

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM
ISOLADOS DE *Xanthomonas albilineans* ORIUNDOS DE
DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Ana Carolina Tardiani de Faria

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM
ISOLADOS DE *Xanthomonas albilineans* ORIUNDOS DE
DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Ana Carolina Tardiani de Faria

Orientador : Prof. Dr. Dilermando Perecin

**Co- orientadora: Dr^a. Silvana Aparecida Creste Dias de
Sousa**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA CAROLINA TARDIANI DE FARIA – casada, nascida em 30 de agosto de 1984 em Ribeirão Preto (SP), Brasil. Ingressou em 2005, no curso de Ciências Habilitação Plena em Biologia no Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto. Durante a graduação estagiou em 2005 no Bosque e Zoológico Fábio Barreto de Ribeirão Preto realizando a função de manejo de animais silvestres . De 2006 a 2007 realizou estágio no Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto (DAERP), onde atuou no projeto DAERP na Escola ministrando palestras de educação ambiental, abordando temas como "Conscientização do uso racional da água", "Aquífero Guarani" e "Coleta Seletiva de Resíduos Sólidos (Lixo)", junto às escolas públicas e privadas de ensino fundamental e médio. Entre meados de 2007 e início de 2008 realizou estágio na Universidade de São Paulo, Departamento de Genética da Faculdade de Medicina na área de citogenética molecular humana. m 2008 recebeu grau de Licenciatura em Ciências Biológicas. De 2008 a 2010 realizou estágio Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana - IAC/Apta, onde foi bolsista Apoio Técnico "A" CNPq no projeto " Estratégias Integradas para o Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar Visando Tolerância à Seca (processo 552381/2007-1), desenvolvendo atividades em biologia molecular (extração de DNA de cana-de-açúcar, preparo de géis, preparo de soluções, reações de PCR, genotipagem, análise de dados, interpretação de resultados), micropropagação de cana-de-açúcar além de técnicas em sistemas de diagnósticos de doenças em genótipos comerciais e em bancos de germoplasma de cana, .sob a orientação da Dr.^a Silvana Creste. Em março de 2010 ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, sendo bolsista CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) durante o curso.

*Dentre inúmeros conhecimentos que adquiri durante meu mestrado, o mais importante
foi que no meu dia-a-dia em meio aos reveses que foram surgindo ao longo dessa
caminhada, Deus me mostrou que quando estou fraca, então é que sou forte!
E me lembrou que TUDO posso naquele que me fortalece!*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e mais essa conquista primeiramente aos meus pais Alberto José Tardiani e Maria de Lourdes P. S. Tardiani, que foram as primeiras pessoas que me amaram, que acreditaram em mim e que sempre que necessário se abdicaram dos caprichos da vida para formarem seus três filhos com muito esforço, amor e dedicação.

Ao meu marido Alexandre Ignácio de Faria, peça fundamental para que esse sonho se realizasse. Sempre estive ao meu lado sendo um poço de amor, apoio, compreensão, paciência, conselhos, incentivo, sabedoria, fé, oração, carinho...Enfim, foi meus olhos quando o cansaço me cegou, minhas pernas quando o desânimo me derrubou, minha segurança quando o medo me assombrou. É e sempre será a razão da minha alegria. Amo você!

Aos meus irmãos Mariana Tardiani Dechandt e Alberto José Tardiani Filho, pela amizade que sempre existiu entre nós, pelas várias e incansáveis conversas, conselhos, algumas discussõezinhas, torcida e apoio, que fizeram e sempre farão parte da convivência sadia de irmãos que, acima de tudo, se respeitam e se amam!

À todos os meus amigos, anjos que Deus colocou em minha vida que estando constantemente presentes ou não, me basta saber que eles existem e que me estenderão a mão sempre que eu chamar.

“Se alguma coisa me consome e me envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, andando comigo, falando comigo, vivendo comigo, todos os meus amigos, e, principalmente os que só desconfiam ou talvez nunca vão saber que são meus amigos!”

Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por se fazer sempre presente, realizando incontáveis maravilhas.

“Não sou nada; sou apenas um instrumento, um pequeno lápis nas mãos do Senhor, com o qual Ele escreve aquilo que deseja. Por mais imperfeitos que sejamos, Ele escreve magnificamente.” (Madre Tereza de Calcutá).

À Nossa Senhora, por estar sempre ao meu lado e me ensinar a caminhar ao encontro de Jesus.

À minha co-orientadora Dr^a. Silvana Creste por um dia ter aberto as portas do laboratório do Centro de Cana-IAC para que eu realizasse estágio durante minha graduação e posteriormente ter acreditado e confiado em minha pessoa e meu trabalho, me incentivando e direcionando ao mestrado. Agradeço a oportunidade, a orientação e formação que dedicou à mim durante todo esse tempo. Foi muito mais do que uma co-orientadora!

Ao meu orientador Prof. Dr. Dilermando Perecin que sempre esteve disponível em ajudar todas as vezes que precisei. Por me acolher como orientada e acreditar na minha capacidade. Agradeço a paciência, disponibilidade, e orientação.

Ao Dr. Álvaro Sanguino por compartilhar da sua infinita sabedoria. Pelas inúmeras colaborações, dicas, apoio, sugestões, conselhos, paciência e ajuda.

Às minhas grandes amigas Camila Nunes e Débora Chanquinie. Amigas da época de graduação, que se tornaram também minhas companheiras de trabalho e principalmente amigas para toda a vida! E é claro, agradeço também minhas outras duas amigas que chegaram no laboratório um tempinho depois e já foram ocupando espaço em meu coração e que hoje me matam de saudade, Priscila Costacurta e Mariana David Pires. Agradeço a todas pela amizade, carinho, força e companheirismo. É maravilhoso poder dividir com vocês momentos de alegria, decepções, conquistas, trabalho, lazer, amizade, estresses, tensão, descontração... Enfim, vocês foram peças fundamentais durante toda essa minha caminhada!

À Bruna Sousa Gonçalves minha amiga e companheira de laboratório, por dividir seu conhecimento e sabedoria. Pelos inúmeros momentos em que me socorreu! Pela ajuda, apoio, dicas, paciência e serenidade.

À Thais Monteiro, técnica do laboratório que me ajudou muito principalmente quando comecei no estágio e continuou ajudando sempre precisei. À todos os amigos e colegas do laboratório do Centro de Cana-IAC, Maria Letícia Melloni, Maria Natália Melloni, Rafael Gudar, e todos os demais, pelo companheirismo, trocas de experiências, ajudas, momentos de descontração, dicas e conselhos.

“Sozinhos podemos, em alguns casos, até chegar mais rápido, mas acompanhados podemos sempre ir muito mais longe”.

À FAPESP-BioEn e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	x
SUMMARY	xi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	2
Sintomatologia	4
O patógeno	5
Transmissão.....	6
Patogenicidade	6
Variabilidade Genética	9
Marcadores VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)	11
II. Objetivos	13
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE ANTÍSSORO ESPECÍFICO PARA DETECÇÃO <i>Xanthomonas albilineans</i>	14
RESUMO	14
I. INTRODUÇÃO	14
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Produção do antissoro	15
Avaliação da especificidade do antissoro.....	16
Avaliação da sensibilidade do antissoro.....	16
RESUMO	22

II.	MATERIAL E MÉTODOS	25
	Obtenção dos isolados de <i>Xanthomonas albilineans</i>	25
	Identificação e confirmação dos isolados	27
	Construção dos “primers”	28
	Extração de DNA dos isolados	28
	Condições da PCR	29
	Eletroforese e detecção do polimorfismo	29
	Análise dos locos microssatélites	30
	Avaliação da variabilidade patogênica	30
III.	RESULTADOS	33
	Confirmação dos isolados obtidos	33
	Análise das sequências microssatélites	33
	Diversidade genética dos isolados de <i>Xanthomonas albilineans</i>	34
	Diversidade patogênica dos isolados de <i>Xanthomonas albilineans</i>	39
IV.	DISCUSSÃO	45
IV.	CONCLUSÕES	51
V.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Xanthomonas alibilineans* ORIUNDOS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

RESUMO – *Xanthomonas alibilineans* é um importante patógeno da cana-de-açúcar, causando grandes perdas na produção. Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de um antissoro específico para *X. alibilineans* bem como a caracterização molecular e fenotípica de um banco de isolados de diferentes regiões do Brasil. O antissoro foi produzido a partir da imunização de coelhos da raça Nova Zelândia, utilizando como antígeno, o isolado 2256 utilizado neste trabalho. Os isolados foram obtidos de canas sintomáticas, coletadas a campo, utilizando-se meio de cultura seletivo XAS. “Simple Sequence Repeats” - SSRs obtidas a partir da análise do genoma de *X. alibilineans* foram utilizadas para o desenho de 15 “primers”, e o polimorfismo avaliado em gel de poliacrilamida corados com nitrato de prata. O antissoro desenvolvido foi altamente específico para *X. alibilineans*. Os 15 “primers” amplificaram um total de 54 alelos polimórficos. A análise de agrupamento mostrou a existência de variabilidade genética entre os isolados coletados em diferentes estados brasileiros, os quais foram divididos em três grupos principais, embora não foi possível agrupar esses indivíduos por local de coleta. A avaliação da patogenicidade mostrou a existência de diversidade patogênica entre os isolados, embora vários deles não tenham sido distinguidos molecularmente pelo marcadores utilizados. Dois alelos foram identificados como associados a patogenicidade, sendo que um deles, , está localizado no loco que codifica a síntese de peptídeos não ribossomais (non ribosomal peptide synthetase – NRPS), os quais estão associados à virulência de muitas bactérias fitopatogênicas.

Palavras-chave: Escaldadura das folhas, diversidade genética, dot-blot, microsatélite, patogenicidade, cana-de-açúcar.

CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY AMONG ISOLATES OF *Xanthomonas albilineans* FROM DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

SUMMARY - *Xanthomonas albilineans* is an important pathogen of sugarcane, causing important losses in production. This study aimed to develop an antiserum specific for *X. albilineans* and the phenotypic and molecular characterization of a set of isolates from different regions of Brazil. The antiserum was produced from immunizing New Zealand rabbits, using as antigen, the isolated 2256 used in this work. The isolates were obtained from symptomatic canes, collected in the field, using selective culture media XAS. Simple Sequence Repeats - SSRs obtained from the analysis of the genome of *X. albilineans* were used to design 15 primers and the polymorphism analyzed on polyacrylamide gels stained with silver nitrate. The antiserum developed was highly specific for *X. albilineans*. The 15 primers amplified a total of 54 polymorphic alleles. Cluster analysis showed the existence of genetic variability among isolates collected in different Brazilian states, which were divided into three main groups, although it was not possible to group these individuals based on collect site. The evaluation showed the presence of pathogenic diversity among isolates, although many of them have not been distinguished with the molecular markers used. Two alleles were identified as being associated with pathogenicity, one of which is located in the site encoding the non-ribosomal peptide synthetase - NRPS, which are associated with virulence of many pathogenic bacteria.

Keywords: leaf scald, genetic diversity, dot-blot, microsatellite, pathogenicity, sugarcane.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância do Brasil, classificando o país como o maior produtor de cana do mundo. É a principal fonte de açúcar, além de fornecer inúmeros subprodutos, tais como bagaço, vinhaça, vinhoto. O Brasil encontra-se na posição de maior produtor mundial de açúcar com produção de 24 milhões de toneladas por ano, com 60% da produção destinada à exportação (Apta, 2009). O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil também é destinado à produção do etanol, fazendo do país o maior produtor mundial de etanol, com 14 bilhões de litros de álcool/ano, sendo o único país a utilizar o etanol em larga escala como combustível renovável e alternativo ao petróleo (Apta, 2009).

A expansão do cultivo da cana-de-açúcar tem ocorrido de forma ascendente principalmente devido à valorização do etanol, que é considerado o mais importante dos combustíveis alternativos, seja no ponto de vista econômico ou ambiental. No Brasil estão reunidas as melhores condições em relação aos demais países em termos de tecnologia, disponibilidade de recursos naturais, clima e solo para o cultivo da cana-de-açúcar (EMBRAPA, 2008). Estima-se que, nos próximos cinco anos, será necessário dobrar a produção de etanol no Brasil para atender a demanda interna e externa. A obtenção de novas variedades mais produtivas e tolerantes aos diversos tipos de estresses é fundamental, resultando no aumento da produtividade e expansão da fronteira agrícola a regiões antes não cultiváveis.

No campo, a cana está sujeita à diferentes tipos de estresses, sejam bióticos ou abióticos, os quais podem afetar sua produtividade. Dentre as principais doenças que afetam a produção da cana-de-açúcar, a Escaldadura das Folhas merece grande destaque. A Escaldadura é uma doença bacteriana, disseminada mundialmente, que causa severas perdas na produção e que ainda pouco se conhece a seu respeito,

portanto, é grande a necessidade de maior investimento em pesquisas e estudos relacionados à *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora da Escaldadura.

A variabilidade genética e patogênica de *X. albilineans* tem sido demonstrada por pesquisadores de todo o mundo, sendo que estudos da diversidade genética e patogênica podem auxiliar diretamente nas medidas de controle, bem como nos programas de melhoramento genético tanto no contexto nacional como internacional (HUERTA-LARA, 2009). Em países como o Brasil, onde a cana-de-açúcar é cultivada em grandes extensões e, portanto, sujeita às mais variadas combinações entre populações de *X. albilineans*, torna-se extremamente importante conhecer o grau de diversidade genética deste patógeno. Essa informação é de fundamental importância para que os programas de melhoramento não corram o risco de lançarem variedades consideradas resistentes e que, na presença de variantes mais agressivas do patógeno, se comportem como suscetível. Desta maneira, se faz necessário o conhecimento da diversidade genética de *X. albilineans* nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Escaldadura das folhas

Atualmente já foram identificadas aproximadamente 216 doenças que atingem a cana-de-açúcar, das quais 58 foram encontradas no Brasil, sendo que pelo menos dez podem ser consideradas de grande importância econômica para a cultura canavieira (EMBRAPA, 2011).

Dentre as principais doenças que acarretam sérios prejuízos na produção da cana-de-açúcar em todo o Brasil, a Escaldadura das folhas, causada pela bactéria *X. albilineans* merece grande destaque. A Escaldadura das folhas foi registrada pela

primeira vez na Austrália em 1911 por North, mas há grandes indícios de que a doença tenha se originado nas Ilhas Fiji em 1908, ou até mesmo antes (MARTIN & ROBINSON, 1961), pois há relatos que sugerem a presença da doença antes dela ser reconhecida, sendo confundida com outros distúrbios ou em estado latente de infecção (JAUFEERALLY-FAKIM et al., 2000; ALVAREZ et al., 1995). A causa da doença foi descrita em 1920 por Wilbrink em Java (WILBRINK, 1920) e por North na Austrália e Fiji (NORTH, 1926). Logo depois de ser descrita, a doença foi encontrada nas Filipinas, Ilhas Maurício e Havaí (MARTIN & ROBINSON, 1961). Graves prejuízos causados pela Escaldadura ocorreram nas primeiras décadas do século XX, quando canas nobres (*Saccharum officinarum*) foram amplamente cultivadas (ROTT et al., 1994).

No Brasil, a Escaldadura das folhas foi registrada pela primeira vez em 1945 (ARRUDA, 1945), e em 1961 a doença já tinha sido registrada em 22 países produtores de cana-de-açúcar (MARTIN & ROBINSON, 1961). Em 1967 a Escaldadura das folhas foi observada pela primeira vez nos Estados Unidos-Flórida (KOIKE, 1968), mas somente em 1989, quando sua incidência e distribuição aumentaram rapidamente, foi dada maior importância econômica à doença (COMSTOCK E SHINE, 1992). A partir de então a Escaldadura foi relatada em diversos países como Guatemala e México no ano de 1992 (IRVINE & AMADOR, 1993; ORDOSGOITTI et al., 1977) e em outros estados americanos como Luisiana também em 1992 (GRISHAM et al., 1993) e Texas no ano de 1993 (ISAKEIT & IRVINE, 1995).

