somente por meio de testes fenotípicos e sequências do gene ribossomal 16S devido a grande similaridade entre as espécies, sendo essencial a identificação através de novos métodos que complementem estes dados, como os ensaios de hibridização DNA-DNA e análises por multilocus.

A caracterização metabólica também é muito utilizada na caracterização da diversidade de comunidades microbianas, bem como na identificação e classificação de bactérias fitopatogênicas, sendo uma ferramenta de uso frequente na microbiologia ambiental e ecologia microbianas, apesar de muitas vezes ser impossível a caracterização de linhagens em nível infra-específico recorrendo apenas a ela (KONOPKA; OLIVER; TURCO JR., 1998).

Dentre os vários testes metabólicos existentes destacam-se aqueles que determinam a capacidade de alguns organismos em utilizar determinadas fontes de carbono (açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos) quando adicionados a meios apropriados juntamente com um indicador de pH. Outros testes bioquímicos podem determinar a capacidade de células bacterianas produzirem determinadas substâncias a partir de substratos específicos, como a produção de gás sulfídrico a partir de cisteína e a produção de nitrito a partir de nitrato. Os efeitos enzimáticos podem ser observados ainda por meio da inoculação de placas

contendo meios específicos para cada teste, como acontece na hidrólise de amido. O conjunto de perfis metabólicos estabelecidos após a aplicação de uma série de testes poderá ser então comparado com espécies existentes e auxiliar na identificação (CRUZ, 2009).

A utilização de testes de patogenicidade como parâmetro complementar na taxonomia de bactérias fitopatogênicas constitui-se em um dos pontos fundamentais para a identificação e classificação de bactérias entre os principais gêneros de fitobactérias já descritos (FERREIRA; SALGADO, 1995).

3.4.2 Hibridização DNA-DNA

Métodos físico-químicos de hibridização DNA-DNA são utilizados para delimitar espécies procarióticas há décadas e consistem em medir a similaridade genética total entre isolados pelo grau de hibridização dos genomas dentro de determinadas condições padronizadas. A definição atual de “espécie bacteriana” compreende grupos de isolados coerentes em características genômicas que compartilham alto grau de similaridade em diversas características independentes. Linhagens que exibem, sob condições controladas de ensaio, valores de hibridização DNA-DNA superiores a 70% em seus genomas são consideradas como sendo da mesma espécie, conforme definido pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana (WAYNE et al., 1987; STACKEBRAND et al., 2002). Em 2002, após a reavaliação por um novo comitê a respeito da definição de espécie bacteriana, foi proposto que outras técnicas envolvendo genomas, além da hibridização DNA-DNA e a sequência do gene ribossomal 16S, deveriam ser utilizadas como base para a definição de novas espécies (STACKEBRANDT et al., 2002).

Apesar da importância fundamental da técnica para o estabelecimento dos fundamentos da taxonomia de diferentes grupos taxonômicos de procariontes, ainda possui algumas limitações por utilizar grandes quantidades de DNA com alta pureza e integridade de linhagens tipo, incluídas a cada novo experimento; os resultados obtidos com esta técnica não são cumulativos em bases de dados, sendo que cada experimento novo deve incluir as linhagens de referência além de ser uma técnica trabalhosa e demorada, realizada em poucos laboratórios de referência no mundo para classificação e identificação de espécies.

3.5 Análise do gene ribossomal 16S

Os genes que codificam o RNAr, os DNAr, distribuídos universalmente, apresentam um grau de conservação elevado e podem acumular variabilidade em maior ou menor grau em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985). Estes elementos conservados ou variáveis de estrutura primária ou secundária dos RNAr documentam a história da evolução microbiana e podem ser usados para identificação de organismos ou grupos (WOESE, 1987). Uma das grandes vantagens de informações de sequências de RNAr é que estas são cumulativas, isto é, uma vez obtidas, as sequências podem ser depositadas em banco de dados especializados, ficando disponíveis para estudos posteriores.

O sequenciamento do gene ribossomal 16S consiste em um dos métodos mais utilizados para a discriminação de espécies bacterianas devido ao seu alto grau de conservação em todas as células. Trabalhos realizados por Stackebrandt e Goebel (1994) demonstraram que a similaridade em sequências do gene ribossomal 16S também deveriam ser utilizadas na definição de espécies, sendo que linhagens que apresentassem similaridade maior do que 97% com sequências desse gene pertenceriam a mesma espécie. Cepas que apresentam graus de similaridade menores que 97% com sequências do gene ribossomal 16S de taxas conhecidos previamente publicados são consideradas como pertencentes a uma nova espécie (GEVERS; COHAN; LAWRENCE, 2005).

Considerado um marcador filogenético universal para procariontes, o gene ribossomal 16S possui sequências divergentes únicas para cada espécie, sendo frequentemente utilizado para determinar a posição filogenética de novos isolados. A automação das técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos apresentou grande impacto no uso de sequências do gene ribossomal 16S como marcador molecular, resultando numa grande gama de sequências disponíveis em bases de dados para pesquisa de livre acesso, como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RDP (*Ribosomal Database Project*, Wisconsin, USA) (<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) (WOESE, 1987; GÜRTLER; STANISICH, 1996). Sendo assim, não existe nenhum outro gene que tenha sido tão bem caracterizado e estudado quanto o gene ribossomal 16S, facilitando a classificação e o estudo das relações entre os micro-organismos.

No caso de isolados bacterianos novos ou atípicos, a taxonomia molecular baseada na análise de sequência do gene ribossomal 16S representa uma primeira etapa de afiliação filogenética, direcionando desta forma testes bioquímicos e fisiológicos subsequentes que permitirão definir melhor a posição taxonômica destes organismos.

Apesar de todas as vantagens de se utilizar o gene ribossomal 16S, Martens e colaboradores (2007) constataram que a análise filogenética baseada somente neste gene poderia resultar em dados incoerentes, já que a alta conservação das sequências nucleotídicas seria capaz de não permitir que linhagens de espécies distintas fossem diferenciadas, além da possibilidade de ocorrência de transferência horizontal de genes ou efeitos de recombinação gênica, o que dificultaria a análise.

Várias abordagens têm sido utilizadas para identificar bactérias com base no sequenciamento do gene ribossomal 16S, sendo em associação com a PCR a metodologia mais comumente usada (BOYE; HOGDALL; BORRE, 1999). O sequenciamento do fragmento produzido pela amplificação por PCR deste gene tem sido muito utilizado em análises comparativas para entender as relações filogenéticas em procariotos no nível de espécie.

Atualmente a taxonomia bacteriana vem permitindo a reclassificação e descoberta de novas espécies a partir de métodos e técnicas cada vez mais elaboradas de análises de sequências gênicas. Dentre estas técnicas podemos destacar a de tipagem de sequências baseadas em multilocus – MLST (*Multilocus Sequence Typing*) e MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), uma variação da MLST, que se baseiam na similaridade de um conjunto de genes bem conservados (genes *housekeeping*) para definição e alocação taxonômica de novas espécies (RAMOS, 2007). A análise conjunta desses genes permite a distinção entre espécies altamente relacionadas que não seriam esclarecidas somente com o sequenciamento do gene ribossomal 16S.

3.6 Análise por multilocus – MLST e MLSA

A análise de sequências de DNA tem assumido um papel de grande importância em estudos taxonômicos nos últimos anos devido ao fato da tecnologia principal utilizada para a realização destes estudos ser relativamente rápida, barata, altamente reprodutível e disponível, já que muitos dados podem ser encontrados em bases de dados virtuais de centros especializados em sequenciamento (ZEIGLER, 2003).

O *Multilocus Sequence Typing* (MLST), descrito por Maiden et. al (1998), foi desenvolvido para tipagem de espécies de patógenos em estudos epidemiológicos, sendo utilizado com frequência para agrupar linhagens com sequências gênicas idênticas em pelo menos cinco de sete genes (RAMOS, 2007). Seu uso tem ampliado a visão sobre a

biodiversidade e evolução de bactérias (FEIL; SPRATT, 2001; FEIL et al., 2003; MAIDEN et al., 1998). Esta técnica se originou da eletroforese de enzimas, amplamente usada por biólogos de populações. A metodologia atual consiste no sequenciamento e análise de fragmentos de cinco a sete genes conservados (geralmente *housekeeping*), espaçados ao longo do genoma bacteriano com pelo menos 100 kb de distância um do outro (MAIDEN et al., 1998). A grande vantagem desta técnica é que a diferença entre linhagens é indexada diretamente nas sequências de DNA e como estes genes evoluem muito lentamente, se tornam ideais para estudos de longo termo de epidemiologia e identificação. Além disto, sequências gênicas podem ser acumuladas em bases de dados de domínio público e comparadas com facilidade.

Esta ferramenta vem merecendo grande destaque na taxonomia polifásica (STACKEBRANDT et al., 2002; ZEIGLER, 2003; SANTOS ; OCHMAN, 2004), com grande potencial na descrição de novas espécies, podendo eventualmente vir a substituir a técnica de hibridação DNA-DNA (ZEIGLER, 2003), a qual é laboriosa e oferece grandes dificuldades de padronização. Thompson e colaboradores (2005) utilizaram esta técnica para realizar a análise da posição taxonômica de seis novas cepas de bactérias da família Vibrionaceae (gênero *Vibrio*) obtidas em corais de ilhas da Austrália, se apoiando também em análises de propriedades fenotípicas para determinar as espécies.

Por outro lado, a técnica por MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) foi desenvolvida para analisar gêneros e famílias de procariontes, sendo seu principal objetivo a identificação de espécies (RAMOS, 2007). Trata-se de um método de caracterização genotípica que se baseia no uso de múltiplos genes codificadores de proteínas, sendo usada para estudar grupos mais diversificados de procariontes (incluindo gêneros inteiros) e sugerida por alguns autores como metodologia base para a definição da espécie de estudo (GEVERS; COHAN; LAWRENCE, 2005). Esta abordagem tem sido utilizada em vários estudos envolvendo grupos taxonômicos heterogêneos com alto número de espécies e bactérias fitopatogênicas, incluindo o gênero *Xanthomonas*.

Na seleção de genes para estudos de MLSA é fundamental, para fins de comparação, a utilização de genes que possam representar genomas inteiros, devendo ser exclusivo dentro do genoma, moderadamente conservados e essenciais para o metabolismo bacteriano (ZEIGLER, 2003). No entanto, para cada família ou gênero é necessário escolher o conjunto de genes mais apropriado, visto que não é possível utilizar o mesmo conjunto de genes para analisar todos os organismos. Com os genes escolhidos as sequências são concatenadas, comparadas entre si e utilizadas na construção de árvores filogenéticas (OLIVEIRA, 2010).

Os genes *housekeeping* são genes constitutivos estruturais ou de regulação celular, essenciais para todas as células de um organismo, que se encontram amplamente distribuídos dentre os genomas bacterianos. Segundo Zeigler (2003), os genes *atpA*, *rec A* e *rpoA* são excelentes exemplos de genes selecionáveis para MLSA.

O gene *atpA*, que codifica a subunidade alfa da proteína ATP sintase, é um gene de ampla distribuição entre os organismos, sendo conservado entre bactérias e sugerido em estudos baseados em sequências do genoma total e em diferentes loci de vários grupos bacterianos como marcador alternativo para análises filogenéticas e de identificação (ZEIGLER, 2003). Estudos baseados em análises de sequências do gene *atpA* (1102 pb) com espécies do gênero *Enterococcus* revelaram a mesma relação filogenética em comparação com sequências do gene ribossomal 16S, porém mais discriminatórias para a diferenciação das espécies (NASER et al., 2005).

O gene *dnaK* é uma chaperona molecular pertencente a um conjunto de proteínas denominadas proteínas de choque térmico, muito antigas e altamente conservadas, que possuem um importante papel na maquinaria das células, auxiliando no processo de dobramento de proteínas. A proteína *dnaK* utiliza a energia da hidrólise de ATP para desnover proteínas, possibilitando novo enovelamento de forma correta ou no lugar correto. Auxiliam as células a recuperar-se do estresse causado pela temperatura ou por outros fatores encontrados por elas, como exposição a altas concentrações de determinados compostos químicos ou de radiação ultravioleta (MADIGAN et al., 2010).

A subunidade B da DNA girase é uma proteína codificada pelo gene *gyrB* responsável por induzir uma menor pressão no desenrolamento da fita de DNA, já que a DNA girase bacteriana é uma topoisomerase tipo II que catalisa o superenovelamento negativo gradativo do DNA empregando a energia livre liberada durante a hidrólise do ATP. Essa proteína também é capaz de concatenar e desencadear círculos de fita dupla e atar nós nestes mesmos círculos (VOET; VOET, 2006). Análises de sequências deste gene têm sido utilizadas para estabelecer relações filogenéticas entre diversos organismos como *Acinetobacter* spp. (YAMAMOTO; BOUVET; HARAYAMA, 1999), *Pseudomonas* spp. (ANZAI et al., 2000), *Helicobacter* spp. (HANNULA; HÄNNINEN, 2007) e mais recentemente, *Xanthomonas* spp. (PARKINSON et al., 2007; PARKINSON et al., 2009).

O gene *recA* (recombinase A) é uma enzima multifuncional que está relacionada com atividades de recombinação homóloga e mecanismo de reparo do DNA, atuando também na remoção dos dímeros de pirimidinas induzidos pela radiação, quando, por exemplo, bactérias são expostas a luz ultravioleta (KREUTZER et al., 1994; RAMOS, 2007). Estudos

realizados por Payne e colaboradores (2005) utilizando-se análises filogenéticas do gene *recA* possibilitaram a diferenciação de espécies do gênero *Burkholderia*, incluindo a discriminação do complexo *B. cepacia*, confirmando assim a eficiência deste gene como ferramenta molecular na identificação de espécies do gênero.

O gene *rpoA* codifica a subunidade alfa da RNA polimerase, enzima geralmente formada por várias cadeias polipeptídicas que catalisam toda a transcrição do DNA, sendo a subunidade mais caracterizada em *Escherichia coli* e responsável pela transcrição gênica (RAMOS, 2007; ISHIHAMA, 1981). Park e colaboradores (2010) obtiveram uma clara diferenciação entre espécies do gênero *Streptococcus* utilizando sequências do gene *rpoA* (445 pb) em seus estudos. As espécies *S. pneumoniae*, *S. mitis* e *S. oralis* ficaram alocadas em grupos separados na árvore filogenética, o que não foi possível com o gene ribossomal 16S.

O gene *rpoB* codifica a subunidade beta da RNA polimerase, sendo essencial para todo o metabolismo celular em bactérias, já que é o responsável pela ligação ao molde de DNA que será transcrito. Ferreira-Tonin e colaboradores (2012) avaliaram o gene *rpoB* como marcador molecular alternativo para diferenciação de espécies de *Xanthomonas*, a fim de compreender melhor as relações filogenéticas dentro do gênero. Uma análise de MLSA com linhagens representativas do gênero utilizando genes *housekeeping* conservados incluindo *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD* e da região espaçadora 16S-23S DNAr sugeriram que a análise da sequência do gene *rpoB* representa um método viável e simples para diferenciação de espécies de *Xanthomonas*.

Já o gene *rpoD* codifica a subunidade sigma da RNA polimerase, sendo fundamental devido ao seu papel de reconhecimento específico da região promotora dos genes que serão transcritos. Fargier e Manceau (2006), por meio da técnica de MLSA, utilizaram seis genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* e *tpiA*) e o gene estrutural *fyuA* como base de diferenciação entre espécies do gênero *Xanthomonas*, obtendo alta congruência de dados na representação de espécies com *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*. Posteriormente, Young e colaboradores (2008) utilizaram sequências concatenadas dos genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD* de espécies tipo do gênero *Xanthomonas* para análises de MLSA e conseguiram diferenciar a maioria das espécies incluídas no estudo, além de obterem topologia similar a árvore filogenética construída a partir de sequências de gene ribossomal 16S. Estes estudos serviram como base para um estudo subsequente que sugeriu a reclassificação de fitopatógenos a uma ampla gama de hospedeiros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas

No presente estudo foram utilizadas nove linhagens de *Xanthomonas* sp (IBSBF 2324, 2325, 2326, 2365, 2366, 2367, 2420, 2421, 2433) obtidas através de isolamentos realizados a partir de lesões em folhas de jenipapeiro, coletadas no período de agosto de 2006 a março de 2007, na região de Ilha Solteira/SP. Também foram incluídas diferentes linhagens Tipo e Patotipo do gênero *Xanthomonas* para fins comparativos (Tabela 2). Todas as linhagens foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) (www.biologico.sp.gov.br/bacterias.php).

Tabela 2 - Linhagens de *Xanthomonas* utilizadas neste estudo.

Linhagens	IBSBF	Outras coleções	Hospedeiro	Procedência
<i>X. albilineans</i>	1374 ^T	LMG 494 / ICMP 196 ^T	<i>Saccharum officinarum</i>	Ilhas Fiji
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	1375 ^T	LMG 747 / ICMP 35 ^T	<i>Juglans regia</i>	Nova Zelândia
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	1444 ^T	LMG 538 ^T / ICMP 50 ^T	<i>Axonopus scoparicus</i>	Colômbia
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> .	1412 ^P	LMG 682 / ICMP 24 ^P	<i>Citrus limon</i>	Nova Zelândia
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>	1709 ^P	LMG 937 / ICMP 336 ^P	<i>Lactuca</i> sp.	EUA
<i>X. bromi</i>	1567 ^T	LMG 947 ^T / ICMP 12545	<i>Bromus carinatus</i>	França
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1163 ^T	LMG 568 / ICMP 13 ^T	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Inglaterra
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	1590 ^P	LMG 860 / ICMP 1404 ^P	<i>Raphanus sativus</i>	EUA
<i>X. cassavae</i>	270 ^T	LMG 673 ^T / ICMP 204	<i>Manihot esculenta</i>	Malawi
<i>X. codiae</i>	1389 ^T	LMG 8678 ^T / ICMP 9513	<i>Codiaeum variegatum</i> var. <i>pictum</i>	EUA
<i>X. cucurbitae</i>	268 ^T	LMG 690 ^T / ICMP 2299	<i>Cucurbita maxima</i>	Nova Zelândia
<i>X. fragariae</i>	1371 ^T	LMG 708 / ICMP 5715 ^T	<i>Fragaria</i> hib.	EUA
<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	1391 ^P	LMG 733 ^P / ICMP 453	<i>Hedera helix</i>	EUA
<i>X. hyacinthi</i>	1390 ^T	LMG 739 ^T / ICMP 189	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Holanda
<i>X. melonis</i>	68 ^T	LMG 8670 ^T / ICMP 8682	<i>Cucumis melo</i>	Brasil
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	1732 ^T	LMG 5164 / ICMP 3125 ^T	<i>Oryza sativa</i>	Índia

Tabela 2 – Continuação.

Linhagens	IBSBF	Outras coleções	Hospedeiro	Procedência
<i>X. pisi</i>	1356 ^T	LMG 847 ^T / ICMP 570	<i>Pisum sativum</i>	Japão
<i>X. sacchari</i>	1313 ^T	LMG 471 ^T / ICMP16916	<i>Saccharum officinarum</i>	Guadeloupe
<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	1967 ^P	ICMP 3867 ^P	<i>Vitis</i> sp.	Índia
<i>X. theicola</i>	1565 ^T	LMG 8684 ^T / ICMP 6774	<i>Camellia sinensis</i>	Japão
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	581 ^T	LMG 876 / ICMP 5752 ^T	<i>Hordeum vulgare</i>	EUA
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	865 ^P	LMG 736 ^P / ICMP 3103	<i>Sorghum bicolor</i>	Nova Zelândia
<i>X. vesicatoria</i>	1338 ^T	LMG 911 ^T / ICMP 63	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Nova Zelândia
<i>Xanthomonas</i> sp.	2324		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2325		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2326		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2365		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2366		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2367		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2420		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2421		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	2433		<i>Genipa americana</i> L.	Brasil

^T = linhagem tipo; ^P = linhagem referência do patovar; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil); ICMP (*International Collection of Microorganisms from Plants*, Nova Zelândia); LMG (*Laboratorium voor Microbiologie*, Bélgica).

4.2 Reativação das linhagens bacterianas

As linhagens de *Xanthomonas* preservadas por liofilização e/ou ultracongelamento (- 80 °C) foram reativadas de modo que, na reativação de linhagens preservadas por liofilização, as ampolas foram desinfetadas externamente com algodão umedecido em álcool 70%, abertas, hidratadas com água destilada esterilizada e incubadas por cerca de 30 minutos. Uma alíquota dessa suspensão foi semeada em placa de Petri contendo o meio de cultura adequado para o cultivo das linhagens. Para linhagens preservadas por ultracongelamento, uma alíquota de crescimento bacteriano foi retirada dos criotubos com o auxílio de uma alça descartável (10 µL) e transferida para placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 3-7 dias.

4.3 Meios de cultura e condições de cultivo

Para os isolamentos, manutenção de culturas e obtenção de populações bacterianas foram utilizados diferentes meios de cultivo, de acordo com a linhagem estudada. As linhagens Tipo e Patotipo de *Xanthomonas* foram cultivadas em meio NA (LEVINE, 1954) e incubadas a 28 °C por 48-72 horas. As linhagens de *X. albilineans* e *X. fragariae*, foram cultivadas em meio YSG (DYE, 1962) e incubadas a 28 °C por 5-7 dias.

Nos isolamentos realizados a partir de lesões de folhas de jenipapeiro em meio NA não se observou crescimento de bactérias fitopatogênicas, entretanto, quando se utilizou o meio YSG, houve aparecimento dessas bactérias. Outros quatro meios de cultura foram testados a fim de se avaliar o crescimento das linhagens isoladas de jenipapeiro, sendo eles: DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986), GYCA (DYE, 1962), YDC (WILSON; ZEITOUN; FREDRICKSON, 1967) e 523 (KADO; HESKETT, 1970). A composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento bacteriano e na realização dos testes bioquímicos e fisiológicos é apresentada nos Anexos A e B.

4.4 Caracterização bioquímica e fisiológica

A caracterização bioquímica e fisiológica das linhagens de *Xanthomonas* foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Schaad, Jones e Chun (2001). Diferentes linhagens bacterianas foram utilizadas como controles para os testes descritos a seguir. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.4.1 Produção de catalase

Catalase é uma enzima capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio livre e água, estando presente na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. Sua função é remover o H_2O_2 tóxico resultante de processos de oxidação-redução envolvendo oxigênio. Para a realização deste teste, as bactérias foram cultivadas em meio que não continha sangue em sua composição (já que os eritrócitos contêm catalase e podem dar uma reação falso-positiva ao teste), sendo utilizado o meio YSG (Anexo A). Com o auxílio de uma alça de platina colocou-se uma pequena quantidade de cultura bacteriana a ser analisada sobre uma lâmina de vidro. Em seguida, cobriu-se o local com uma gota de água oxigenada 10 volumes. Bactérias que produzem a enzima catalase

decompõem o H_2O_2 , resultando numa reação de desprendimento de bolhas. A linhagem *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (IBSBF 703) foi utilizada como controle positivo para esse teste.

