

Detecção da diversidade genética em *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*  
por SDS-PAGE, RAPD e RFLP da região espaçadora 16S-23S

Patricia P. Coltri<sup>1</sup>, Edmilson R. Gonçalves<sup>1</sup>, Julio Rodrigues Neto<sup>2</sup>, Yoko B. Rosato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CBMEG, UNICAMP, Cidade Universitária, Barão Geraldo - Campinas, SP

<sup>2</sup>Instituto Biológico, Seção de Fitopatologia Bacteriológica - Campinas, SP

e-mail: [yrosato@obelix.unicamp.br](mailto:yrosato@obelix.unicamp.br)

Accito para publicação em : 19/09/2000.

RESUMO

Coltri, P.P., Gonçalves, E.R., Rodrigues Neto, J., Rosato, Y.B. Detecção da diversidade genética em *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* por SDS-PAGE, RAPD e RFLP da região espaçadora 16S-23S. *Summa Phytopathologica*, v. 26, p. 399-406, 2000.

*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* é uma bactéria Gram-negativa, responsável pela requeima foliar em plantas das famílias Araceae e Agavaceae, entre as quais estão espécies ornamentais do gênero *Anthurium*. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da diversidade genética no grupo, a comparação com linhagens de outros patovares de *X. axonopodis* relacionados e a verificação de possíveis correlações das linhagens isoladas com seus hospedeiros, por meio de SDS-PAGE, RAPD e RFLP-PCR da região espaçadora 16S-23S (ITS) do rDNA. Foram utilizadas 16 linhagens do patovar *dieffenbachiae*, sendo 11 isoladas no Brasil e 13 linhagens de patovares distintos de *X. axonopodis*, além de 3 linhagens de *X. campestris* isoladas de cebola (patovar indeterminado). As análises de proteínas por SDS-PAGE revelaram alta variabilidade entre os isolados, agrupando,

no entanto, as linhagens pertencentes ao patovar *dieffenbachiae*, com exceção da 255. O alto grau de variabilidade genética foi confirmado na análise de RAPD, que apresentou, apesar disso, maior similaridade entre os isolados deste patovar. Em ambas as análises cerca de 80% das linhagens de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* se agruparam com aproximadamente 40% de similaridade. O RFLP-PCR da região ITS indicou uma similaridade de 100% para as linhagens do patovar *dieffenbachiae*, exceto para a linhagem 1413, isolada nos Estados Unidos. Embora a região ITS seja considerada relativamente conservada, sua análise foi capaz de detectar polimorfismo entre linhagens de *X. axonopodis* isoladas de hospedeiros distintos como algodão, mandioca, citros e cebola, sem a formação de grupos específicos.

Palavras-chave adicionais: Taxonomia polifásica, Variabilidade genética, rDNA.

ABSTRACT

Coltri, P.P., Gonçalves, E.R., Rodrigues Neto, J., Rosato, Y.B. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* by SDS-PAGE, RAPD and RFLP of 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Summa Phytopathologica*, v. 26, p. 399-406, 2000.

*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* is a Gram-negative bacterium responsible for the leaf blight in Araceae and Agavaceae plants, including ornamental species such as *Anthurium* sp. Diversity of 16 strains was assessed by different approaches and compared to other 13 related strains of *X. axonopodis* from different hosts and 3 strains of *X. campestris* of undetermined pathovar, isolated from onion. SDS-PAGE of whole-cell proteins analysis revealed a high degree of variation and the dendrogram showed clustering of the *dieffenbachiae* strains, except for the 255 strain. RAPD analysis confirmed the high level of polymorphism of the *dieffenbachiae* strains and

two major subgroups were identified. 40% of similarity was observed among 80% of *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains. Three *dieffenbachiae* strains (1423, 1424, 1413), isolated in the United States, from different hosts, clustered separately. The other *X. axonopodis* pathovars showed clustering according to their hosts. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacer revealed a lower degree of polymorphism and the *dieffenbachiae* strains presented 100% of similarity, except for the 1413 strain isolated in the United States. The other *X. axonopodis* pathovars showed clustering inconsistent to their hosts.

Additional keywords: Poliphasic taxonomy, Genetic variability, rDNA.

A identificação e caracterização de bactérias fitopatogênicas tem apresentado grande importância no diagnóstico e no controle de diversas doenças que atingem culturas de plantas. O gênero *Xanthomonas* compreende 20 espécies genômicas segundo a classificação taxonômica proposta por VAUTERIN et al. (1995). As diferentes espécies causam doenças em um grande número de plantas, incluindo diversas culturas de importância econômica. *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* causa a requeima foliar em plantas das famílias Araceae e Agavaceae, que compreendem espécies de plantas ornamentais como *Anthurium*, *Dieffenbachia*, *Philodendron*, *Epipremnum*, *Syngonium* e *Spathiphyllum*. No Brasil, o isolamento desta bactéria ocorreu somente em 1953 (ROBBS, 1953). Os sintomas típicos descritos são a mancha bacteriana ou a requeima foliar que consiste de uma clorose ou necrose marginal e a invasão do sistema vascular da planta. Estes sintomas, no entanto, podem ser confundidos com deficiências nutricionais das plantas, o que reforça a necessidade de caracterização e identificação corretas do patógeno. Neste sentido, é muito importante o papel que a avaliação da diversidade assume na caracterização de linhagens. A similaridade pode ser avaliada por métodos fenotípicos e moleculares, e recentemente, tem sido proposto que a taxonomia polifásica, que inclui a análise através de diversos métodos, seja utilizada (VANDAMME et al., 1996).