Antes de a doença ser suficientemente entendida para o implemento efetivo da quarentena, a bactéria *X. albilineans* foi mundialmente disseminada por meio de canas-de-açúcar assintomáticas (BIRCH, 2001). Atualmente a Escaldadura das folhas está presente em mais de 66 países causando severas perdas na produção (ROTT et al., 2000) e atingido todas as regiões canavieiras do mundo, desde a África e Ásia, até as Américas e Oceania, possível região de origem da doença (ROTT et al., 1994).

A Escaldadura das folhas é uma das principais e mais severas doenças que acometem o cultivo da cana-de-açúcar, pois em plantios comerciais que utilizam variedades suscetíveis, compromete a produtividade, causando baixa germinação das mudas, baixo desenvolvimento das plantas infectadas e redução do rendimento em

sacarose. A escassez de informações sobre variabilidade genética e patológica da bactéria *X. albilineans*, é o principal fator que limita o controle da doença e o desenvolvimento de variedades resistentes.

Sintomatologia

A expressão dos sintomas da doença e sua severidade estão associadas com o nível de resistência da variedade cultivada, condições ambientais e agressividade do patógeno (LOPES et al., 2001). De uma forma geral, a sintomatologia da Escaldadura, apresentada em plantas suscetíveis, é caracterizada pelo aparecimento de linhas brancas (cloróticas) de aproximadamente 1-2 mm de espessura que se localizam paralelamente à nervura principal da folha, podendo apresentar zonas necróticas, extensa clorose de folhas emergentes, vermelhidão vascular, formação de cavidade em hastes invadidas, produção de brotamentos laterais, rápido murchamento e morte da planta (BIRCH, 2001; PIERETTI et al., 2009; ROTT et al., 2000).

O principal composto que induz a clorose nas plantas é chamado albicidina, que possui propriedades fitotóxica e antibiótica, e é caracterizado como um composto de baixo peso molecular contendo 38 átomos de carbono e vários anéis aromáticos (BIRCH & PATIL, 1985a). As albicidinas inibem a replicação do DNA do cloroplasto, causando o bloqueio da diferenciação deste, que resulta nas listras cloróticas das folhas que são características da doença (BIRCH & PATIL, 1983). Em concentrações nanomolar, as albicidinas atuam como bactericidas contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Isso pode dar à *X. albilineans* vantagens na competição contra outras bactérias no mesmo local de invasão (BIRCH & PATIL, 1985a).

Existem duas fases diferentes de sintomas, a fase crônica e a aguda. A fase crônica é caracterizada por estrias paralelas à nervura principal da folha e geralmente são brancas e estreitas, mas pode tornar-se avermelhada com a idade. Com o progresso

da doença, pode ser observado uma necrose no tecido foliar ao redor da estria que se estende progressivamente da ponta em direção à base da folha. As estrias também tendem a se ampliar e tornam-se mais difusas com a maturidade. A clorose pode afetar toda a folha e essa descoloração é seguida de murchamento das extremidades da folha com enrolamento interior. Esse processo que mais se assemelha a um escaldão explica o nome dado à doença. Em plantas adultas, a forma crônica comumente se manifesta pelo desenvolvimento anormal das brotações laterais (ROTT et al., 2000).

A fase aguda é caracterizada pelo murchamento repentino das plantas, como se estivessem em condições de seca, não sendo, na maioria das vezes, observada anteriormente à fase crônica. Essa forma aguda as vezes ocorre após o período de chuva seguido por um período de tempo seco, mas parece ser limitado a cultivares altamente suscetíveis (ROTT et al., 2000). Até o momento, não se sabe se as duas formas existentes são causadas por genes diferentes em diferentes raças do patógeno, ou por diferenças na regulação gênica entre raças similares, ou ainda por fatores externos ambientais que atuam sobre raças idênticas (ROTT et al., 2010).

A Escaldadura pode apresentar também uma fase latente. Algumas canas-de-açúcar podem ser tolerantes ao patógeno sem exibirem qualquer sintoma, ou os sintomas são tão imperceptíveis que escapam da detecção. Essa fase termina por motivos que ainda são desconhecidos, mas comumente a explicação dada é o estresse, particularmente climático ou nutricional (ROTT et al., 1994; ROTT et al., 2000).

A frequente ocorrência da fase latente é um dos principais fatores que impedem o controle da Escaldadura, visto que uma das principais formas de disseminação ocorre pelo plantio de colmos e /ou mudas infectadas assintomáticas.

O patógeno

Xanthomonas albilineans é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Xanthomonadaceae* da ordem *Xanthomonadales* (SADDLER & BRADBURY, 2005).

Essa bactéria é sistêmica, colonizadora do xilema da cana-de-açúcar e parasita obrigatório de plantas monocotiledôneas da família *Poaceae*, incluindo outras gramíneas. Além disso, é uma bactéria aeróbica, não esporulante, de crescimento lento, apresenta formato de bastonete delgado e move-se por um único flagelo polar. As células bacterianas podem ocorrer de forma isolada ou formando cadeias, dando origem a colônias de cor amarelo pálido, viscosas, brilhantes, convexas, de bordos lisos e seu crescimento favorecido em temperaturas variáveis de 25 a 28°C (BIRCH, 2001).

Transmissão

O agente causal da Escaldadura das folhas é disseminado principalmente por meio de plantio de mudas ou colmos contaminados assintomáticos e transmitido mecanicamente pela utilização de lâminas de facões ou implementos agrícolas contaminadas com exsudados de plantas doentes (RICAUD et al., 1989). Os toletes contaminados são a principal forma de disseminação da bactéria a longas distância (CASAGRANDE et al., 1997).

Há também fortes indícios de transmissão área sob certas condições ambientais em áreas com severos surtos (DAVIS et al., 1997), além de supostas evidências de transmissão por meio de contato folha-folha, raiz-raiz, por infestação do solo (AUTREY et al., 1995; KLETT & ROTT, 1994) e por sementes de cruzamentos¹.

Patogenicidade

A capacidade de *X. albilineans* colonizar e infectar colmos de cana-de-açúcar varia de acordo com a raça do patógeno, indicando a existência de “patótipos” diferentes

¹ Alvaro Sanguino, comunicação pessoal.

dentro da mesma espécie. A recente descrição e sequenciamento de genes envolvidos na produção de albicidina forneceram a primeira ferramenta para estudar a variabilidade dos genes envolvidos na patogenicidade de *X. albilineans* e a variação da doença causada por esse patógeno.

A correlação entre produção de albicidina e variação da patogenicidade da bactéria ainda é uma incógnita que vem gerando controversas entre pesquisadores. Alguns afirmam que esse composto tóxico produzido especificamente pela *X. albilineans* desenvolve um importante papel na patogenicidade (BIRCH & PATIL, 1983; BIRCH, 2001). Zhang et al. (1999), verificaram que bactérias mutantes, deficientes na produção de albicidina, não desenvolveram sintomas da doença em plantas de cana-de-açúcar e verificaram também que canas-de-açúcar geneticamente modificadas que expressaram um gene de detoxificação da albicidina, são resistentes a Escaldadura das folhas. Outros pesquisadores afirmam não terem encontrado relação alguma entre produção de albicidina e variação da patogenicidade (CHAMPOISEAU et al., 2006; RENIER et al., 2007).

Diversos trabalhos têm sido realizados para estudar e conhecer melhor a albicidina, bem como os genes e outros fatores envolvidos na sua biosíntese, sua relação com a patogenicidade e outros fatores envolvidos na capacidade patogênica da bactéria. A albicidina atua inibindo a replicação do DNA do cloroplasto e consequentemente bloqueando a sua diferenciação (BIRCH & PATIL, 1987). Em nível molecular verificou-se que ela é uma potente inibidora da DNA girase (HASHIMI et al., 2007). A albicidina foi descrita como uma pequena molécula fitotóxica com propriedades antibióticas, sintetizada por um cluster misto de genes PKS (polyketide synthase) - NRPS (non ribosomal peptide synthetase) (BIRCH & PATIL, 1985; BIRCH & PATIL, 1987). A clonagem e sequenciamento desse cluster revelou a existência de 20 ORFs (Open Read Frame) , incluindo um gene PKS-NRPS (*albi*) e dois genes NRPS (*albiX* and *albiV*), bem como vários possíveis genes de resistência, genes regulatórios e modificadores (ROTT et al., 2010).

Champoiseau et al. (2006), realizaram um estudo com o objetivo de caracterizar a variação genética de *X. albilineans* quanto aos genes envolvidos na produção de

albicidina, e identificar qualquer relação entre essa variação e a variação na patogenicidade da bactéria em questão. A conclusão do estudo realizado foi que nenhuma relação óbvia foi observada entre a variação na patogenicidade (severidade da doença ou colonização dos colmos) e diversidade genética da albicidina ou variabilidade na sua produção. O papel da albicidina na patogenicidade da *X. albilineans* foi confirmado no trabalho de Champoiseau, porém, variações na produção de albicidina e na patogenicidade da bactéria não foram relacionadas, exclusivamente, com a diversidade de genes de biossíntese de albicidina. Portanto, de acordo com Champoiseau et al. (2006), a albicidina é necessária, mas não suficiente para desenvolver a Escaldadura, pois ela parece ser um fator de virulência atuando coordenadamente junto com outros fatores. Contudo, a identificação de genes codificadores para esses outros fatores de virulência é um importante passo para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade da bactéria em estudo.

Sabe-se que em bactérias fitopatogênicas, uma ampla gama de genes relacionados à patogenicidade têm sido identificados e analisados. Esses genes codificam proteínas constitutivas do sistema de secreção, exopolissacarídeos, fatores de virulência, toxinas, enzimas que degradam a parede celular da planta hospedeira, células de mobilidade, fatores de mobilidade ou fatores de adesão. Os genes que codificam proteínas constitutivas são chamados *housekeeping genes* (GENIN et al., 2002; VAN SLUYS et al., 2002). Porém, ainda sabe-se pouco desses genes em *X. albilineans*. De um total de 40 genes relacionados à patogenicidade de várias *Xanthomonadales* ou *Xylella fastidiosa*, apenas 3 (*pilB*, *rpfA* e *xpsE*) foram amplificados em *X. albilineans*. Todos esses genes estão envolvidos em mecanismos gerais de patogenicidade. (CAO et al., 2001; DA SILVA et al., 2002; DOW et al., 2000; SIMPSON et al., 2000).

Variabilidade Genética

A bactéria *X. albilineans* é considerada uma espécie bem definida dentro do gênero *Xanthomonas*. Entretanto, ocorrem variações dentro da espécie, sendo que surtos da Escaldadura na Flórida, aonde a doença vinha ocorrendo em baixos níveis desde 1967, e também em Louisiana foi atribuído à introdução de variantes genéticas distintas (COMSTOCK & SHINE, 1992; DAVIS et al., 1994; GRISHAM et al., 1993). A variabilidade genética de *X. albilineans* tem sido demonstrada em nível global por pesquisadores de todo o mundo, sendo que estudos da diversidade genética e patogênica podem auxiliar diretamente nas medidas de controle, bem como nos programas de melhoramento genético tanto no contexto nacional como internacional (HUERTA-LARA, 2009).

Várias técnicas têm sido usadas no estudo da diversidade genética em *X. albilineans*. Persley, (1973) usou inoculação artificial para demonstrar que isolados de diferentes regiões da Austrália exibem diferentes níveis de agressividade em cultivares de cana-de-açúcar. Além disso, mudanças na agressividade em populações natural de *X. albilineans* têm ocorrido no mesmo local (DAVIS, 1992). Essas observações estimularam pesquisas a investigar mais detalhadamente a variabilidade da bactéria *X. albilineans*.

Variações antigênicas dentro de *X. albilineans* foram identificadas por Baudin e Chatenet (1980). Desde então, alguns estudos têm usado métodos sorológicos para agrupar cepas desta bactéria. Alvarez et al. (1996) utilizaram uma série de sete anticorpos monoclonal espécie-específico para comparar 38 cepas de *X. albilineans*. Rott et al. (1994) usaram anticorpos policlonal para investigar características de 215 cepas dessa bactéria de 28 locais de todo o mundo, tendo identificado três sorotipos diferentes, I, II e III. O sorotipo I é o maior grupo, compreendendo cepas de várias localidades geográficas como Austrália, USA (Flórida), Guadalupe, Índia, Mauricio, Réunion e Sul da África. O sorotipo II contém apenas cepas do continente africano enquanto que o sorotipo III é o menor grupo e contém cepas da Oceania, Ásia e Caribe.

Entretanto, o uso de anticorpos é limitado, pois podem apenas detectar a presença de um epítipo particular e, além disso, nenhuma preparação policlonal é única, assim a comparação de diferentes estudos é difícil. Portanto, de acordo com Jaufeerally-Fakim (2000), técnicas moleculares têm se revelado mais robustas na identificação da variação de patógenos para muitos fitopatógenos.

Diversas técnicas utilizando DNA têm sido empregadas para detectar variações patogênicas. Davis et al. (1996) por meio da técnica PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) realizaram um estudo da variação genética da *X. albilineans* em 218 cepas provenientes de 31 localidades geográficas utilizando marcadores RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism). Nesse estudo, 8 grupos foram descritos denominados PFGE A- PFGE H, sendo que a maioria das cepas associadas com novos surtos pertencia ao grupo PFGE B.

Tsushima et al. (2006) compararam sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* para investigar relações filogenéticas em cepas isoladas de *X. albilineans* em Okinawa, Japão. O nível de diversidade da sequência dos genes *gyrB* e *rpoD* depende da origem geográfica das cepas, sugerindo que análises das sequências desses genes podem ser úteis para diferenciar as variações genéticas dentro da espécie .

Lopes et al. (2001) utilizaram rep-PCR na caracterização de isolados de *X. albilineans* e também para distinguir essa bactéria de outras espécies de bactérias. Essa técnica tem sido muito útil na determinação da identidade genômica de um grande número de microorganismos, baseando-se na presença de sequências repetitivas de DNA dispersas no genoma, que podem ser identificadas pelo uso dos “primers” REP, ERIC e BOX (LOWS et al., 1994; LOPES et al., 1998).

Recentemente, Shaik et al. (2009) caracterizaram por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) um total de 57 cepas de *X. albilineans* provenientes de 28 países. Padrões distintos de AFLP permitiram diferenciar isolados de diferentes regiões geográficas, possibilitando estabelecer “fingerprintings” únicos para cada um dos isolados analisados.

A vantagem de se utilizar informações genéticas para identificar diversidades entre cepas é devido ao fato de que características genéticas não são influenciadas por

condições de nutrição, ambiente, temperatura e idade do microorganismo; portanto, os dados obtidos são menos variáveis e podem ser interpretados com maior precisão do que dados obtidos a partir de testes fisiológicos ou bioquímicos. (ALVAREZ et al., 1996; DAVIS et al., 1997; LOUWS et al., 1999; PAN et al. 1999; WANG et al. 1999; VALADEZ & KAHL, 2000; SCHHD et al., 2001, 2003).

Marcadores moleculares são ferramentas muito úteis para estudos de variabilidade genética e fornecem meios eficientes para ligar variações fenotípicas e genotípicas (VARSHNEY et al., 2005a). Nos últimos anos, esses marcadores provaram ser uma ferramenta poderosa para a estimativa da diversidade genética e relações filogenéticas de espécies (JOSHI et al., 1999).