4.4.2 Teste de oxidase

A oxidase é um teste diferencial importante na identificação de bactérias que permite determinar a presença ou ausência de atividade de oxidase no citocromo C quando em contato com um reagente. Para a realização deste teste, adotou-se o método de Kovacs (1956). Algumas gotas de uma solução aquosa a 1% de N-N-dimetil-p-fenilenediamino, recém preparada e mantida no escuro, foram depositadas em um pedaço de papel filtro. Essa solução foi preparada no momento de uso, devido ao fato do reagente se decompor em contato com a luz. Com o auxílio de uma alça de platina, coletou-se uma quantidade da cultura bacteriana a ser testada, transferindo-a para o papel de filtro embebido com a solução. A leitura foi realizada em até 15 segundos após a colocação da cultura em contato com o reagente. O teste é considerado positivo quando na mistura do reagente com a massa bacteriana desenvolve-se a cor vermelho escuro em até um minuto. Na reação negativa não há desenvolvimento de cor. Os organismos que contêm o citocromo C como parte de sua cadeia respiratória são positivos para a oxidase, tornando o reagente vermelho escuro; os que não possuem o citocromo C como parte de sua cadeia respiratória e, portanto negativos para a oxidase, não oxidam o reagente, deixando-o incolor. A linhagem *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (IBSBF 533) foi utilizada como controle positivo para esse teste.

4.4.3 Produção de gás sulfídrico (H_2S) a partir de cisteína

A produção de H_2S resulta da decomposição de compostos orgânicos que contenham enxofre (cistina e cisteína) ou da redução de compostos inorgânicos que contenham enxofre (sulfito), podendo assim reagir com metais pesados como o chumbo. Para a realização deste teste adotou-se a metodologia descrita por Dye (1962) utilizando o meio YSG líquido, ao qual foi acrescentado 0,01% de cisteína. O meio, após autoclavagem, foi distribuído em tubos de ensaio previamente esterilizados e uma fita de papel de filtro impregnada de acetato de chumbo, também previamente esterilizada, foi presa à boca dos tubos após

inoculação com as suspensões bacterianas, de modo a ficar suspensa. Tais fitas foram preparadas cortando-se o papel de filtro em tiras e passando-os em uma solução saturada de acetato de chumbo. Após total absorção, as fitas foram retiradas da solução e colocadas em um suporte de vidro para secagem. A produção de H₂S foi demonstrada pelo escurecimento da tira de papel de filtro impregnada com acetato de chumbo suspensas sobre o meio (reação positiva); a ausência do escurecimento evidencia uma reação negativa. A linhagem *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IBSBF 1913) foi utilizada como controle positivo para esse teste.

4.4.4 Produção de acetoína

Este teste objetivou detectar a presença de acetoína (acetilmetil-carbinol), substância formada a partir de fermentação da glicose. Utilizou-se a metodologia descrita por Dye (1962). As linhagens bacterianas foram cultivadas em tubos de ensaio com meio YSG líquido acrescidos de glicose na concentração de 5 g/L e incubadas em estufa por sete dias. A detecção de acetoína no meio foi realizada acrescentando-se a cada 1 mL de cultura 0,6 mL de alfa-naftol 5% (v/v) em álcool absoluto e 0,2 mL de solução aquosa de KOH 40% (v/v). Os tubos foram agitados vigorosamente e a leitura dos testes realizada após duas horas, mantendo-se os tubos no escuro. Resultados positivos foram indicados pela alteração da coloração do meio para avermelhado após o tempo de incubação.

4.4.5 Redução de nitrato a nitrito

O teste de redução de nitrato a nitrito foi realizado em meio líquido conforme descrito no Anexo 3. As suspensões bacterianas das diferentes linhagens foram acrescentadas ao meio e incubadas em estufa bacteriológica por sete dias. Após o período de incubação, a cada tubo de ensaio foi adicionado igual volume do reagente de Follet-Ratcliff [ácido acético glacial (50 mL), água destilada (360 mL), ácido sulfanílico (0,25 g), alfa-naftol (0,2 g), solução aquosa de amônia 0,88 a 10% (v/v) (90 mL) (LELLIOTT; STEAD, 1987)]. O desenvolvimento de uma coloração de alaranjada a amarronzada após o período de 10 minutos indicou a presença de nitrito. Em casos de ausência de coloração dentro do período estabelecido, acrescentou-se uma pequena quantidade de pó de zinco ao tubo, agitou-se e aguardaram-se mais 10 minutos. O aparecimento da coloração alaranjada demonstrou que

o nitrato existente reagiu com o metal, indicando um resultado negativo. A não visualização de mudança de coloração mostrou a ausência de nitrato no meio, indicando a ocorrência de desnitrificação, portanto, um resultado positivo. Um tubo controle não inoculado também foi utilizado, apresentando a coloração alaranjada quando da presença do metal.

4.4.6 Produção de urease

A atividade de produção de urease, enzima que decompõe a ureia em amônia e dióxido de carbono, foi avaliada pelo método descrito por Dye (1962). O meio basal utilizado para este teste foi o YSG líquido, com concentração de extrato de levedo reduzida a 0,1% e acrescido de vermelho de cresol 0,0016 % (v/v). Uma solução aquosa de ureia a 20%, previamente esterilizada por filtração, foi acrescentada ao meio basal a fim de se obter uma concentração final de 2%. O meio foi distribuído em tubos de ensaio esterilizados. Devido à presença de extrato de levedura no meio foi necessária também a utilização de tubos controle compostos pelo meio basal acrescido de ureia não inoculado com a bactéria e pelo meio basal sem ureia e inoculado com a linhagem bacteriana. A produção de urease e hidrólise de ureia resultam na produção de amônia, conseqüentemente aumentando o pH do meio e mudando sua coloração amarelada para rosa. Na prova negativa não há alteração da cor do meio. A linhagem *Burkholderia andropogonis* (IBSBF 165) foi utilizada como controle positivo para esse teste.

4.4.7 Hidrólise de amido

O amido é um polissacarídeo constituído por dois tipos de moléculas, a amilose e a amilopectina, que são rapidamente hidrolisadas por algumas bactérias que utilizam a enzima α -amilase na liberação de diversos produtos como dextrinas, glicose e maltose. Para se testar a produção de amilase, todas as linhagens bacterianas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio basal YSG com adição de amido solúvel na concentração de 2% e mantidas em estufa a 28 °C por 5-7 dias. Após esse período, as placas foram cobertas com solução de lugol [iodo (1,0 g), iodeto de potássio (2,0 g), água destilada (q.s.p. 300 mL)]. O aparecimento de uma descoloração ao redor das colônias, em contraste com a coloração escura do restante do meio, indica que houve a hidrólise de amido. Por outro lado, a ausência do halo descolorido ao redor das colônias aponta que o amido não foi hidrolisado e

a α -amilase não foi produzida pela bactéria. A linhagem *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IBSBF 1913) foi utilizada como controle positivo para esse teste.

4.4.8 Hidrólise de gelatina

A produção de gelatinase foi avaliada pelo método descrito por Lelliott e Stead (1987), sendo a composição do meio basal utilizado descrita no Anexo 4. O objetivo deste teste foi determinar a capacidade do micro-organismo excretar a gelatinase, enzima hidrolítica extracelular capaz de degradar a gelatina. A liquefação da gelatina foi determinada inoculando-se a bactéria por picada no meio de cultura colocado em tubo de ensaio. Após o período de incubação a 28 °C por sete dias, os tubos foram colocados em um recipiente contendo água previamente resfriada a 4 °C e deixados em geladeira por aproximadamente dez minutos até atingir a mesma temperatura. Linhagens bacterianas que produzem a enzima gelatinase hidrolisam a gelatina e o meio de cultura permanece líquido durante o período em que permanecer num recipiente com água a 4 °C (reação positiva). Caso a bactéria não produza a enzima, o meio ficará sólido durante o mesmo período (reação negativa). A linhagem *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (IBSBF 1197) foi utilizada como controle positivo para esse teste.

4.4.9 Produção de ácidos a partir de carboidratos e fontes de carbono relacionadas

A avaliação da utilização de fontes de carbono foi efetuada empregando-se o meio básico C (DYE, 1968), distribuído assepticamente em tubos de ensaio após autoclavagem a 121 °C / 20 min. / 1 atm. Todos os carboidratos e fontes de carbono foram esterilizados separadamente por filtração (membrana 0,22 μ m) e adicionados ao meio básico previamente esterilizado, para dar uma concentração final de 0,4% (v/v). Foram testadas as seguintes fontes de carbono: adonitol, D (-) arabinose, L (+) arabinose, celobiose, galactose, dulcitol, D (-) frutose, glucose, inositol, D (+) manose, alfa-metil-D-glicoside, ramnose, sorbitol, sacarose, salicina e inulina. As leituras foram efetuadas após 2, 4, 7, 14 e 21 dias da inoculação no meio de cultivo. As linhagens *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IBSBF 1913) e *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^P) foram utilizadas como controle para esses testes.

4.4.10 Utilização de sais de ácidos orgânicos

Os testes de utilização de sais de ácidos orgânicos foram efetuados em meio básico OAA modificado (WILKIE, 1973) distribuído assepticamente em tubos de ensaio após autoclavagem a 121 °C / 20 min. / 1 atm. Os sais de ácido orgânico foram esterilizados separadamente por filtração (membrana 0,22 µm) e adicionados ao meio básico em uma concentração final de 0,2% (v/v). Foram testados os seguintes sais sódicos: acetato, benzoato, citrato, gluconato, lactato, malato, oxalato, propionato, succinato e tartarato. As leituras foram efetuadas após 2, 4, 7, 14 e 21 dias da inoculação no meio de cultivo. As linhagens *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IBSBF 1913) e *Xanthomonas vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^P) foram utilizadas como controle para esses testes.

4.4.11 Utilização de aminoácidos

Os testes de utilização de aminoácidos foram efetuados em meio básico OAA modificado (WILKIE, 1973). Os aminoácidos, preparados como soluções aquosas, foram previamente esterilizados por filtração (membrana 0,22 µm) e adicionados para dar uma concentração final de 0,2% (v/v) ao meio básico previamente autoclavado a 121 °C / 20 min. / 1 atm. Foram testados os seguintes aminoácidos: D(-) alanina, L(-) alanina, L(-) ácido aspártico, L (-) ácido glutâmico, L(-) asparagina, betaina, L(-) fenilalanina, L(-) histidina, L(-) leucina, L(-) ornitina, L(-) prolina, L(-) serina, L(-) treonina e L(-) valina. As leituras foram realizadas após 2, 4, 7, 14 e 21 dias da inoculação no meio de cultivo. As linhagens *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IBSBF 1913) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T) foram utilizadas como controle para esses testes.

4.5 Crescimento em meio de cultura com diferentes condições de temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura no crescimento das culturas bacterianas, 100 µL de suspensão bacteriana das diferentes linhagens isoladas de jenipapeiro na concentração de 10⁶ UFC/mL foram acrescentadas separadamente em tubos de ensaio contendo meio YSG líquido (sem adição de ágar) pH 7,0. Os tubos foram incubados em banho-maria em estufas bacteriológicas tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), previamente

ajustadas às temperaturas de 7, 12, 17, 22, 27, 32, 37 e 42 °C, por um período de 15 dias. Tubos não inoculados foram utilizados como controle. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez do meio de cultivo. Dos tubos que apresentaram turbidez foram realizadas transferências para placas de Petri com meio YSG e/ou NA, mantidas a 28 °C, para comprovar a autenticidade das linhagens bacterianas.

4.6 Crescimento em meio de cultura com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH 4,0; 7,0; 8,0 ou 9,0)

O crescimento das linhagens isoladas de jenipapeiro em meio de cultura (YSG líquido) deu-se pelo acréscimo de 100 µL de suspensão bacteriana na concentração de 10⁶ UFC/mL das linhagens em tubos de ensaio contendo o meio nas diferentes condições de pH (4,0; 7,0; 8,0 ou 9,0). Para a obtenção dos valores de pH testados, o meio foi ajustado com NaOH ou HCl 1M. Os tubos foram incubados em estufa a 28 °C por 14 dias. Tubos não inoculados contendo o meio em pH 7,0 foram utilizados como controle. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez do meio de cultivo. Dos tubos que apresentaram turbidez foram realizadas transferências para placas de Petri com meio YSG e/ou NA, mantidas a 28 °C, para comprovar a autenticidade das linhagens bacterianas.

4.7 Crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl)

Para o teste de tolerância à salinidade utilizou-se o meio YSG líquido distribuído em tubos de ensaio com diferentes concentrações de NaCl (0,5%, 1%, 2% ou 3%) ao qual acrescentou-se 100 µL de suspensão bacteriana na concentração de 10⁶ UFC/mL das diferentes linhagens isoladas de jenipapeiro. Os tubos foram incubados em estufa a 28 °C e a turbidez do meio de cultivo foi observado por um período de 14 dias. Tubos contendo o meio sem adição de NaCl inoculados com a bactéria foram utilizados como controle. Tubos de ensaio contendo apenas o meio de cultura nas diferentes concentrações de NaCl, sem a suspensão bacteriana também foram utilizados. Dos tubos que apresentaram turbidez foram realizadas transferências para placas de Petri com meio YSG e/ou NA, mantidas a 28 °C, para comprovar a autenticidade das linhagens bacterianas.

4.8 Extração de DNA cromossômico

A extração do DNA cromossômico das linhagens de *Xanthomonas* sp. e linhagens Tipo e Patotipo do gênero *Xanthomonas* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pitcher, Saunders e Owen (1989), com algumas modificações.

Após o surgimento de colônias típicas para cada espécie em placas com meio de cultivo, selecionou-se uma colônia isolada e com o auxílio de uma alça plástica descartável, a mesma foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido apropriado. O material inoculado foi incubado a 28 °C por cerca de 12 a 16 horas, sob agitação constante de 150 rpm (New Brunswick Classic C25KC Refrigerated incubator shaker). Parte da suspensão foi transferida para microtubos e centrifugada a 12000 rpm em centrífuga (Minispin – Eppendorf) por dois minutos. Descartou-se o sobrenadante em um béquer com álcool e repetiu-se o procedimento até que todo o conteúdo do tubo fosse centrifugado. O sedimento foi então suspenso em 100 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA) contendo 2 mg/mL de lisozima, homogeneizado com o auxílio de agitador de tubos e incubou-se em banho maria a 37 °C por uma hora. Após este período, foram adicionados 500 µL de solução de tiocianato guanidina 5 M, agitou-se o tubo brevemente e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por cinco a dez minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M e os microtubos foram invertidos por várias vezes. Estes foram incubados no gelo por dez minutos. Após, foram adicionados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v). Os tubos foram agitados manualmente até homogeneização das soluções e a seguir, centrifugados a 12.000 rpm por dez minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 0,54 volume (cerca de 450 µL) de isopropanol gelado para precipitar o DNA. Os tubos foram invertidos vagarosamente por várias vezes até a visualização de um precipitado fibroso branco. Centrifugou-se novamente a 12000 rpm por dois minutos. Os sedimentos foram então lavados com etanol 70% (v/v) por duas vezes para a remoção de possíveis resíduos centrifugados a 12000 rpm por um minuto. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e posteriormente dissolvido em 200 µL de TE pH 8,0, adicionando-se 2 µL de RNase A (10 mg/mL) com posterior incubação por uma hora a 37 °C. Adicionou-se então 1 volume (240 µL) de clorofórmio-álcool isoamílico após a adição de 40 µL de cloreto de lítio 8 M. As fases foram misturadas manualmente até a emulsificação. Centrifugou-se novamente a 12000 rpm por dez minutos e em seguida a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 400 µL de etanol gelado, os tubos foram misturados por inversão e centrifugados a 12000 rpm por dois minutos. Os

sedimentos foram então lavados com etanol 70% por duas vezes. O DNA foi suspenso em volume de 20 a 50 μL de água Milli-Q e estocado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

A pureza e quantificação do DNA das amostras foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 0,6%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultra-violeta e fotografados em sistema digital Alpha

4.9 Amplificação por PCR dos diferentes genes

Nesse estudo foram analisados o gene ribossomal 16S e parte dos genes *atpA* (unidade alfa da ATP sintase), *dnaK* (chaperonina RNA polimerase), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase) e *rpoD* (subunidade Sigma da RNA polimerase) amplificados por meio da utilização de diferentes pares de *primers* descritos em estudos desenvolvidos por Lane (1991), Ramos (2007), Young e colaboradores (2008), Ramos e colaboradores (2011) e Ferreira-Tonin e colaboradores (2012) (Tabela 3).

Os experimentos de amplificação foram realizados preparando-se reações de 25 μL contendo 200 ng de DNA cromossômico, 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 1X tampão da enzima; 1,5 mM de MgCl_2 , 1X BSA (*Bovine Serum Albumine*) 10 mg/mL; 0,4 μM de uma mistura de dNTPs e 0,4 μM de cada *primer*. As amplificações foram realizadas em termociclador MyCycler (Bio-Rad) ou Axygen Maxygene. Quando necessário, as concentrações dos reagentes e os programas de amplificação foram padronizados por meio de experimentos de gradiente de temperatura de anelamento e testes com variações nas quantidades dos reagentes utilizados nas reações. As regiões amplificadas, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos estão descritos na Tabela 4.

Os produtos de amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultra-violeta e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

Nesse experimento foi utilizado como controle positivo DNA da linhagem Tipo da espécie *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T) e como controle negativo, uma

alíquota contendo todos os componentes preparados para a reação, menos o DNA molde, submetido às mesmas condições de temperatura.

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados neste estudo

Gene	Código	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')*	N°. nucleotídeos	Referência
RNAr 16S	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	20	Lane (1991)
	1525R	AGG GAG GTG WTC CAR CC	17	Lane (1991)
<i>atpA</i>	atpA3F	CGC ATC CTB GAR GTK CCG	18	Ramos et al. (2011)
	atpA7R	GCR CGC TCS AGC ARR CG	17	Ramos et al. (2011)
<i>dnaK</i>	dnaK1F	GGT GGA AGA CCT GGT CAA GA	20	Young et al. (2008)
	dnaK1R	TCC TTG ACY TCG GTG AAC TC	20	Young et al. (2008)
<i>gyrB</i>	gyrB1F	ACG AGT ACA ACC CGG ACA A	19	Young et al. (2008)
	gyrB1R	CCC ATC ARG GTG CTG AAG AT	20	Young et al. (2008)
<i>recA</i>	recA5F	GGY GAG ATG GGM GAY CAG	18	Ramos et al. (2011)
	recA7R	TTK CCY TGS CCG ATS CGC TC	20	Ramos et al. (2011)
<i>rpoA</i>	rpoA1F	TCG AWG GBB TDC AGG AAG A	19	Ramos (2007)
	rpoA3R	GGC GGC CAR TTV TCS AR	17	Ramos (2007)
<i>rpoB</i>	rpoB2F	TCA AGG AGC GTC TGT CGA T	19	Ferreira-Tonin et al. (2012)
	rpoB3R	TCT GCC TCG TTG ACC TTG A	19	Ferreira-Tonin et al. (2012)
<i>rpoD</i>	rpoD1F	TGG AAC AGG GCT ATC TGA CC	20	Young et al. (2008)
	rpoD1R	CAT TCY AGG TTG GTC TGR TT	20	Young et al. (2008)

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

Tabela 4 - Pares de *primers*, regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos, concentrações de reagentes e programas de amplificação utilizados nos experimentos de PCR.

Pares de <i>primers</i>	Região amplificada/ Especificidade	Fragmento (pb)	<i>primers</i> (μ M)	dNTPs (mM)	Enzima (U/reação)	Programas de Amplificação
27S / 1525 R	gene ribossomal 16S	1500	0,4	0,2	2,0	95 °C/ 2 min; 30X (94 °C/ 1 min, 55 °C/ 1 min, 72 °C/ 3 min); 72 °C/ 3 min
atpA3F/ atpA7R	parte do gene <i>atpA</i>	600	0,5	0,2	4,0	94 °C/ 2 min; 35X (94 °C/ 30 seg, 61 °C/ 1 min, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 5 min
dnaK1F/ dnaK1R	parte do gene <i>dnaK</i>	940	0,5	0,2	2,0	94 °C/ 3 min; 30X (94 °C/ 30 seg, 54 °C/ 30 seg, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 10 min
gyrB1F/ gyrB1R	parte do gene <i>gyrB</i>	865	0,5	0,2	2,0	94 °C/ 3 min; 30X (94 °C/ 30 seg, 54 °C/ 30 seg, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 10 min
recA5F/ recA7R	parte do gene <i>recA</i>	400	0,5	0,2	2,0	94 °C/ 2 min; 35X (94 °C/ 30 seg, 65 °C/ 30 seg, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 5 min
rpoA1F/ rpoA3R	parte do gene <i>rpoA</i>	700	0,5	0,2	3,0	94 °C/ 2 min; 35X (94 °C/ 30 seg, 58 °C/ 30 seg, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 5 min
rpoB2F/ rpoB3R	parte do gene <i>rpoB</i>	800	0,4	0,2	2,0	94 °C/ 2 min; 35X (94 °C/ 30 seg, 63 °C/ 30 seg, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 5 min
rpoD1F/ rpoD1R	parte do gene <i>rpoD</i>	875	0,5	0,2	2,0	94 °C/ 3 min; 30X (94 °C/ 30 seg, 54 °C/ 30 seg, 72 °C/ 1 min); 72 °C/ 10 min

pb : pares de bases ; **U** : unidade

4.10 Sequenciamento dos marcadores moleculares analisados

Os produtos de amplificação correspondentes ao gene ribossomal 16S e as partes dos genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*; *recA*, *rpoA*; *rpoB* e *rpoD* das linhagens de *Xanthomonas* foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento. Após as purificações, os DNAs foram quantificados em gel de agarose 1%.

As reações de sequenciamento foram efetuadas utilizando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems), empregando-se os mesmos *primers* da amplificação por PCR (Tabela 2) e as purificações das reações foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante do kit. As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no sequenciador automático, marca Applied Biosystems-Hitachi, modelo ABI Prism 3700 DNA Analyzer. O sequenciamento foi efetuado no Laboratório de Sequenciamento e Genotipagem do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Campinas, SP.

4.11 Hibridização DNA-DNA

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

4.11.1. Formato Slot-blotting

Os DNAs a serem transferidos para as membranas de nitrocelulose, cerca de 200 ng, foram fervidos em tampão TE (1M pH 8) por 10 minutos para desnaturação e transferidos imediatamente para o gelo. Posteriormente, adicionou-se 1 volume de tampão SSC 20X (citrato de sódio 0,3 M; NaCl 3 M) às amostras desnaturadas que permaneceram no gelo. A membrana de nitrocelulose foi lavada em tampão SSC 10X e colocada no sistema de *Slot-blotting*. Um volume de 0,5 mL de SSC 10X foi aplicado em cada canaleta do *slot* para lavagem. Após a lavagem, 200 ng das amostras de DNA foram aplicadas e transferidas para a membrana por meio de bomba de vácuo. As canaletas 1A e 1B foram utilizadas como controle positivo, contendo o DNA da linhagem utilizada como sonda.

