



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Estrutura de população e caracterização filogenética de
isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado
de pernambuco**

Edilaine Alves de Melo

Recife-PE

2016

EDILAINÉ ALVES DE MELO

**ESTRUTURA DE POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE
ISOLADOS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* DO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza

Co-orientadora: Rosa de Lima Ramos Mariano
Kátia Cilene da Silva Felix

**RECIFE-PE
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M528e Melo, Edilaine Alves de
Estrutura de população e caracterização filogenética de
isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de
Pernambuco / Edilaine Alves de Melo. – 2016.
82 f. : il.

Orientadora: Elineide Barbosa de Souza.

Coorientadoras: Rosa de Lima Ramos Mariano, Kátia Cilene
da Silva Félix.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, BR-PE, 2016.

Inclui referências.

1. Podridão negra 2. Genotipagem 3. MLSA 4. Relações
filogenéticas I. Souza, Elineide Barbosa de, orient. II. Mariano,
Rosa de Lima Ramos, coorient. III. Félix, Kátia Cilene da Silva,
coorient. IV. Título

CDD 632

**ESTRUTURA DE POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE
ISOLADOS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* DO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

EDILAINE ALVES DE MELO

Tese Defendida e Aprovada pela Banca Examinadora em: 27/07/2016

ORIENTADORA:

Prof^a Dra. Elineide Barbosa de Souza

EXAMINADORES:

Prof^a Dra. Kátia Cilene da Silva Felix

Prof^a Dra. Luiza Suely Semen Martins

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff

**RECIFE-PE
2016**

A Deus, por ter concedido todo amor, paciência e fé.

Aos meus pais, Edimucio e Aparecida pelo amor, apoio e incentivo, permitindo que eu seguisse em frente sem desistir jamais.

DEDICO

Ao meu esposo, Marciel, pelo amor e paciência durante todo o tempo, me apoiando em todas os momentos.

Aos meus irmãos Elizangila e Erivaldo por todo apoio e amizade na minha vida.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor, força e principalmente pela paciência concedida, permitindo que eu chegasse até aqui.

As minhas queridas orientadoras Prof^a. Dra. Elineide Barbosa de Souza, Prof^a. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano e Dra. Kátia Cilene da Silva Felix, pela oportunidade, orientação, amizade, apoio e ensinamentos tão valiosos.

Ao Professor Dr. Marco Aurélio Siqueira da Gama, pelos ensinamentos e amizade.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, Edimucio e Aparecida, pelo amor, incentivo e confiança durante toda a minha vida.

Ao meu esposo, Marciel, por todo amor, carinho, paciência e incentivo em todos os momentos compartilhados.

Aos meus irmãos, Erivaldo e Elizangila pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos de dificuldades.

As minhas amigas Greecy, Jéssica, Liliana, Meridiana, Mirtis, Myrzânia e Walquíria, pela ajuda, sincera amizade e por estar sempre ao meu lado, compartilhando cada momento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelas contribuições necessárias à minha formação.

Aos meus companheiros do Laboratório de Fitobacteriologia: Tássia, Luciana, Adriano, Nelson, Willams, Claudeana, Alessandra, Leandro Velez, Leandro Victor, Ana Dulce, Carla, Pedro Henrique, Joelma e Elias pela amizade, pela colaboração e por transformar o trabalho diário em momentos tão agradáveis.

Ao Sr. Luiz Coelho, por suas contribuições valiosas em todos os momentos trabalhosos da casa de vegetação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO.....	VI
RESUMO GERAL	VIII
GENERAL ABSTRACT.....	IX
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
ESTRUTURA DE POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> DO ESTADO DE PERNAMBUCO	2
INTRODUÇÃO GERAL	2
1. Importância das brássicas.....	2
2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> e Podridão negra.....	4
3. Identificação e diversidade genética de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	7
4. Estrutura genética de população	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO II.....	20
Estrutura genética de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> no estado de Pernambuco	20
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Material e Métodos.....	25
Obtenção dos isolados.....	25
Extração de DNA	25
Identificação molecular dos isolados.....	26
Genotipagem com BOX-PCR	26