Marcadores VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

Sequências Repetitivas de DNA, que ocorre frequentemente em células eucarióticas, tem sido cada vez mais identificados em seres procariotos, sendo que nestes organismos, atuam como a principal fonte de diversidade genética em muitas bactérias patogênicas (BAYLISS et al., 2001). Embora essas sequências foram inicialmente definidas como DNA mini e microssatélites, consistindo de curtas sequências repetidas (Short Sequence Repeats – SSRs) ou curtas repetições em tandem (Short Tandem Repeats – STRs) (JEFFREY et al., 1985), Nakura et al. (1988) introduziram uma terminologia mais precisa. Algumas das repetições, especialmente aquelas que representam um único loco e apresentam variabilidade do comprimento entre os indivíduos, foram designadas “Variable Number of Tandem Repeat” (VNTR) locos. VNTRs e SSRs são alvos moleculares bem estabelecidos para análise de relações genéticas (JEFFREY et al., 1986). Devido ao seu polimorfismo, VNTRs tem sido usados como marcador molecular para acessar a variabilidade genética em espécies de bactérias, incluindo *Salmonella enterica* (LINDSTEDT et al., 2003), *Nisseria meningitidis* (Yazdankhah et al, 2005) e *Mycobacterium tuberculosis* (LE FLECHE et al,

2002). Por uma questão de clareza, van Belkum (1998) optou em utilizar a abreviação SSR como um acrônimo para a maioria das sequências repetidas de DNA encontradas em procariotos. Da mesma forma será feito no presente trabalho.

Os marcadores SSRs representam locos hipermutáveis sujeitos a reversíveis alterações em seu comprimento (MOXON et al., 1994; ROCHA, 2003; GROISMAN & CASADESUS, 2005). De uma forma geral essas sequências são caracterizadas como motivos que se repetem em tandem e tem uma ocorrência frequente em todos os genomas procariotos e eucariotos analisados até o momento (ZANE et al., 2002), estão presente tanto em regiões codificantes como em não-codificantes e estão distribuídos em todo o genoma (PROVAN et al., 2001).

A evolução das sequências microssatélites, ou seja, qualquer mudança na SSR resultando de aumento ou diminuição no número de repetições, é associada com sua taxa de mutação. A origem de SSRs é um processo evolutivo dinâmico e tem provado ser extremamente complexo (ELLEGREN, 2004; PEARSON et al., 2005).

Os marcadores microssatélites (SSR) têm ganhado considerável importância devido a muitos atributos desejáveis incluindo hipervariabilidade, natureza multialélica, herança co-dominante, reprodutibilidade, abundância relativa, cobertura ampla do genoma, localização cromossômica específica e genotipagem de alto rendimento (PARIDA et al., 2006). Além disso, apresentam alto polimorfismo devido à diferentes números de repetições na região microssatélite, portanto eles podem ser facilmente e de forma reprodutível detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (PARIDA et al., 2009). Nos últimos anos, esses marcadores provaram ser uma ferramenta poderosa para a estimativa da diversidade genética e relações filogenéticas entre espécies (JOSHI et al., 1999).

A existência de SSRs foi demonstrada por Hamada et al. (1982) em vários eucariotos variando de leveduras a vertebrados. A presença de SSRs tem sido mostrada tanto para patógenos de humanos como de animais (VAN BELKUM et al., 1998). Entretanto, a utilização de marcador molecular SSR para bactéria fitopatogênica é um fato recente, que foi registrado pela primeira vez por Coletta-Filho et al. (2001) na caracterização de isolados de *Xylella fastidiosa*. Porém, até o momento,

nenhuma abordagem foi realizada com este marcador molecular em *X. albilineans*, apesar desta bactéria possuir seu genoma completo sequenciado.

II. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos principais estabelecer e caracterizar um banco de isolados de *X. albilineans* provenientes de diferentes locais produtores de cana-de-açúcar no Brasil.

Os objetivos específicos foram:

- a) Desenvolver antissoro específico à *X. albilineans* para utilização em diagnóstico;
- b) Desenvolver iniciadores específicos a partir do genoma sequenciado de *X. albilineans* visando a amplificação de locos microssatélites;
- c) Caracterizar a diversidade genética entre isolados de *X. albilineans* coletados em diferentes regiões produtoras de cana do Brasil;
- d) Avaliar a patogenicidade de cada isolado por meio de inoculações em cultivar de cana-de-açúcar suscetível.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE ANTÍSSORO ESPECÍFICO PARA DETECÇÃO *Xanthomonas albilineans*.

RESUMO – O presente trabalho teve por objetivos desenvolver um antissoro específico para *Xanthomonas albilineans*; avaliar a especificidade e sensibilidade do antissoro produzido, além de comparar a eficácia dos métodos “dot-blot” e PCR na identificação do patógeno. A produção do antissoro foi feita a partir da imunização via linfonódo de coelhos raça Nova Zelândia, utilizando como antígeno, o isolado 2256. A especificidade do antissoro foi avaliada utilizando 38 isolados de *X. albilineans* provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Alagoas, além de cinco isolados de outras bactérias endofíticas da cana-de-açúcar, utilizados como controle negativo. A avaliação da sensibilidade do antissoro foi realizada por meio de diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) de uma cultura de *X. albilineans* pura (IBSBF 3414). Os resultados obtidos mostraram que o antissoro produzido foi altamente específico à *X. albilineans*, não apresentando reação cruzada com as demais bactérias testadas. Quanto à sensibilidade, a técnica de PCR foi dez vezes mais sensível do que o “dot-blot”, capazes de detectar o patógeno em concentrações de 3×10^2 UFC e 3×10^3 UFC respectivamente. A escolha do método a ser utilizado vai depender do propósito, sendo que o PCR deve ser obrigatoriamente utilizado em diagnósticos de quarentena e o “dot-blot”, para monitorar a qualidade fitossanitária das mudas em viveiros comerciais.

I. INTRODUÇÃO

A Escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*) é uma importante doença bacteriana que pode comprometer a cultura da cana-de-açúcar causando baixa germinação das mudas, baixo desenvolvimento das plantas infectadas e redução do rendimento em sacarose, além de reduzir a longevidade do canavial.

Devido à grande dificuldade de identificar a presença desse patógeno por sintomas visuais, visto que a bactéria pode permanecer na fase latente, vários métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos. São exemplos os testes de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) usados por Irey e Comstock (1991), método da imunofluorescência dos tecidos, descrito por Leóville e Coleno (1976), isolamento em meio sólido seletivo desenvolvido por Davis et al. (1994) e a técnica de PCR (polymerase chain reaction).

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um antissoro específico para *X. albilineans*, bem como avaliar sua especificidade, além de comparar a eficácia e a sensibilidade do antissoro quando utilizado o método “dot-blot” com o método baseado em PCR utilizando “primers” específicos ao patógeno (RENIER et al., 1997).

II. MATERIAL E MÉTODOS

Produção do antissoro

A produção do antissoro foi feita a partir da imunização via linfonódo (OLIVEIRA et al., 1977) de coelho da raça Nova Zelândia utilizando uma linhagem de *X. albilineans* (2256) cedida pelo Instituto Biológico (IB). O antígeno foi preparado a partir do cultivo da bactéria em meio de cultura Wilbrink's líquido (DAVIS et al., 1994) por 72 horas. Posteriormente, preparou-se uma suspensão bacteriana (10^{11} UFC/mL) em tampão fosfato salino (PBS) 0,01M, pH 7. A suspensão foi lavada e centrifugada a 10000g durante cinco minutos três vezes e em seguida ressuspensa em 200µl de tampão PBS. O coelho foi imunizado duas vezes, com intervalo de 15 dias entre as imunizações, com 200µl da suspensão bacteriana + 200 µl de adjuvante completo de Freund (Sigma) adicionado imediatamente antes da injeção. Após 60 dias da primeira imunização, procedeu-se a sangria do animal e obtenção do antissoro.

Avaliação da especificidade do antissoro

A especificidade do antissoro foi avaliada em uma coleção de 38 isolados de *X. albilineans* obtidos de canas sintomáticas para Escaldadura das folhas, provenientes de quatro estados brasileiros (SP, MG, GO e AL), além de outros cinco isolados de outras bactérias endofíticas da cana-de-açúcar (*Glucanocetobacter diazotrophicus*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Azospirillum brasilense*, *Achromobacter insolitus*, *Zooglea ramigera*). Cada isolado foi crescido por 72 horas em meio de cultura Wilbrink's líquido, diluído em PBS na proporção 1:10 e uma alíquota de 100 µl de cada isolado foi aplicada em membrana de nitrocelulose para realização do teste por "dot-blot". Posteriormente, a membrana foi incubada em estufa a 85°C durante 2 horas. Depois foi realizado bloqueio da membrana em solução PBS contendo 5% leite em pó desnatado por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada em 20 ml de solução em PBS contendo 1ul do antissoro bruto por 1 hora, seguida de lavagem em PBS. Posteriormente, a membrana foi incubada em 20ml de PBS acrescidos de 4ul do anticorpo GoatAnti-Rabbit IG (Sigma) por 1 hora. Após a lavagem em PBS a membrana foi revelada em 15 ml de solução substrato contendo 4,5mg de Naphtol-AS-phosphato – (Sigma) e 15mg Fast Blue BB Salt (Sigma) durante 30 minutos. Como controle positivo, foi empregado o isolado de *X. albilineans* (2256) inicialmente utilizado para imunização do coelho, e como controles negativos, solução PBS e água.

Avaliação da sensibilidade do antissoro

Para avaliar a sensibilidade do antissoro bruto, utilizou-se a espécie tipo de *X. albilineans* (IBSBF 1374) cedida pelo IB a qual cresceu em meio de cultura Wilbrink's por 48h a 28°C.. Após o tempo de crescimento a cultura bacteriana apresentou OD= 1,45. A partir dessa cultura, realizou-se diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) e 100 uL de cada

diluição foi aplicado em membrana de nitrocelulose (Biorad) para avaliação da sensibilidade do antissoro por meio do método “dot-blot”. Paralelamente, uma alíquota de 100 uL de cada diluição foi inoculada em meio sólido seletivo (DAVIS et al., 1994) com cinco repetições, e depois de 72 horas de crescimento realizou-se contagem do número de colônias, possibilitando estimar a quantidade de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) presentes em 100 uL de cada diluição utilizada no teste “dot-blot”.

As mesmas diluições que foram utilizadas para realização do dot-blot também foram utilizadas para realização de PCR para posterior comparação da sensibilidade das duas técnicas. Para realização da PCR utilizou-se o “primer” *albl*, *NRPS-2*, *A4-A5* proposto por Renier et al. (2007) que amplifica fragmento de 500pb. As reações foram preparadas em volume final de 25 µL contendo: 1 µL de suspensão bacteriana, tampão Taq DNA polimerase 1X, 120 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada “primer”, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen *platinum*). As amplificações foram realizadas com um ciclo inicial de 2 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de 1 min a 95°C, um ciclo de 1 min a 54°C para anelamento, 1 ciclo de 1 min a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio “dot-blot”, é baseado numa reação antígeno-anticorpo específico, que na presença de um substrato (Fast Blue), revela coloração azul para a presença da bactéria, sendo que a intensidade do azul é proporcional à concentração de bactéria.

A análise “dot-blot” com antissoro bruto, conduzida com os 38 isolados de *X. albilineans* e os outros cinco isolados de microorganismos endofíticos de cana-de-açúcar revelou reação positiva para todos os isolados de *X. albilineans*, refletida pela intensa coloração azul, e resultado negativo para todos os isolados das demais bactérias (*Glucanocetobacter diazotrophicus*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Azospirillum brasilense*, *Achromobacter insolitus*, *Zooglea ramigera*). Portanto, o antissoro produzido mostrou-se específico somente à *X. albilineans*, sendo capaz de detectar apenas a presença da

bactéria em estudo e não apresentando reações cruzadas com outros tipos de bactérias endofíticas da cana-de-açúcar (Figura 1).

O desenvolvimento de antissoro específico para *X. albilineans* também foi obtido com sucesso por Silva et al. (2007) com 50 isolados de *X. albilineans* provenientes de diferentes regiões canavieiras do estado de São Paulo. No entanto, a especificidade do antissoro com outras bactérias endofíticas de cana não foi avaliada pelos autores.

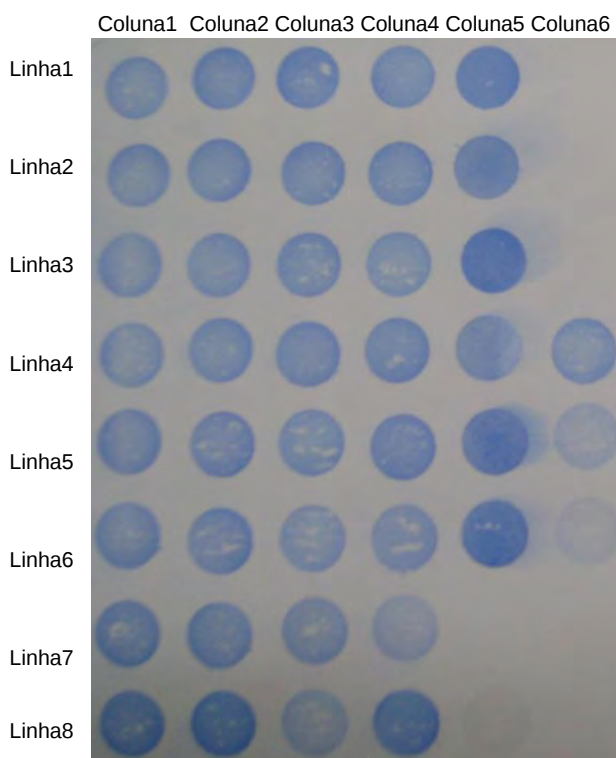


Figura1: Teste por dot-blot para avaliação da especificidade do antissoro em membrana de nitrocelulose. Colunas 1 a 4: isolados de *X. albilineans*. Coluna 5, linhas 1 a 6: isolados de *X. albilineans*. Coluna 5, linha 7: isolado de *Leifsonia xyli subsp xyli*. Coluna5, linha8: isolado de *Glucanacetobacter diazotrophicus*. Coluna 6, linha1: *Azospirillum brasilense*. Coluna6, linha2: *Achromobacter insolitus*. Coluna 6, linha 3 : *Zooglea ramigera*. Coluna 6, linha 4: Controle positivo para *Xanthomonas albilineans* na proporção 1:1000. Coluna 6, linhas 5: Controle positivo para *Xanthomonas albilineans* na proporção 1: 3000. Coluna 6, linha 6: Controle positivo para *Xanthomonas albilineans* na proporção 1:5000. Coluna 6, linhas 7 e 8: Controles negativos (PBS e água).

A avaliação da sensibilidade do antissoro bruto mostrou que ele foi capaz de detectar a presença da bactéria *X. albilineans* na diluição mínima 10^{-5} (Figura 2), equivalente a 3×10^3 UFC em 100 uL. Por outro lado, o método baseado em PCR foi capaz de detectar a bactéria com apenas 1 uL da diluição 10^{-4} (3×10^2 UFC) e portanto, foi 10 vezes mais sensível do que o método “dot-blot”. Wang et al. (1999) compararam a eficiência e confiabilidade de métodos baseados em PCR (PCR com “primers” específicos e BIO-PCR); em ensaios imunológicos (DIA – dot immunoblotting assay e ELISA) e o método baseado em isolamento em meio específico para detecção de *X. albilineans*. Os autores verificaram que o isolamento em meio específico e o BIO-PCR foram os mais eficientes na detecção do patógeno, no entanto, os dois métodos foram bastante demorados, levando sete e cinco dias, respectivamente, para obter o resultado. DIA e ELISA foram os menos sensíveis, requerendo concentrações de 10^6 UFC/ mL e 10^5 UFC/ mL respectivamente, para detecção positiva. Quando comparado, a BIO-PCR foi 60 vezes mais sensível, com amostras positivas em concentrações de 10 UFC por reação (286 UFC/ mL), enquanto que com a PCR convencional, a sensibilidade foi de 6×10^2 UFC por reação. No presente trabalho, os dois métodos empregados mostraram-se mais sensíveis do que o verificado por Wang et al, (1999), sendo que o imunológico foi capaz de detectar o patógeno em concentrações de 3×10^4 UFC / mL e a PCR clássica, 3×10^2 UFC por reação. As vantagens dos métodos baseados em PCR sobre os métodos imunológicos residem principalmente na sensibilidade e na detecção apenas de células viáveis pelo método BIO-PCR. Isso é de extrema importância para patógenos de importância quarentenária, como a *X. albilineans* (WANG et al., 1999).