Depois de todo o volume das amostras ter sido transferido para a membrana, foram adicionados 0,5 mL de tampão SSC 10X para lavagem das canaletas e ao final, a bomba ficou ligada por mais 5 minutos para secagem da mesma. A membrana foi retirada e colocada sobre papel de filtro umedecido com solução de desnaturação (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por 20 minutos. Posteriormente, a membrana foi transferida para papel de filtro umedecido com solução de neutralização (NaOH 20 mM; acetato de amônio 1 M) por 10 minutos, colocada sobre papel de filtro e queimada por 2 horas a 80 °C em forno de hibridização. Foram preparadas três membranas para a hibridização DNA-DNA (três repetições) e uma membrana para a hibridização utilizando-se como sonda o gene ribossomal 16S.

4.11.2. Marcação não radioativa da sonda

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

4.11.3. Hibridização

Foram adicionados aproximadamente 200 µL de solução de pré-hibridização (tampão SSC 5X; N-laurilsarcosina 0,1%; SDS 0,02%; formamida 50%, agente bloqueador 2%) para cada cm² de membrana. A membrana foi embebida em solução SSC 6X até completa hidratação e transferida para uma garrafa de hibridização. Adicionou-se a solução de hibridização e incubou-se por quatro horas sob leve agitação a 68 °C (pré-hibridização).

Após este período, a sonda foi desnaturada em banho-maria fervente por 5 minutos, e transferida imediatamente para o gelo. Nova solução de hibridização foi adicionada às garrafas contendo as membranas a serem hibridizadas. Em seguida, adicionou-se a sonda e incubou-se durante a noite a 68 °C, sob leve agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em SSC 2X e SDS 0,1% à temperatura ambiente, num volume suficiente para cobri-las. Em seguida foram realizadas duas lavagens de 15 minutos em SSC 0,1X e SDS 0,1% a 68 °C sob constante agitação.

4.11.4. Detecção

Depois das lavagens, as membranas foram incubadas por 5 minutos em tampão de ácido maleico (ácido maleico 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M). Em seguida foram incubadas por 30 minutos em 100 mL de solução bloqueadora 1%. O anticorpo conjugado anti-DIG-AP foi diluído para 75 Um/mL (1:10000) em solução bloqueadora, adicionado às membranas e incubado por 30 minutos, sob baixa rotação. Após este período, foram efetuadas duas lavagens de 15 minutos com 100 mL de tampão de ácido maleico. As membranas foram então equilibradas por 5 minutos em 50 mL de tampão de detecção (Tris-HCL 10 mM pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 10 mM). O substrato quimioluminescente CSPD foi diluído (1:100) em 10 mL do tampão de detecção e adicionado às membranas. Após incubação de 5 minutos as membranas foram colocadas em sacos plásticos, seladas e expostas a filmes de raio-X por aproximadamente 10 minutos.

4.11.5. Análise dos resultados

Após a revelação, os filmes foram digitalizados (*scanner*) e a leitura dos sinais de hibridização foi realizada com a utilização do programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (DC120). Nas análises, a membrana hibridizada com a sonda correspondente ao gene ribossomal 16S (similaridade deste gene é de aproximadamente 100% no gênero *Xanthomonas*) foi utilizada para a normalização das quantidades de DNA, uma vez que o cálculo das concentrações de DNAs a serem transferidos para as membranas foi baseado em comparação visual com o DNA do fago lambda. O sinal correspondente ao controle da sonda foi considerado como controle positivo da hibridização (100% de homologia). Por exemplo, se a leitura da banda para a linhagem utilizada como

sonda (controle) foi 18,66 de intensidade, valor fornecido pelo programa de leitura, assumiu-se que ela continha 200 ng de DNA hibridizado, ou seja, 100% de hibridização DNA-DNA. Todas as outras leituras foram normalizadas com este controle, sendo que a porcentagem de homologia foi determinada por regra de três, a partir dos valores de intensidade gerados pelo programa. Linhagens que exibem, sob condições controladas de ensaio, valores de homologia superiores a 70% em seus genomas são consideradas como sendo da mesma espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

4.12 Análise das sequências por MLSA

Nas análises de multilocus foram utilizadas sequências dos genes *housekeeping* (*atpA*, *dnaK*, *gyrB*; *recA*, *rpoA*; *rpoB* e *rpoD*) das linhagens de *Xanthomonas* sp., assim como sequências dos mesmos genes de *Stenotrophomonas malthophilia*, utilizada como grupo externo, disponíveis na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências dos diferentes genes foram editadas, concatenadas e alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). Posteriormente foram construídas árvores filogenéticas utilizando-se o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para prover suporte aos ramos das árvores filogenéticas obtidas, estimando a sua consistência interna. A partir dos dados de alinhamento também foram construídas matrizes de similaridade das sequências, utilizando o parâmetro Kimura 2 de correção (KIMURA, 1980), por meio do programa MEGA 5.

4.13. Avaliação da patogenicidade em diferentes espécies de plantas hospedeiras

Os experimentos de patogenicidade foram efetuados em etapas, sendo inoculadas plantas de jenipapo e de outras plantas da família Rubiaceae, como café, ixora e gardênia. Para avaliação de possível abrangência da faixa de hospedeiros, espécies de plantas de famílias botânicas sem nenhuma relação com a família Rubiaceae também foram inoculadas artificialmente, sendo estas: feijão (*Phaseolus vulgaris*), maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), morango (*Fragaria* hib.), soja (*Glycine max*) e tomate (*Solanum lycopersicum*).

Os ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação do Centro Experimental Central do Instituto Biológico, nas dependências do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, em Campinas/SP. As plantas selecionadas foram cultivadas em vasos, cada qual com duas mudas. Plantas contendo pelo menos quatro pares de folhas verdadeiras expandidas foram inoculadas com suspensões aquosas bacterianas obtidas de cultivo em meio YSG, na concentração de 10^8 UFC/mL ($\lambda = 550$ nm; T = 55 %), preparadas em solução salina 0,85%. As inoculações foram efetuadas por aspensão da suspensão bacteriana, até o escorrimento, em folhas previamente feridas por agulhas múltiplas esterilizadas. Plantas controle foram inoculadas da mesma forma utilizando, apenas solução salina. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em câmara úmida, com o auxílio de sacos de polietileno fechados, durante 48-72h, de modo a promover as condições adequadas ao processo de infecção (Figura 1). As observações sobre a ocorrência ou não da infecção e colonização por meio da expressão de sintomas característicos nas plantas foram efetuadas diariamente até o período de 21 dias após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído por nove tratamentos, referentes às linhagens bacterianas estudadas, e seis repetições, sendo cada repetição representada por uma muda de cada espécie.

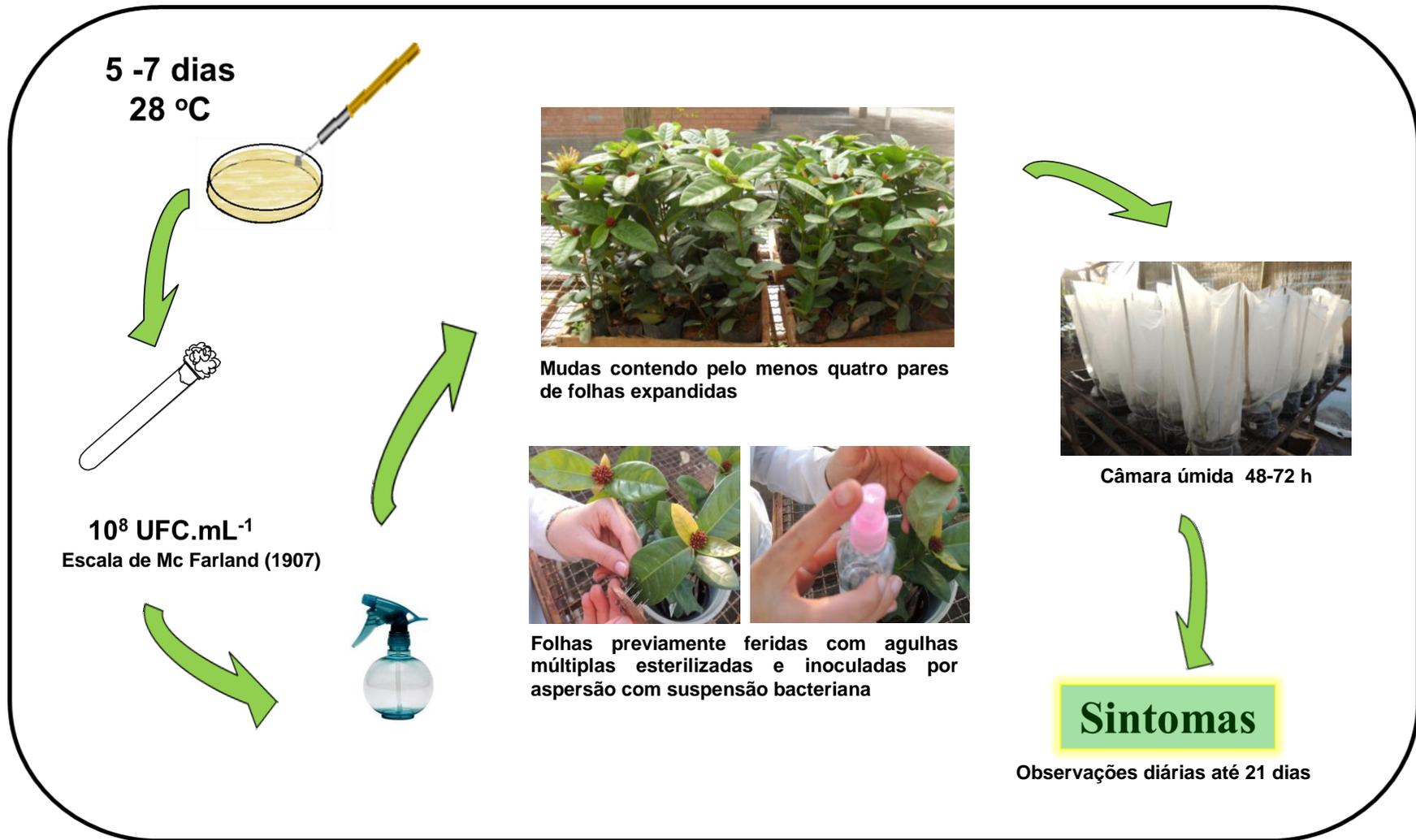


Figura 1. Esquema utilizado para a avaliação da patogenicidade em diferentes plantas hospedeiras inoculadas artificialmente em casa-de-vegetação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento das linhagens de jenipapeiro em diferentes meios de cultura

Observações realizadas após o período de 5-7 dias do plaqueamento dos isolados no meio de cultura demonstraram que as linhagens apresentaram crescimento mais vigoroso, mantendo constantes as características de forma e coloração, quando utilizado o meio YSG (Figura 2A). Utilizando os meios GYCA (Figura 2B) e YDC (Figura 2C) observou-se um crescimento moderado da bactéria. Já nos meios DYGS (Figura 3A) e 523 (Figura 3B) o crescimento das linhagens foi quase nulo.

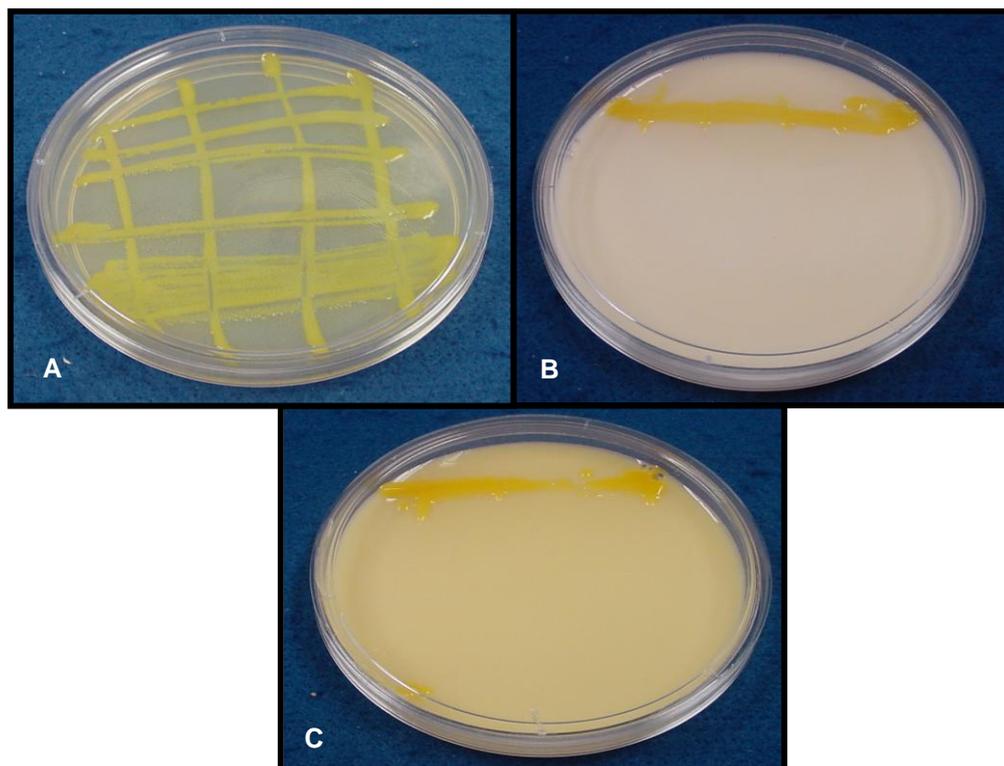


Figura 2 – Crescimento bacteriano das linhagens de jenipapeiro em diferentes meios de cultura. **(A)** YSG; **(B)** GYCA e **(C)** YDC.

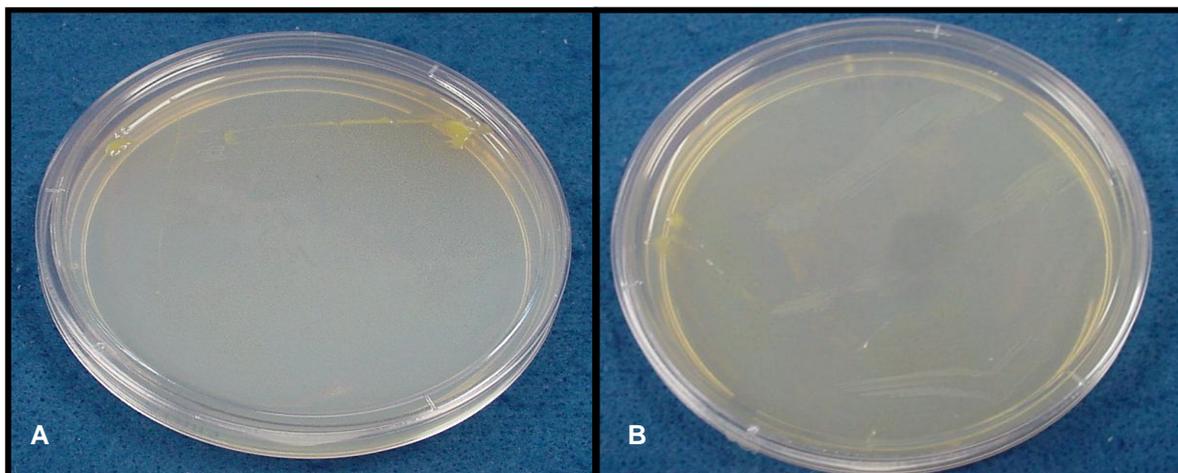


Figura 3 – Crescimento bacteriano das linhagens de jenipapeiro em diferentes meios de cultura. (A) DYGS e (B) 523.

Sendo assim, as linhagens isoladas do jenipapeiro foram cultivadas em meio YSG, onde se apresentaram com as características culturais pertinentes às descritas na literatura para o gênero *Xanthomonas*, como colônias com formato circular, arredondada, bordos inteiros e lisos, de coloração amarela, convexas e viscosas.

5.2 Caracterização bioquímica e fisiológica

5.2.1 Produção de catalase

Todas as linhagens de *Xanthomonas* isoladas de jenipapeiro mostraram resultados positivos para este teste, observando-se o desprendimento de bolhas de oxigênio com a adição de água oxigenada sobre o esfregão das culturas bacterianas (Figura 4).



Figura 4 – Reação de catalase: desprendimento de bolhas formadas pelo oxigênio molecular liberado na reação, indicando resultado positivo.

5.2.2 Teste de oxidase

Nos experimentos realizados não foi verificada mudança de coloração do esfregaço em contato com a solução de aquosa incolor de N-N-dimetil-p-fenilenediamino para nenhuma das linhagens de *Xanthomonas* isoladas de jenipapeiro e, portanto, os resultados foram considerados negativos (Figura 5).



Figura 5 – Produção de oxidase: ausência de mudança de cor do esfregaço em contato com N-N-dimetil-p-fenilenediamino para vermelho escuro após 15 segundos, indicando resultado negativo.

5.2.3 Produção de gás sulfídrico (H_2S) a partir de cisteína

O resultado do teste de produção de gás sulfídrico foi positivo para todas as linhagens testadas já que, ao final dos sete dias de cultivo, a fita de papel de filtro impregnada com acetato de chumbo apresentou uma coloração escura, reação que ocorre quando o gás sulfídrico produzido pelas linhagens entra em contato com o chumbo (Figura 6).

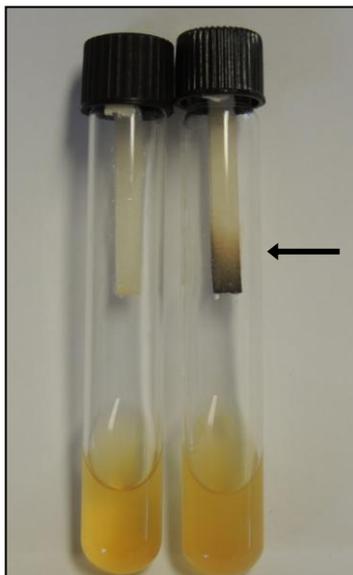


Figura 6 – Produção de gás sulfídrico: escurecimento do papel de filtro (seta) indicando resultado positivo para este teste.

5.2.4 Produção de acetoina

Neste teste, após a adição dos reagentes e agitação, verificou-se uma coloração amarelada; entretanto, não foi observada a produção de acetoina, pois após as duas horas de incubação a temperatura ambiente e no escuro, não houve alteração de cor do meio para a coloração avermelhada, indicando resultado negativo (Figura 7).

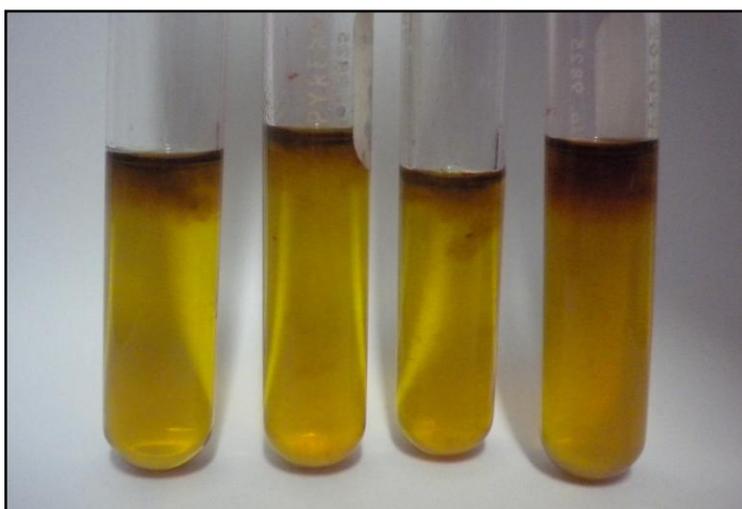


Figura 7 – Produção de acetoina: resultado negativo indicado pela não alteração da cor do meio de cultura de amarelada para avermelhada.

5.2.5 Redução de nitrato a nitrito

O resultado do teste de redução de nitrato a nitrito para as linhagens de *Xanthomonas* patogênicas ao jenipapeiro foi considerado negativo, tendo em vista que o desenvolvimento de uma coloração laranja-amarronzada que seria indicativa da presença de nitrito, não foi observada (Figura 8A). Com a adição de pó de zinco aos tubos observou-se mudança de coloração do meio para laranja, indicando a redução do nitrato existente (Figura 8B).

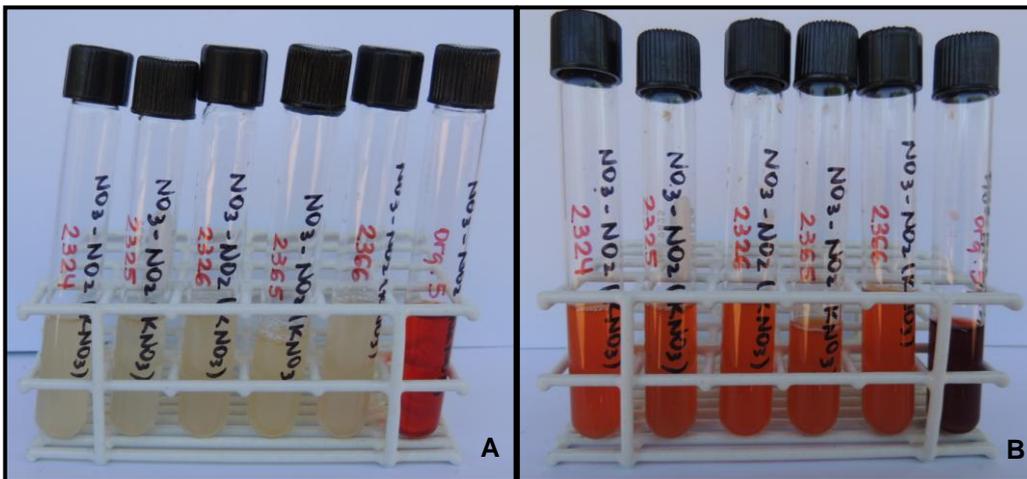


Figura 8 – Teste de redução de nitrato a nitrito realizado para as linhagens de *Xanthomonas* patogênicas ao jenipapeiro

5.2.6 Produção de urease

As linhagens de *Xanthomonas* patogênicas ao jenipapeiro mostraram-se negativas para produção de urease, mantendo o meio com a coloração inicial (amarelada) (Figura 9).



Figura 9 – Produção de urease: alcalinização do meio (tubo à direita) pela degradação da ureia.

5.2.7 Hidrólise de amido

A presença de halos não corados ao redor do crescimento bacteriano demonstrou que todos os isolados de jenipapeiro foram capazes de produzir amilase e consequentemente hidrolisar amido. (Figura 10).



Figura 10 – Formação de halo após adição da solução de lugol em linhagens de *Xanthomonas* patogênicas ao jenipapeiro.