Resultados	28
Obtenção e identificação dos isolados	28
Genotipagem com BOX-PCR	28
Discussão	30
Agradecimentos	35
Referências	35
CAPÍTULO III	56
Caracterização filogenética por análise de sequência multilocus de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> do estado de Pernambuco, Brasil.....	56
Resumo	57
Abstract	58
Introdução	58
Material e Métodos.....	61
Obtenção de isolados e extração de DNA	61
PCR e Sequenciamento	62
Filogenia Multilocus	62
Resultados	63
Discussão	65
Agradecimentos	68
Referências	68
CONCLUSÕES GERAIS	81

RESUMO GERAL

A podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, tem causado grandes perdas aos cultivos de brássicas no estado de Pernambuco, Brasil. Portanto, é de extrema importância obter conhecimentos sobre a diversidade genética e estrutura de população do patógeno que forneçam dados relevantes para direcionar as estratégias de controle da podridão negra em brássicas, principalmente o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes ao patógeno. O presente estudo teve como objetivos: a) analisar a estrutura genética de populações de 159 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco, utilizando perfis genômicos de BOX-PCR; b) inferir relações filogenéticas entre isolados de *X. campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco e outros patovares da espécie (*aberrans*, *armoraciae*, *raphani*, *barbareae* e *incanae*) através de seis genes housekeeping (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *rpoD*, *tpiA* e *fyuA*) utilizando a técnica MLSA. Os 159 isolados de brássicas (brócolis, couve-comum, couve-flor e repolho) foram obtidos dos principais municípios produtores no estado de Pernambuco. A genotipagem através de BOX-PCR revelou uma alta variabilidade de *X. campestris* pv. *campestris*. Análises de populações revelaram uma alta riqueza de haplótipos e diversidade genética dessa bactéria. Foi possível observar a migração desses haplótipos entre municípios. Houve forte indício de acasalamento aleatório e, conseqüentemente, alta capacidade recombinogênica dessa espécie. Não foi possível observar a estrutura das populações para municípios ou hospedeiros. Também não existiu diferenciação genética entre as populações e a análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que grande parte da variação ocorreu dentro das subpopulações. As análises MLSA demonstraram uma alta diversidade para os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* revelando dois grupos desse patovar, o estreito relacionamento do mesmo com o patovar *aberrans*, e a distinção do patovar *campestris* dos patovares *raphani*, *barbareae* e *incanae*.

Palavras-chave: podridão negra, genotipagem, MLSA, relações filogenéticas

GENERAL ABSTRACT

The black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) has caused great losses on brassica crops in the state of Pernambuco, Brazil. The knowledge of genetic diversity of this pathogen, population structure and pathogenic variability in the producing areas are very important because it will support disease control strategies, mainly the development and use of resistant cultivars. The objectives of the present study were: a) to analyze the genetic structure of populations of 159 isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from the state of Pernambuco, through genomic profiles of BOX-PCR; b) to infer phylogenetic relationship among these isolates and other *X. campestris* pathovars (*aberrans*, *armoraciae*, *raphani*, *barbareae* e *incanae*) using the MLSA technique with six housekeep genes (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *rpoD*, *tpiA* e *fyuA*). The 159 isolates of brassica (broccoli, cabbage-leaf, cauliflower and cabbage) were obtained from the main producing cities of Pernambuco. Through the genotyping of BOX-PCR showed a high variability of *X. campestris* pv. *campestris*. Population analysis revealed a high richness of haplotypes and genetic diversity of this bacteria. It was possible to observe the migration of these haplotypes between cities. There were strong indications of random mating and therefore high recombinogenic capacity in this species. It was not observed the structure of populations related to cities or hosts. Also have not existed genetic differentiation among populations and the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most of the variation was within subpopulations. The MLSA analysis demonstrated a high diversity in *X. campestris* pv. *campestris* isolates revealing two groups in this patovar, its close relationship with patovar *aberrans*, and its distinction from pathovars *raphani*, *barbareae* and *incanae*.

Keywords: black rot, genotyping, MLSA, phylogenetic relationships

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

ESTRUTURA DE POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DO ESTADO DE PERNAMBUCO

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância das brássicas

A família Brassicaceae compreende cerca de 3.500 espécies em 350 gêneros, constituindo a família de maior riqueza de espécies oleráceas (WARWICK et al., 2000). Nessa família botânica se destacam espécies de grande valor econômico, social e nutricional, como brócolis (*Brassica oleraceae* L. var. *italica* Plenk.), couve-flor (*Brassica oleraceae* L. var. *botrytis* L.), couve-comum (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) e repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.) (FILGUEIRA, 2008).