Os resultados deste trabalho sugerem que a escolha do método de diagnóstico depende do objetivo da análise, sendo que o “dot-blot”, por ser mais viável economicamente, pode ser utilizado na avaliação da qualidade de mudas em viveiros, visando um melhor controle do patógenos em áreas comerciais. Por outro lado, o método baseado em PCR deve necessariamente, ser utilizado para diagnósticos de quarentena, para importação e/ou exportação de genótipos de cana-de-açúcar, garantindo a

segurança no intercambio de germoplasma e dificultando a entrada de variantes mais agressivos.

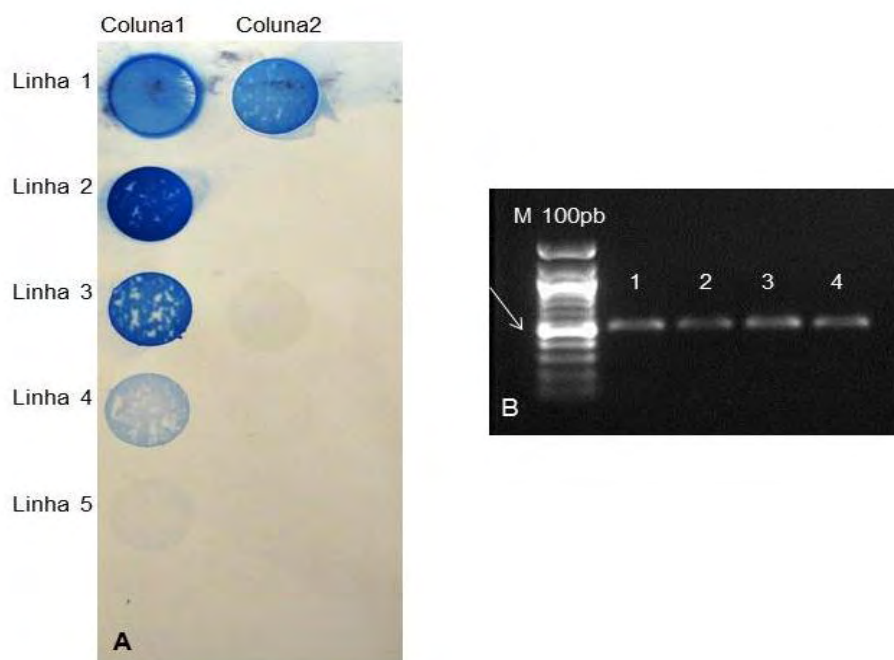


Figura 2: Comparação dos métodos de diagnóstico de *X. albilineans* utilizados no presente trabalho. **A:** “dot-blot” com antissoro específico desenvolvido para *X. albilineans*. Coluna 1, Linha1: cultura de *X. albilineans* na diluição 10^{-1} . Coluna 1, Linha 2: cultura de *X. albilineans* na diluição 10^{-2} . Coluna 1, Linha 3: cultura de *X. albilineans* na diluição 10^{-3} . Coluna 1, Linha 4: cultura de *X. albilineans* na diluição 10^{-4} . Coluna 1, Linha 5: cultura de *X. albilineans* na concentração 10^{-5} . Coluna 2, Linha 1: controle positivo. Coluna 2, Linhas 2 e 3: controles negativos (água e PBS). **B:** Gel de agarose contendo produto de PCR das culturas puras de *X. albilineans* nas diluições 10^{-1} a 10^{-4} . M: marcador de peso molecular 100pb. A seta indica fragmento amplificado esperado de 500pb.

IV. CONCLUSÃO

- o antissoro desenvolvido foi específico para *X. albilineans* e poderá ser utilizado como sistema de diagnóstico para análise da qualidade de mudas em viveiros comerciais ou para confirmação da identidade de *X. albilineans*.

CAPÍTULO 3 - DIVERSIDADE MOLECULAR E PATOGÊNICA ENTRE ISOLADOS DE *Xanthomonas albilineans*.

RESUMO – Isolados de *X. albilineans* foram obtidos de canas-de-açúcar com sintomas de Escaldadura das folhas provenientes de 4 estados brasileiros (AL, GO, MG e SP). Quinze “primers” microssatélites foram desenhados e utilizados na avaliação da diversidade genética entre os isolados. Além disso, foram realizadas inoculações de cada isolado em cultivar de cana-de-açúcar suscetível para avaliação de sua patogenicidade. A caracterização molecular mostrou que existe variabilidade genética entre os isolados, porém não foi possível agrupá-los de acordo com a região de origem. Quanto à patogenicidade, observou-se diferenças entre os isolados, mostrando-se como mais agressivo o isolado Xa11 proveniente de Conchal-SP. Um alelo de 160 pb foi amplificado exclusivamente em oito isolados, sendo que destes, sete foram caracterizados como os mais agressivos. Este alelo foi obtido pelo “primer” IACXa03, o qual amplifica uma sequência codificadora de peptídeos não ribossomais, NRPS, um dos genes da biossíntese de albicidina envolvidos na patogenicidade.

Palavras-chaves: Escaldadura, cana-de-açúcar, microssatélite, variabilidade.

I. INTRODUÇÃO

A Escaldadura das folhas é causada pela bactéria *X. albilineans* (Ashby) Dowson. É uma das principais e mais severas doenças da cana-de-açúcar, pois em plantios comerciais compromete a produtividade, causando baixa germinação das mudas, baixo desenvolvimento das plantas infectadas e redução do rendimento em sacarose. A escassez de informações sobre variabilidade genética e patogênica da bactéria é o

principal fator que limita o controle da doença e o desenvolvimento de cultivares de canas-de-açúcar resistentes. Atualmente a doença está presente em mais de 66 países, causando severas perdas na produção (ROTT & DAVIS, 2000). A bactéria *X. albilineans* coloniza os vasos do xilema, causando severos sintomas que em geral são caracterizados pela clorose das folhas, podendo apresentar zonas necróticas, vermelhidão vascular, formação de cavidade em hastes invadidas, produção de brotamentos laterais, rápido murchamento e morte da planta (BIRCH, 2001; PIERETTI et al., 2009; ROTT & DAVIS, 2000). A indução da clorose é causada por vários compostos tóxicos, sendo o mais importante deles chamado albicidina (ZHANG & BIRCH, 1997), que inibe a replicação de DNA do cloroplasto, resultando no bloqueio da sua diferenciação e aparecimento de estrias brancas que são característica da doença (BIRCH, 2001). A correlação entre produção de albicidina e variação da patogenicidade da bactéria ainda é uma incógnita que vem gerando controversas entre pesquisadores. Alguns afirmam que esse composto tóxico produzido especificamente pela *X. albilineans* desenvolve um importante papel na patogenicidade (BIRCH, 2001). Em contrapartida, há pesquisadores que concordam que a albicidina está estreitamente relacionada com a patogenicidade de *X. albilineans*, porém afirmam não terem encontrado relação alguma entre variação na produção de albicidina e variação na patogenicidade (CHAMPOISEAU et al., 2006b; RENIER et al., 2007). Portanto, de acordo com Champoiseau et al. (2006b), a albicidina é necessária, mas não suficiente para desenvolver a Escaldadura, pois ela parece ser um fator de virulência atuando coordenadamente junto com outros fatores.

A Escaldadura das folhas apresenta uma fase latente, na qual não apresenta sintomas visíveis. A frequente ocorrência dessa fase é um dos principais fatores que impedem o controle da Escaldadura, visto que a disseminação ocorre pelo plantio de colmos infectados assintomáticos ou quando lâminas de facões e/ou implementos agrícolas entram em contato com plantas doentes (RICAUD & RYAN, 1989). A principal forma de controle da doença é a utilização de cultivares resistentes (ZHANG & BIRCH, 1995), associadas ao uso de mudas saudáveis e manejo sanitário no plantio e colheita.

Variação genética tem sido muito observada em populações de plantas bem como em seus patógenos. No sistema cana-*X. albilineans*, diferentes níveis de sensibilidade ou resistência tem sido observado entre cultivares de canas idênticas, evidenciando a existência de variações na patogenicidade ou virulência (ALVAREZ et al., 1996).

Várias técnicas têm sido usadas para se avaliar a diversidade genética em *X. albilineans*, como a inoculação artificial (PERSLEY, 1973), métodos sorológicos (ALVAREZ et al., 1996; ROTT et al., 1995) e técnicas moleculares como RFLP (DAVIS, 1997), sequenciamento gênico (TSUSHIMA et al., 2006), Rep-PCR (LOPES et al., 2001) e AFLP (SHAIK et al., 2009).

Marcadores moleculares são ferramentas muito úteis para estudos de variabilidade genética e fornecem meios eficientes para ligar variações fenotípicas e genotípicas (VARSHNEY et al., 2005). Nesse contexto, os marcadores microssatélites (SSR) têm ganhado considerável importância devido a muitos atributos desejáveis incluindo hipervariabilidade, natureza multialélica, herança co-dominante, reprodutibilidade, abundância relativa, cobertura ampla do genoma, localização cromossômica específica e genotipagem de alto rendimento (PARIDA et al., 2006). Nos últimos anos, esses marcadores provaram ser uma ferramenta poderosa para a estimativa da diversidade genética e relações filogenéticas entre espécies (JOSHI et al., 1999). Apesar do seu potencial, ainda não há relatos da sua utilização em estudos de diversidade em *X. albilineans*.

Tendo em vista que estudos da diversidade genética e patogênica da bactéria *X. albilineans* podem auxiliar diretamente na definição das medidas de controle, bem como direcionar estratégias de melhoramento genético da cana, este trabalho objetivou caracterizar, por meio de marcadores microssatélites obtidos a partir do sequenciamento do genoma completo de *X. albilineans*, um banco de isolados de *X. albilineans* provenientes de diferentes regiões produtoras de canas-de-açúcar do Brasil. Paralelamente, a agressividade de cada isolado também foi avaliada por meio da inoculação em cultivar de cana-de-açúcar suscetível.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados de *Xanthomonas albilineans*

Colmos de cana-de-açúcar com sintomas de Escaldadura-das-folhas foram coletados em plantios, cortados transversalmente na região de entrenó e amostradas porções do nó da terça parte inferior de cada colmo. Posteriormente, foi realizado um corte longitudinal de 2 a 3 cm removendo a porção central da região do nó, as quais foram colocados individualmente em tubos tipo “Eppendorf” de 1,5mL estéreis, e centrifugados a 10000g durante 5 minutos. Alíquotas da seiva de xilema diluída 10 vezes foram riscadas em placas de Petri contendo meio de cultura XAS - *Xanthomonas Albilineans Seletive Medium* (DAVID et al., 1994), as quais foram incubadas por 7-10 dias a 28°C. Um total de 44 isolados de *X. albilineans* provenientes dos principais estados produtores de cana-de-açúcar no Brasil, foi utilizado. Detalhes dos isolados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Isolado, cultivar, local de coleta e ano de isolamento de todas as cepas utilizadas no presente estudo.

Isolado	Cultivar	Local de coleta	Ano
Xa1	Brava de Pericó	Ribeirão Preto – SP	2010
Xa2	2254	Santa Adélia – SP	2010
Xa3	2255	Santa Adélia – SP	2010
Xa4	2256	Santa Adélia – SP	2010
Xa5	RB72-454	Conchal – SP	2010
Xa6	IACSP95-5000	Goianésia – G	2010

Xa7	CTC 11	Goianésia – GO	2010
Xa8	CTC 17	Goianésia – GO	2010
Xa9	IACSP04-6165	Ribeirão Preto – SP	2010
Xa10	IACSP93-3046	Indiára – GO	2010
Xa11	SP90-7027	Conchal – SP	2010
Xa12	CT92-3796	Conchal – SP	2010
Xa13	CT94-3195	Conchal – SP	2010
Xa14	COO-513	Conchal – SP	2010
Xa15	CP65-0357	Maceió – AL	2010
Xa16	CT92-1808	Maceió – AL	2010
Xa17	CP70-1133	Maceió – AL	2010
Xa18	CT92-1864	Maceió – AL	2010
Xa19	CP81-1302	Maceió – AL	2010
Xa20	IACSP04-656	Pindorama – SP	2010
Xa21	CV5007 1791	Araçatuba – SP	2010
Xa22	CV5007 1899	Araçatuba – SP	2010
Xa23	RB86-7515	Araçatuba – SP	2010
Xa24	IACSP04-656	Vargem Grande do Sul – SP	2010
Xa25	IACSP04-656	Mococa – SP	2010
Xa26	IACSP07-4616	Mococa – SP	2010
Xa27	CTC 14	Ribeirão Preto – SP	2010
Xa28	POJ 2878	Ribeirão Preto – SP	2010
Xa29	SP81-1763	Ribeirão Preto – SP	2010
Xa30	IBSBF – 1374	Ilhas Maurício	2011
Xa31	326-01	Piracicaba - SP	2011

Xa32	IBSBF654-01	Araras - SP	2011
Xa33	IBSBF-2113	Piracicaba - SP	2011
Xa34	IACSP04-704	Ribeirão Preto – SP	2011
Xa35	185	Lins – SP	2011
Xa36	106	Valparaíso - SP	2011
Xa37	IACSP08-1592	Piracicaba – SP	2011
Xa38	CUSP07-7231	Conc. Alagoas – MG	2011
Xa39	SP79-1011	Conc. Alagoas – MG	2011
Xa40	SG43-401	Maceió – AL	2011
Xa41	990:R32-P31	Maceió – AL	2011
Xa42	1990:R32-P30	Maceió – AL	2011
Xa43	THA82-084	Maceió – AL	2011
Xa44	CVNE08-2544	Maceió – AL	2011

Identificação e confirmação dos isolados

As colônias de *X. albilineans* crescidas em placas de Petri foram selecionadas pela morfologia e coloração, confirmadas por “dot blot”, utilizando-se antissoro específico para *X. albilineans* e também por PCR utilizando-se o “primer” *albl*, *NRPS-2*, *A4-A5* proposto por Renier et al. (2007) que amplifica fragmento de 500pb. As reações foram preparadas em volume final de 25 µL contendo: 2 µL de diluição bacteriana (1:20), tampão Taq DNA polimerase 1X, 120 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada “primer”, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen *platinum*). As amplificações foram realizadas com um ciclo inicial de 2 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de 1 min a

95°C, um ciclo de 1 min a 54°C para anelamento, 1 ciclo de 1 min a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Construção dos “primers”

A partir de uma sequência genômica completa de *X. albilineans* (FP565176.1), depositada no *GenBank*, sequências de microssatélites foram identificadas pelo programa *Tandem Repeat Finder* (TRF). A partir das sequências selecionadas, os “primers” foram desenhados utilizando o programa PRIMER3 (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi). A avaliação da qualidade dos “primers” desenhados foi realizada pelo programa NETPRIMER (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html), verificando assim a formação de dímeros e *loops* para os “primers forward”, “reverse” e entre ambos.