*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* é um problema para a cultura de plantas ornamentais como o antúrio (*Anthurium* sp.), e ocorre em diferentes regiões tropicais e subtropicais, onde esta planta é mais comumente cultivada. Mudanças na prática cultural bem como medidas sanitárias rígidas tem mantido o controle da doença dentro de certos limites mas não se tem conseguido a erradicação da mesma. Em climas mais amenos, a infecção latente perpetua o patógeno em plantas assintomáticas (FUKUI et al., 1996). Este mesmo trabalho relata que a dispersão da doença através de material propagativo foi também registrada na rota da Holanda para a Índia, indicando que ela não é limitada aos países tropicais. Cultivares resistentes de antúrio têm sido desenvolvidos, entretanto, a demanda por formas e cores das flores se concentra em cultivares susceptíveis a *Xanthomonas* (FUKUI et al., 1999). Apesar dos problemas que causam para a cultura dessas plantas, as linhagens de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* foram pouco analisadas quanto às suas características genéticas ou moleculares. Quatro grupos principais foram detectados através da análise de ácidos graxos e o uso de anticorpos monoclonais revelou 12 sorogrupos relacionados com o hospedeiro mas não com a origem geográfica do isolado (LIPP et al., 1992). Experimentos com eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) revelaram dois padrões eletroforéticos distintos, mostrando a heterogeneidade no grupo assim como a correlação com a origem geográfica dos isolados (VAUTERIN et al., 1991).

Entre os métodos de análise genética, é reconhecido o uso da técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), descrita por WILLIAMS et al. (1990). O uso de "primers" aleatórios permite amplificar sequências casuais distribuídas no genoma, gerando perfis únicos para linhagens ou espécies. O método se mostrou bastante sensível em estudos de biodiversidade, sendo capaz de detectar diferenças intra-patovar em *Rhizobium* (HARRISON et al., 1992) e *Xanthomonas* (FERREIRA et al., 1997). Uma segunda técnica utilizada na caracterização genética de diferentes linhagens é o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de genes

ribossomais 16S ou da região espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S. Em *Xanthomonas* os genes 16S tem se mostrado altamente conservados, com similaridade média de 98,2% (HAUBEN et al., 1997), o que indica seu valor limitado para detecção da variabilidade genética. Por outro lado, a região ITS revelou maiores níveis de variação, cerca de 10 vezes superiores aos do gene 16S (LEBLOND-BOURGET et al., 1996). Apesar de não existirem confirmações a respeito do nível de variação dessa região em *Xanthomonas*, os resultados de BERTHIER et al. (1993) revelaram maior grau de divergência em linhagens de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. Cinco padrões distintos foram detectados e também foi observada uma correlação das linhagens com seus hospedeiros.

No presente trabalho, foi avaliado o nível de diversidade genética existente no patovar *dieffenbachiae*, e foram comparados os padrões apresentados por estas linhagens com os de outros patovares relacionados de *X. axonopodis* e isolados de cebola (*X. campestris*) por meio de estudos de SDS-PAGE, RAPD e RFLP-PCR da região espaçadora 16S-23S. Linhagens do patovar *dieffenbachiae* apresentaram similaridade aos patovares *malvacearum* e *manihotis*, em estudos de SDS-PAGE (VAUTERIN et al., 1991), e aos isolados de cebola (*X. campestris*) em testes fisiológico-bioquímicos (ALVAREZ et al., 1978).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Linhagens utilizadas e cultivo.** Foram utilizadas 16 linhagens de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* e outras 16 linhagens de *Xanthomonas* isoladas de diferentes hospedeiros (Quadro 1) da coleção depositada no Instituto Biológico, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, SP. As linhagens isoladas de cebola foram descritas pela primeira vez por ALVAREZ et al. (1978) e caracterizadas como *X. campestris*, sem designação de patovar. As linhagens foram crescidas em meio NYG (0,5% peptona; 0,3% extrato de levedura; 2% glicerol; 1% ágar) (TURNER et al., 1984), à temperatura de 28 °C por 16 horas sob agitação constante (250 rpm).

**SDS-PAGE de proteínas totais.** A extração de proteínas totais foi realizada de acordo com VAUTERIN et al. (1991). Aliquotas de 1,5 ml de cultura de bactérias, crescidas por 16 horas sob agitação de 250 rpm, foram centrifugadas por 3 minutos a 10.000g. O precipitado de células obtido foi pesado e para cada 20 mg de bactéria foram adicionados 90ml de tampão de amostra (62,5mM Tris HCl pH 6,8; 20% glicerol; 2% SDS; 5% b-Mercaptoetanol). A mistura foi ressuspendida e fervida por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 10.000g e o sobrenadante foi recolhido e aplicado em gel de poliacrilamida. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com LAEMMLI (1970). O gel foi posteriormente corado com nitrato de prata segundo BLUM et al. (1987).

**Extração de DNA total.** O DNA total das linhagens foi extraído de acordo com o descrito por ROSATO et al. (1998).

**RAPD.** Onze "primers" da série OPR e seis da série OPQ (Operon Technologies, Inc.) foram testados previamente para amplificar DNAs de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 1426 e *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538<sup>T</sup>, dos quais foram selecionados cinco por apresentarem bandas definidas e reprodutíveis. As 32 linhagens (Quadro 1) foram amplificadas com os "primers" OPR-2; OPR-12; OPR-13; OPQ-16 e OPQ-18. As

reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, utilizando 50 ng de DNA; 15 pmol de "primer"; 100 mM de cada nucleotídeo; 3,75 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Pharmacia), nas condições de amplificação de 1X/3min à 94°C e 45 X (1min/94°C,

1 min/34°C, 2min/72°C). Os produtos de amplificação foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados com brometo de etídio (10 mg/mL). Como controle negativo foi incluída, para cada experimento, uma amostra sem DNA.