As brassicáceas são espécies cosmopolitas, presentes nas regiões do Mediterrâneo, sudoeste da Ásia, Ásia Central e costa Ocidental da América do Norte, América do Sul, estando entre as principais hortaliças cultivadas no mundo, considerando a área, volume de produção e consumo (ALMEIDA, 2006). De modo geral, são cultivadas tanto por pequenos quanto por médios produtores (MAROUELLI; ABDALLA; MADEIRA, 2009).

Segundo a FAO, a produção mundial de brássicas em 2013 foi de aproximadamente 71,434 bilhões de toneladas (FAO, 2014). Em 2015, a produção brasileira de hortaliças, incluindo brássicas, foi de 19,62 milhões, para uma área de 656,730 mil hectares no Brasil (SANTOS et al., 2015). O estado de Pernambuco é um dos principais produtores de brássicas, com a produção concentrada nos municípios de Camocim de São Félix, Gravatá, Brejo da Madre de Deus, São Joaquim do Monte, Chã Grande, Caruaru, Garanhuns, Vitória de Santo Antão, João Alfredo e Bom Jardim (CEASA, 2012).

O brócolis é uma hortaliça cultivada pela sua inflorescência desenvolvida (cor verde-escuro ou verde-acinzentado), constituída por pequenos botões florais imaturos, os quais devem estar túrgidos e fechados, sendo este o principal critério de qualidade. É uma cultura de estação fresca tolerante à geada. Essa hortaliça se destaca por ser uma das mais ricas em proteínas, fibras, sódio e vitamina A e C (ALMEIDA, 2006).

A couve-flor é uma hortaliça cultivada por agricultores familiares, em pequenas áreas. É uma cultura bastante lucrativa e exigente em mão-de-obra, principalmente na fase de

colheita. Essa espécie pode ser produzida o ano todo, dependendo da região de cultivo, em razão do surgimento de cultivares adaptadas aos meses mais quentes do ano. Uma inflorescência imatura inserida sobre um caule curto compõe a parte comestível, podendo ter diversas colorações, desde a cor branca até roxa. A couve-flor possui 93% de água, sais minerais e vitaminas importantes, é uma boa fonte de potássio e possui poucas calorias e muita fibra (MAY et al., 2007).

Couve-comum é bastante semelhante à sua ancestral couve silvestre. Apresenta caule ereto, que dá suporte a planta e emite novas folhas continuamente, distribuindo-se as folhas em forma de roseta, ao redor do caule. Há também emissão de numerosos rebentos laterais, utilizados na propagação. As folhas apresentam limbo bem desenvolvido, arredondado, com pecíolo longo e nervuras bem destacadas. Possuem diversas características, desde folhas verde-claras a folhas verde-escuras com nervuras roxas. Devido ao alto teor de clorofila e carotenóides, são ricas em pró-vitamina A e em cálcio de elevada disponibilidade. É uma cultura bastante comum em horta familiar. Apresenta certa tolerância ao calor, podendo o plantio se estender ao longo do ano em várias regiões (ALMEIDA, 2006; FILGUEIRA, 2008).

O repolho está entre as variedades botânicas da espécie de maior importância econômica mundialmente, sendo, no Brasil, a brassicácea mais consumida. É uma planta herbácea com folhas arredondadas e cerosas, com superposição das folhas centrais, formando uma “cabeça” compacta. Possui um caule curto, direto, sem ramificações. Em alguns Estados, a produção de repolho apresenta dificuldades devido a períodos chuvosos e quentes, aos quais as cultivares utilizadas atualmente não mostram adaptação perfeita (BRACKMANN et al., 2003; FILGUEIRA, 2008). Dentre as hortaliças, o repolho constitui-se em alimento de excelente qualidade, do ponto de vista nutricional, sendo fonte de vitaminas C, B1 e B2 e sais minerais, com destaque para cálcio e fósforo facilmente assimiláveis pelo organismo (LUZ; OLIVEIRA, 1997).