Extração de DNA dos isolados

DNA total de cada isolado foi obtido a partir do procedimento descrito por Hauben et al. (1997), com modificações. Placas de Petri contendo as colônias de *X. albilineans* crescidas por 5 dias foram lavadas e raspadas com 3mL de PBS estéril. Posteriormente 2 mL da solução de PBS com bactéria foi colocada em tubos tipo Eppendorf e centrifugada a 10.000 g durante 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 2 mL de PBS, seguido de nova centrifugação. Esse procedimento de lavagem foi repetido três vezes. Posteriormente, o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de tampão Tris-EDTA, tratado com 6 µL de RNase (10 mg/mL), 5 µL de proteinase K (20 mg/mL), 6 µL de lisozima e incubado a 37°C “overnight”. Após a incubação, foram adicionados 30 µL de SDS (100mg/mL) e novamente incubado a 37°C durante 1 hora. Em seguida, foram adicionados 160 µL de CTAB (100mg/mL) e 200 µL de NaCl (5 M), sendo a solução incubada por 10 minutos a

65°C. Na sequência, três lavagens foram realizadas para a purificação do DNA, sendo a primeira e última, constituída de uma extração com clorofórmio álcool isoamil (24:1) e a lavagem intermediária, uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamil, (25:25:1) e inalmente uma precipitação com isopropanol (60%, v/v). O precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 100 µL de tampão Tris-EDTA na concentração de 0,5M e pH8. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (10 µg/mL), e a concentração obtida comparativamente, a partir de padrões com concentrações conhecidas (DNA do fago λ).

Condições da PCR

Cada reação de microssatélite foi padronizada para um volume final de 15 µL, contendo: 30ng de DNA, tampão da enzima 1X, 1,2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µL de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase Invitrogen. As amplificações foram realizadas em termociclador *MyCicle* (Bio-Rad) com ciclo de desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguido de um programa “touchdown” de 10 ciclos de 40s a 95°C, 30s a 68°C e 30s a 72°C, reduzindo 1°C a cada ciclo, seguido de 30 ciclos de 40s a 95°C, 30s a 58°C, 30s a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C.

Eletroforese e detecção do polimorfismo

A eletroforese foi realizada em géis desnaturante poliacrilamida 6%, e o polimorfismo visualizado por meio da coloração com prata, seguindo o procedimento proposto por Creste et al. (2001).

Análise dos locos microssatélites

Fragmentos amplificados foram avaliados para presença (1) e ausência (0) de alelos em cada loco para cada um dos 44 isolados. A similaridade genética entre todos os isolados foi calculada de acordo com o coeficiente de Jaccard. As relações entre os isolados foi avaliada com a análise genética em cluster, pelo “unweighted pair-grouping with arithmetic average (UPGMA) clustering”, e os resultados plotados em um dendrograma pelo programa NTSYS-PC versão 2.0j (Exeter Software, Setauket, NY, USA). Análise “bootstrap” (EFRON, 1981), baseado no método Dboot software, com 1000 reamostragens, foi usado para verificar se o número de marcadores SSRs polimórficos foi suficiente para fornecer estimativas de distância precisas entre os isolados (TIVANG et al., 1994).

Avaliação da variabilidade patogênica

A variabilidade patogênica dos 44 isolados de *X. albilineans* foi avaliada na cultivar SP78-4467 que é utilizada como padrão de susceptibilidade para *X. albilineans* pelo Centro de Tecnologia Canavieira (Dabbas et al., 2006). As canas foram multiplicadas na biofábrica do Centro de Cana-IAC e certificadas para ausência de *X. albilineans* por PCR, utilizando-se os “primers” descritos por Renier et al. (2007)

As plantas aclimatadas em casa-de-vegetação por 30 dias foram transferidas para vasos de 5L contendo uma mistura de solo, areia e substrato (Tropstrato, da marca Vida Verde) na proporção de 3:1:1.

Um experimento em casa de vegetação do Centro de Cana foi estabelecido para avaliar a expressão de sintomas de cada isolados de acordo com metodologia proposta por Champoiseau et al. (2006b), com modificações. Plantas da cultivar SP78-4467,

produzidas *in vitro* e aclimatadas, com quatro meses de idade, foram inoculadas com suspensão bacteriana contendo 10^8 UFC/mL ($OD_{600} = 0,4$), por meio da técnica de decaptação, como descrito por Rott et al. (1997), com modificações. Para realizar a decaptação utilizou-se bisturi cuja lâmina foi previamente mergulhada na suspensão bacteriana e logo em seguida 100 μ L da mesma suspensão foi aplicado na região do corte. Depois de cada corte, as lâminas do bisturi eram trocadas por lâminas estéreis para evitar contaminação cruzada das plantas. Plantas controle inoculadas com água destilada estéril foram incluídas no experimento para avaliar qualquer contaminação cruzada de ocorrência natural, além de comprovar que as plantas inoculadas não apresentavam contaminação prévia. Após a inoculação a irrigação foi suspensa durante quatro dias com o objetivo de induzir estresse nas plantas, facilitando assim a invasão da bactéria.

O delineamento estatístico utilizado foi blocos casualizados, constituído por nove blocos com uma repetição, cada unidade amostral foi constituída por uma planta.

Passados 30 dias da inoculação foi realizada a avaliação da patogenicidade dos isolados a partir de uma escala de notas variando de 1 (sem sintoma) a 8 (sintoma muito avançado), elaborada nesse trabalho seguindo observações visuais da sintomatologia da doença ao longo de seu desenvolvimento; onde 1= sem sintomas, 2= início de clorose com pequenas linhas necróticas no limbo foliar, podendo ocorrer pequenas estrias brancas, 3= manchas cloróticas, podendo ocorrer uma ou duas estrias finas e brancas no limbo foliar ao longo de toda a extensão da folha paralela à nervura principal, 4= 3 a 5 finas estrias brancas em toda a extensão no limbo foliar e paralelas à nervura principal, 5= 5 ou 6 linhas brancas, podendo ocorrer linhas mais largas, 6= Linhas ou estrias brancas, podendo ocorrer faixas brancas largas e início de necrose no bordo das folhas (geralmente necrose pontual), 7= mais de 6 linhas brancas, faixas brancas e necrose na extensão lateral da folha, e 8= muitas linhas brancas e formação de faixas brancas largas e necrose muito avançada nas folhas e presença de brotos mortos (Figura 4).

Os dados obtidos pela avaliação foram transformados em logarítimo da (nota+1) e analisados pelo programa SAS, utilizando o teste “t” (LSD = least significant difference) a 5% ($p < 0,05$).

Associação das médias fenóticas e das marcas genóticas

Para essas análises, as 44 médias fenóticas transformadas (fenótipo = média de $\log_{10}(\text{nota}+1)$), de cada um dos 44 acessos, foram confrontadas com as 54 marcas genotipadas com valores zero para ausência e um para presença da banda.

Para avaliar o efeito de associação simples, foi inicialmente calculado a frequência e a média em cada um dos valores, $x=0$ (ausência da banda) e $x=1$ (presença da banda), respectivamente para cada um dos 54 alelos. A significância da diferença entre as médias ($p < 0,10$) foi avaliada por regressão linear simples ($y=a+bx$), em que y representam as médias fenóticas transformadas e x é zero ou um. Ou seja, a significância da regressão indica que b é diferente de zero e expressa quanto a média se altera quando para de $x=0$ para $x=1$.

Como os alelos podem segregar de forma independente ou não, os efeitos de marcas simples podem ficar inter-relacionados e é interessante verificar os efeitos de associação simultânea. Para isso, foi utilizado um programa de regressão linear múltipla, com processo de seleção simultânea das marcas ($p < 0,05$), usando o método “stepwise”. Selecionadas as marcas simultâneas, foi usado um programa de regressão múltipla para obter os efeitos ajustados de cada alelo (ou marca) selecionado e o coeficiente de determinação, R^2 , que expressa o quanto essas marcas explicam da variação do fenótipo.

III. RESULTADOS

Confirmação dos isolados obtidos

Os 44 isolados utilizados neste trabalho tiveram sua identidade confirmada tanto por “dot blot” (dado não mostrado) como por PCR (Figura 1), provando-se com as duas metodologias, tratarem-se de *X. albilineans*, mostrando-se que os dois métodos são eficientes para detecção do patógeno. No caso do “dot blot”, além dos 44 isolados de *X. albilineans*, foram aplicados também como controles negativos amostras de outras bactérias endofíticas de cana-de-açúcar (*Leifsonia xyli* e *Glucanacetobacter diazotrophicus*), água e PBS.

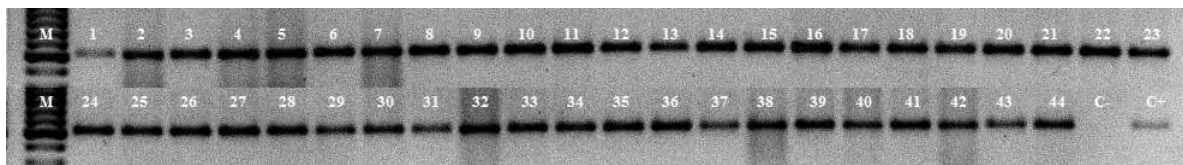


Figura 1: Gel de agarose 1,2% contendo produto de PCR de todos os isolados para confirmação.

M: marcador de tamanho molecular de 500pb, C (-): controle negativo e C(+): controle positivo.

Análise das sequências microssatélites

A partir de uma sequência genômica completa de *X. albilineans* (PIERETTI et al., 2009), acessada pelo *GenBank* (FP565176.1), sequências de microssatélites foram buscadas pelo programa “*Tandem Repeat Finder*” (TRF). Essa busca resultou em um total de 429 sequências microssatélites com motivos que variaram de 1 a 210 nucleotídeos com repetições que variaram de 2 a 27. Desse total foram utilizadas 16 sequências, escolhidas com base no tamanho dos motivos e número de repetição,

sendo selecionadas as sequências com tamanho e número de repetições intermediários. Duas das 16 sequências tiveram seus motivos sobrepostos.

Entre as 16 sequências escolhidas, a repetição mais frequente foi hexanucleotídeos, representando 33% das sequências obtidas, seguido de trinucleotídeos (26%). Foram selecionadas também sequências com nove (6%), 12 (6%), 18 (13%) e 36 (6%) motivos repetidos. Do total das sequências obtidas, 12 são sequências de microssatélites puras, e quatro apresentaram microssatélites com motivos interrompidos, ou seja, são sequências interrompidas em alguma região por motivos não repetidos.

As repetições dos motivos trinucleotídeos encontrados variaram de 8 a 14 vezes. Microssatélites com motivos hexanucleotídeos foram observados repetindo desde cinco até 11 vezes. As sequências microssatélites que apresentaram motivos maiores que hexanucleotídeos apresentaram repetições que variaram de 7 a 23 vezes.

A partir das sequências contendo regiões microssatélites, foram desenhados 15 pares de “primers”.

Todos os “primers” foram capazes de amplificar alelos nítidos. Dos 15 “primers” sintetizados 12 foram polimórficos, e três monomórficos. O total de alelos polimórficos foi 54, com média de 4,5 alelos por loco. O maior número de alelos foi obtido com o loco IACXa02 (12 alelos), e o menor nos IACXa05, IACXa15 e IACXa16 (2 alelos). A Tabela 2 apresenta em detalhes, as características dos “primers” obtidos.

Diversidade genética dos isolados de *Xanthomonas albilineans*

A caracterização molecular dos 44 isolados de *X. albilineans* realizada a partir dos 54 alelos obtidos com os 12 locos microssatélites polimórficos revelou a existência de variabilidade genética entre os isolados.

Conforme pode ser observado no dendrograma (Figura 3) foi possível reunir os 44 isolados em dois grandes grupos distintos. O grupo 1 foi constituído por 30 isolados,

sendo estes provenientes das quatro regiões estudadas (AL, GO, MG e SP), e o grupo 2 reuniu 11 isolados, os quais foram originários apenas dos estados de Alagoas e São Paulo. Os isolados Xa35 (Ribeirão Preto) e Xa4 (Santa Adélia) mostraram-se distantes de todos os demais, apresentando-se como “outgroup”. O mesmo ocorreu com o isolado IBSBF1374, representado como isolado “tipo” de *X. albilineans* proveniente das Ilhas Maurício.

Analisando o dendrograma, observa-se que dentro do grupo 1, os marcadores SSR utilizados não foram capazes de detectar polimorfismo entre alguns isolados, os quais apresentaram 100% de identidade, tais como os isolados de Ribeirão Preto : Xa1, Xa27, Xa28, Xa29 e o isolado de Araçatuba: Xa22; entre os isolados Xa38 e Xa39 provenientes de Minas Gerais; como também entre os isolados Xa40, Xa44 provenientes de Maceió-AL e Xa11 proveniente de Conchal-SP.

Não foi possível agrupar os isolados por estados e/ou região de procedência. Tal fato pode ser explicado pelo intenso fluxo de canas infectadas assintomáticas dentro das principais regiões canavieiras do Brasil, contribuindo assim para a disseminação do patógeno e favorecendo o fluxo gênico entre populações de *X. albilineans*.

A partir da matriz de similaridade genética, pôde-se verificar que a menor similaridade observada foi de 0,3 entre os indivíduos Xa4 e Xa36 provenientes respectivamente dos municípios de Santa Adélia e Valparaíso, ambos do estado de São Paulo; e a maior similaridade observada foi 1,0; valor encontrado entre 10 isolados de *X. albilineans*. A similaridade genética média estimada foi 0,6.

Tabela 2: Características dos “primers” microsossatélites que foram desenhados e utilizados para caracterização molecular dos isolados de *X. albilineans*

Primer	Sequência	Sequências Repetidas	Tm	Tamanho do fragmento	Número de alelos
IACXa01-For	TCATCGGCATTACGACAAAG	(CCG) ₁₁	60	109	1
IACXa01- Ver	CAACATCAACGCTGCAAGAT		60		
IACXa02- For	GGTCAGTCAAAAGCAAAAC	(AGCAACAGCACACA) ₁₉	60	312	12
IACXa02- Ver	TTTCAACGTGGCTGAAAG		60		
IACXa03- For	AACTGTTGCAAGCGTCTGTG	(ACACCG) ₁₁	60	149	8
IACXa03- Ver	ATATTCGGCTACCCCGTCAC		60		
IACXa04- For	GTCGCTATTGACGGTGTA	(GTGGAGCCGCGCCACCT) ₂₃	60	493	1
IACXa04- Ver	TTCCACTAGCGGTGTAGC		60		
IACXa05- For	GAACATTAAACGCGCAGAG	(GGCGGCTCGACGGGCGGTG GCGGTTCCACTGTGGC) ₁₀	60	483	2
IACXa05- Ver	GATATGTTTTTCGCAATAGCC		60		
IACXa06- For	GATGACCTTGGTGCTGAA	(GGAGCCACCCCGCT) ₈	60	174	4
IACXa06- Ver	GTTGAGATCGGTGCGAAA		60		
IACXa07- For	TTTCAGATCGGCCTGGATT	(CGGAGA) ₅	60	156	3
IACXa07- Ver	GCCACTCTAAGCGACACCAT		60		

IACXa08- For	CTTCGCATATCACCTCAAC	(GGTGGTGAA) ₇	60	148	3
IACXa08- Ver	GTGTCTTGAGCACCGTCA		60		
IACXa09- For	GAATTTGGAGGAGGAGGA	(GGT) ₁₁	60	143	1
IACXa09- Ver	GTTGCGTTGACTTCTTGTG		60		
IACXa10- For	ACACAGGCCAGTTCAAGA	(GTCGTG) ₉	60	129	4
IACXa10- Ver	GGTGACCAACGACCATGATA		60		
IACXa11- For	GAGAAAATGCCAAGAAAAGC	(GAGAAAG) ₅	60	128	4
IACXa11- Ver	TCAGGTCGGGTTAGGTCT		60		
IACXa13- For	GATGTTGCATAAGCTGTGG	(GGT) ₁₄ + (TGGCAA) ₆	60	130	6
IACXa13- Ver	GTCGACGATGACATGAGTG		60		
IACXa14- For	GTTAACCTGTTGCATAAGCTG	(GGTGGTGGTGGCTCCACC) ₁₅	60	346	5
IACXa14- Ver	TATCGACGATGACATGAGTG		60		
IACXa15- For	GCGTCGTAGTAGTTGTTGGT	(CCA) ₈	60	134	2
IACXa15- Ver	GGCATGTTCTTGTTCGAG		60		
IACXa16- For	CTGCCGTATGTGTTCCCTG	(GGATGA) ₅	60	149	2
IACXa16- Ver	ACACGTCCTCCTCTTTCATC		60		