**Quadro 1 - Linhagens de *Xanthomonas* spp. utilizadas.**

Espécie	Linhagem (IBSBF)	Hospedeiro	Origem
<i>X. axonopodis</i>			
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1426 (=LMG695)	<i>Anthurium</i> sp.	Brasil, 1953
pv. <i>dieffenbachiae</i>	255	<i>Anthurium</i> sp.	Brasil, 1979
pv. <i>dieffenbachiae</i>	269 (=NCCPB3657); 1076; 1109	<i>Anthurium</i> sp.	Brasil, 1974
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1296; 1300	<i>Anthurium</i> sp.	Brasil, 1996
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1304; 1305	<i>Anthurium</i> sp.	Brasil, 1997
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1380	<i>Anthurium</i> sp.	Brasil, 1998
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1423	<i>Dieffenbachia</i> sp.	EUA, 1950
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1173; 1174	<i>Dieffenbachia camila</i>	Brasil, 1995
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1424	<i>Philodendron scardens</i>	EUA, 1984
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1425	<i>Epipremnum aureum</i>	EUA, 1986
pv. <i>dieffenbachiae</i>	1413	<i>Anthurium andraeanum</i>	EUA, 1983
pv. <i>malvacearum</i>	555	<i>Gossypium hirsutum</i>	Brasil, 1985
pv. <i>malvacearum</i>	1038	<i>Gossypium hirsutum</i>	Brasil, 1993
pv. <i>malvacearum</i>	1153	<i>Gossypium hirsutum</i>	Brasil, 1995
pv. <i>manihotis</i>	280; 289; 1411; 1182; 1351	<i>Manihot esculenta</i>	Brasil
pv. <i>citri</i>	438 <sup>A</sup>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Brasil, 1982
pv. <i>aurantifolii</i>	423B; 434C (=ICMP8435)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Uruguai, 1981
pv. <i>citrumelo</i>	1011	<i>Citrus paradisi X Poncirus Trifoliata</i>	EUA
pv. <i>axonopodis</i> <sup>T</sup>	1444 (=LMG 538)	<i>Axonopodis scoparius</i>	Colômbia, 1949
<i>X. campestris</i>			
pv. indeterminado	595; 759; 759	<i>Allium cepa</i>	Brasil
		<i>Allium cepa</i>	Hawaii

<sup>A</sup>: Linhagem tipo. IBSBF: Instituto Biológico, Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Campinas, SP. LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium. NCCPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK. ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand.

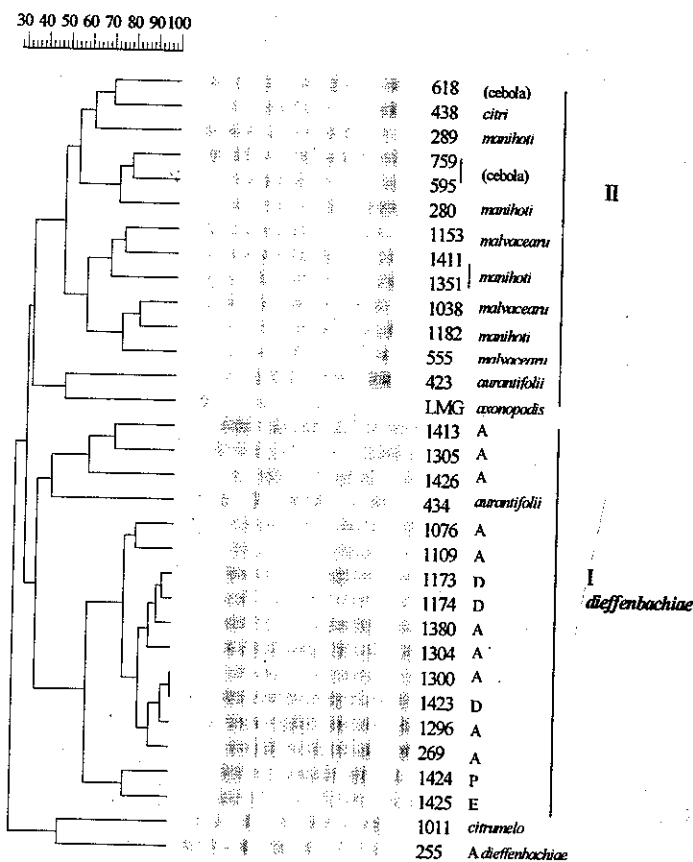
**RFLP-PCR da região espaçadora 16S-23S.** As amostras de DNA total de todas as linhagens foram amplificadas com os "primers" 16S uni 330 e 23S uni 322 anti desenhados a partir de regiões conservadas de *Xanthomonas* (HONEYCUTT et al, 1995). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, com 30 ng de DNA; 100 mM dNTPs; 0,5 mM de cada "primer" e 0,5 U *Taq* polimerase, nas condições de amplificação de 1 X 4 min/94°C e 40 X (1min/94°C, 1min/68°C, 1min/72°C). Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Para se obter os perfis de RFLP-PCR, estes produtos de PCR foram digeridos separadamente com 4 enzimas de restrição, *Sau3AI*, *HinfI*, *PstI* e *HhaI* por 1 hora a 37°C. As amostras digeridas foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% e coradas com nitrato de prata de acordo com DE MORENO et al (1985).