5.2.8. Hidrólise de gelatina

Inicialmente, o teste foi realizado em meio isento de glicose em sua composição, onde não houve crescimento das linhagens estudadas. Tendo em vista que essas linhagens necessitavam obrigatoriamente da glicose para seu crescimento, o teste foi então repetido com a adição de 0,1% e 1% de glicose ao meio. Após a realização dos experimentos verificou-se que a quantidade de glicose utilizada no meio interferia no resultado final obtido com as linhagens isoladas do jenipapeiro. Sendo assim, os resultados obtidos com esse teste não foram conclusivos, já que se modificavam com a quantidade de glicose utilizada.

5.2.9 Produção de ácidos a partir de carboidratos e fontes de carbono relacionadas

Os testes de utilização de carboidratos mostraram a produção de ácidos a partir de meios contendo L (+) arabinose, celobiose, D(-) frutose, galactose, glicose, D(+) manose e sacarose para todos os isolados de jenipapeiro, resultando na acidificação do meio demonstrado pela mudança de coloração do indicador de pH (Figura 11). A reação de produção de ácidos foi negativa para os seguintes carboidratos: adonitol, α -metil-D-glicosídeo, D(-) arabinose, dulcitol, inositol, inulina, ramnose, salicina e sorbitol.



Figura 11 – Produção de ácidos a partir de carboidratos: acidificação do meio C, através da mudança de cor do corante indicador de pH de violeta para amarelo.

5.2.10 Utilização de sais de ácidos orgânicos

Os testes de utilização de sais de ácidos orgânicos mostraram reações positivas para acetato, citrato, lactato, malato, propionato e succinato, resultando na alcalinização do meio demonstrado pela mudança de coloração do indicador (Figura 12) enquanto que com benzoato, gluconato, oxalato e tartarato isso não foi observado.



Figura 12 – Utilização de sais de ácido orgânico: Indicação de alcalinização no meio OAA resultante da mudança de cor de verde-oliváceo (tubo da esquerda) para azul (tubos do meio e da direita).

5.2.11 Utilização de aminoácidos

Os resultados dos testes de utilização de aminoácidos mostraram reações positivas para D(-) alanina, L(-) alanina, L(-) ácido aspártico, L(-) ácido glutâmico, L(-) ornitina, L(-) prolina, L(-) serina, L(-) treonina e L(-) valina, resultando na alcalinização do meio demonstrado pela mudança de coloração do indicador de esverdeada para azul (Figura 13). Os aminoácidos L(-) asparagina, betaina, L(-) fenilalanina, L(-) histidina e L(-) leucina apresentaram reação negativa.



Figura 13 – Alcalinização do meio OAA resultante da utilização de aminoácidos. Tubo à esquerda com a coloração verde-olivácea original (pH 6,8); os dois tubos à direita, com coloração azul, resultante da alcalinização.

5.3. Crescimento em meio de cultura com diferentes condições de temperatura

A temperatura mínima de crescimento para todas as linhagens avaliadas foi de 12 °C. As linhagens apresentaram crescimento no intervalo de 12-37 °C, sendo considerado 27 °C a temperatura ótima de crescimento. As linhagens não apresentaram crescimento às temperaturas de 7 °C ou 42 °C (Figura 14).

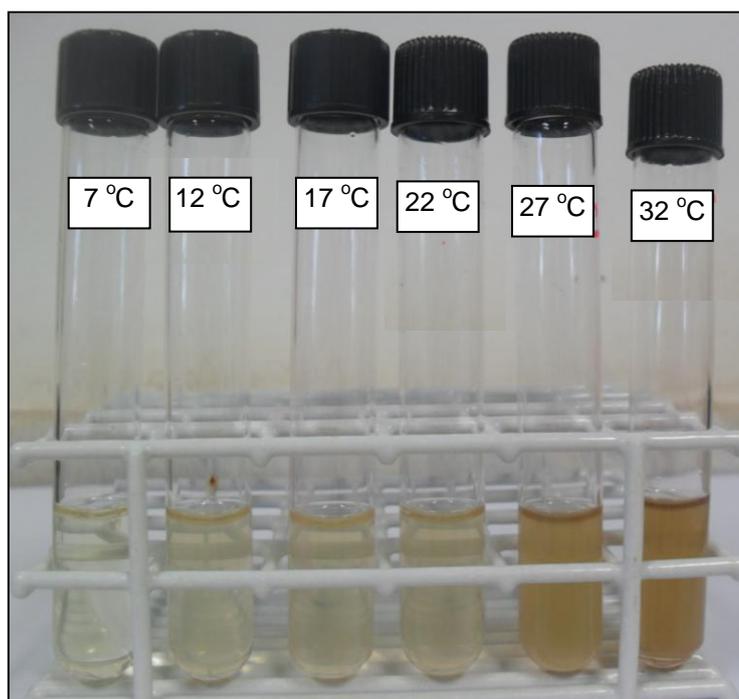


Figura 14: Crescimento bacteriano em diferentes temperaturas das linhagens de *Xanthomonas* isoladas de jenipapeiro utilizadas neste estudo.

Todas as linhagens de *Xanthomonas* isoladas do jenipapeiro apresentaram crescimento nas placas de Petri com meio YSG e resultaram em colônias semelhantes às originais, indicando tratar-se de *Xanthomonas*. Nenhuma delas cresceu em meio NA.

5.4. Crescimento em meio de cultura com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH 4,0; 7,0; 8,0 ou 9,0)

A avaliação do crescimento bacteriano em diferentes valores de pH foi realizada por meio da observação da turbidez do meio de cultivo no tubo. Todas as linhagens analisadas apresentaram crescimento em pH 7 e 8, sendo incapazes de crescer em pH 4 ou 9. O pH 7 foi o que se apresentou como ótimo de crescimento, idêntico ao utilizado no meio YSG selecionado no estudo após realização de testes para se avaliar o melhor crescimento das linhagens isoladas de jenipapeiro.

Todas as linhagens de *Xanthomonas* isoladas do jenipapeiro apresentaram crescimento nas placas de Petri com meio YSG e resultaram em colônias semelhantes às originais, indicando tratar-se de *Xanthomonas*. Nenhuma delas cresceu em meio NA.

5.5 Crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl)

A tolerância ao cloreto de sódio foi observada por meio da turbidez do meio de cultivo no tubo após o período de incubação. Todas as linhagens isoladas de jenipapeiro estudadas apresentaram crescimento bacteriano somente no meio onde não foi adicionado NaCl, sendo incapazes de crescer nas concentrações testadas de 0,5; 1; 2 e 3%.

Já que na composição do meio YSG utilizado para realização de todos os experimentos presentes neste estudo não houve adição de NaCl, o resultado obtido era esperado.

Todas as linhagens de *Xanthomonas* isoladas do jenipapeiro apresentaram crescimento nas placas de Petri com meio YSG e resultaram em colônias semelhantes às originais, indicando tratar-se de *Xanthomonas*. Nenhuma delas cresceu em meio NA.

A Tabela 5 demonstra, de forma resumida, os resultados obtidos nos diversos testes bioquímicos e fisiológicos realizados.

Os resultados obtidos nos testes bioquímicos e fisiológicos mostraram que a bactéria estudada possui as seguintes características: catalase positiva, oxidase negativa, produz H₂S a partir de cisteína, não produz acetoina, não reduz nitrato a nitrito, não produz urease, hidroliza amido, cresce no intervalo de 12-37 °C e em pH 7 e 8 e não cresce em NaCl. Os testes de utilização de carboidratos mostraram a produção de ácidos a partir de meios contendo L(+) arabinose, celobiose, D(-) frutose, galactose, glucose, D(+) manose e sacarose, sendo negativa para adonitol, α-metil-D-glicosídeo, D(-) arabinose, dulcitol, inositol, inulina, ramnose, salicina e sorbitol. Já os testes de utilização de sais orgânicos mostraram reações positivas para acetato, citrato, lactato, malato, propionato e succinato enquanto que com benzoato, gluconato, oxalato e tartarato essas reações não foram observadas. Quanto à utilização de aminoácidos, D(-) alanina, L(-) alanina, L(-) ácido aspártico, L(-) ácido glutâmico, L(-) ornitina, L(-) prolina, L(-) serina, L(-) treonina e L(-) valina apresentaram reações positivas, enquanto para L(-) asparagina, betaina, L(-) fenilalanina, L(-) histidina e L(-) leucina isso não foi observado. Estas características foram comuns a todas as linhagens de jenipapeiro estudadas (IBSBF 2324, 2325, 2326, 2365, 2366, 2367, 2420, 2421, 2433). A comparação dos resultados com os dados obtidos na literatura possibilitou concluir que a bactéria estudada pertence ao gênero *Xanthomonas*.

Os testes de produção de catalase, oxidase, produção de acetoina, redução de nitrato a nitrito, produção de urease e hidrólise de amido apresentaram resultados similares aos relatados por Dye (1962) e por Holt et al. (1994) para os testes de redução de nitrato a nitrito, oxidase e catalase para o gênero.

Um estudo comparativo realizado por Dye (1962) com 209 linhagens de *Xanthomonas* fitopatogênicas de 57 espécies reconhecidas numa tentativa de esclarecer a identificação da espécie por procedimentos laboratoriais demonstrou que os resultados encontrados para o teste de hidrólise de amido variavam desde reações bem definidas, formando grandes áreas hidrolisadas, até ausência de reações ao redor ou abaixo das colônias, podendo concluir com esses resultados que a capacidade de hidrolisar amido não deve ser utilizada como característica determinante do gênero e/ou suas espécies. No mesmo estudo, o autor também observou a variação nos resultados obtidos para o teste de hidrólise de gelatina, onde a maioria das culturas com os quais trabalhou hidrolisou gelatina numa taxa de moderada a fraca, sendo que numa avaliação após 7 dias, estas reações seriam consideradas negativas. Por não conseguir demonstrar tal teste em alguns isolados, considerou o teste de hidrólise de gelatina como um teste inadequado para separar bactérias no gênero *Xanthomonas* e/ou de suas espécies

A temperatura tem uma grande influência sobre o crescimento bacteriano, visto que todos processos de crescimento dependem de reações químicas que são afetadas pela variação da temperatura (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). De acordo com Ridé e Ridé (1978), linhagens pertencentes à espécie *X. populi* são incapazes de crescer em temperaturas acima de 23 °C, enquanto as demais espécies do gênero crescem em temperatura ótima de 28 °C. Por outro lado, linhagens pertencentes à espécie *X. campestris* foram capazes de crescer a 37 °C. Algumas espécies analisadas por Dye (1962) não foram capazes de crescer a 5 °C, embora a maioria apresentasse crescimento a 7 °C, sendo algumas, ainda, incapazes de crescer a 9 °C. O autor verificou também o crescimento de linhagens a temperaturas mais elevadas (35 e 39 °C) do que as descritas como ótima para a espécie, sendo que todas apresentaram crescimento a 33 °C e foram incapazes de crescer a 40°C. Sendo assim concluiu que este teste não poderia ser utilizado para diferenciar espécies do gênero *Xanthomonas* devido à grande variabilidade de resultados obtidos.

A variação do pH reflete no crescimento bacteriano, uma vez que influencia a atividade enzimática. Os dados obtidos nos experimentos de pH estão de acordo com Swings, Vauterin e Kersters (1993) que relataram que linhagens pertencentes ao gênero *Xanthomonas* não crescem em pH 4, 5 ou inferiores a este, mas crescem bem em pH 6,5 -7.

Segundo Mariano et al. (2005), bactérias fitopatogênicas toleram diferentes concentrações de NaCl, sendo este teste bastante utilizado em identificação. Os estudos realizados por Dye (1962) também demonstraram que o gênero *Xanthomonas* é um grupo não particularmente tolerante a NaCl, já que em nenhuma das linhagens por ele utilizada foi capaz de crescer na presença de 6% de NaCl e muito poucas puderam tolerar 5%. Como os resultados indicaram muita variação entre linhagens de mesma espécie, o autor considerou que este teste não poderia ser utilizado como um diferencial conclusivo entre espécies do gênero *Xanthomonas*.

Van Den Mooter e Swings (1990) examinaram características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas de 266 linhagens de *Xanthomonas*, com o objetivo de analisar as semelhanças e diferenças dentro do gênero. Dentre as diversas análises efetuadas, os resultados encontrados no presente estudo para os testes realizados foram similares as características descritas pelos autores para linhagens de *Xanthomonas axonopodis*.

Apesar da caracterização bioquímica e fisiológica ser muito importante no processo de identificação da espécie de *Xanthomonas*, algumas espécies compartilham de características morfológicas semelhantes, o que se faz necessário da utilização de outras características em associação a essa análise para a identificação de linhagens.

5.6 Caracterização molecular

5.6.1 Amplificação do gene ribossomal 16S

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp. com o par de *primers* 27F e 1525R (LANE, 1991), correspondente ao gene ribossomal 16S resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 1500 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 15 e 16). Devido ao aparecimento de bandas não específicas, os produtos da amplificação foram purificados e sequenciados. As sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvore filogenética.

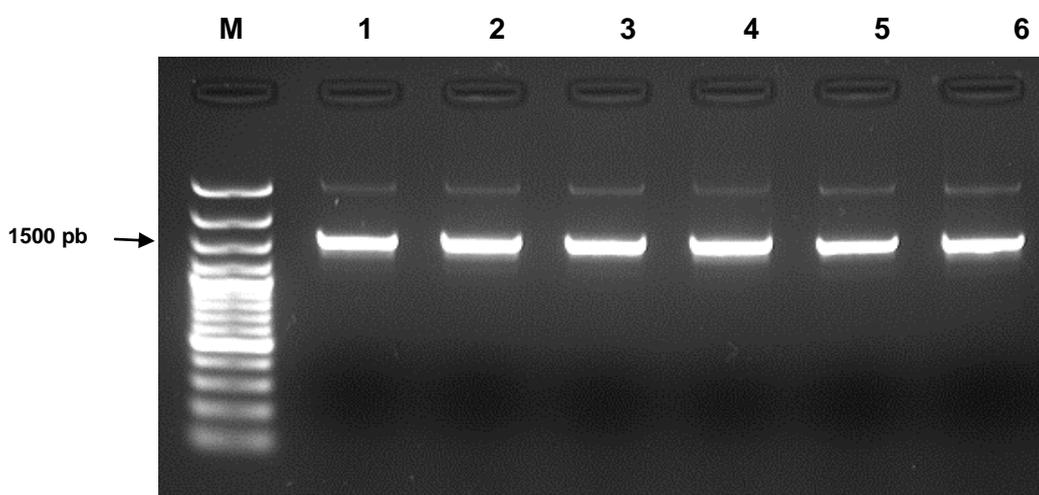


Figura 15 – Amplificação do gene 16S DNAr de linhagens de *Xanthomonas* sp. (**M**) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 2420; **(2)** IBSBF 2421; **(3)** IBSBF 2433; **(4)** IBSBF 2365; **(5)** IBSBF 2366; **(6)** IBSBF 2367.

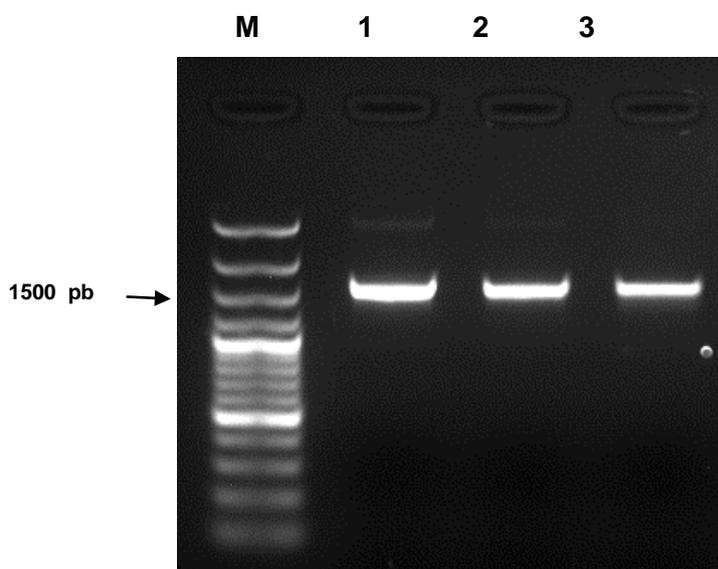


Figura 16 – Amplificação do gene 16S DNAr de linhagens de *Xanthomonas* sp. (**M**) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 2324; **(2)** IBSBF 2325; **(3)** IBSBF 2326.

5.6.2 Análise de multilocus utilizando-se os genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*.

5.6.2.1 Amplificação de parte do gene *atpA*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp. com o par de *primers* *atpA*-3F e *atpA*-7R (RAMOS, 2007), correspondente à parte do gene *atpA*, resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 600 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 17 e 18). Os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

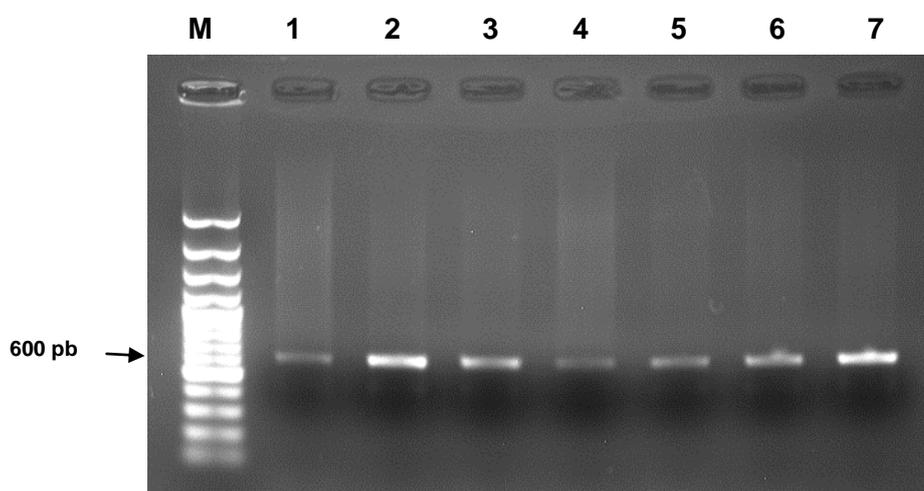


Figura 17 - Amplificação de parte do gene *atpA* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (M) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (1) IBSBF 1444; (2) IBSBF 2420; (3) IBSBF 2421; (4) IBSBF 2433; (5) IBSBF 2365; (6) IBSBF 2366; (7) IBSBF 2367.

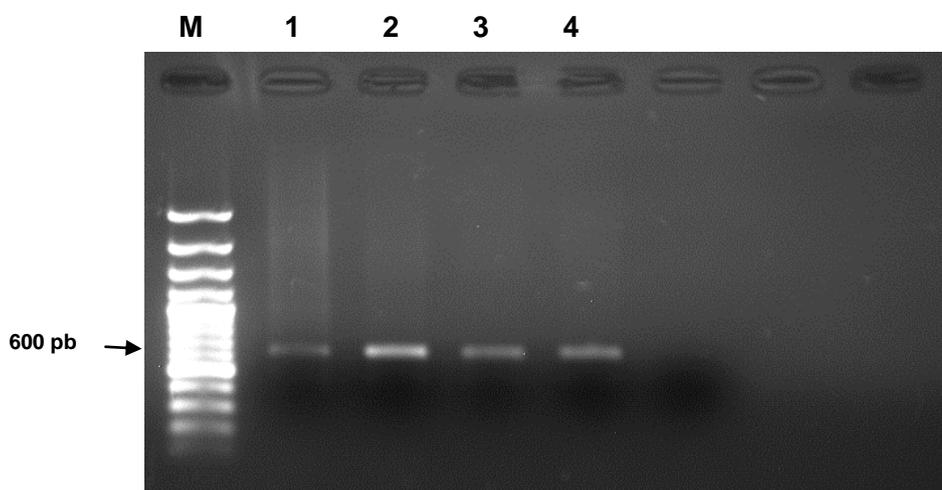


Figura 18 - Amplificação de parte do gene *atpA* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (M) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (1) IBSBF 1444; (2) IBSBF 2324; (3) IBSBF 2325; (4) IBSBF 2326.

5.6.2.2 Amplificação de parte do gene *dnaK*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp com o par de *primers* *dnaK*-1F e *dnaK*-1R (YOUNG et al., 2008), correspondente à parte do gene *dnaK* resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 940 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 19 e 20). Os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

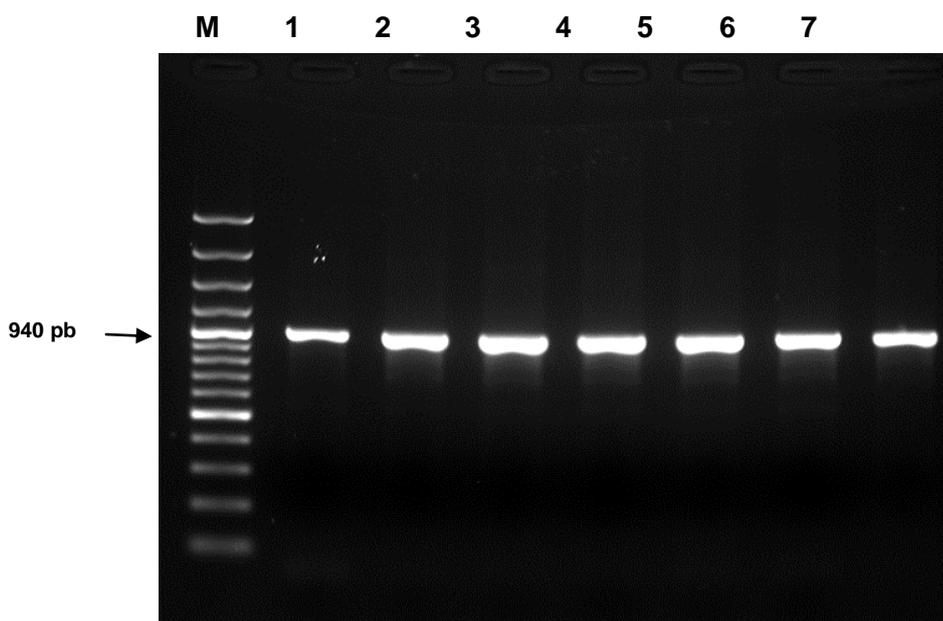


Figura 19 - Amplificação de parte do gene *dnaK* de linhagens de *Xanthomonas* sp. **(M)** marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 1444; **(2)** IBSBF 2420; **(3)** IBSBF 2421; **(4)** IBSBF 2433; **(5)** IBSBF 2365; **(6)** IBSBF 2366; **(7)** IBSBF 2367.