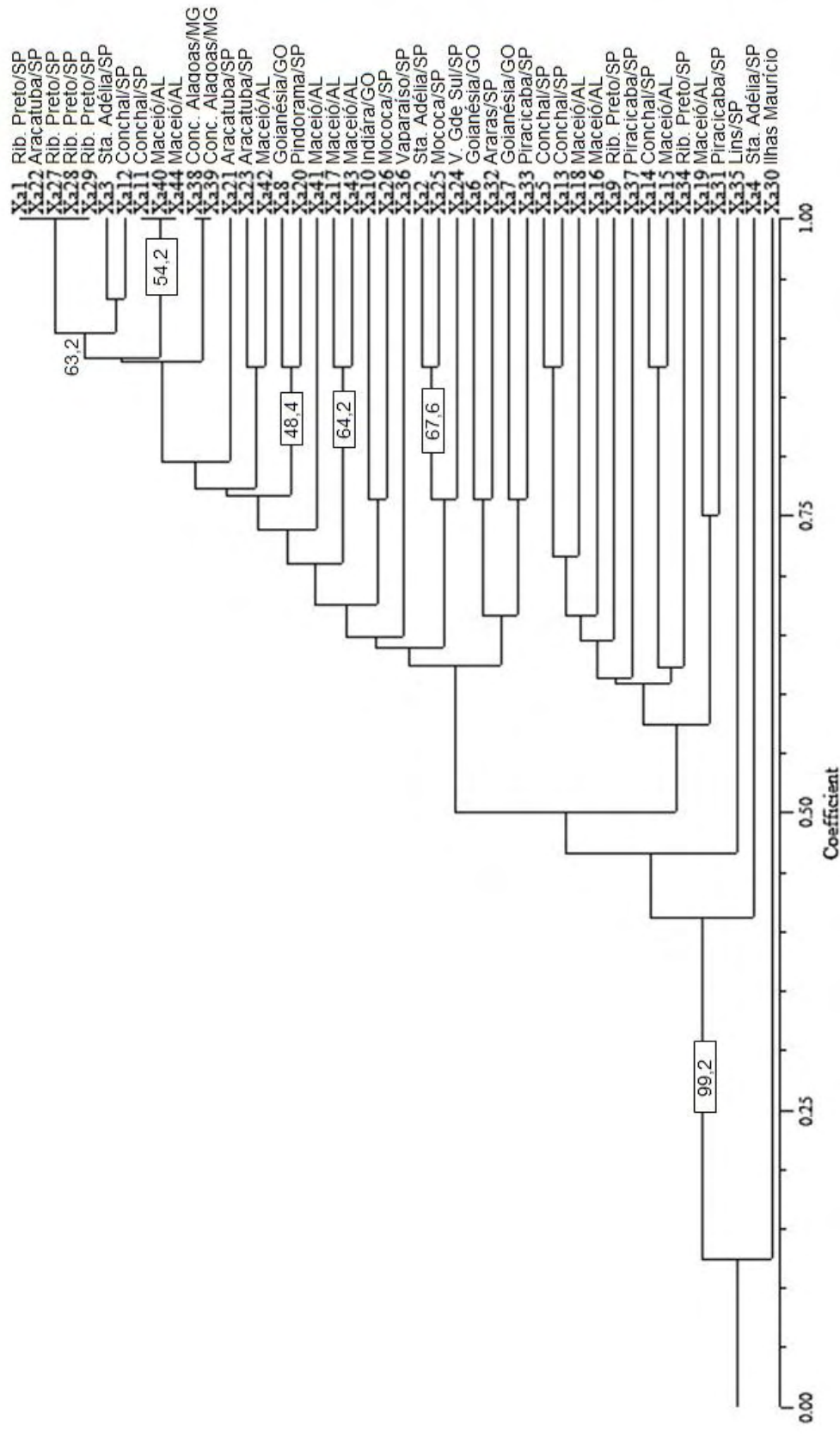


Figura 3: Agrupamento de 44 isolados de *X. albilineans* baseado no programa UPGMA e plotado pelo programa NTSYS-PC versão 2.0.

Diversidade patogênica dos isolados de *Xanthomonas albilineans*

A agressividade dos isolados de *X. albilineans* foi avaliada na cultivar de cana-de-açúcar SP78-4467, considerada suscetível para a doença em estudo. Após 30 dias da inoculação, todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas de Escaldadura, os quais foram avaliados de acordo com a escala de notas elaborada neste trabalho seguindo observações de padrões de sintomas visuais (Figura 4).

Análise estatística realizada pelo teste “t” (LSD) mostrou que há diferença significativa ($p < 0,05$) de agressividade entre os diferentes isolados avaliados (Tabela 3). Dos 44 isolados avaliados, Xa11 coletado em Conchal-SP, apresentou maior agressividade patogênica enquanto que o isolado Xa21, proveniente de Araçatuba/SP, apresentou menor agressividade patogênica. O isolado tipo IBSBF1374, proveniente das Ilhas Mauricio, foi classificado entre os três isolados menos agressivos.

Ao se comparar o dendrograma com os resultados gerados pelo teste ‘t’(LSD), verifica-se que o grupo 1 reuniu maior proporção (14) de isolados agressivos do que o grupo 2 (5 isolados).

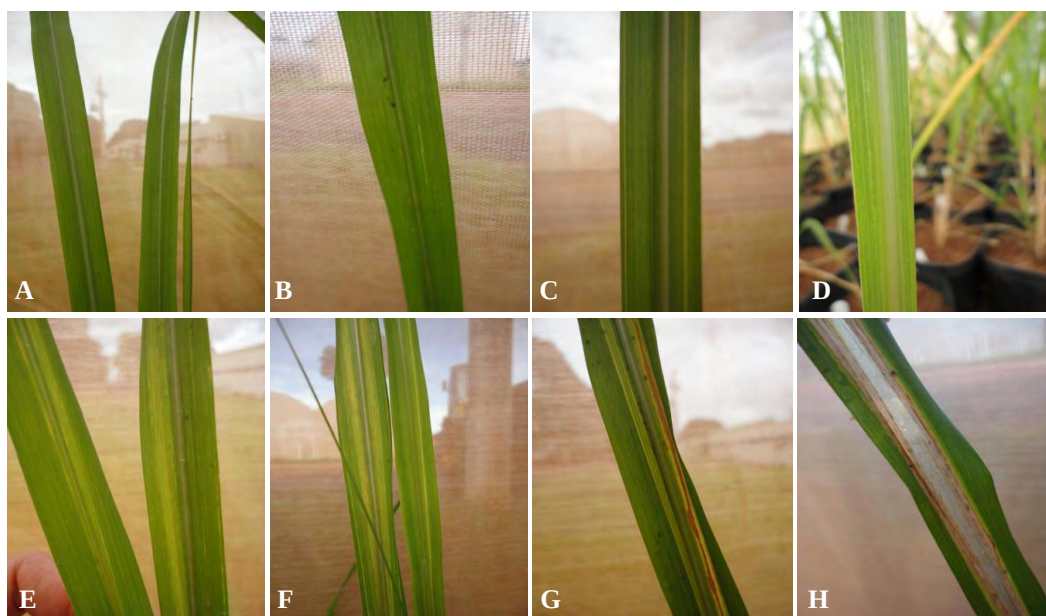


Figura 4: Escala de notas para avaliação de sintomas de Escaldadura das folhas. A: Nota 1-Sem sintoma. B: Nota 2- início de manchas cloróticas, podendo ocorrer pequena estria branca no limbo foliar. C: Nota 3 - Linhas cloróticas, podendo ocorrer uma ou duas estrias finas e brancas no limbo foliar ao longo de toda a extensão da folha paralela à nervura principal. D: Nota 4 -3 a 5 finas estrias brancas em toda a extensão do limbo foliar e paralelas à nervura principal. E: Nota 5 - 5 ou 6 linhas brancas no limbo foliar ao longo de toda a extensão da folha, podendo ocorrer linhas mais largas. F: Nota 6 - Linhas ou estrias brancas, podendo ocorrer faixas brancas largas e início de necrose no bordo das folhas (geralmente necrose pontual). G: Nota 7 - mais de 6 linhas brancas, faixas brancas e necrose na extensão lateral da folha. H: Nota 8 - muitas linhas brancas, formação de faixas brancas largas, necrose muito avançada nas folhas e presença de brotos mortos.

Tabela 3: Médias para agressividade utilizando teste “t”(LSD) para os 44 isolados de *X. albilineans* utilizados no estudo.

Isolado	Região	Estado	Médias=log(nota+1)
Xa1	Ribeirão Preto	São Paulo	1,89 BCDEFGHIJK
Xa2	Santa Adélia	São Paulo	1,78 CDEFGHIJKL
Xa3	Santa Adélia	São Paulo	1,60 IJKLMN
Xa4	Santa Adélia	São Paulo	2,05 AB
Xa5	Conchal	São Paulo	1,58 JKLMN
Xa6	Goianésia	Goiás	1,86 ABCDEFGH
Xa7	Goianésia	Goiás	1,76 CDEFGHIJKL
Xa8	Goianésia	Goiás	1,91 ABCDEF
Xa9	Ribeirão Preto	São Paulo	1,67 FGHIJKLM
Xa10	Indiára	Goiás	1,70 EFGHIJKLM

Xa11	Conchal	São Paulo	2,07 A
Xa12	Conchal	São Paulo	1,89 ABCDEFG
Xa13	Conchal	São Paulo	1,80 BCDEFGHIJK
Xa14	Conchal	São Paulo	1,70 EFGHIJKLM
Xa15	Maceió	Alagoas	1,77 CDEFGHIJKL
Xa16	Maceió	Alagoas	1,86 ABCDEFGH
Xa17	Maceió	Alagoas	1,77 CDEFGHIJKL
Xa18	Maceió	Alagoas	1,86 ABCDEFGH
Xa19	Maceió	Alagoas	1,84 ABCDEFGHI
Xa20	Pindorama	São Paulo	1,90 ABCDEFG
Xa21	Araçatuba	São Paulo	1,33 N
Xa22	Araçatuba	São Paulo	1,55 KLMN
Xa23	Araçatuba	São Paulo	1,60 IJKLMN
Xa24	Vargem Grande do Sul	São Paulo	1,83 ABCDEFGHIJ
Xa25	Mococa	São Paulo	1,88 ABCDEFG
Xa26	Mococa	São Paulo	1,63 GHIJKLM
Xa27	Ribeirão Preto	São Paulo	1,58 JKLMN
Xa28	Ribeirão Preto	São Paulo	1,60 HIJKLM
Xa29	Ribeirão Preto	São Paulo	1,82 ABCDEFGHIJ
Xa30	Ilhas Mauricio	África	1,54 LMN
Xa31	Piracicaba	São Paulo	1,68 FGHJKLM
Xa32	Araras	São Paulo	1,82 ABCDEFGHIJ
Xa33	Piracicaba	São Paulo	1,73 DEFGHIJKLM
Xa34	Ribeirão Preto	São Paulo	1,75 CDEFGHIJKLM
Xa35	Lins	São Paulo	1,70 EFGHIJKLM
Xa36	Valparaíso	São Paulo	1,90 ABCDEF
Xa37	Piracicaba	São Paulo	2,05 AB
Xa38	Conceição das Alagoas	Minas Gerais	1,78 CDEFGHIJKL
Xa39	Conceição das Alagoas	Minas Gerais	1,78 CDEFGHIJKL
Xa40	Maceió	Alagoas	1,99 ABC
Xa41	Maceió	Alagoas	1,98 ABCD
Xa42	Maceió	Alagoas	1,94 ABCDE
Xa43	Maceió	Alagoas	1,49 MN
Xa44	Maceió	Alagoas	1,76 CDEFGHIJKL
			F = 2,86*

CV = 15,89 Média = $\log(\text{nota}+1)$. Medidas seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste "t" (LSD) ($p > 0,05$), * ($p < 0,05$).

Também considerando patogenicidade, observa-se tendência de agrupamentos independentemente da região de procedência, tal como o agrupamento entre os isolados Xa11, Xa12, Xa40 e Xa44; Xa8, Xa20, Xa41 e Xa42; Xa6 e Xa32. É interessante notar que embora os isolados Xa1, Xa27, Xa28 e Xa29 provenientes de Ribeirão Preto e o isolado Xa22 proveniente de Araçatuba tenham apresentado 100% de identidade genética quando caracterizadas pelos marcadores microssatélites, eles

variaram quanto à patogenicidade, existindo isolados de patogenicidade alta (Xa29), média (Xa1) e baixa (Xa22, Xa27 e Xa28).

Associação das médias fenóticas e das marcas genóticas

As notas fenóticas atribuídas a partir da escala de notas e a genotipagem das 54 marcas (alelos) polimórficas avaliadas estão na Tabela 4.

Na média geral verifica-se que não houve diferença significativa entre a diferença das médias gerais com a ausência de marcas (1,7575) versus com a presença (1,7464); ou seja; na maior parte dos locos não houve associação significativa entre marcas e nota fenotípica. Por outro lado, na análise marca por marca, via regressão linear simples, houve diferença ($p < 0,10$) para as marcas 16 e 50 (embora este último, com apenas um isolado com presença da marca). Portanto, entre as 54 marcas avaliadas, pelo menos duas mostram associação com o fenótipo.

A análise de regressão com todas as marcas simultaneamente, via método 'stepwise', também selecionou as marcas 16 e 50, como associadas ($p < 0,05$), e a equação da regressão linear dupla obtida foi:

$$\text{Fenótipo} = 1,74029 + 0,11346 y_{16} + 0,30971 y_{50} \quad (R^2 = 0,1596; p = 0,03).$$

Ou seja, o modelo de marcas simultâneas mostra coeficiente de determinação de 15,96%, significativo ($p < 0,05$) e as presenças das marcas 50 e 16 são no sentido de aumentar a resposta esperada do fenótipo (maior nota). Com a presença da marca 50 tem-se que a resposta fenotípica média esperada aumenta 0,36; (embora essa marca só ocorra no acesso 2256, proveniente de Santa Adélia, São Paulo). Ao se excluir o isolado 2256 do modelo, tem-se o efeito simples ajustado da marca 16, e a equação fica:

$$\text{Fenótipo} = 1,74029 + 0,11346 y_{16} \quad (R^2 = 0,0879; p = 0,05).$$

Portanto, a marca 16 responde por 8,79%, enquanto que ambas (16 e 50), respondem por 15,96%, das variações do fenótipo. A presença da marca 16 faz a nota média esperada aumentar de 0,12. Quando se consideram as duas marcas, espera-se que a nota média fenotípica aumente: $0,36 + 0,12 = 0,48$. (ou seja, quase meio ponto).

Tabela 4 : Frequência da ausência e da presença das marcas genotípicas e respectivas médias fenotípicas, transformadas em $\log(x+1)$, em cada um dos 54 locos polimórficos, avaliadas com os 44 acessos.