**Construção dos dendrogramas.** Os géis de SDS-PAGE, RAPD e RFLP foram avaliados qualitativamente pela presença ou ausência de bandas. A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o coeficiente de Jaccard (S). Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Mean) com ajuda dos programas GELCOMP (VAUTERIN & VAUTERIN, 1992) e NTSYS-PC (ROHLF, 1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**SDS-PAGE de proteínas totais.** O perfil eletroforético das diferentes linhagens de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* mostrou-se bastante divergente, com variações em muitas bandas (Figura 1). Em geral, foram observadas 15 bandas por linhagem, com peso molecular variando entre 20 e 100 kDa. Os perfis apresentados pelas linhagens do pv. *dieffenbachiae* apresentaram algumas diferenças bastante evidentes, como por exemplo, entre as linhagens 1424 e 1305, a ausência da banda de 30 kDa nas linhagens 1424 e 1305, diferentemente das demais linhagens. Uma banda intensa de aproximadamente 40 kDa foi observada nas linhagens 1305 e 1413, diferente das demais linhagens do patovar *dieffenbachiae*. A linhagem 1305 foi a única a não apresentar a banda de 28 kDa, comum entre as linhagens deste patovar. A linhagem 255 revelou um perfil distinto, apresentando cerca de 12 bandas sendo uma de 55 kDa observada somente nesta linhagem. Linhagens dos demais patovares também apresentaram perfis distintos. Uma banda de cerca de 35 kDa foi frequentemente observada entre linhagens de *X. campestris* isoladas de cebola, *X. axonopodis* pv. *manihotis* 280 e 289, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* 423 e 434, *X. axonopodis* pv. *citrumelo* 1011 e *X. axonopodis* pv. *axonopodis* LMG 538<sup>T</sup>. Diferenças menores, tanto em termos de

intensidade das bandas e nitidez foram também observadas e consideradas para análise apenas quando presentes em mais de duas repetições.



**Figura 1** - Dendrograma (S/UPGMA) obtido com análises de SDS-PAGE de 32 linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas campestris*. No Grupo I estão cerca de 90% das linhagens do pv. *dieffenbachiae* e no Grupo II estão linhagens de patovares distintos, conforme indicado. No Grupo I, as letras indicam os hospedeiros do pv. *dieffenbachiae*. A - *Anthurium*; D - *dieffenbachia*; P - *Philodendron*; E - *Epipremnum*. A barra de escala indica similaridade.

O dendrograma obtido pela análise dos perfis de SDS-PAGE (Figura 1) apresentou dois grandes grupos (I e II) com similaridade de 35 a 100%. As linhagens do patovar *dieffenbachiae*, reunidas no Grupo I com similaridade de 40 a 100%, indicam a existência de um alto grau de polimorfismo. Apenas a linhagem 255, isolada de antúrio (*Anthurium* sp.) no Brasil apresentou características divergentes e não foi incluída no Grupo I. Por outro lado, duas linhagens, 1300 e 1423, apresentaram perfis idênticos, apesar de terem sido isoladas de regiões geográficas distintas (Brasil e Estados Unidos, respectivamente). Nesse grupo também foi incluída uma linhagem isolada de citros (434), apesar de apresentar um perfil diferenciado. O Grupo I pôde ser dividido em 2 subgrupos principais, com similaridade maior do que 60%. Um

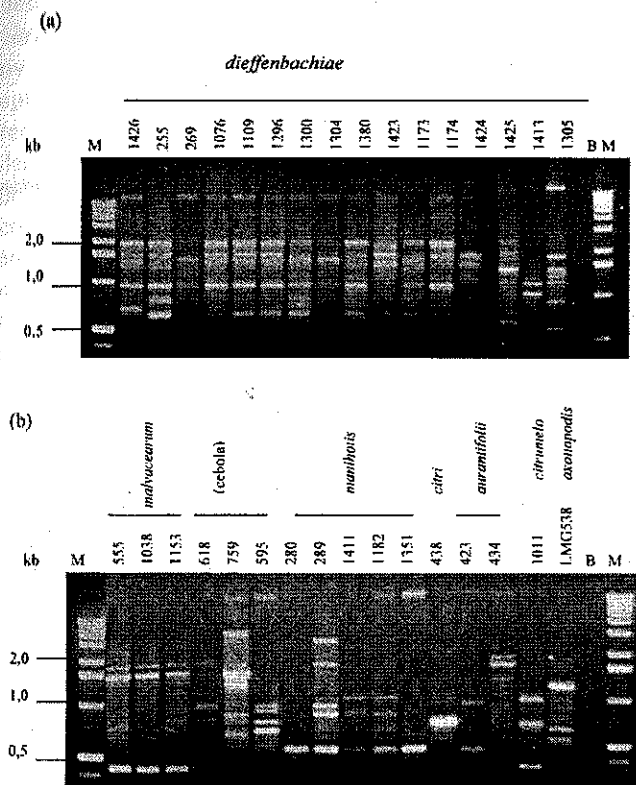
deles inclui a linhagem referência (1426), e o outro subgrupo compreende as demais linhagens isoladas de diferentes hospedeiros, do Brasil e exterior. O perfil de proteínas obtido não apresentou correlação com o tipo de hospedeiro quando no caso de *Anthurium* e *Dieffenbachia*. Entretanto, duas linhagens (1424 e 1425), isoladas de *Philodendron* e *Epipremnum*, encontram-se isoladas dos dois subgrupos principais. O Grupo II reuniu as demais linhagens de *X. axonopodis* pertencentes a patovares distintos e as três linhagens de *X. campestris* isoladas de cebola, com similaridade de 35 a 85%. Não foi observada nenhuma correlação dos perfis com os respectivos hospedeiros.