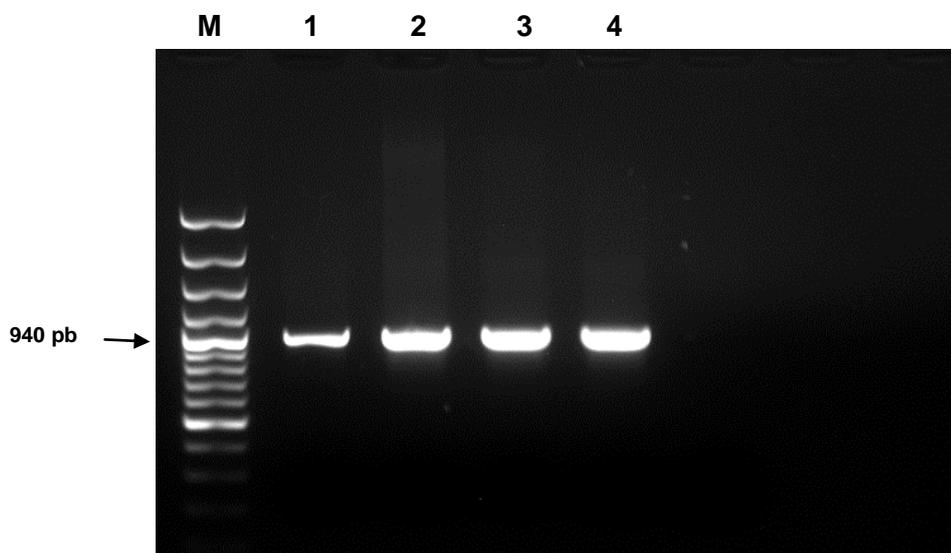


Figura 20 - Amplificação de parte do gene *dnaK* de linhagens de *Xanthomonas* sp. **(M)** marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 1444; **(2)** IBSBF 2324; **(3)** IBSBF 2325; **(4)** IBSBF 2326

5.6.2.3 Amplificação de parte do gene *gyrB*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp com o par de *primers* *gyrB*-1F e *gyrB*-1R (YOUNG et al., 2008), correspondente à parte do gene *gyrB* resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 865 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 21 e 22). Os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

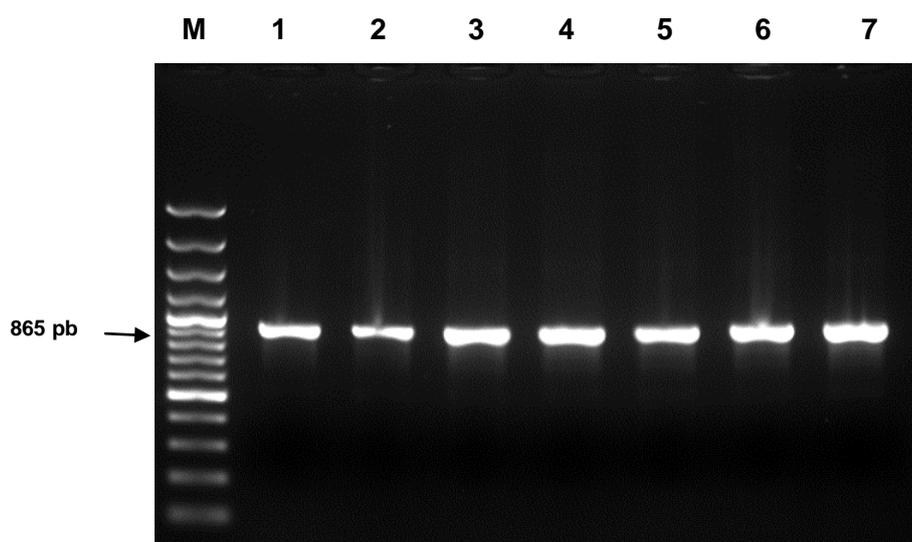


Figura 21 - Amplificação de parte do gene *gyrB* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (M) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (1) IBSBF 1444; (2) IBSBF 2420; (3) IBSBF 2421; (4) IBSBF 2433; (5) IBSBF 2365; (6) IBSBF 2366; (7) IBSBF 2367.

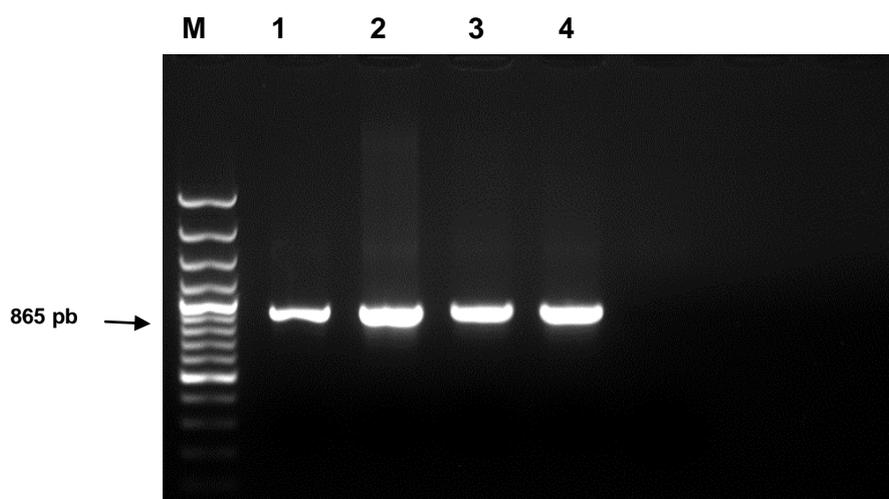


Figura 22 - Amplificação de parte do gene *gyrB* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (M) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (1) IBSBF 1444; (2) IBSBF 2324; (3) IBSBF 2325; (4) IBSBF 2326.

5.6.2.4 Amplificação de parte do gene *recA*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp. com o par de *primers* *recA*-5F e *recA*-7R (RAMOS, 2007), correspondente à parte do gene *recA* resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 400 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 23 e 24). Os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

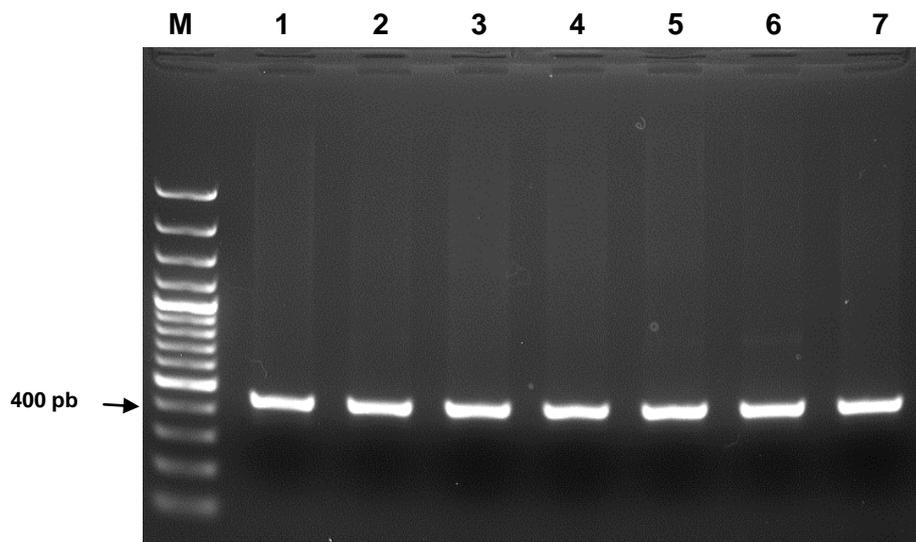


Figura 23 - Amplificação de parte do gene *recA* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (**M**) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 1444; **(2)** IBSBF 2420; **(3)** IBSBF 2421; **(4)** IBSBF 2433; **(5)** IBSBF 2365; **(6)** IBSBF 2366; **(7)** IBSBF 2367.

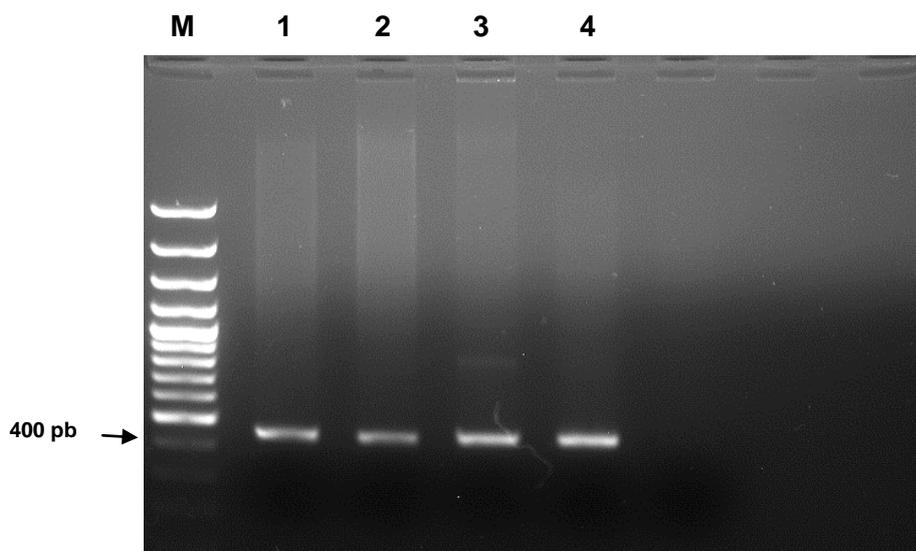


Figura 24 - Amplificação de parte do gene *recA* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (**M**) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 1444; **(2)** IBSBF 2324; **(3)** IBSBF 2325; **(4)** IBSBF 2326.

5.6.2.5 Amplificação de parte do gene *rpoA*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp. com o par de *primers* *rpoA*-1F e *rpoA*-3R (RAMOS, 2007), correspondente à parte do gene *rpoA* resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 700 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 25 e 26). Os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

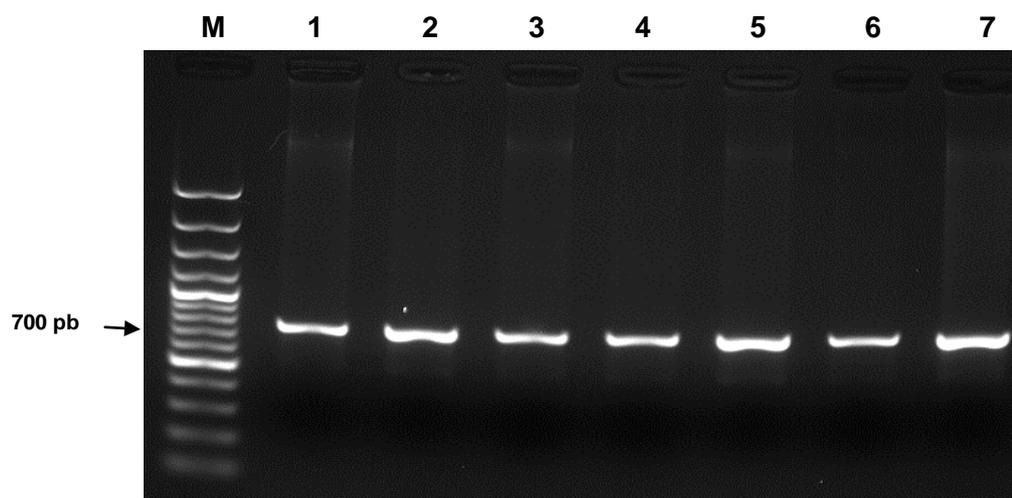


Figura 25 - Amplificação de parte do gene *rpoA* de linhagens de *Xanthomonas* sp. **(M)** marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 1444; **(2)** IBSBF 2420; **(3)** IBSBF 2421; **(4)** IBSBF 2433; **(5)** IBSBF 2365; **(6)** IBSBF 2366; **(7)** IBSBF 2367.

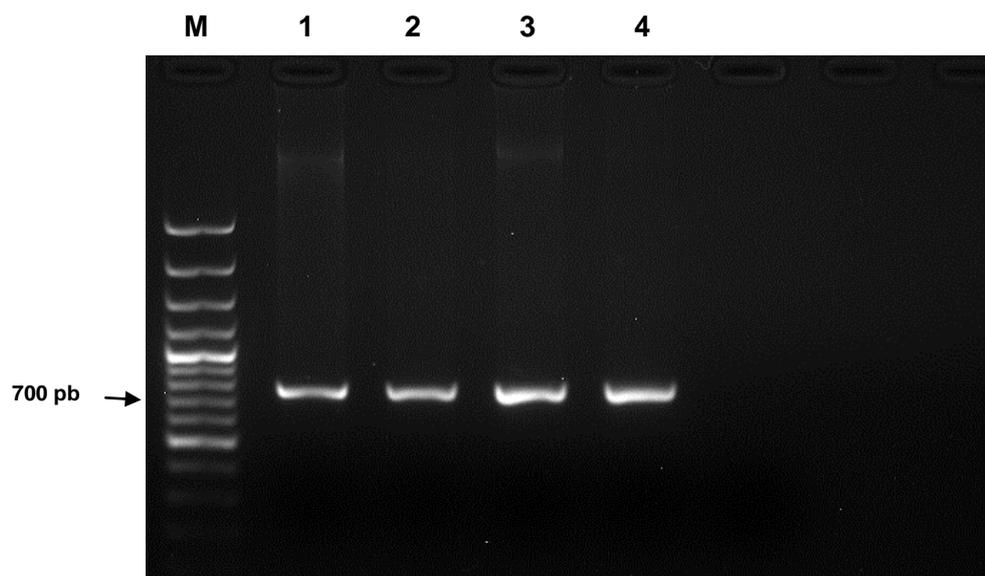


Figura 26 - Amplificação de parte do gene *rpoA* de linhagens de *Xanthomonas* sp. **(M)** marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); **(1)** IBSBF 1444; **(2)** IBSBF 2324; **(3)** IBSBF 2325; **(4)** IBSBF 2326.

5.6.2.6 Amplificação de parte do gene *rpoB*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp. com o par de *primers* *rpoB*-2F e *rpoB*-3R (FERREIRA-TONIN et al., 2012), correspondente à parte do gene *rpoB* resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 800 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 27 e 28). Devido ao aparecimento de bandas não específicas, os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

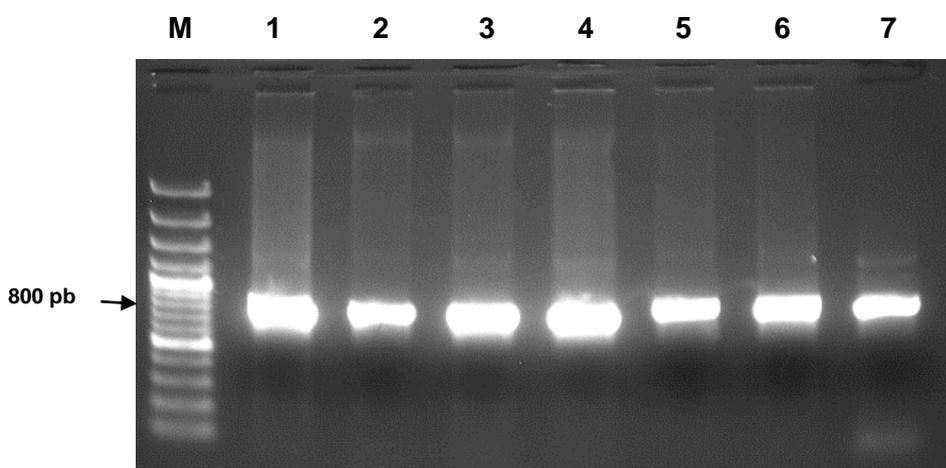


Figura 27 - Amplificação de parte do gene *rpoB* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (**M**) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (**1**) IBSBF 1444; (**2**) IBSBF 2420; (**3**) IBSBF 2421; (**4**) IBSBF 2433; (**5**) IBSBF 2365; (**6**) IBSBF 2366; (**7**) IBSBF 2367.

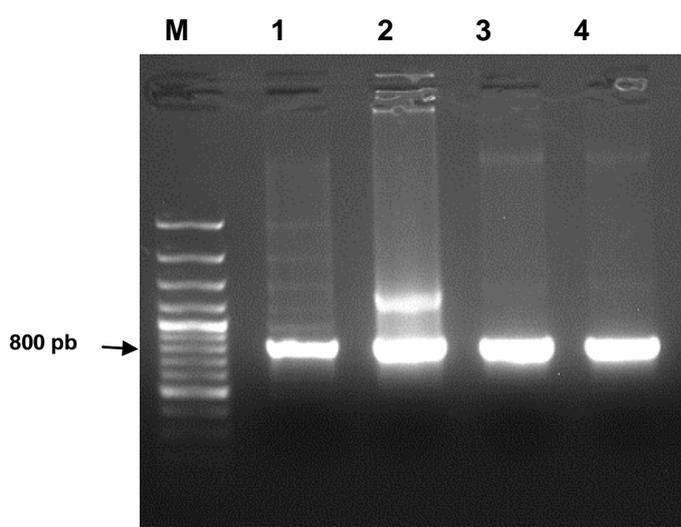


Figura 28 - Amplificação de parte do gene *rpoB* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (**M**) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (**1**) IBSBF 1444; (**2**) IBSBF 2324; (**3**) IBSBF 2325; (**4**) IBSBF 2326.

5.6.2.7 Amplificação de parte do gene *rpoD*

A amplificação das linhagens de *Xanthomonas* sp com o par de *primers* rpoD-1F e rpoD-1R (YOUNG et al., 2008), correspondente à parte do gene *rpoD* resultou em fragmento único com tamanho aproximado de 875 pb para todas as linhagens testadas (Figuras 29 e 30). Devido ao aparecimento de bandas não específicas, os produtos da amplificação foram purificados, sequenciados, as sequências foram alinhadas, editadas e, posteriormente, utilizadas na construção de árvores filogenéticas para cada gene ou com diferentes combinações dos mesmos.

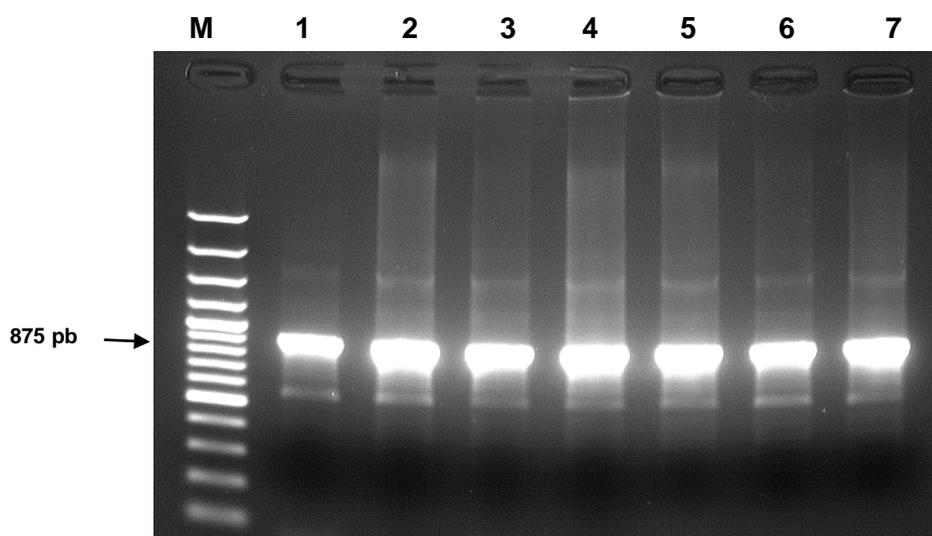


Figura 29 - Amplificação de parte do gene *rpoD* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (M) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (1) IBSBF 1444; (2) IBSBF 2324; (3) IBSBF 2325; (4) IBSBF 2326; (5) IBSBF 2365; (6) IBSBF 2366; (7) IBSBF 2367.

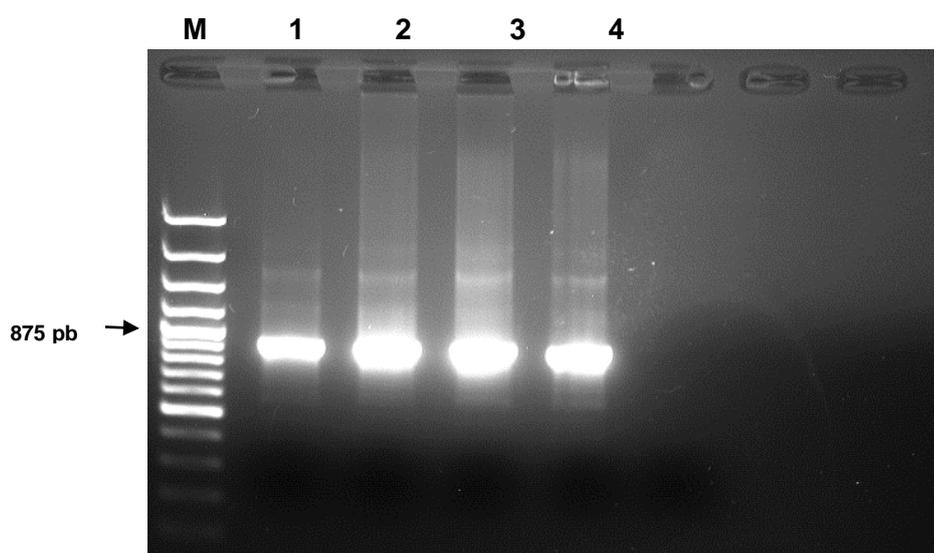


Figura 30 - Amplificação de parte do gene *rpoD* de linhagens de *Xanthomonas* sp. (M) marcador molecular de peso de 100 pb (Fermentas); (1) IBSBF 1444; (2) IBSBF 2420; (3) IBSBF 2421; (4) IBSBF 2433.

5.7 Hibridização DNA-DNA

Nesse experimento foram transferidos para as membranas os DNAs das linhagens *X. axonopodis* pv. *vitians* (IBSBF 1709^P), *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF 2586^P), *X. axonopodis* pv. *viticola* (IBSBF 1967^P), *X. axonopodis* pv. *betae* (IBSBF 857^P), *X. axonopodis* pv. *paullinae* (IBSBF 828^P), *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T), *X. oryzae* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^T), *X. hortorum* pv. *hederae* (IBSBF 1391^T), *X. cassavae* (IBSBF 270^T), *X. codiae* (IBSBF 1389^T), *X. translucens* pv. *translucens* (IBSBF 581^T), *X. theicola* (IBSBF 1565^T) e as linhagens isolados de jenipapeiro *X. sp.* IBSBF 2421, IBSBF 2433, IBSBF 2420, IBSBF 2367, IBSBF 2366, IBSBF 2365, IBSBF 2326, IBSBF 2325 e IBSBF 2324, utilizando-se como sonda a linhagem Tipo da espécie *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T). Os resultados revelaram valores de homologia superiores a 73% entre a espécie *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e as linhagens *X. axonopodis* pv. *vitians*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *viticola*, *X. axonopodis* pv. *betae*, *X. axonopodis* pv. *paullinae* e todas as linhagens isoladas de jenipapeiro analisadas (Figura 31, Tabela 6), confirmando, desse modo, que essas linhagens pertencem à espécie *X. axonopodis*.