Primer	Marca	Ausência	Média	Presença	Média
IACXa2	1	43	1,7649	1	1,9000
	2	43	1,7658	1	1,8600
	3	41	1,7651	3	1,7800
	4	41	1,7624	3	1,8433
	5	39	1,7802	5	1,6720
	6	40	1,7705	4	1,7425
	7	40	1,7710	4	1,7375
	8	37	1,7600	7	1,8100
	9	35	1,7657	9	1,7767
	10	42	1,7686	2	1,7550
	11	42	1,7681	2	1,7650
	12	43	1,7681	1	1,7600
IACXa3	13	43	1,7695	1	1,7000
	14	42	1,7717	2	1,6900
	15	41	1,7661	3	1,7933
	16	36	1,7489 ^b	8	1,8537 ^a
	17	36	1,7767	8	1,7287

	18	27	1,7704	17	1,7641
	19	42	1,7638	2	1,8550
	20	41	1,7761	3	1,6567
IACXa 5	21	2	1,7200	42	1,7702
	22	42	1,7702	2	1,7200
IACXa 6	23	43	1,7733	1	1,5400
	24	42	1,7745	2	1,6300
	25	16	1,7563	28	1,7746
	26	33	1,7576	11	1,7991
IACXa 7	27	2	1,7950	42	1,7667
	28	42	1,7667	2	1,7950
IACXa 8	29	43	1,7733	1	1,5400
	30	43	1,7698	1	1,6900
	31	2	1,6150	42	1,7524
IACXa 10	32	39	1,7672	5	1,7740
	33	11	1,7864	33	1,7618
	34	39	1,7615	5	1,8180
	35	43	1,7698	1	1,6900
IACXa 11	36	42	1,7614	2	1,9050
	37	5	1,7980	39	1,7641
	38	42	1,7655	2	1,8200
	39	43	1,7733	1	1,5400
IACXa 13	40	43	1,7732	1	1,5400
	41	42	1,7693	2	1,7400
	42	43	1,7663	1	1,8400
	43	42	1,7662	2	1,8050

	44	34	1,7532	10	1,8180
	45	16	1,7906	28	1,7550
IACXa 14	46	43	1,7733	1	1,5400
	47	43	1,7684	1	1,7500
	48	34	1,7635	10	1,7830
	49	13	1,7823	31	1,7619
	50	43	1,7614 ^b	1	2,0500 ^a
IACXa 15	51	1	1,5400	43	1,7733
	52	43	1,7733	1	1,5400
IACXa 16	53	1	1,5400	43	1,7733
	54	43	1,7733	1	1,5400
média			1,7575		1,7464

Obs: letras diferentes na linha ($p < 0.10$).

IV. DISCUSSÃO

A análise do genoma de *X. albilineans* revelou a existência de um grande número de sequências simples repetidas (SSRs) que variam na composição, tamanho e repetição do motivo. Um total de 429 repetições em tandem foram encontradas, as quais variaram de 1 a 210 nucleotídeos, com número de repetição variando de 2 a 27. Todos os “primers” desenhados para amplificar motivos variando de 3 a 36 bases amplificaram fragmentos nítidos e escoráveis, os quais foram eficientes para acessar a diversidade genética dos diferentes isolados de *X. albilineans* estudados. Até o momento, este é o único relato de caracterização de isolados do gênero *Xanthomonas* com marcadores SSRs.

A utilização de marcador molecular SSR para bactéria fitopatogênica é um fato pouco comum, registrado uma única vez em 2001 por Coletta-Filho et al. na avaliação da diversidade genética de *Xylella fastidiosa* de diferentes hospedeiros. Neste trabalho, um total de 67 repetições em tandem foram identificadas, com motivos variando de 3 a 33 nucleotídeos, sendo que nove delas foram utilizadas no desenvolvimento de “primers” SSRs. A comparação com marcadores RAPD revelou que para *X. fastidiosa* dos citros os SSRs foram mais informativos, com valor de diversidade genética igual a 0,83, enquanto que para RAPD a diversidade genética máxima foi de 0,12. Com isso, os autores afirmaram que os marcadores SSR são uma ferramenta de alta resolução para análise epidemiológica, genética e ecológica para cepas de *X. fastidiosa* de citros. Segundo esses autores, os SSRs também tem a vantagem de poder ligar regiões genômicas hipervariáveis produzidas como resultado de variações na composição de sequências e atividade da DNA polimerase.

Desde então, outros trabalhos foram desenvolvidos visando a caracterização de outras espécies de bactérias não fitopatogênicas, como *Nisseria meningitidis* (YAZDANKHAH et al, 2005), *Mycobacterium tuberculosis* (LE FLECHE et al, 2002), *Salmonella enterica* (LIU et al, 2003). Uma vez que as repetições em tandem são sequências de DNA hipermutáveis, tem sido proposto que elas representam a principal fonte de diversidade genética para muitas bactérias patogênicas, por isso essas sequências tem despertado crescente interesse. O sequenciamento de genomas completos microbianos oferecem novas oportunidades para investigar a evolução dos SSRs em genomas pequenos.

Mrázek et al., 2007 analisaram a abundância de SSRs em mais de 300 genomas procariotos e identificaram características importantes entre os genomas estudados, os quais foram bastantes distintos em relação as tipos de SSRs encontrados. Longos SSRs (LSSRs) compostos por motivos de 1 a 4 nucleotídeos em tandem, são geralmente encontrados em parasitas obrigatórios com genomas reduzidos. Em contraste, LSSRs com motivos grandes, com 5 a 11 nucleotídeos são encontrados principalmente em organismos não patogênicos ou oportunistas, com genomas de ampla dimensão. Segundo os autores, comparações de SSRs de comprimentos

diferentes sugerem que LSSRs compostos por motivos de 1 a 4 nucleotídeos são provavelmente mantidos por seleção. Field & Wills, (1998) relataram que em organismos procariotos, repetições longas não ocorrem em abundância no genoma, com exceção de algumas extremamente longas, as quais fogem completamente do comprimento que é esperado de ocorrência ao acaso. LSSRs, com elevado número de repetições perfeitas, são mais prováveis de revelarem polimorfismos, devido a alta taxa de escorregamento na amplificação do DNA ou crossing-over desigual. Dessa forma, vários estudos tem mostrado que o número de repetições é um bom indicativo do nível de variabilidade genética (GOLDSTEIN & CLARK, 1995). De fato, apesar do grande número de repetições em tandem observada no genoma de *X. albilineans*, apenas 16 apresentaram número de repetições suficientes para permitir uma boa análise da diversidade, visto que, segundo a literatura, para um bom desenho de primer, deve-se explorar sequências com no mínimo, oito repetições perfeitas em tandem (DUTECH et al., 2007).

Os marcadores SSRs utilizados neste trabalho revelaram que existe variabilidade genética entre os 44 isolados de *X. albilineans* coletados em diferentes regiões canavieiras do Brasil, porém não foi possível agrupar os isolados por estado e/ou região de coleta. Diversos trabalhos tem demonstrado a ocorrência de diversidade genética entre isolados de *X. albilineans* no Brasil e outros países. Silva et al. (2007), utilizaram rep-PCR para avaliar a existência de diversidade genética entre 50 isolados de *X. albilineans* provenientes de áreas comerciais do estado de São Paulo. Similarmente ao presente trabalho, os resultados obtidos pelos autores demonstraram a existência de diversidade genética entre os isolados os quais foram separados em três grupos. Porém, ao contrário do presente trabalho, os autores observaram que houve tendência de agrupamento dos isolados conforme região de coleta, o que pode ser explicado pelo fato de que todos os isolados foram provenientes de um mesmo estado.

Rott et al. (1994), estudaram 215 cepas de *X. albilineans* provenientes de 28 diferentes localidades do mundo e identificaram três grupos de sorotipos diferentes: Sorotipo I que consiste no maior grupo, formado por cepas de várias localidades geográficas, tais como Áustria, E.U.A., Guadalupe, Índia, Ilhas Maurício e Sul da

África; Sorotipo II que contém apenas cepas africanas e sorotipo III que é o menor grupo, constituído por Ilhas do Caribe. Alvarez et al. (1996) utilizaram sete tipos de anticorpos monoclonais específicos bem como “fingerprint” de DNA genômico para comparar 38 cepas de *X. albilineans* provenientes de 13 países diferentes. Com base na similaridade das reações sorológicas das bactérias, os autores identificaram 3 grandes grupos formados por 8 subgrupos, sendo que os agrupamentos sorológicos se correlacionaram fortemente com os agrupamentos baseados no DNA. Os grupos de cepas que foram genética e sorologicamente relacionados, não necessariamente foram coletados em locais próximos, sendo que a maioria das cepas que se agruparam foram coletadas em regiões distantes. Esses dados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual não foi possível agrupar os isolados conforme local de coleta.

Lopes et al.(2001) utilizaram rep-PCR para analisar a diversidade em *X. albilineans* e por meio de “primer” BOX eles agruparam os isolados em cinco grupos, sendo a maioria deles agrupados conforme o país de origem. Tsushima et al. (2006), compararam a variabilidade genética nos genes *gyrB* e *rpoD* em 21 cepas de *X. albilineans* provenientes de Okinawa (Japão) e outras 10 cepas provenientes de outros países. Os autores verificaram que a diversidade genética para os genes *gyrB* e *rpoD* foram dependentes da região geográfica dos isolados, com isolados de regiões mais distantes geograficamente exibindo maiores distâncias genéticas. Tanto os resultados obtidos por Lopes et al. (2001) quanto os resultados obtidos por Tsushima et al. (2006) corroboram com os resultados obtidos neste estudo, no qual o isolado coletados nas Ilhas Maurício (IBSBF 1374) manteve-se como um grupo distinto, separado dos isolados brasileiros. Esses resultados merecem atenção especial no intercâmbio de germoplasma entre países, fator que dificulta a entrada de novas variantes do patógeno.

Rott et al. (2010) afirmaram que a introdução ou o desenvolvimento de novas cepas de *X. albilineans* pode ser o motivo da quebra de resistência varietal para Escaldadura das folhas, ressaltando com isso a importância do conhecimento da diversidade genética desse patógeno. Em 1996, surtos de Escaldadura ocorreram pela

primeira vez na Guatemala, Louisiana, México e Texas, porém ocorreram surtos em locais onde a doença já era endêmica como Florida e Ilhas Maurício, o que levou a Davis et al. (1997) afirmarem a possibilidade da ocorrência de novas variantes do patógeno, decorrentes, tanto de mutação de cepas já estabelecidas, como pela introdução de cepas exóticas.

De acordo com Schaad et al. (2001), a variação genética de *X. albilineans* pode estar associada com os fatores que governam a disseminação do patógeno de uma planta para outra na natureza, bem como as condições ambientais e o intercâmbio de material genético no plasmídeo. A propagação aparente de *X. albilineans* por meios aéreos, ao contrário da difusão usual por meios mecânicos, foi encontrada, sugerindo que as diferenças na transmissibilidade podem também serem associadas com a variação intraespecífica (1997).

No presente trabalho, os isolados também diferiram quanto a patogenicidade, tendo sido possível identificar isolados de agressividade média, intermediária e alta, sendo que alguns deles, com graus variados de patogenicidade, mostraram-se indênticos pelos marcadores SSRs utilizados. Diferenças em patogenicidade também foram verificadas por Champoiseau et al. (2006b) que concluíram que a patogenicidade de *X. albilineans*, baseada na capacidade de colonizar canas-de-açúcar ou causar sintomas, varia de acordo com a cepa do patógeno. Esses resultados são corroborados também pelos resultados obtidos por Champoiseau et al. (2006a), que por meio de experimentos em casa de vegetação realizando inoculações de isolados de *X. albilineans* em canas-de-açúcar suscetível e posterior avaliação dos sintomas da doença, caracterizaram ampla variação na patogenicidade de 75 isolados de *X. albilineans* provenientes de Guadalupe – México, confirmando a existência de diferentes patótipos de *X. albilineans* nessa localidade geográfica.

No presente trabalho, um alelo, de 160pb, correspondente ao loco IACXa03 foi amplificado exclusivamente em oito isolados, sendo que sete deles (Xa6, Xa8, Xa16, Xa18, Xa19, Xa24 e Xa25) estão entre os 18 isolados mais agressivos identificados. Esse loco, representa um marcador funcional, que codifica a síntese de peptídeos não ribossomais (*non ribosomal peptide synthetase* - NRPS), os quais são metabolitos

secundários como antibióticos, imunossupressores e toxinas produzidos por muitas bactérias e fungos (MARAHIEL et al., 1997). Tem sido proposto que a produção dessas toxinas por bactérias patogênicas está associada com sua virulência (BENDER & RANGASWAMY, 1999; GUENZI et al., 1998). Em *X. albilineans*, sabe-se que dois genes NRPS (albIV e albIX) estão envolvidos na biossíntese de albicidina, a qual atua como bactericida contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e provavelmente garante à *Xanthomonas albilineans* vantagens na competição contra outras bactérias no mesmo local de invasão (BIRCH & PATIL, 1985).

Field & Willis, (1998), verificaram que marcadores SSRs funcionais estão envolvidos com a regulação dos fatores de virulência, enquanto que, segundo Bayliss et al., (2004) estes marcadores são responsáveis por controlar a expressão a nível populacional de determinantes de superfície, resultando em variações de fase. A variação de fase é uma estratégia pela qual a bactéria facilita a seleção do nicho e evita os mecanismos de resposta inum do hospedeiro, causando mudanças no fenótipo. Dessa forma, patógenos bacterianos exploram hipermutações localizadas, através do escorregamento da DNA polimerase de sequências simples repetidas (SSRs) para gerar variação no fenótipo e aumentar sua adaptabilidade. Esses SSRs estão localizados em fases de leitura ou em regiões promotoras de uma série de genes, frequentemente denominados de locos de contingência, cujas funções estão usualmente envolvidas em interações diretas com estruturas do hospedeiro (MOXON et al., 2006; SARAUBH et al., 2011). Segundo Moxon et al. (2006), as bactérias possuem dois principais e complementares mecanismos de adaptação para alterações no seu ambiente: alteração na expressão gênica (alteração no fenótipo sem alteração do fenótipo), ou alteração do genótipo. Apesar de haver claras vantagens para um organismo possuir uma adaptação programada de adaptação do fenótipo por meio da regulação gênica, há várias desvantagens com relação a esta estratégia, visto que o repertório de respostas programadas é limitado. Contrariamente a percepção do ambiente, as mutações geram diversidade em populações pelas quais os indivíduos variantes são selecionados. Por esse motivo, as mutações são os principais

determinantes do número de variantes dentro de uma população de bactéria e portanto, da probabilidade de que pelo menos uma célula bacteriana poderá prevalecer.

A hipermutação localizada em locos SSRs de contingência ocorre em genes bacterianos que interagem direta ou indiretamente com as moléculas do ambiente hospedeiro. Portanto, embora a mudança genotípica dos locos de contingência seja estocástica (não se pode prever quando ocorrerá a mudança ou em qual bactéria particular em que a mutação vai ocorrer), a variação fenotípica resultante não é aleatória na medida em que apenas um subconjunto de genes é hipermutável (MOXON et al, 2006).

Gur-Arie et al., 2000 avaliaram a abundância, distribuição e polimorfismo SSR no genoma de *E.coli*, e também verificaram que os SSRs estão diferentemente distribuídos entre regiões codificantes e não codificantes. Também verificaram que os SSRs mostraram-se polimórficos entre os diferentes isolados de *E. coli* estudados, apresentando-se como importantes marcadores para rápida detecção de polimorfismo entre locos, como também para aplicações práticas como detecção de isolados, identificação de locos controlando fenótipos chaves.

Diante do exposto, este trabalho abre possibilidades para novos estudos visando aprofundar os conhecimentos sobre este importante patógeno da cana-de-açúcar.

IV. CONCLUSÕES

- Há variabilidade genética e patogênica entre isolados de *X. albilineans* provenientes de diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil;
- A variabilidade encontrada não foi restrita a uma região específica;
- Isolados idênticos molecularmente para o marcador utilizado diferiram em agressividade.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, A. M.; SCHENCK, S.; BENEDICT, A. A. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, p. 358-366, 1996.

ARRUDA, S. ; AMARAL, Y. J. Leaf scald of sugar cane in Brasil. **Phytopathology**, Saint Paul , v.35, p. 135-137, 1945.

AUTREY, L. J. C.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN, A.; MEDAN, H. Studies on variation in the leaf scald pathogen *Xanthomonas albilineans*. **Proceedings of International Society Sugarcane Technologists**, Cali, v.21, p.485-497, 1995.

BAUDIN, P.; CHATENET, M. Détermination d'une souche de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson isolée de Haute-Volta. **Agronomie Tropicale**, Paris, v. 35, p. 288-291, 1980.