O alto grau de divergência dentro do patovar *dieffenbachiae* detectado nesta análise contrasta com aqueles descritos em diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* (GONÇALVES & ROSATO, 2000). Um outro resultado contrastante foi obtido pela ausência de correlação entre as linhagens e seus hospedeiros ou regiões geográficas. Essa correlação foi observada por VAUTERIN et al. (1991), que diferenciaram linhagens isoladas de *Anthurium* no Brasil de outras isoladas de *Dieffenbachia* nos Estados Unidos, sugerindo que o patovar *dieffenbachiae* seria heterogêneo. Finalmente, as linhagens de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* apresentaram maior similaridade com as linhagens do pv. *dieffenbachiae*, confirmando resultados já descritos (VAUTERIN et al., 1991).

**RAPD.** Os DNAs de todas as linhagens utilizadas foram amplificados com cinco primers. Os perfis gerados com cada "primer" revelaram de 2 a 6 bandas variando entre 0,4 e 3,0 kb. O padrão mais variável foi gerado pelo "primer OPQ-16, que apresentou cerca de 20 perfis distintos. Por outro lado, os produtos dos "primers" OPQ-18, OPR-12 e OPR-13 revelaram menor variação entre as linhagens do patovar *dieffenbachiae*, sendo poucas as discrepantes (1413, 1304, 1423, 1380). A Figura 2 mostra o perfil obtido com as diferentes linhagens do patovar *dieffenbachiae* e de outros patovares, utilizando-se o "primer" OPR-12.

O nível de similaridade genética observado no dendrograma construído (Figura 3), de 7 a 65%, foi menor do que o obtido com SDS-PAGE. Apesar do alto grau de polimorfismo obtido, as linhagens do patovar *dieffenbachiae* formaram um grupo distinto, com similaridade de 25 a 75% (Grupo I).

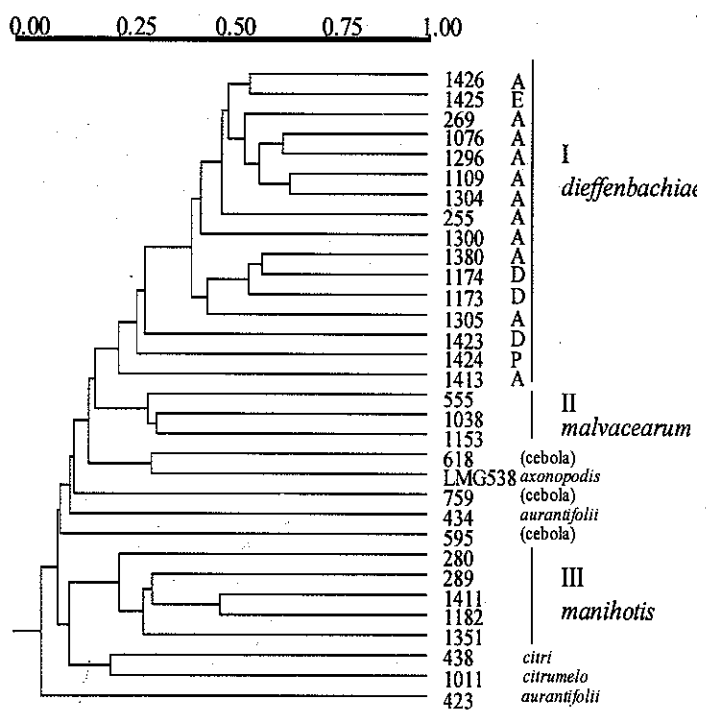
Dois subgrupos podem ser identificados, um com linhagens isoladas de *Anthurium* e *Dieffenbachia* e outro com isolados de *Anthurium* e *Epipremnum*. As linhagens 1423 e 1424, provenientes dos EUA e isoladas de *Dieffenbachia* e *Philodendron*, respectivamente, permaneceram separadas dos dois subgrupos assim como a linhagem 1413, isolada de *A. andraeanum*. Apesar do pequeno número de linhagens provenientes de outros hospedeiros, que não de *Anthurium* sp., analisado, os resultados obtidos com RAPD permitiram a separação das linhagens *dieffenbachiae* de hospedeiros distintos. Apenas as linhagens isoladas de *Anthurium* sp. e de *Dieffenbachia* não puderam ser distinguidas. As demais linhagens, pertencentes a patovares distintos, não permitiram a formação de grupos definidos devido ao alto grau de variação apresentada pelas mesmas. Entretanto, considerando-se níveis de similaridade menores, podem ser observados outros dois grupos distintos, um deles compreendendo todas as linhagens do patovar *malvacearum* (Grupo II) e o outro, as linhagens do patovar *manihoti* (Grupo III).



**Figura 2** - Perfil de RAPD de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas campestris* com primer OPR-12. Em (a) linhagens do patovar *dieffenbachiae*; em (b) linhagens de patovares distintos de *Xanthomonas axonopodis* e isolados de cebola (*Xanthomonas campestris*). M. Marcador de peso molecular de 1 kb (Gibco-BRL); B. controle negativo (sem DNA).

De forma geral, as análises efetuadas com RAPD tem apresentado alto nível de polimorfismo em bactérias de diferentes gêneros, como *Rhizobium* (HARRISON et al., 1992); *Xylella* (ROSATO et al., 1998) e mesmo em espécies de *Xanthomonas* (FERREIRA et al., 1997; GONÇALVES & ROSATO, 2000). Em *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, o RAPD revelou perfis praticamente únicos, podendo diferenciar linhagens do mesmo patovar com similaridade média de 50%, o que revela a alta sensibilidade desta técnica (GONÇALVES & ROSATO, 2000).