Em geral, as brássicas são altamente suscetíveis a diversos fitopatógenos. No Brasil e no mundo essas culturas são afetadas por doenças causadas pela espécie *Xanthomonas campestris*, que ocasionam grandes prejuízos. *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson e *X. campestris* pv. *aberrans* (Knösel) Dye causam podridão negra, *X. campestris* pv. *raphani* (White) Dye, *X. campestris* pv. *armoraciae* (McCulloch) Dye e *X. campestris* pv. *barbareae* (Burkholder) Dye causam mancha foliar e *X. campestris* pv. *incanae* (Kendrick & Baker) Dye causa crestamento bacteriano em plantas ornamentais (FARGIER; MANCEAU, 2007). Dentre estas doenças, a podridão negra causada por *X. campestris* pv. *campestris* é

responsável por grandes perdas em várias espécies de brássicas incluindo repolho, couve ou couve-manteiga, brócolis, couve-comum, couve-flor e couve-de-bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera* L.), entre outras (FILGUEIRA, 2008).

2. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e Podridão negra

Xanthomonas campestris pv. *campestris* é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonete e apenas um flagelo para mobilidade. As colônias da maioria das espécies do gênero *Xanthomonas* são mucóides, convexas e capazes de produzir um polissacarídeo extracelular chamado de goma de xantana (SCHAAD et al., 2001). Cresce em meios de cultura de rotina como ágar nutritivo e ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose, apresentando colônias amareladas com diâmetro de 1 a 2mm em até 4h. A coloração amarela é devido à produção do pigmento xantomonadina. É aeróbica e não utiliza asparagina como fonte de carbono e nitrogênio. Não apresenta crescimento em 0,1% de cloreto detrifeniltetrazólio e 2-5% de NaCl. Hidroliza o amido e liquefaz moderadamente a gelatina (MARIANO et al., 2001). Essa bactéria é ativa em uma ampla faixa de temperatura (5-36°C), sendo a temperatura ideal de aproximadamente 28°C (CARRIJO; RÊGO, 2000).

A podridão negra é uma doença bastante destrutiva afetando brássicas em todo o mundo e é considerada um fator limitante à produção devido às lesões nas folhas, que reduzem o seu valor comercial (LEMA et al., 2012). Foi descrita pela primeira vez por Garman (1894) nos Estados Unidos, e desde então tem sido identificada em brássicas em todos os continentes (VICENTE; HOLUB, 2013). É capaz de reduzir a produtividade a nível mundial, registrando perdas de até 60% na produtividade (DZHALILOV; TIWARI, 1995). Em geral, é mais severa em regiões de climas quentes e úmidos, condições facilmente encontradas em regiões tropicais e subtropicais (VICENTE; HOLUB 2013).

No Brasil, sua distribuição é generalizada, sendo amplamente encontrada em todas as regiões produtoras, pelo fato da bactéria ser transmitida por sementes e mudas (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA-JR., 1995). Em Pernambuco, no município de Camocim de São Félix, foi encontrada uma incidência de 77,60% para podridão negra em repolho (AZEVEDO et al., 2002) e prevalência da doença no estado foi de 88,9% em cultivos de couve-flor (PERUCH et al., 2006). Essa bactéria é considerada cosmopolita e tem sido observada em todos os países, nas mais variadas condições, durante todos os períodos de cultivo. Normalmente a maior intensidade de doença ocorre em regiões onde predomina clima

quente e úmido, pois temperaturas e umidades elevadas, no ar e no solo, favorecem a doença (CARRIJO; RÊGO, 2000; FILGUEIRA, 2008).

Praticamente todas as brássicas cultivadas são hospedeiras dessa bactéria, como brócolis, couve-de-bruxelas, couve-comum, couve-flor, couve-rábano (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L.), nabo (*Brassica rapa* var. *rapa*), rabanete (*Raphanus sativus* L.), repolho e outras brássicas silvestres, como mastruço (*Lepidium virginicum*) e rabanete-de-cavalo (*Raphanus raphanistrum*) (CARRIJO; RÊGO, 2000). É mais importante em couve e repolho, pois as folhas que são a parte comercial são também as partes mais afetadas pela doença (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

A bactéria penetra através de aberturas naturais da folha, principalmente pelos hidatódios, e por ferimentos, multiplica-se intensamente nos espaços intercelulares e atinge o sistema vascular, sendo levada a todos os órgãos da planta (MARINGONI, 2005).