BAYLISS, C. D.; SWEETMAN, W. A.; MOXON, E. R. Mutations in *Haemophilus influenzae* mismatch repair genes increase rates of dinucleotide repeat tracts but not dinucleotide repeat-driven pilus phase variation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, n.10, p.2928–2935, 2004.

BENDER, C. L., RANGASWAMY, V. Polyketide production by plant-associated pseudomonads. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.37, p.175–196, 1999.

BIRCH, R. G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2(1), p. 1-11, 2001.

BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Antibiotic and process for the production thereof. **United States Patent** , Washington, 1985a.

BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 30, p. 207-214, 1987.

BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 131, p. 1069-1075, 1985.

BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 1368-1374, 1983.

CAO, H.; BALDINI, R. L.; RAHME, L. G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 259-284, 2001.

CASAGRANDE, M. V. ;SANGUINO, A.; FERREZINI, E. In: **VII Seminário de Tecnologia Agrícola**, Piracicaba, p. 183-190. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças da cana-de-açúcar. Centro de Tecnologia Copersucar, 1997.

CHAMPOISEAU, P.; DAUGROIS, J. H.; GIRARD, M.; ROYER, M.; ROTT, P. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 33-45, 2006b.

CHAMPOISEAU, P.; DAUGROIS, J. H.; PIERETTI, I.; COCIANCICH, S.; ROYER, M.; ROTT, P. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 1081-1091, 2006a.

COLETTA-FILHO, H. D., TAKITA, M. A., DE SOUZA, A. A., AGUILAR-VILDOSO, C. I., MACHADO, M. A. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4091-4095, 2001.

COMSTOCK, J. C.; SHINE, J. M. Outbreak of leaf scald of sugarcane, caused by *Xanthomonas albilineans*, in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul , v. 76, p. 426, 1992.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

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

DABBAS, K. M.; FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M.; GIACHETTO, P. F.; MORAES, V. A.; FERRO, J. A. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaldadura das folhas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.4, p.328-338, 2006.

DAVIS, M. J. et al. Worldwide genetic variations in the sugarcane leaf scald disease pathogen, *Xanthomonas albilineans*. **Sugar y Azucar**, Engliword, v. 89, p. 34, 1994.

DAVIS, M. J. Increased incidence of leaf scald disease in Florida associated with a genetic variant of *Xanthomonas albilineans*. **Sugar y Azucar**, Engliword, v. 87, n.6, p. 34, 1992.

DAVIS, M. J.; ROTT, P. ; DEAN, J.L. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.1, p.78-82, 1994.

DAVIS, M. J.; ROTT, P.; WARMUTH, C. J.; CHANTENET, M.; BAUDIN, P. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 3, p. 316-324, 1997.

DOW, J. M.; FENG, J. X.; BARBER, C. E.; TANG, J. L.; DANIELS, M. J. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the rpf gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, Cambridge, v. 146, p. 885-891, 2000.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTTE, F.; BARRE`S, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44 , n.10, p. 933–949, 2007.

EFRON, B. The bootstrap, the jackknife, and the other resampling plans. **Society of Indiana Applied Mathematics**, Philadelphia, 1981.

EMBRAPA, 2008. A energia que vem da cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20energia%20que%20vem%20da%20cana%20de%20acucar%20ultimo.pdf/view>>. Acesso em: 18 mar. 2010.

FIELD D.; WILLS, C. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. **Proceedings National Academy Sciences**. Washington, v. 95, p. 1647–1652, 1998.

GENIN, S.; BOUCHER, C. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 107-134, 2004.

GOLDSTEIN, D.; CLARK, A. Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n.19, 3882– 3886, 1995.

GRISHAM, M. P.; LEGENDRE, B. L.; COMSTOCK, J. C. First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Louisiana. **Plant Disease**, Saint Paul , v. 77, p. 537, 1993.

GROISMAN, E.A; CASADESUS. The origin and evolution of human pathogens. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 56, n.1, p.1–7, 2005.

GUENZI, E., GALLI, G., GRGURINA, I., GROSS, D.C., GRANDI, G. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 48, p. 32857–32863, 1998.

HASHIMI, S. M. et al. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 51, n.1, p. 181-187, 2007.

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

HUANG, G.; ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. **Gene**, Amsterdam,v. 258, p. 193-199, 2000.

HUERTA-LARA, M.; ROJAS-MARTINEZ, R. I.; BAUTISTA-CALEES, J.; REYES-LOPEZ, D.; BECERRIL-HERRERA, M.; ROMERO-ARENAS, O.; FRANCO-MORA, D.; JIMENEZ-GARCIA, D.; ARAGON-GARCIA, A.; SIMON-BAEZ, A.; GUILLEN-SANCHEZ,

D. Genetic and pathogenic diversity of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, in Mexico. Research **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.4, n.3 , p. 312-319, 2009.

IREY, M. S.; COMSTOCK, J. C. Use of enzyme-linked immunosorbente assay to detect the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in sugarcane. **Journal American Society Sugarcane Tecnology**. v.11, p.48-52, 1991.

IREY, M. S.; COMSTOCK, J. C. Use of enzyme-linked immunosorbente assay to detect the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in sugarcane. **Journal American Society Sugarcane Tecnology**. V.11, p.48-52, 1991.

IRVINE, J. Y. J. AMADOR. First report of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* of sugarcane in México. **Plant Disease**, Saint Paul , v. 77, p. 846, 1993

JAUFEERALLY-FAKIM, Y. et al. Genetic polymorphism in *Xanthomonas albilineans* strains originating from 11 geographical locations, revealed by two DNA probes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n.4, p. 287-293, 2000.

JEFFREYS, A. J., V. WILSON, S. L. THEIN, D. J. WEATHERALL, B. A. J. PONDER. DNA fingerprints and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.39, n.1, p.11–24, 1986.

JEFFREYS, A. J.; WILSON ,V.; THEIN, S. L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. **Nature**, London, v. 314, p. 67–73, 1985.

JOSHI, S.P.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, Bangalore, v.77, p. 230-340, 1999.

KLETT, P. ; ROTT, P. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. **Journal of phytopathology** , Berlin, v.142, n.3, p.283-291, 1994.

LE FLÈCHE, P. ; FABRE, M.; DENOEUDE, F.; KOECK, J. L.; VERGNAUD, G. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. **BMC Microbiology**, London, v. 2, n.37, 2002.

LEOVILLE, F.; COLENO, A. Detection de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agent de léchaudure de la canne à sucre dans des boutures contaminées. **Annuary Phytopathology**, Palo Alto, v.8, p.233-236, 1976.

LINDSTEDT, B. A.; HEIR, E.; GJERNES, E.; KAPPERUD, G. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n.4, p. 1469–1479, 2003.

LIU, Y.; LEE, M. A.; OOI, E. E.; MAVIS, Y.; TAN, A. L.; QUEK, H.H. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable-number tandem repeats. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n. 9, p. 94388 – 94394, 2003.

LOPES, S. A.; DAMANN, K. E.; GRELEN, L. B. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on rep-PCR fingerprints. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 155-159, 2001..

LOWS, F. J.; FULBRINGHT, D.W; STEPHENS, C.T.; J. L. W.; DE BRUIJN. Specific genomics fingerprints of phythopatogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.70, p.2286 – 2295, 1994.

LOWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MARAHIEL, M. A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D.; Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chemical Reviews*, Washington, v. 97, n. 7, p. 2651-2674, 1997.

MARTIN, J. P.; ROBINSON P. E. Leaf scald. in: **Sugarcane Diseases of the World**. Martin, J. P.; Abbott, E. V.; Hughes, C. G. Eds. Elsevier Publishing Co., Amsterdam. p. 79-107, 1961.

MOXON, E.R.; RAINEY, P.B.; NOWAK, M.A.; LENSKE, R.E. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. **Current Biology**, London, v.4, n.1, p. 24–33, 1994.

MOXON, R.; BAYLISS, C.; HOOD, D. Bacterial Contingency Loci: The Role of Simple Sequence DNA Repeats in Bacterial Adaptation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 307-333. 2006.

MRÁZEK, J., GUO, X., SHAH, A. Simple sequence repeats in prokaryotic genome. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, v. 104, n.20, p. 8472-8477, 2007.

NAKAMURA, Y., M. CARLSON, K. KRAPCHO, M. KANAMORI, AND R. WHITE. New approach for isolation of VNTR markers. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.43, n.6, p.854–859, 1988.

NAKAMURA, Y., M. LEPPERT, P. O'CONNELL, R. WOLFF, T. HOLM, M. CULVER, C. MARTIN, E. FUJIMOTO, M. HOFF, E. KUMLIN, AND R. WHITE. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, New York, v. 235, n. 4796, p. 1616–1622, 1987.

ORDOSGOITTI, A., A. MANZANO Y A. APONTE. La Escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 27, n.2, p. 235-252, 1977

PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M.; LEGENDRE, B. L.; WEI, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 218-222, 1999.

PAN,Y.B.; GRISHAM,M.P.; BURNER,D.M. A polymerase chain reaction protocol for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p. 189-194, 1997.

PARIDA, S.K.; KALIA, S.K.; SUNITA, K.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T.R.; SRIVASTAVA, P.S.; SINGH, N.K.; MOHAPATRA,T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.118, n.2, p.327-338, 2006.

PERSLEY, G. J. Pathogenic variation in *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, the causal agent of leaf-scald disease of sugar cane. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 26, p. 781-786, 1973.

PIERETTI, I.; ROYER, M.; BARBE, V.; CARRERE, S.; KOEBNIK, R.; COCIANCICH, S.; COULOUX, A.; DARRASSE, A.; GOUZY, J.; JACQUES, M. A.; LAUBER, E.; MANCEAU, C.; MANGENOT, S.; POUSSIER, S.; SEGURENS, B.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; ARLAT, M.; ROTT, P. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 616-630, 2009.

RENIER, A.;VIVIEN, E.; COCIANCICH, S.; LETOURMY, P.; PERRIER, X.; ROTT, P.; ROYER, M.Substrate specificity-conferring regions of the nonribosomal peptide synthetase adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly conserved within the species *Xanthomonas albilineans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5523-5530, 2007.

RICAUD, C.; PAULO, M. Leaf scald. **Rep. Maurit. Sug. Ind. Res. Inst.** p. 87-92, 1971.

RICAUD, C.; RYAN, C. C. Leaf scald. In: **Diseases of Sugarcane**. Ricaud, C.; Ryan, B. T.; Gillaspie, A. G.; Hughes, C. G. Eds Elsevier Publishing Co., Amsterdam. p.39-58, 1989.

ROCHA, E.P. An appraisal of the potential for illegitimate recombination in bacteria genomes and its consequences: from duplications to genome reduction. **Genome Research**, New York, v.13, p. 1123–1132, 2003.

ROTT, P.; COSTET, L.; DAVIS, M. J.; FRUTOS, R.; GABRIEL, D. W. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 4590- 4596, 1996.

ROTT, P.; DAVIS, M. J.; BAUDIN, P. Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p. 344-349, 1994.

ROTT, P.; DAVIS, M.J. Leaf Scald. In: **A Guide to Sugarcane Disease**. ROTT, P.; BAILEY, R. A.; COMSTOCK, J. C.; CROFT, B. J.; SAUMTALLY, A. S. Eds: La Librairie du Cirad, Montpellier, France, p. 38-44, 2000.

ROTT, P.; MARGUERETTAZ, M.; COCIANCICH, S.; GIRARD, J. C.; PIERETTI, I.; GABRIEL, D. W.; ROYER, M. Unravelling pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald. **Proceeding International Society Sugarcane Technologists**, v. 27, p.1-11, 2010.

ROTT, P.; MOHAMED, I.S.; KLETT, P.; SOUPA, D.; de SAINT-ALBIN, A.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, p.1202-1213, 1997.

ROYER, M.; VIVIEN, E.; BER, M.; COUSIN, A.; DAMAIS, A.; PIERETTI, I.; SAVIN, A.; MEGESSIER, S.; VIARD, M.; FRUTOS, R.; GABRIEL, D. W.; ROTT, P. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 414-427, 2004.

SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. The proteobacteria. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Springer, 2005. second edition, v. 2.

SAURABH, B.; SNEHA, S.; SUVIDYA, R.; PRAMOD, K.; SHAILESH, B. Analysis of distribution and significance of simple sequence repeats in enteric bacteria *Shigella dysenteriae*. **Bioinformation**, Singapore, v. 6, n. 9, p. 348-351, 2011.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **3rd Edn. APS Press**. Saint Paul, p. 373, 2001.

SHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W. L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M. D.; LUSTER, D. G.. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 305-324, 2003.

SHAIK, R.; PILLAY, D.; PILLAY, B. Amplified fragment length polymorphisms reveal genetic differentiation among strains of *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Microbiological Methods**, Durban, v. 76, p. 43-51, 2009.

SILVA, M. S; BEDENDO, I. P; CASAGRANDE, M. V. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p.341-347, 2007.

SIMPSON, A. J. G. ; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J. M.; BRIONES, M.R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANÇA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME,

M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI, A. Jr.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; de OLIVEIRA, M. C.; de OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA, H. A. Jr.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; de M ROSA A. J.; de ROSA VE Jr.; de SÁ R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; da SILVA, A. C.; da SILVA, A. M.; da SILVA, F. R.; da SILVA, W. A. Jr.; da SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; de SOUZA, A. A.; de SOUZA, A. P.; TERENCEZ, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, p. 151-157, 2000.

TAYLOR, P. W. J.; RYAN, C. C.; BIRCH, R. G. Harvester transmission of leaf scald and ratoon stunting disease. **Sugar Cane**, High Wycombe, v. 4, p. 11-14, 1998.

TIVANG, J. G.; NIENHUIS J.; SMITH O. S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 259-264, 1994.

TOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSUSHIMA, S.; SHINOHARA, H.; NAKAZATO, T.; ANDO, S.; SUGISAWA, T.; TABEL, Y. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas albilineans* strains from Okinawa, Japan, through a comparison of the *gyrB* and *rpoD* genes in geographically distinct strains. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 683-687, 2006.

UNICA. Disponível em:
<<http://www.unica.com.br/content/default.asp?cchCode={C2B8C535-736F-406B-BEB2-5D12B834EF59}>>. Acesso em: 18 mar. 2010.

VALADEZ, E.; KAHL, G. DNA marking in plant genomes. In: **Mundi Prensa**, C. V. (Ed.). Mexico, D. F., p. 147, 2000.

van BELKUM, A., SCHERER, S., van ALPHEN, L., VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeat in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.2, p. 275-293, 1998.

VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; MENCK, C. F.; Da SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P.; SIMPSON, A. J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 169-189, 2002.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genetic microsatellite markers in plants: feature and applications. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v.23, p. 48-55, 2005.

VIVIEN, E.; MEGESSIER, S.; COCIANCICH, S.; FRUTOS, R.; GABRIEL, D. W.; ROTT, P.; ROYER, M. *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 81-89, 2005.

WANG, Z. K. ; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of

Xanthomonas albilineans, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, p. 245–252, 1999

WILBRINK, G. De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding. **Archief voor de Suikerindustrie Nederslndsch-Indie**, v. 28, p. 1399-1525, 1920.

YAZDANKHAH, S. P.; LINDSTEDT, B. A.; CAUGANT, D. A. Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Neisseria meningitides*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v.43, n.4, p. 1699-1705, 2005.

YAZDANKHAH,S.P., LINDSTEDT, B.A., CAUGANT,D.A. Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton, v. 43, n.4, p.1699-1705, 2005.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Genetic engineering of sugarcane for leaf scald phytotoxin and disease resistance. **In ISSCT XXII Congress**, Cartagena, Columbia. Ed. Cock J. H. and Brekelbaum T, p. 497-502, 1995.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 448-454, 1996.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R. G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 1021-1024, 1999.