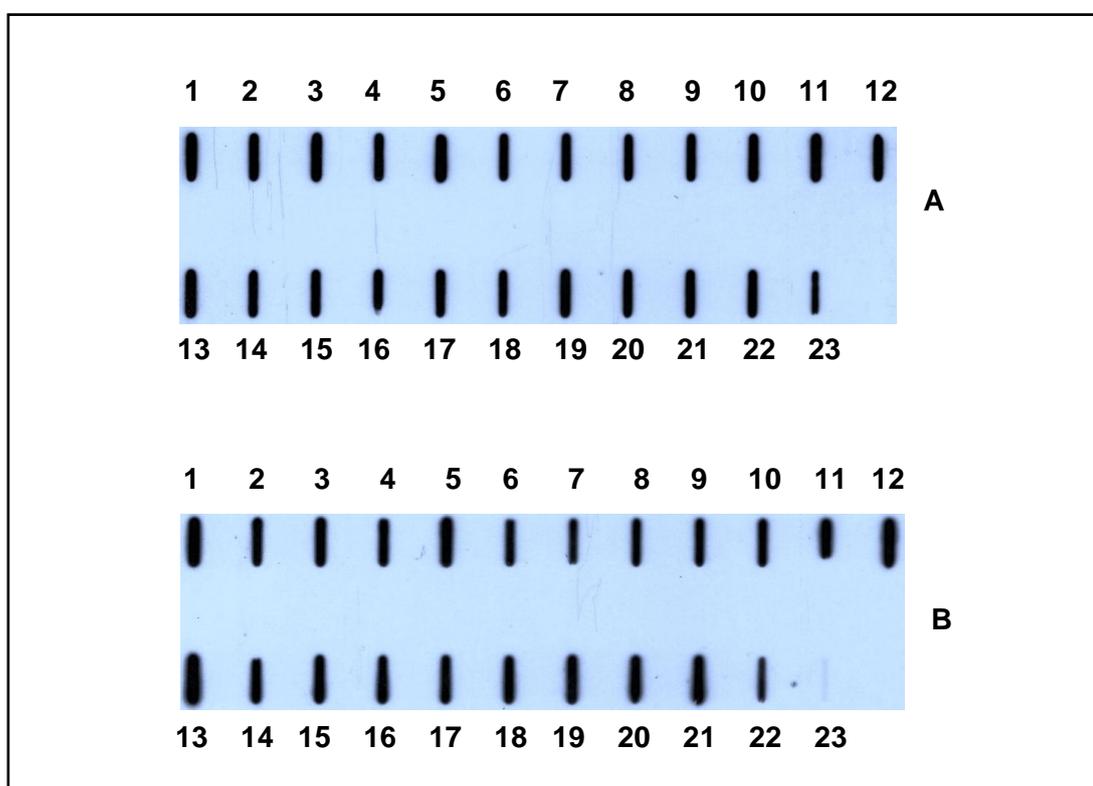


Figura 31 - Membranas obtidas nos experimentos de hibridização DNA-DNA. **(A)** DNAs hibridizados com o gene ribossomal 16S da espécie *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T); **(B)** DNAs hibridizados com o DNA genômico de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T). **(1)** *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T); **(2)** *X. axonopodis* pv. *vitians* (IBSBF 1709^P); **(3)** *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF 2586^P); **(4)** *X. axonopodis* pv. *viticola* (IBSBF 1967^P); **(5)** *X. axonopodis* pv. *betae* (IBSBF 857^P); **(6)** *X. axonopodis* pv. *paullinae* (IBSBF 828^P); **(7)** *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T); **(8)** *X. axonopodis* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^T); **(9)** *X. hortorum* pv. *hederae* (IBSBF 1391^T); **(10)** *X. cassavae* (IBSBF 270^T); **(11)** *X. codiae* (IBSBF 1389^T); **(12)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2421); **(13)** *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T); **(14)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2433); **(15)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2420); **(16)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2367); **(17)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2366); **(18)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2365); **(19)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2326); **(20)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2325); **(21)** *Xanthomonas* sp. (IBSBF 2324); **(22)** *X. theicola* (IBSBF 1565^T); **(23)** *X. t.* pv. *translucens* (IBSBF 581^T).

Tabela 6 - Valores de homologia (%) obtidos nos experimentos de hibridização DNA-DNA com diferentes linhagens de *Xanthomonas* sp. utilizando-se como sonda a linhagem Tipo da espécie *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T).

Linhagens	Homologia (%)
1444 ^T <i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	100
1709 ^P <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>	78
2586 ^P <i>X. axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	76
1967 ^P <i>X. axonopodis</i> pv. <i>viticola</i>	76
857 ^P <i>X. axonopodis</i> pv. <i>betae</i>	80
828 ^P <i>X. axonopodis</i> pv. <i>paullinae</i>	74
1163 ^T <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	52
1732 ^T <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	67
1391 ^T <i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	74
270 ^T <i>X. cassavae</i>	67
1389 ^T <i>X. codiae</i>	68
2421 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	90
2433 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	78
2420 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	86
2367 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	88
2366 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	80
2365 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	84
2326 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	73
2325 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	83
2324 <i>Xanthomonas</i> sp. (jenipapo)	82
1565 ^T <i>X. theicola</i>	42
581 ^T <i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	9

A técnica de hibridização DNA-DNA consiste em comparar um DNA cromossômico marcado (sonda) com outros a serem analisados e observar o grau de homologia entre eles. Se a porcentagem obtida for maior que 70 % entre o DNA analisado e a sonda, consideramos que estes pertencem à mesma espécie genômica (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Apesar de ser uma técnica com algumas limitações, de tempo de resposta demorado e reprodutibilidade de resultados inexata, é um experimento obrigatório para

estudos que resultem em alterações taxonômicas como a reclassificação e proposição de novas espécies, sendo referência para o delineamento de espécies em bacteriologia.

Em 1987, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana definiu espécie bacteriana como um grupo de isolados coerentes em características genômicas que apresentam homologia maior que 70% na hibridização DNA-DNA (WAYNE et al., 1987). Trabalhos realizados por Stackebrandt e Goebel em 1987 demonstraram que a similaridade das sequências do gene ribossomal 16S também deveria ser utilizada na definição de espécies, sendo consideradas de mesma espécie linhagens com similaridade maior que 97% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Já em 2002, um novo comitê reavaliou a definição de espécie bacteriana, propondo que além da hibridização DNA-DNA e as sequências do gene ribossomal 16S, outras técnicas envolvendo genomas deveriam ser utilizadas como base para a definição de novas espécies (STACKEBRANDT et al., 2002).

Tendo em vista que a técnica de hibridização DNA-DNA é laboriosa e de difícil padronização, o que aumenta assim a possibilidade de erros experimentais, tem sido gradativamente substituída por análises de multilocus em estudos taxonômicos e filogenéticos de diversos micro-organismos da área clínica, ambiental e fitopatologia (FERREIRA-TONIN, 2012).

Sendo assim, o comitê para a reavaliação da definição de espécies em bacteriologia incentiva o desenvolvimento e a utilização de novos métodos que complementem ou substituam os experimentos de hibridização DNA-DNA, considerando o sequenciamento dos genes *housekeeping* como um método promissor. Recomenda ainda que autores demonstrem concordância entre os métodos empregados para proposição de novas espécies com a técnica de hibridização DNA-DNA (STACKEBRANDT et al., 2002), sendo esta utilizada em recentes proposições dentro do gênero *Xanthomonas* como *X. citri*, *X. fuscans* e *X. alfalfae*, divididas em diversas subespécies (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

5.8 Análise filogenética

No presente estudo foram utilizados sete genes *housekeeping* (*atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*) e o gene ribossomal 16S para a investigação da posição taxonômica das linhagens isoladas de jenipapeiro por meio de análise de multilocus, assim como sequências dos mesmos genes de linhagens de *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Xylella*, *Thermomonas* e *Stenotrophomonas malthophilia*, utilizada como grupo externo, disponíveis no banco de dados do NCBI.

Uma análise das sequências de parte dos genes supracitados foi realizada para investigação da posição taxonômica das linhagens de *Xanthomonas* sp. Diferentes linhagens Tipo e Patotipo de *Xanthomonas* foram incluídas nessa análise. Os DNAs das espécies Tipo e Patotipo do gênero e das linhagens isoladas de jenipapeiro foram submetidos a amplificações com os pares de *primers* correspondentes para cada parte dos genes, conforme descrito anteriormente (Tabela 2). As sequências de todos os genes foram amplificadas para a maioria das linhagens. Embora diversas condições de amplificação tenham sido testadas, algumas linhagens não apresentaram produto de amplificação para alguns dos genes, sendo elas: *X. albilineans* (IBSBF 1374^T) para o gene *dnaK*; *X. arboricola* pv. *juglandis* (IBSBF 1375^P) para o gene *recA*; *X. axonopodis* pv. *vitians* (1709^P) para o gene ribossomal 16S; *X. campestris* pv. *raphani* (IBSBF 1590^P) para o gene ribossomal 16S e *recA*; *X. hyacinthi* (IBSBF 1390^T) para o gene *dnaK*; *X. sacchari* (IBSBF 1313^T) para o gene *dnaK*; *X. sp.* pv. *viticola* (IBSBF 1967^P) para o gene ribossomal 16S e *atpA*; *X. theicola* (IBSBF 1565^T) para o gene *dnaK* e *X. translucens* pv. *translucens* (IBSBF 581^T) para o gene *dnaK*. Devido a este fato foram construídas duas árvores filogenéticas, sendo que na primeira utilizaram-se as sequências concatenadas dos genes *atpA*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD* e na segunda as sequências concatenadas dos genes sete genes estudados (*atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*) para que o maior número de linhagens possíveis pudessem ser analisadas. Para todas as árvores filogenéticas construídas foi utilizada somente uma linhagem isolada de jenipapeiro (IBSBF 2324), já que com base na sequência de nucleotídeos as nove amostras estudadas para cada gene compartilharam identidade de 100%.

Uma árvore filogenética com base em sequências do gene ribossomal 16S foi construída a partir de 21 espécies de *Xanthomonas* como uma abordagem complementar, tendo em vista que o sequenciamento do gene indicou que as linhagens estudadas pertencem ao gênero *Xanthomonas*. Espécies representativas de diferentes gêneros

pertencentes à Família Xanthomonadaceae também foram incluídos, sendo estes formados por 2 espécies do gênero *Pseudoxanthomonas*, 2 espécies do gênero *Xylella* e 2 espécies do gênero *Thermomonas* (Figura 32).

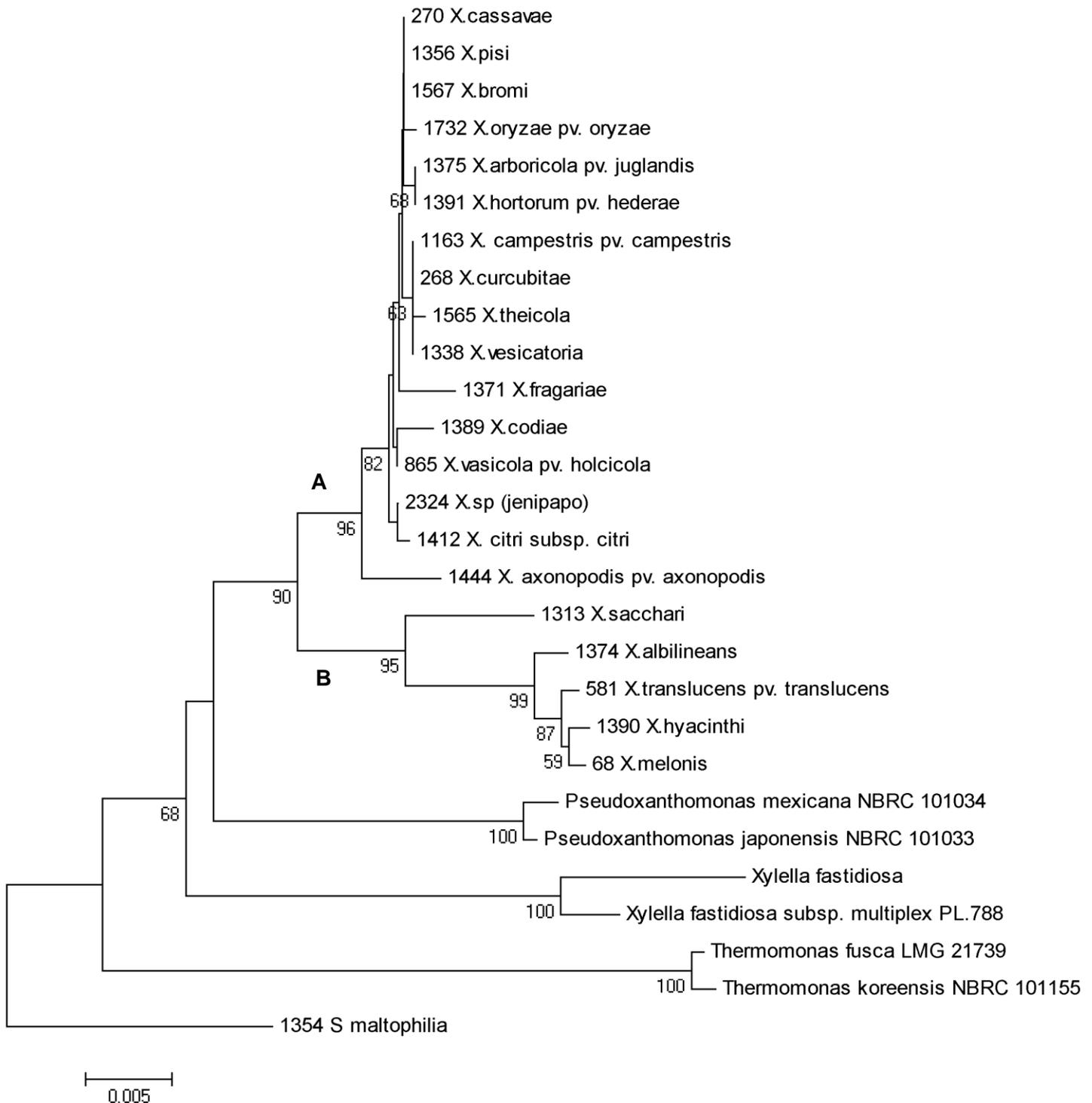


Figura 32 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene ribossomal 16S de linhagens do gênero *Xanthomonas*, utilizando o método Neighbor-joining. Espécies representativas de diferentes gêneros pertencentes a mesma família também foram incluídos. A sequência de *Stenotrophomonas maltophilia* K279a foi utilizada como grupo externo. Os números em cada ramo são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 0,5% de diferença nas sequências.

Na análise filogenética das sequências do gene ribossomal 16S, espécies de *Xanthomonas* foram alocadas em dois grupos principais, fortemente apoiados por altos valores de *bootstrap* (97 e 96%). O primeiro grupo incluiu grande parte das espécies, dentre elas as linhagens isoladas de jenipapeiro (*Xanthomonas* sp.), que ficaram agrupadas com a linhagem de *X. axonopodis* pv. *axonopodis*. O segundo grupo foi composto pelas linhagens de *X. sacchari* (1313^T), *X. albilineans* (1374^T); *X. translucens* pv. *translucens* (581^T), *X. hyacinthi* (1390^T), e *X. melonis* (68^P). Espécies de *Pseudoxanthomonas*, *Xylella* e *Thermomonas* foram alocadas em ramos individuais, separados dos grupos principais. Esta análise possibilitou confirmar de que as linhagens estudadas pertencem ao gênero *Xanthomonas*.

As análises individuais das sequências de parte dos genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD* resultaram em árvores filogenéticas com topologia similares (Apêndices 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). Os resultados revelaram dois agrupamentos principais, sendo um composto pelas linhagens de *X. albilineans* (1374^T); *X. theicola* (1565^T), *X. hyacinthi* (1390^T), *X. translucens* pv. *translucens* (581^T) e *X. sacchari* (1313^T) e o outro por todas as linhagens restantes nas análises dos genes *atpA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*. Quanto à análise dos genes *recA* e *gyrB*, as linhagens de *X. albilineans* e *X. sacchari* constituíram um grupo isolado das demais espécies testadas. Nas análises do gene *dnaK*, essas linhagens não foram utilizadas na construção da árvore devido ao fato de não apresentarem produto de amplificação para este gene. As linhagens isoladas de jenipapeiro (*Xanthomonas* sp.) ficaram agrupadas com as linhagens da espécie *X. axonopodis* na maioria das árvores filogenéticas, sendo que na análise do gene *gyrB*, onde foi adicionada a linhagem *X. axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae* (IBSBF 689^P) para fins comparativos, agrupou com esta espécie, mostrando grande proximidade mas, ao mesmo tempo, distinção da mesma. Sendo assim, uma análise completa foi realizada utilizando-se as sequências concatenadas dos diversos genes estudados.

Inicialmente foi construída uma árvore filogenética utilizando-se as sequências concatenadas dos genes *atpA*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*, excluindo-se da análise o gene *dnaK* por não apresentar produto de amplificação para o maior número de linhagens (Figura 33). A árvore filogenética com base nas sequências concatenadas dos seis genes housekeeping foi construída a partir de 21 linhagens de *Xanthomonas* e uma linhagem representante da espécie *Stenotrophomonas malthophilia*, utilizada como grupo externo. Os resultados revelaram a formação de dois agrupamentos principais (A e B), sendo um composto pelas espécies *X. albilineans* (1374^T); *X. sacchari* (1313^T); *X. theicola* (1565^T), *X.*

hyacinthi (1390^T) e *X. translucens* pv. *translucens* (581^T) e o outro formado por todas as linhagens restantes (Figura 33).

No Grupo A, as linhagens de *Xanthomonas* isoladas de jenipapeiro (*Xanthomonas* sp.) ficaram agrupadas com as linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T), *X. axonopodis* pv. *vitians* (1709^P) e *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^P), anteriormente classificada como *X. axonopodis* pv. *citri.*, em 99% das repetições. Os altos valores de *bootstrap* indicam a confiabilidade dos agrupamentos obtidos.

Vauterin e colaboradores (1995) propuseram a reclassificação do agente causal do cancro cítrico, *X. campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye, como *X. axonopodis* pv. *citri*. Posteriormente, uma nova classificação deste fitopatógeno foi proposta por Schaad e colaboradores (2005; 2006), onde *X. axonopodis* pv. *citri* foi reclassificada como *X. citri* subsp. *citri*. Estudos efetuados por Ferreira-Tonin (2012), envolvendo experimentos de amplificação com *primers* específicos para a espécie *X. axonopodis*, mostraram sinal positivo para o patógeno responsável pelo cancro cítrico e análises de multilocus a partir de sequências dos genes *rpoA*, *rpoB* e região espaçadora 16S-23S DNAr revelaram o agrupamento de *X. citri* subsp. *citri* com diferentes linhagens da espécie *X. axonopodis*, sugerindo que o patógeno *X. citri* subsp. *citri* deve ser mantido na espécie *X. axonopodis*.

No segundo agrupamento, linhagens de *X. albilineans* (IBSBF 1374^T), *X. sacchari* (IBSBF 1313^T), *X. theicola* (IBSBF 1565^T), *X. hyacinthi* (IBSBF 1390^T) e *X. translucens* (IBSBF 581^T) ficaram agrupadas em 100% das repetições. Análises filogenéticas do gene *gyrB* efetuadas por Parkinson e colaboradores (2009) e em análises deste mesmo gene realizadas por Ryan e colaboradores (2011) em estudos da complexidade genômica das espécies do gênero *Xanthomonas* demonstraram agrupamentos de *X. theicola*, *X. hyacinthi* e *X. translucens* semelhantes ao encontrado. Uma análise mais abrangente realizada por Young e colaboradores (2008) com linhagens do gênero *Xanthomonas* utilizando os genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD* também revelou os mesmos agrupamentos de *X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. hyacinthi* e *X. translucens* como os encontrados neste estudo.

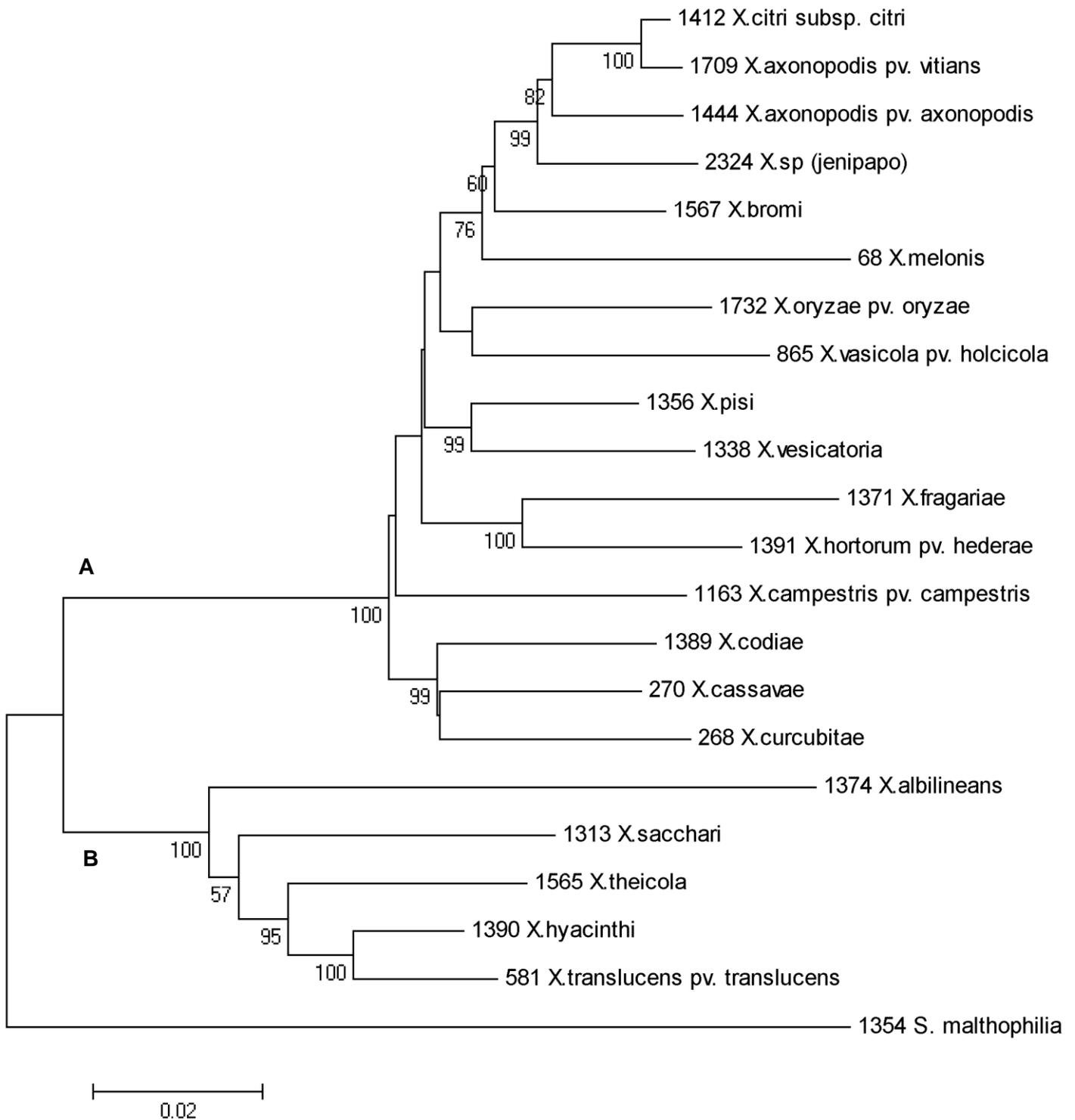


Figura 33 - Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *atpA*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD* de linhagens do gênero *Xanthomonas*, utilizando o método Neighbor-joining. A sequência de *Stenotrophomonas malthophilia* K279a foi utilizada como grupo externo. Os números em cada ramo são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 2% de diferença nas sequências.