Os sintomas da podridão negra manifestam-se em qualquer idade da planta. Nas sementeiras, é observada murcha e queima de uma ou de ambas as folhas cotiledonares, geralmente iniciando-se nas margens, progredindo para o interior das mesmas, que se tornam secas e caem. Nas folhas, a lesão apresenta a forma de "V" com o vértice voltado para o centro do limbo. Com o progresso da doença, a lesão avança para a nervura principal e torna-se marrom-clara, e a folha seca. No repolho, a cabeça pode apresentar-se coberta por lesões necróticas. O patógeno torna-se sistêmico invadindo as nervuras secundárias e a nervura principal da folha, que enegrecem progressivamente, enquanto a bactéria atinge o caule e a raiz (MARINGONI, 2005). O escurecimento dos tecidos vasculares da origem ao nome comum da doença "podridão negra" (BILA et al., 2012).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* pode ser transmitida por sementes, interna ou externamente, sendo importante fonte primária de infecção, principalmente onde a bactéria ainda é ausente (CARRIJO; RÊGO, 2000). Galli et al. (2001) avaliaram a eficácia do método de inoculação de sementes de couve-flor e observaram que o período de contato direto de 48 horas das sementes com o patógeno é suficiente para haver infecção de 100% das sementes e as mesmas são capazes de perder sua capacidade germinativa. Pode sobreviver no solo, embora por curto período, em restos de cultura ou em brássicas silvestres e cultivadas (CARRIJO; RÊGO, 2000). Sobrevive em restos culturais incorporados no solo por até dois anos, entretanto, não é capaz de sobreviver mais do que seis meses na superfície do solo, podendo servir como fonte de inóculo secundário (BILA et al., 2012).

Em condições de campo, a disseminação da bactéria é feita principalmente por água de irrigação e chuvas, podendo ser feita por meio de ferramentas, equipamentos, trabalhadores,

transplante e insetos. Danos mecânicos provocados por insetos, tratos culturais, granizo ou geadas favorecem a penetração da bactéria na planta (CARRIJO; RÊGO, 2000).

Atualmente não existe um método de controle eficiente da podridão negra, assim a melhor forma de controle da doença é a prevenção, uma vez que instalada no campo o controle se torna difícil por se tratar de uma doença sistêmica (GHAZALIBIGLAR, 2014). A utilização de sementes saudáveis para controle da podridão negra é imprescindível. Nos EUA por exemplo, a infecção máxima tolerável em sementes de brócolis é de 0,01%. No tratamento de sementes, a imersão de sementes de repolho e de couve-de-bruxelas em água a 50°C durante 25min, e de sementes de brócolis na mesma temperatura, durante 20min, é indicada. No Brasil, alguns estudos têm demonstrado eficácia para erradicação de *X. campestris* pv. *campestris* em sementes de repolho a partir do tratamento com água a 50°C, por 30min, originando menos de 2% de plantas doentes, ao contrário da testemunha, a qual originou 70% de plantas com sintomas de podridão negra (MARINGONI, 2005). Também se recomenda a utilização de sementes tratadas em solução de antibióticos e pulverizações com cúpricos (FILGUEIRA, 2008).

Essa doença tem sido parcialmente controlada em algumas culturas pela utilização de cultivares resistentes. Seabra-Júnior et al. (2008) através de dois diferentes tipos de inoculações da bactéria em plantas de brócolis, verificaram a resistência dos híbridos Marathon, Legacy e Green Power à podridão negra.

Outras práticas devem ser adotadas para controle da podridão negra como: destruir restos de cultura após a última colheita, não iniciar o cultivo próximo a lavouras antigas, realizar o plantio em condições de cultivo protegido, adotar sistema de irrigação que não promova o molhamento foliar (HALFELD-VIEIRA; NECHET; ARAÚJO, 2010) além de não fazer plantios seguidos com brássicas na mesma área (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997) e utilização de cultivares precoces (CARRIJO; RÊGO, 2000). Neste contexto, também é importante a identificação de hospedeiros alternativos para bactéria em condições de campo. O controle de plantas daninhas é de suma importância, já que a presença da população epifítica é uma das principais fontes de inóculo nas condições desfavoráveis de ambiente, mesmo na presença do hospedeiro (MARCUIZZO, 2009).