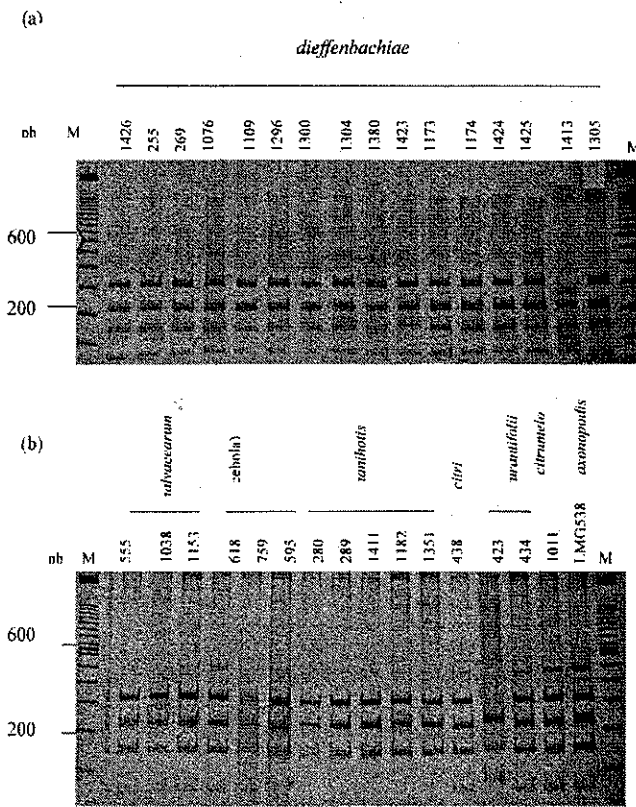
**RFLP-PCR da região espaçadora 16S-23S.** Os produtos de PCR da região espaçadora 16S-23S do rDNA, obtidos a partir das diferentes linhagens de *X. axonopodis*, apresentaram tamanho de cerca de 1,1 kb e foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição *HhaI*, *HinfI*, *PstI* e *Sau3AI*. As digestões com *PstI* e *HhaI* produziram perfis uniformes para todas as linhagens utilizadas gerando fragmentos de 150 pb e 700 pb e de 200 pb e 400 pb, respectivamente. A única exceção foi o perfil da digestão do produto de amplificação da linhagem *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* 423, que revelou apenas uma banda definida de 400 pb na digestão com *HhaI*.



**Figura 3** - Dendrograma (S/UPGMA) obtido com análises de RAPD com 32 linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas campestris*, utilizando os primers OPR-2, OPR-12, OPR-13, OPQ-16 e OPQ-18. No Grupo I estão as linhagens do pv. *dieffenbachiae*; as letras indicam os respectivos hospedeiros, A. *Anthurium*; D. *dieffenbachia*; P. *Philodendron*; E. *Epipremnum*. A barra de escala indica similaridade.

As digestões com *HinfI* e *Sau3AI*, por outro lado, revelaram padrões distintos para os produtos de PCR das diferentes linhagens (Figura 4). A digestão com *Sau3AI* revelou o perfil mais variável, embora ainda similar entre linhagens do patovar *dieffenbachiae*. Dentre estas, as linhagens 1423 e 1413 apresentaram padrões distintos. É bastante visível a diferença da linhagem *dieffenbachiae* 1413 em relação a todas as demais linhagens, com similaridade <50%. Esta linhagem foi também a que apresentou o menor grau de similaridade com as outras linhagens *dieffenbachiae* na análise por RAPD. A linhagem *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* 423 foi, novamente, a mais discrepante, confirmando também a análise por RAPD.

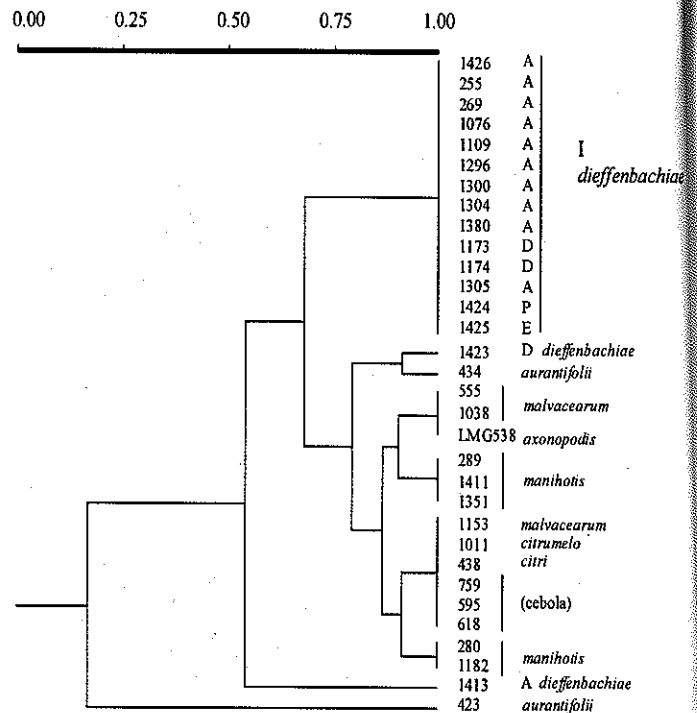
Os perfis de RFLP foram analisados para a construção de um dendrograma, que mostrou um alto grau de similaridade entre as linhagens do patovar *dieffenbachiae* (Figura 5). A grande maioria das linhagens (87,5%) apresentou perfis idênticos. Apenas as linhagens 1423 e 1413 permaneceram fora deste grande grupo, o que demonstra que este marcador é mais conservado e portanto não indicado para detecção de variabilidade genética. A linhagem 1423, isolada nos Estados Unidos, pôde ser diferenciada das demais linhagens de



**Figura 4** - Perfil de RFLP-PCR de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas campestris* a partir de digestão com *Hinf*I. Em (a) linhagens do patovar *dieffenbachiae*; em (b) linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e isolados de cebola (*Xanthomonas campestris*). M. Marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco-BRL).