Outra árvore filogenética foi construída a partir das sequências concatenadas de todos os genes utilizados neste estudo: *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*. A árvore filogenética com base nessas sequências concatenadas foi construída a partir de 16 linhagens de *Xanthomonas* e uma linhagem representante da espécie *Stenotrophomonas malthophilia*, utilizada como grupo externo. Os resultados revelaram os mesmos agrupamentos principais obtidos nas análises com seis genes e novamente as linhagens de *Xanthomonas* isoladas de jenipapeiro (*Xanthomonas* sp.) ficaram agrupadas com as linhagens de *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T), *X. axonopodis* pv. *vitians* (1709^P) e *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^P) em 100% das repetições de *bootstrap* (Figura 34).

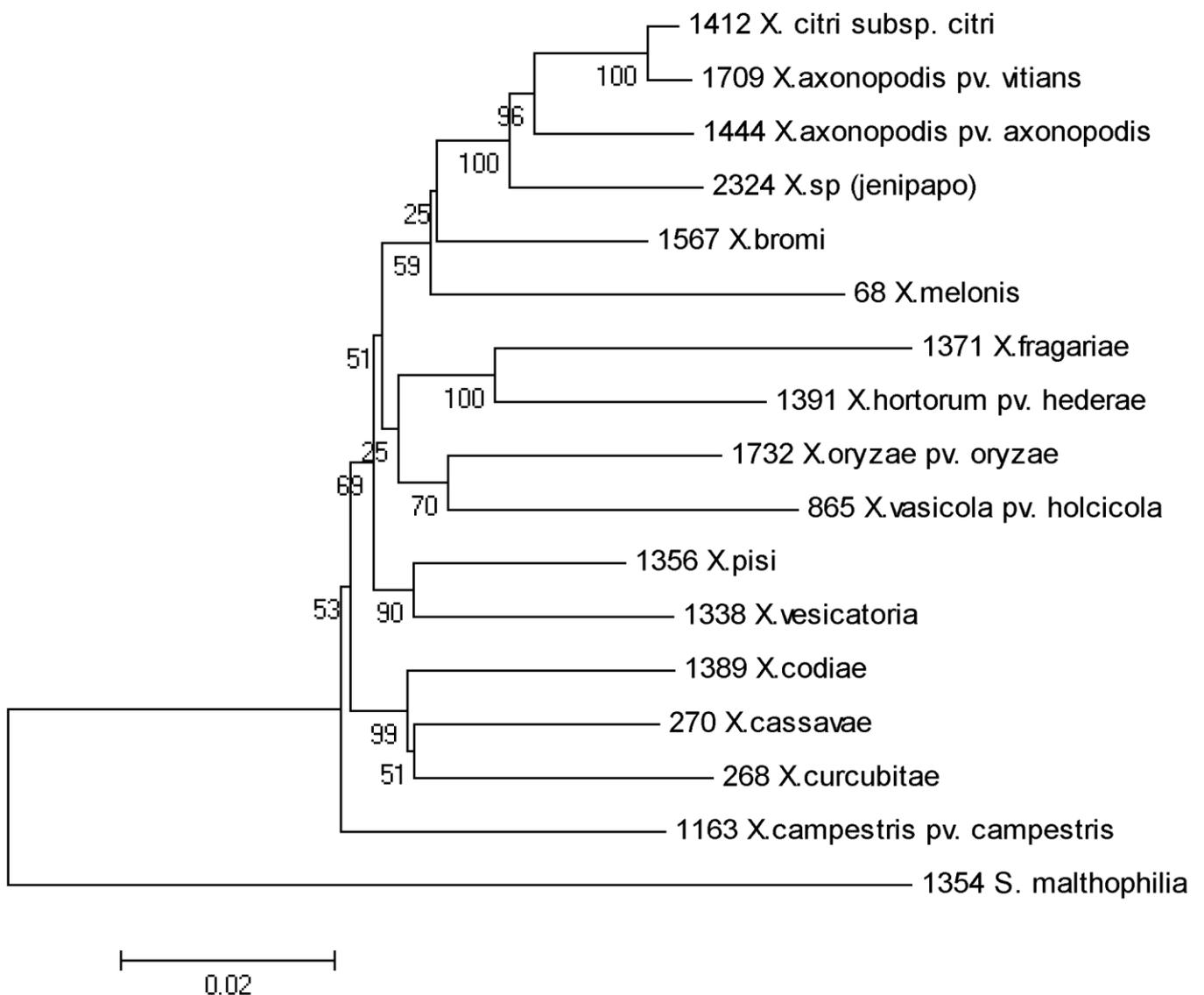


Figura 34 - Árvore filogenética construída a partir das sequências concatenadas dos genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD* de linhagens do gênero *Xanthomonas*, utilizando o método Neighbor-joining. A sequência de *Stenotrophomonas malthophilia* K279a foi utilizada como grupo externo. Os números em cada ramo são as porcentagens de ocorrência dos agrupamentos com base em análises de bootstrap de 1000 repetições. A barra indica 2% de diferença nas sequências.

5.9 Avaliação da patogenicidade em diferentes espécies de plantas hospedeiras

A avaliação da patogenicidade das linhagens de *Xanthomonas* sp. foi realizada por meio de testes em diferentes espécies de plantas da família Rubiaceae como café (*Coffea arabica*), *Ixora* sp e gardênia; e em plantas sem nenhuma relação com esta família como feijão (*Phaseolus vulgaris*), morango (*Fragaria* hib.), soja (*Glycine max*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).

As mudas de jenipapeiro também foram inoculadas artificialmente pela bactéria fitopatogênica do gênero *X. axonopodis* pv. *maculifoliigardeniae* (IBSBF 689^P), hospedeira das espécies *Ixora* sp. e gardênia.

Apenas as plantas de jenipapeiro apresentaram sintomas da doença (Figura 39) durante o período de avaliação (21 dias). Em qualquer outra das espécies vegetais testadas não foram observados quaisquer tipo de sintomas (Figuras 35, 36, 37 e 38).



Figura 35 - Teste de patogenicidade em mudas de tomateiro, em condições de casa de vegetação



Figura 36 - Teste de patogenicidade em mudas de morangueiro, em condições de casa de vegetação



Figura 37 - Teste de patogenicidade em mudas de *Ixora*, em condições de casa de vegetação



Figura 38 - Teste de patogenicidade em mudas de gardênia, em condições de casa de vegetação



Figura 39 - Teste de patogenicidade em mudas de jenipapeiro, em condições de casa de vegetação

6 CONCLUSÕES

- Testes bioquímicos e fisiológicos apresentaram resultados que corresponderam aos descritos na literatura para bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas*;
- Análises de MLSA utilizando-se os genes *atpA*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD* demonstram que agente causal da doença bacteriana em jenipapeiro pertence à espécie *Xanthomonas axonopodis*;
- Experimentos de hibridização DNA-DNA revelaram valores de homologia superiores a 74% entre *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e linhagens pertencentes a outros patovares da espécie e homologia de 80 a 90% com todas as linhagens isoladas de jenipapeiro, indicando que essas linhagens pertencem à espécie supracitada;
- Nos testes de patogenicidade realizados em espécies de plantas da família Rubiaceae [café (*Coffea arabica*) e *Ixora* (*Ixora* sp.)] e em plantas sem nenhuma relação botânica com essa família [feijão (*Phaseolus vulgaris*), morango (*Fragaria* hib.), soja (*Glycine max*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpae*)] nenhuma das linhagens de *Xanthomonas* isoladas do jenipapeiro se mostraram patogênicas às plantas inoculadas após os 21 dias de avaliação. Sintomas de necrose foliar foram observados apenas nas mudas de jenipapeiro, de onde a bactéria foi reisolada;
- Nossos resultados trouxeram um importante esclarecimento na taxonomia do gênero *Xanthomonas*, ficando evidente que um novo patovar para a espécie *Xanthomonas axonopodis* deve ser proposto. Desse modo sugerimos a nomenclatura de *Xanthomonas axonopodis* pv. *genipae* para as linhagens estudadas e a utilização da linhagem IBSBF 2324 como Patotipo para a espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, G. Pesquisadores visitam bancos de germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Aracajú, 2010. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=6076>>. Acesso em: 29 dez. 2011.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1563–1589, 2000.
- ARK, P. A.; BARRET, J. T. A new bacterial leaf spot of greenhouse-grown gardenias. **Phytopathology**, v. 36, p. 865-868, 1946.
- BALANI, D. M. **Deteção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares**. 2009. 63 f. Dissertação (Doutorado em Ciências – Área de Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. USA: Springer-Verlag, v. 1, 2001.
- BOYE, K.; HOGDALL, E.; BORRE, M. Identification of bacteria using two degenerate 16S rDNA sequencing primers. **Microbiological Research**, v. 154, n. 1, p. 23-26, 1999.
- CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H.-J.; FREDERIKSEN, W. C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 166-178, 2007.
- COENYE, T.; SCHOOLS, L. M.; GOVAN, J. R.; KERSTERS, K.; VANDAMME, P. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1657-1666, 1999.
- COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of bacteria. In: Izuka, H.; Hasegawa, T. (Eds). **Culture collections of microorganisms**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1970, p. 421-436.
- CRUZ, J. C. C. **Diversidade genômica, patogenicidade e sensibilidade a compostos bioativos em *Xanthomonas campestris***. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Universidade de Lisboa, 2009.
- DYE, D.W. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. **New Zealand Journal of Science**, v. 5, n. 4, p. 393-416, 1962.
- DYE, D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. the “*amylovora*” group. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 509–607, 1968.
- DOWSON, W. J. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene**, p. 177–193, 1939.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Banco de dados: Fungos relatados em plantas no Brasil**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>>. Acesso em: 13 jan. 2012.

FARGIER, E.; MANCEAU, C. **Pathogenic and genetic characterization of *Xanthomonas campestris* by plant inoculation and multilocus site analysis**. In: Elphinstone, J.; Weller, S.; Thwaites, R.; Parkinson, N.; Stead, D.; Saddler, G. (Eds) Proceedings of the 11 th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Edinburgh: Scottish Agricultural Science Agency, 2006, p. 35.

FEIL; E. J.; SPRATT, B. G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, p. 561-590, 2001.

FEIL, E. J.; COOPER, J. E.; GRUNDMANN, H.; ROBINSON, A. D.; ENRIGHT, M. C. ; BERENDT, T. ; PEACOCK, S. J.; SMITH J. M. ; MURPHY, M. ; SPRATT, B. G.; MOORE, C. E. ; DAY, N. P. J. How clonal is *Staphylococcus aureus*? **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 11, p. 3307-3316, 2003.

FERREIRA, L. P; SALGADO, C. L. Bactérias. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1. p. 97-131, 1995.

FERREIRA, L. P. Bactérias atacam a soja. **Cultivar Grandes Culturas**. Embrapa soja. 24 ed., 2001. Disponível em:<<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=476>>. Acesso em: 29 out. 2014.

FERREIRA-TONIN, M. **Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012. 126 f. Dissertação (Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Área de Genética de Micro-organismos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

FERREIRA-TONIN, M.; RODRIGUES-NETO, J.; HARAKAVA, R.; DESTEFANO, S. A. L. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* sequences and species differentiation by PCR-RFLP. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1419-1424, 2012.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

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

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

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

HANNULA, M.; HÄNNINEN M. Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial *gyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 444 – 449, 2007.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams&Wilkins, 1994, 787p.

ISHIDA, A. K. N. ; HALFELD-VIEIRA, B. A. **Mancha bacteriana do maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) : Etiologia e estratégias de controle**. Embrapa Amazônia Oriental, 2009. Documento 357. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25907/1/maracujazeiro.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2014.

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

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

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

KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO JR., R. F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 103–115, 1998.

KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, v. 178, p. 703, 1956.

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

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing**. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. (Eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. United Kingdom: John Wiley and Sons; 1991. p. 115–175.

LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Oxford: Wiley- Blackwell, 1987. 216 p.

LEVINE, M. **An introduction to laboratory technique in bacteriology**. New York: Macmillan, 1954, p.68-79.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J. G.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da Flora, 2008. 560 p.

MAC FADDIN, J. S. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 3. ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MAIDEN M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones with populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. & Silveira, E.B. (Coords.). **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2. ed. Recife. UFRPE. p.67-111, 2005.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 489-503, 2007.

MEYER, D. F.; BOGDANOVA, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: **Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology**. Jackson, R.W. (Ed.) Norfolk: Caister Academic Press, 2009, p. 147-161.

MILLER, J. W. Bacterial leaf spot of *Ixora*. **Plant Pathology**, Circular n°. 101. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, p.1, 1970.

MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; PERRIERE, G.; NESME, X. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 573-586, 2002.

MUNIZ, A. V. C. S.; JUNIOR, J. F. S. **Jenipapo**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/577094/1/f01.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2011.

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

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

OLIVEIRA, K. Z. **Construção de árvores filogenéticas baseadas em genomas completos**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C.; BEW, J.; STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2881-2887, 2007.

PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of gyrB sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 264-274, 2009.

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

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. Makron Books do Brasil, v. 1, 1997.

PINTO, E.G. **Caracterização da espuma de jenipapo (*Genipa americana* L.) com diferentes aditivos visando à secagem em leite de espuma**. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos - Área de Engenharia de Processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, 2009.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p.151-156, 1989.

PORTZ, R. L. **Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por análise de isoenzimas e agressividade**. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2003.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 665-677, 2000.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SHULTHZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE BRUIJN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 95, p. 1098-1111, 2005.

RAMOS, P. L. **Taxonomia do gênero *Stenotrophomonas* através de multilocus sequence analysis (MLSA)**. 2007. 114 f. Tese (Doutor em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2007.

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

RIDÉ, M; RIDÉ, S. *Xanthomonas populis* (Ridé) comb. nov. (syn. *Aplanobacter populi* Ridé) spécifié, variabilité, et absence de relation avec *Erwinia cancerogena*. **European Journal of Forest Pathology**, v. 8, p. 310-33,1978.

RIZZINI, C.T. ; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995, 248 p.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

ROSSELLÓ-MORA, R. Updating prokaryotic taxonomy. **Journal of Bacteriology**, v.187, n. 18, p. 6255-6257, 2005.

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

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

SANTOS, S.R.; OCHMAN, H. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 754-759, 2004.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plants pathogenic bacteria**. 3. ed. St. Paul: Minn. APS Press, 2001. 164 p.

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

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

SIBINELLI, V. BRA-100: Muito além do licor. **Revista Terra da Gente**. Campinas, 2006. Disponível em: <<http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?docId=18360&c=Brazil%20Print&cRef=Brazil%20Print&year=2006&date=March%202006>>. Acesso em: 29 dez. 2011.

SILVA, A. V. C.; YAGUIU, P.; ALMEIDA, C. S.; FEITOSA, R. B. **Caracterização físico-química de jenipapo**. Aracajú: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2009. 4 p. (Comunicado técnico 99). Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2009/cot_99.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2011.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA: DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C. J.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

STARR, M. P.; GARCÉS, C.O. El agente causal de la gomosis bacterial del pasto imperial en Colombia. Medellín, Colombia. Facultad de Agronomía. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 11, p. 73-83, 1950.

SWINGS J.; VAUTERIN L.; KERSTERS K. **The bacterium *Xanthomonas***. In: Swings JG, Civerolo E. L. (Eds). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall. p. 121-156, 1993.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011.

THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; NASER, S.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; MUNN, C.; BOURNE, D.; SWINGS, J. *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio corallii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 913-917, 2005.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VAN DEN MOOTER, M.; SWINGS, J. Numeral analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and improved taxonomy of the genus. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 348-369, 1990.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 12 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 86).

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1596 p.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. L.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

WILKIE, J. P. Basal glume rot of wheat in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 16, p.155-160, 1973.

WILLEMS, A; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 623-632, 2001.

WILSON, E. E.; ZEITOUN, F. M.; FREDRICKSON, D. L. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. **Phytopathology**, v. 57, p. 618-621, 1967.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P.J. M.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 87-95, 1999.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 1, p.153–177, 1978.

YOUNG, J. M.; PARK, D. C. SHEARMAN, H. M. FARGIER, E. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.

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

ANEXO A

Meios de cultura utilizados para o crescimento bacteriano

Nutriente Agar/NA (LEVINE,1954)	
Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
NaCl.....	1,0 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p 1000 mL
pH 7,0	

YSG [YS modificado (DYE, 1962)]	
Extrato de levedo	5,0 g
Glicose	1,0 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 6,8 – 7,0	

DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986)	
Dextrose	2,0 g
Peptona	1,5 g
Extrato de levedo	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido L-glutâmico.....	1,5 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 7,0	

GYCA (DYE,1962)

Glicose	5,0 g
Extrato de levedo	5,0 g
CaCO ₃	40,0 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 7,0	

YDC (WILSON; ZEITOUN; FREDRICKSON, 1967)

Dextrose	20,0 g
Extrato de levedo	10,0 g
CaCO ₃	20,0 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 7,2	

523 (KADO; HESKETT, 1970)

Sacarose	10,0 g
Caseína ácido hidrolisada.....	8,0 g
Extrato de levedo	4,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 6,9	

ANEXO B

Meios de cultura utilizados na realização dos testes bioquímicos e fisiológicos

Meio C (DYE, 1968)

Extrato de levedo	1,0 g
NaCl.....	0,5 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Púrpura de bromocresol (BCP).....	0,7 mL solução alcóolica 1,5%
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 6,8	

Meio OAA modificado (WILKIE, 1973)

Extrato de levedo	0,8 g
KCl.....	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Púrpura de bromocresol (BCP).....	1,0 mL solução aquosa 1,6%
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 6,8	

Meio líquido – Redução de nitrato a nitrito

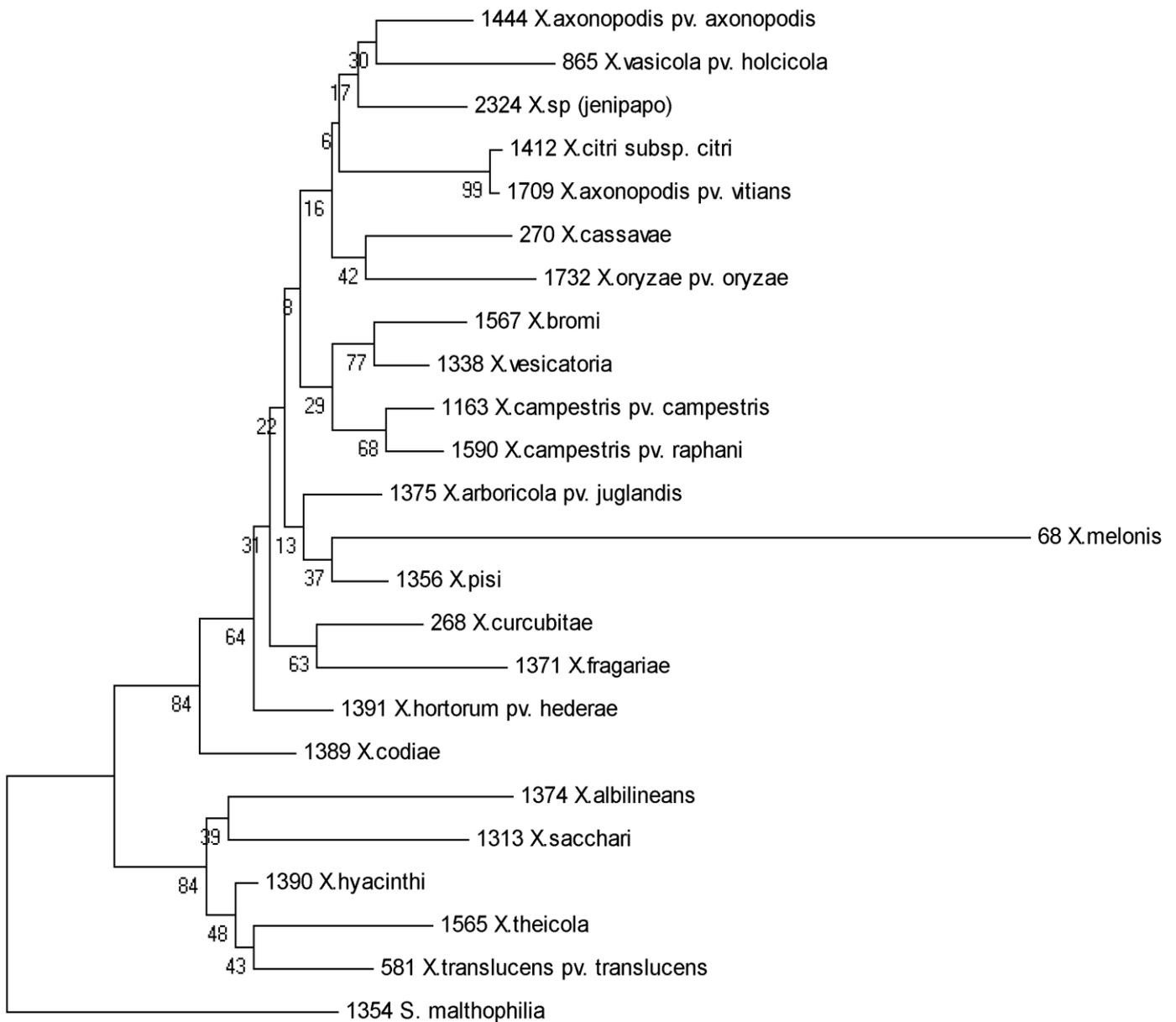
Extrato de levedo	5,0 g
Glicose.....	10,0 g
KNO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL
pH 7,0	

Hidrólise de gelatina (LELLIOT;STEAD, 1987)