*dieffenbachiae* por diferenças em apenas 2 bandas, geradas pela digestão com *Sau*3AI. Esta linhagem apresentou alta similaridade genética (~90%) com a linhagem *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* 434, isolada de citros. Por outro lado, a linhagem 1413, isolada de *A. andraeanum*, nos Estados Unidos, apresentou maior grau de divergência, com similaridade de apenas 53%, indicando a possibilidade de se tratar de um isolado com características bastante distintas dentro do pv. *dieffenbachiae*.

Em *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, a similaridade intrapatovar variou de 88 a 100% (GONÇALVES & ROSATO, 2000) e em *Xylella fastidiosa*, isolada de diferentes hospedeiros, de 87 a 100% (ROSATO et al., 1998). Esses resultados apresentam níveis de similaridade intrapatovar maiores que os obtidos com a linhagem 1413, o que leva a sugerir a necessidade de um estudo mais amplo compreendendo um maior número de linhagens isoladas de *A. andraeanum*. A maior parte das linhagens de outros patovares de *X. axonopodis* apresentou cerca de 75% de similaridade, compreendendo os patovares *manihotis*, *malvacearum*, *citri* e *citrumelo*, além das *X. campestris* isoladas de cebola. Algumas linhagens dos patovares *manihotis* e *malvacearum* se mostraram idênticas, e, em um dos casos, também houve identidade entre isolados de cebola e os patovares *malvacearum*, *citrumelo* e *citri*.



**Figura 5** - Dendograma (S/UPGMA) obtido com análises de RFLP-PCR da região espaçadora 16S-23S de 32 linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas campestris*. No Grupo I estão as linhagens do pv. *dieffenbachiae*; as letras indicam os respectivos hospedeiros, A. *Anthurium*; D. *dieffenbachia*; P. *Philodendron*; E. *Epipremnum*. A barra de escala indica similaridade.

Apesar da baixa diversidade detectada entre as linhagens do patovar *dieffenbachiae*, a região ITS, em geral, apresenta um nível de variabilidade maior do que o gene 16S (GÜRTLER & STANISICH, 1996). Este gene foi exaustivamente analisado no gênero *Xanthomonas* e foi detectada similaridade média de 98,2% entre as seqüências de nucleotídeos. Embora *X. axonopodis* seja a espécie mais variável dentre as *Xanthomonas*, apresentando a maior taxa de variação entre as seqüências, o gene 16S é pouco variável dentro do gênero (HAUBEN et al., 1997). Por outro lado, o espaçador 16S-23S apresenta seqüências menos conservadas. O fato de esta ser uma região intergênica permite que as mutações sofram menor pressão da seleção do que aquelas em seqüências codificadoras podendo, assim, se acumular. Desta forma, essa região pode apresentar uma taxa de variação maior que o gene 16S.

Os estudos realizados com a região ITS de *Xanthomonas* indicaram uma maior diversidade entre os isolados com maior número de hospedeiros, como é o caso de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, ao contrário de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e *X. axonopodis* pv. *manihotis*, que se mostraram mais homogêneos em todas as análises realizadas (BERTHIER et al., 1993). A diversidade de hospedeiros, poderia assim, estar relacionada à diversidade revelada por perfis de SDS-PAGE e RAPD. As relações de patogenicidade das linhagens *dieffenbachiae* nos diferentes hospedeiros poderiam elucidar os diferentes genótipos existentes, entretanto, eles não tem sido

descritos na literatura. Os patógenos de citros *X. axonopodis* pv. *citri* 438, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* 423 e 434 e *X. axonopodis* pv. *citrumelo* 1011, utilizados no presente trabalho, também apresentaram diferenças consideráveis em algumas análises realizadas e esses resultados refletem as diferenças previamente detectadas na patogenicidade e por experimentos de reassociação de DNA (EGEL et al., 1991). Os isolados de cebola, caracterizados como *X. campestris* de patovar indeterminado, apresentaram na análise de ITS, similaridade de 100% com outras linhagens de *X. axonopodis*, o que sugere a necessidade de maiores estudos taxonômicos para uma caracterização mais conclusiva desses patógenos.

Todos os métodos utilizados no presente trabalho para caracterização das linhagens de *X. axonopodis* permitiram distinguir o patovar *dieffenbachiae* dos demais. A técnica de RAPD é a mais indicada para detecção da diversidade intra-patovar, sendo capaz de revelar um maior polimorfismo em relação ao SDS-PAGE, confirmando trabalhos anteriores (FERREIRA et al., 1997). O RFLP-PCR da região espaçadora apresentou maior grau de conservação entre as linhagens, inclusive entre aquelas de patovares distintos. Esta técnica, assim, se mostrou pouco sensível para detecção de variabilidade intra-específica, podendo ser importante na determinação das relações genéticas entre diferentes espécies.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa PIBIC/Unicamp.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, A.M., BUDDENHAGEN, I.W., BUDDENHAGEN, E. S., DOMEN, H.Y. Bacterial blight of onion, a new disease caused by *Xanthomonas* sp. *Phytopathology*, St. Paul, v. 68, p. 1132-1136, 1978.
- BERTHIER, Y., VERDIER, V., GUESDON, J.L., CHEVRIER, D., DENIS, J.B., DECOUX, G., LEMATTRE, M. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.59, p.851-859, 1993.
- BLUM, H., BEIER, H., DGRÖSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 8, p. 93-99, 1987.
- DE MORENO, M.R., SMITH, J.C., SMITH, R.V. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Analytical Biochemistry*, New York, v.151, p.466-470, 1985.
- EGEL, D.S., GRAHAM, J.H., STALL, R.E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, p. 2724-2730, 1991.
- FERREIRA, H., BERIAM, L.O.S., GONÇALVES, E.R., ROSATO, Y.B. Characterization of brazilian isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by ribotyping and RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, p.178-185, 1997.
- FUKUI, R., FUKUI, H., MCELHANEY, R., NELSON, S.C., ALVAREZ, A.M. Relationship between symptom development and actual sites of infection on leaves of *Anthurium* inoculated with a bioluminescent strain of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.62, p.1021-1028, 1996.
- FUKUI, R., FUKUI, H., ALVAREZ, A.M. Suppression of bacterial blight by a bacterial community isolated from the guttation fluids of anthuriums. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.65, p.1020-1028, 1999.
- 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*, Washington, 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*, Glasgow, v.142, p.3-16, 1996.
- HARRISON, S.P., MYTTON, L.R., SKOT, L., DYE, M., CRESSWELL, A. Characterisation of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.
- HAUBEN, L., VAUTERIN, L., SWINGS, J., MOORE, R.B. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.47, p.328-335, 1997.
- HONEYCUTT, R.J., SOBRAL, B.W.S., MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostics for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*, Glasgow, v.141, p.3229-3239, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LEBLOND-BOURGET, N., PHILIPPE, H., MANGIN, I., DECARIS, B. 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.46, p.102-111, 1996.
- LIPP, R.L., ALVAREZ, A.M., BENEDICT, A.A., BERESTECKY, J. Use of monoclonal antibodies and pathogenicity tests to characterize strains of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* from aroids. *Phytopathology*, St. Paul, v. 82, p.677-682, 1992.
- ROBBS, C.F. A mancha bacteriana das Aráceas. *Agricultura e Pecuária*, Rio de Janeiro, v.24, p.18-19, 1953.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50. New York: Exeter Publ., NY, 1989.
- ROSATO, Y., RODRIGUES NETO, J., MIRANDA, V.S., CARLOS, E.F., MANFIO, F. P. Diversity of a *Xyllela fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. *Systematic and Applied Microbiology*, Jena, v.21, p.593-598, 1998.
- TURNER, T., BARBER, C., DANIELS, M. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular and General Genetics*, Berlin, v.195, p.101-107, 1984.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, Washington, v.60, p.407-438, 1996.
- VAUTERIN, L., VAUTERIN, P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology*, v.1, p.37-41, 1992.

23. VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.45, p.472-489, 1995.
24. VAUTERIN, L., SWINGS, J., KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of

proteins. *Journal of General Microbiology*, Cambridge, v.137, p.1677-1687, 1991.

25. WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

**Dinâmica de área foliar, desfolha e variáveis de área foliar sadia em feijoeiros com infecções isoladas e conjuntas de *Phaeoisariopsis griseola* e *Colletotrichum lindemuthianum* \***

Solange M. de T. P. Gomes Carneiro<sup>1</sup>, Lilian Amorim<sup>2</sup>, Armando Bergamin Filho<sup>2</sup>, Bernhard Hau<sup>3</sup>, Anésio Bianchini<sup>1</sup>

\*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

\*Parcialmente financiado pela Comunidade Econômica Européia: Projeto ERBIC18CT960037

<sup>1</sup>IAPAR, CP 481, CEP 86.047-902 - Londrina, PR.

<sup>2</sup>ESALQ/USP, CP 09, CEP 13.418-900 - Piracicaba, SP.

<sup>3</sup>Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover, 30419 Hannover, Alemanha.

Aceito para publicação em: 18/05/2000.

**RESUMO**

Carneiro, S.M. de T.P.G., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Hau, B., Bianchini, A. Dinâmica de área foliar, desfolha e variáveis de área foliar sadia em feijoeiros com infecções isoladas e conjuntas de *Phaeoisariopsis griseola* e *Colletotrichum lindemuthianum*. *Summa Phytopathologica*, v. 26, p. 406-412, 2000.

Foram conduzidos três experimentos, nos anos de 1997 e 1998, com objetivo de verificar o efeito da mancha angular e da antracnose em infecções isoladas e conjuntas sobre variáveis de área foliar sadia do feijoeiro e quantificar a redução de área foliar causada pelos patógenos. Cada experimento foi delineado com três blocos com quatro tratamentos: inoculação com *Phaeoisariopsis griseola*, com *Colletotrichum lindemuthianum*, com ambos patógenos e pulverização com fungicidas sem inoculação. Utilizou-se dois cultivares: Carioca e Iapar-57. Quatro plantas foram marcadas em cada parcela para realização das avaliações semanais de área foliar e de severidade das doenças. As doenças provocaram grande queda de folhas, menor emissão de folhas novas, redução no tamanho médio das folhas e como resultado, reduções no índice de área foliar sadia (HLAI) e na absorção da área foliar sadia (HRI). As reduções em HLAI causadas por *P. griseola* e *C.*

*lindemuthianum* foram de 92% e 78% respectivamente, aos 54 dias após a semeadura (d.a.s.) na cultivar Iapar-57 em 1998. Nesta data a cultivar Carioca apresentou, em média, 31% de redução no número de folhas nas plantas inoculadas em comparação ao controle tratado com fungicidas. A redução média no número de folhas nas plantas inoculadas da cultivar Iapar-57, em comparação com o controle, foi de 70% aos 54 d.a.s. As plantas inoculadas com *P. griseola* tiveram 78% de redução no tamanho médio das folhas aos 61 d.a.s. no experimento com a cv. Iapar-57 em 1998. Por outro lado, as plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* e com os dois patógenos tiveram reduções de 49% e 61%, respectivamente. Não foram observadas diferenças importantes entre plantas inoculadas com os dois patógenos e plantas inoculadas com cada um deles separadamente.

Palavras-chave adicionais: antracnose, mancha angular, duração da área foliar sadia, absorção da área foliar sadia.