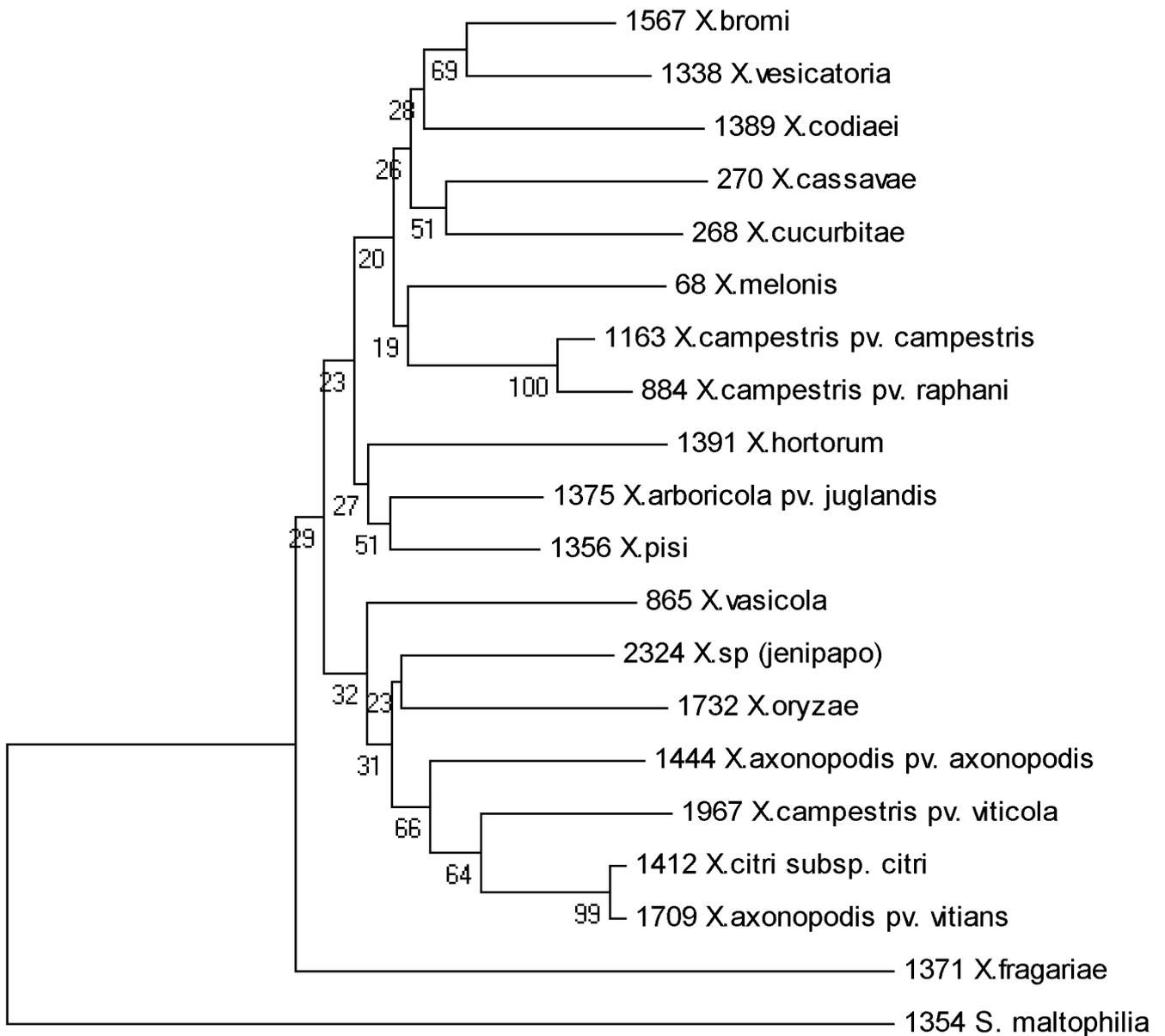
Extrato de levedo	3,0 g
Peptona.....	5,0 g
Gelatina.....	120,0 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

pH 7,0

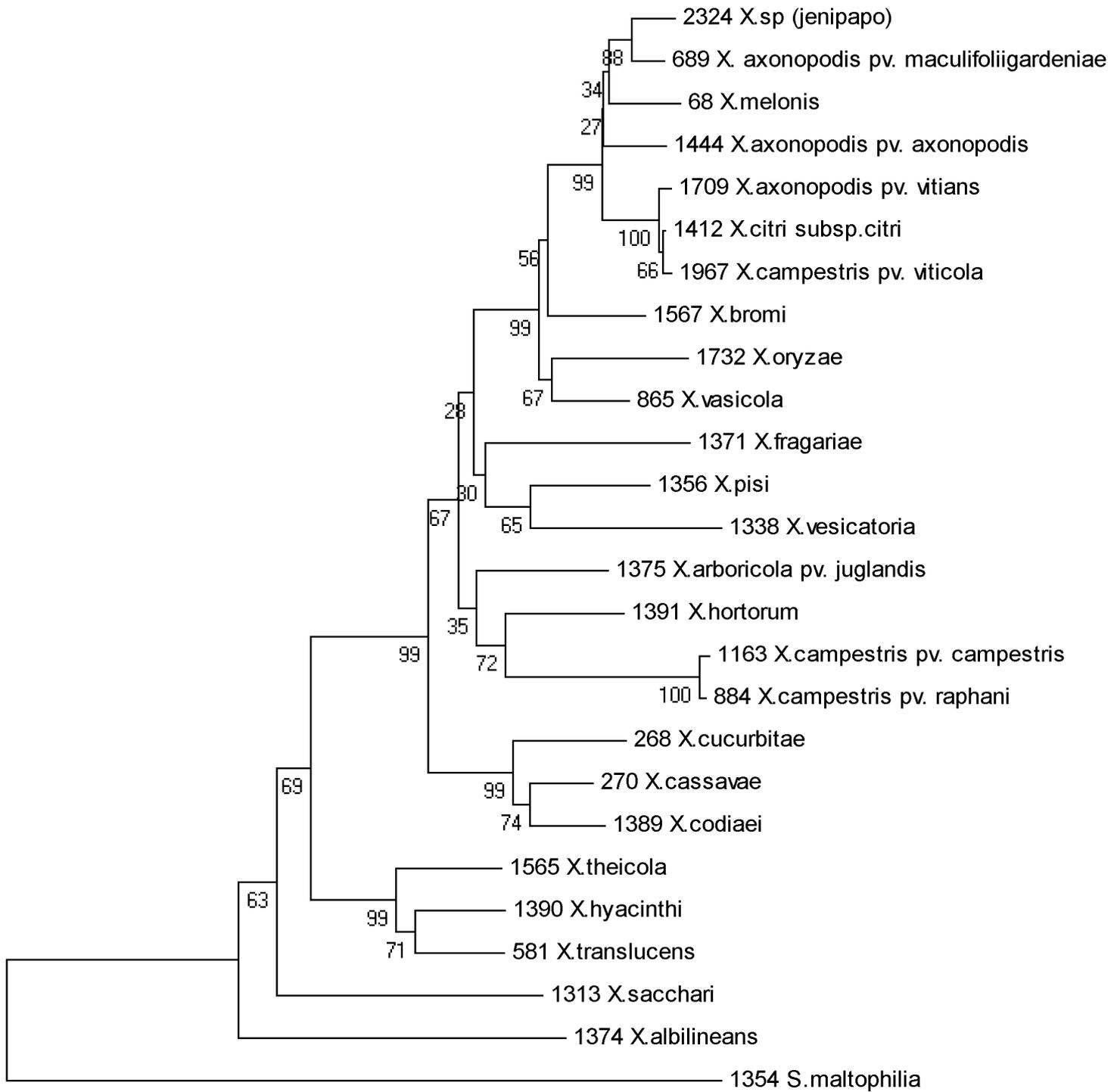
APÊNDICE 1 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *atpA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



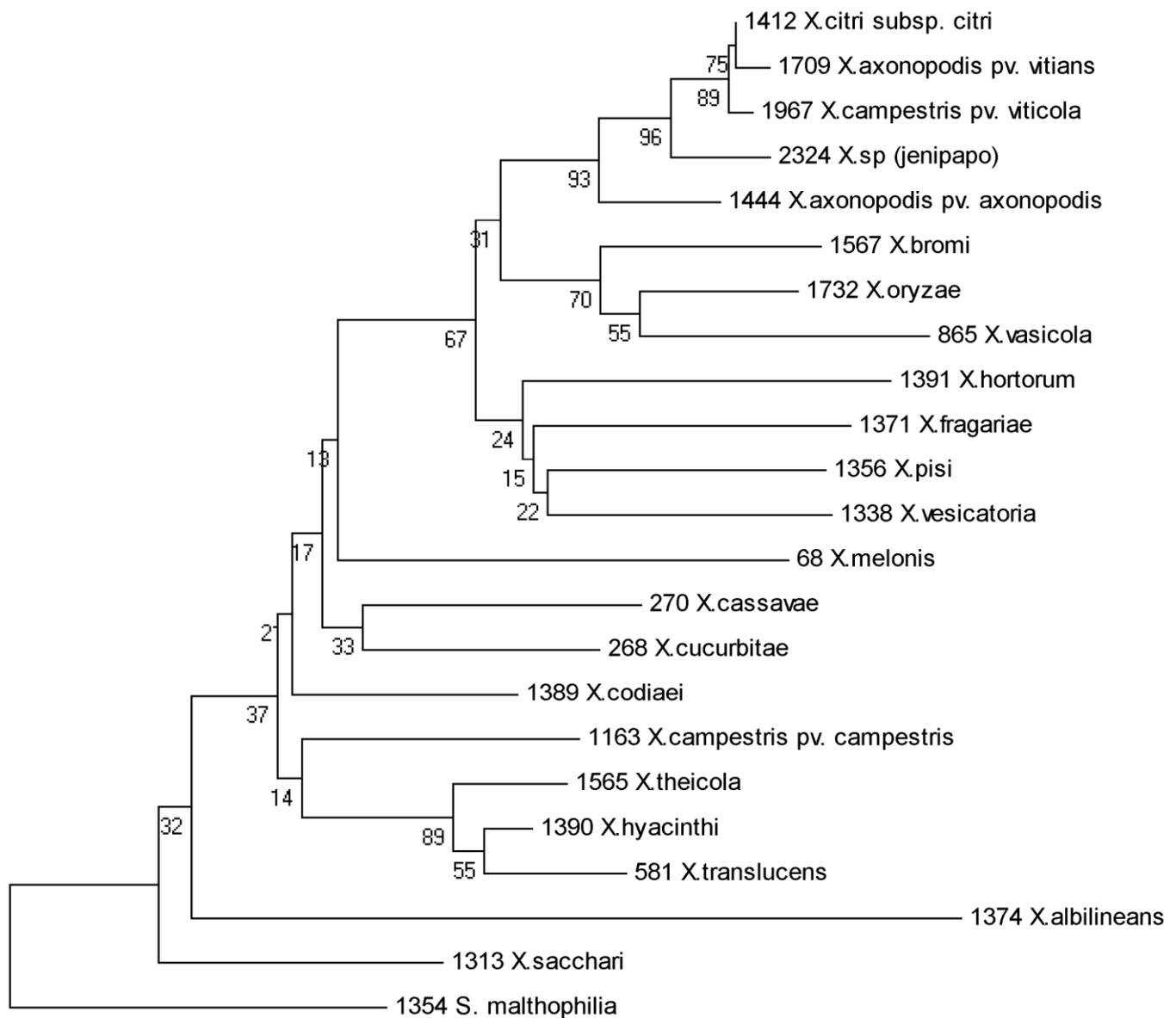
APÊNDICE 2 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *dnak* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



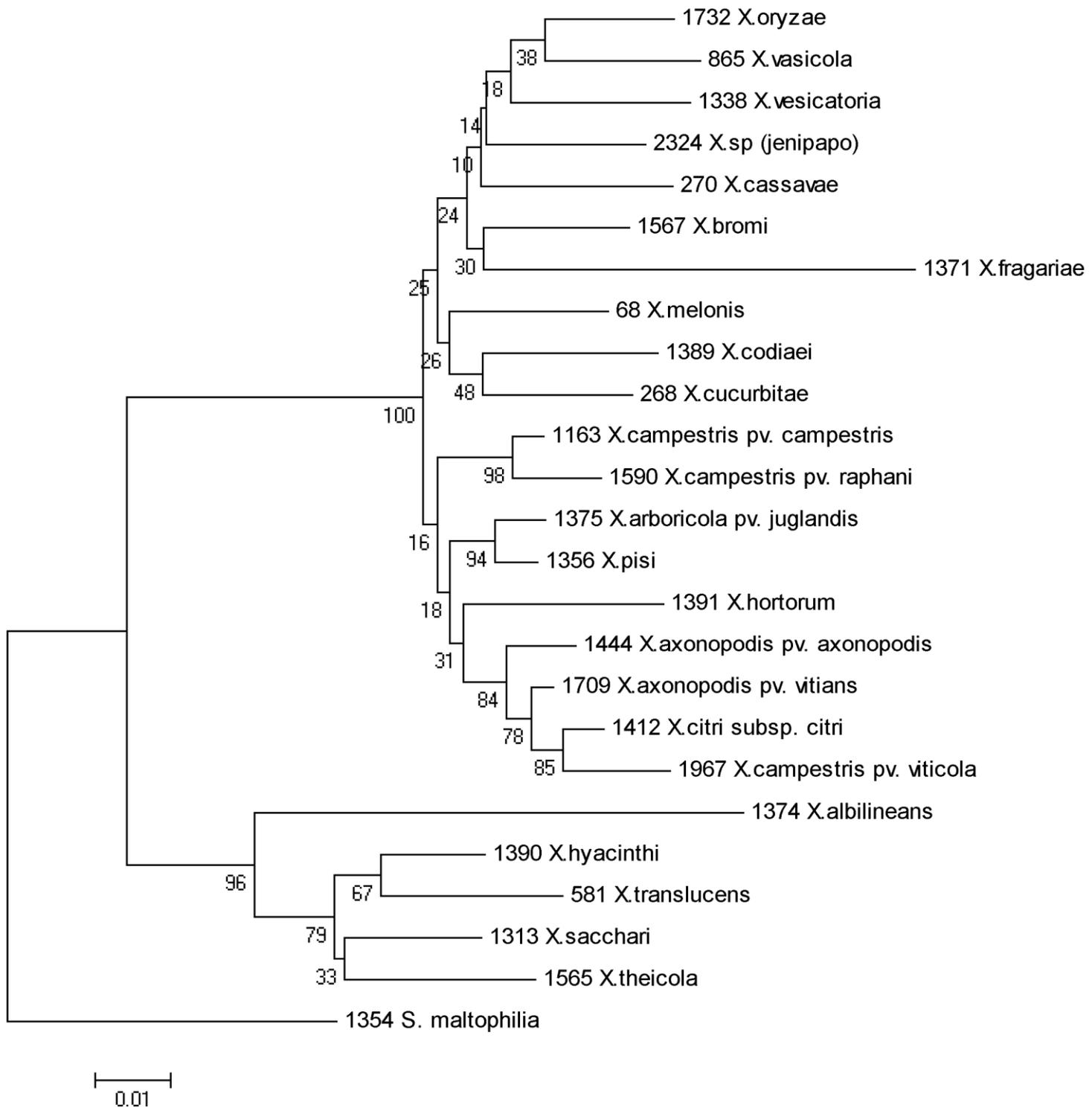
APÊNDICE 3 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *gyrB* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



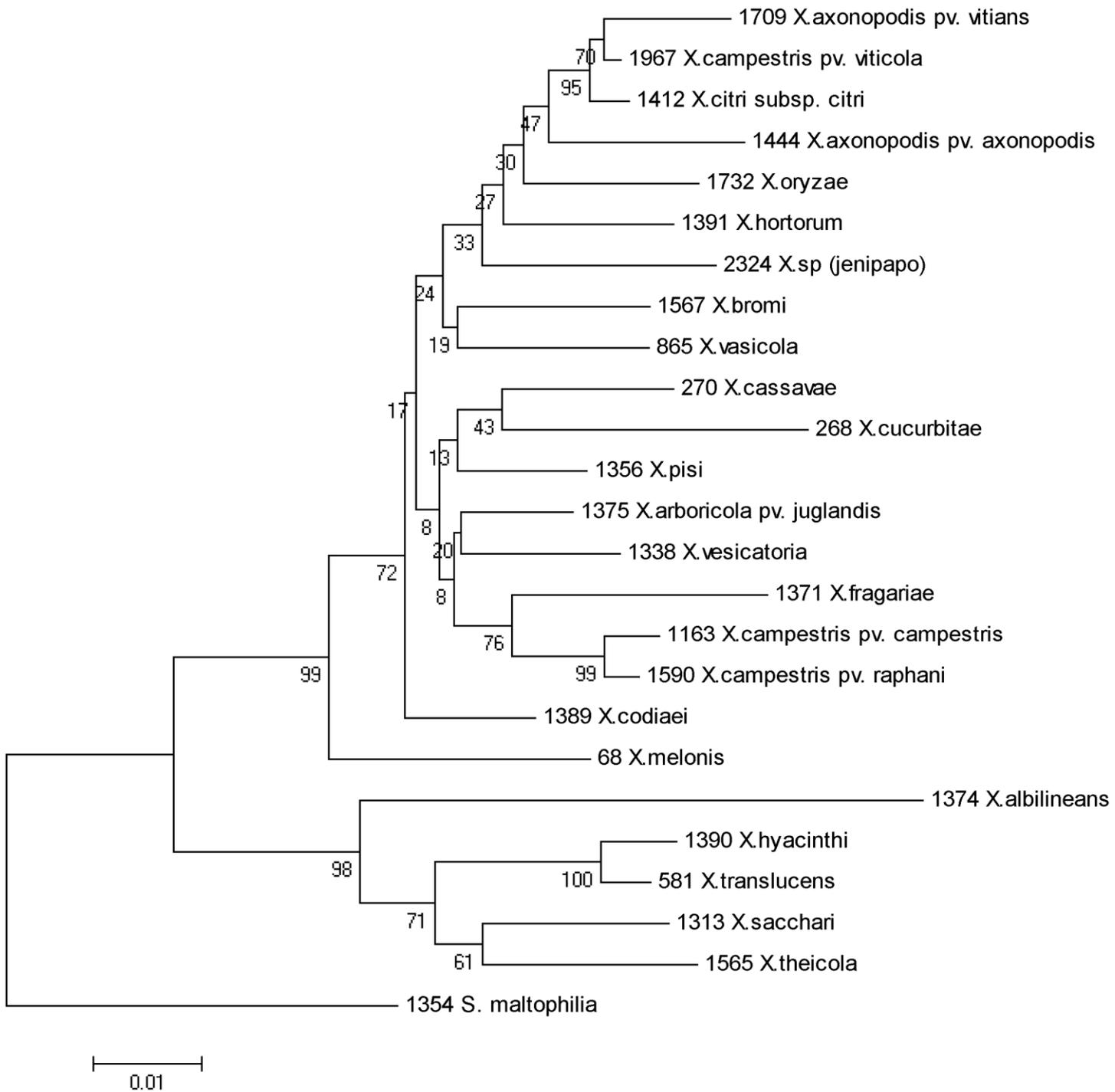
APÊNDICE 4 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *recA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



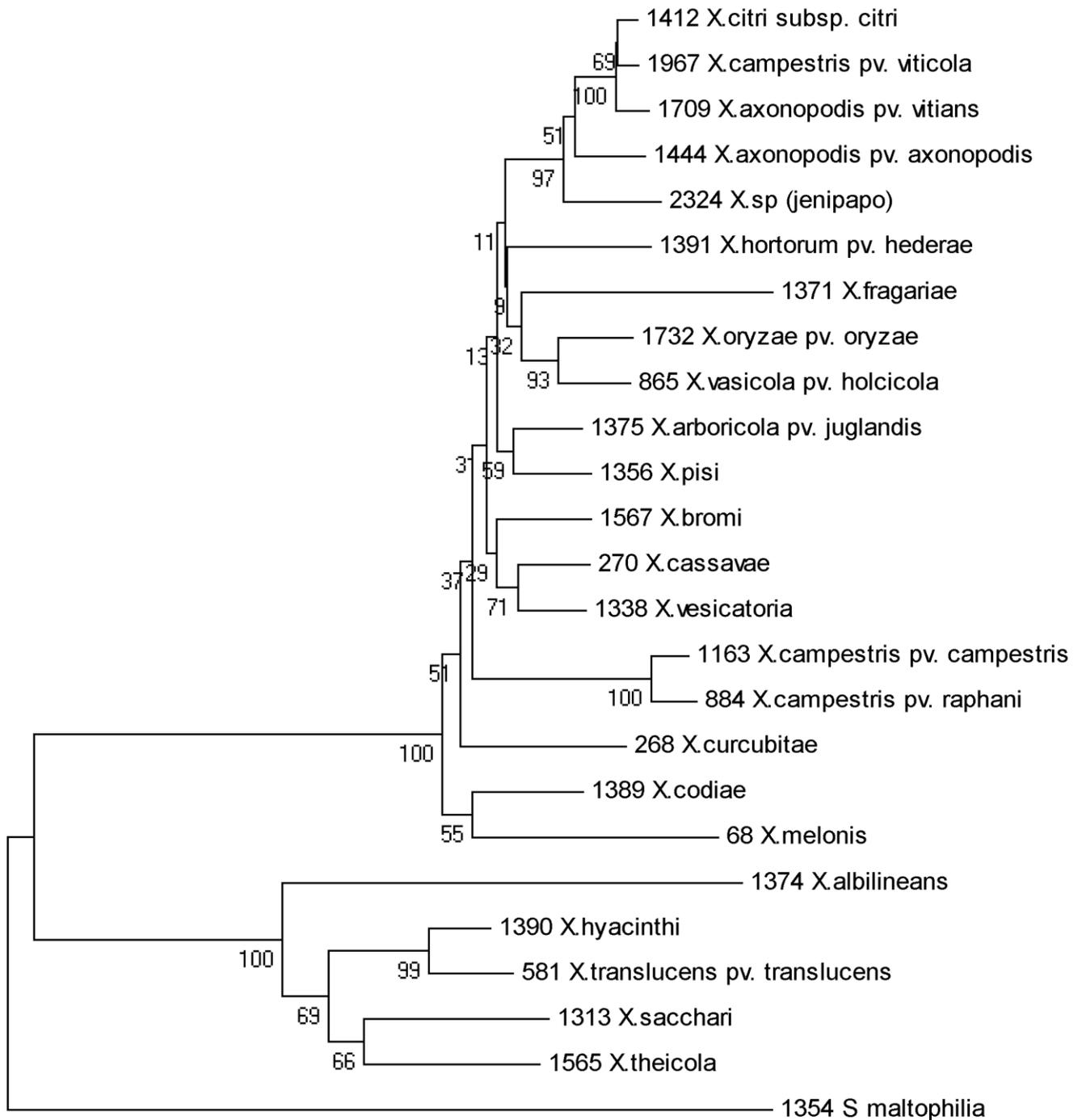
APÊNDICE 5 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *rpoA* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



APÊNDICE 6 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *rpoB* (*Neighbor joining* – Kimura 2)



APÊNDICE 7 - Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *rpoD* (*Neighbor joining* – Kimura 2)





SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