Há ainda que considerar a influência dos nutrientes quanto a suscetibilidade à doenças. Seabra-Júnior et al. (2013) investigaram a influência da adubação com nitrogênio e com potássio na severidade da podridão negra em brócolis e verificaram que as maiores doses de potássio aplicadas reduziram a severidade da doença, porém a ausência ou o excesso de nitrogênio aumentaram a severidade da doença. Consideram para uma adubação equilibrada

que as doses de 283 kg ha⁻¹ de N e 550 kg ha⁻¹ de K₂O são as mais indicadas tanto para obter maior produtividade e tamanho de inflorescência, quanto maior resistência à podridão negra.

O uso de extratos, tinturas e/ou óleos essenciais de plantas medicinais é considerado como alternativa no controle de fitopatógenos em geral (STANGARLIN et al., 1999). Trabalhos tem indicado o potencial da tintura de guaco para o controle preventivo da podridão negra em couve-flor. A tintura etanólica foi capaz de promover redução da doença em folhas tratadas com 100 e 500 mg L⁻¹ de tintura, bem como inibir o crescimento bacteriano *in vitro*, a partir da concentração de 250 mg L⁻¹ (VIGO-SCHULTZ et al. 2006).

Diante do uso abusivo de agroquímicos e frente a novas perspectivas da agricultura com o cuidado ambiental, o controle biológico, embora ainda não utilizado em campo, também tem demonstrado grande potencial para o controle desta doença. Monteiro et al. (2002) demonstraram a atividade antagônica *in vitro* de *Bacillus* spp. contra diversos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. Dos oito isolados de *Bacillus* estudados, quatro produziram substâncias capazes de inibir o crescimento de *X. campestris* pv. *campestris*: *B. subtilis* R14, isolado de repolho; *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, isolado de rabanete; *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, ambos isolados de couve, no sendo os isolados R14 e RAB7 os mais eficientes.

É necessário conhecer a diversidade e estrutura da população do patógeno presente nas áreas de plantio, a qual deve ser levada em consideração na busca de estratégias para o controle de doenças.

3. Identificação e diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

De acordo com a classificação taxonômica, *X. campestris* está agrupada no Domínio Bactéria, Filo Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales, Família Xanthomonadacea e Gênero *Xanthomonas* (EUZÉBY, 1997). Entretanto, essa classificação taxonômica está associada apenas com a caracterização fenotípica, o que pode dificultar a distinção dos diversos patovares pertencentes a esse grupo taxonômico. A definição de patovar refere-se à capacidade de uma bactéria, ou grupo de bactérias de ser patogênica para um determinado gênero de plantas ou espécie (VICENTE et al., 2001). Estudos mostraram que apesar da uniformidade fenotípica, há uma diversidade fitopatogênica no gênero *Xanthomonas* (VAUTERIN et al., 2000).

O gênero *Xanthomonas* tem sofrido algumas modificações ao longo dos anos, no qual tem se sugerido a reclassificação de espécies e patovares. Na nova reclassificação apenas os

patovares que infectam brássicas (pvs. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*) foram mantidos como pertencentes à espécie *X. campestris* (VAUTERIN et al., 1995). Além de distinções quanto à patogenicidade e gama de hospedeiros, várias espécies e patovares de *Xanthomonas* também têm sido diferenciados em raças. Nove raças de *X. campestris* pv. *campestris* já foram descritas com base em sua interação diferencial com cultivares de brássicas (VICENTE et al., 2001).

Para facilitar a detecção e a identificação de patógenos, muitas vezes, faz-se necessário combinar dois ou mais métodos. Cultivo em meio semi-seletivo, testes fisiológicos, perfil de utilização de substratos e primers específicos têm sido utilizados na identificação de *X. campestris* pv. *campestris* (LEU et al., 2010; SILVA, 2006). Várias técnicas moleculares têm sido empregadas para identificar a espécie *X. campestris* e seus patovares. Leu et al. (2010) utilizaram os primers específicos Xcc 2f/2r e Xcr 14f/14r para detecção e identificação dos patovares *campestris* e *raphani*, onde fragmentos de 200 pb e 277 pb foram amplificados, respectivamente. Técnicas como rep-PCR (iniciadores REP, ERIC e BOX) têm demonstrado potencial para diferenciar isolados a nível espécie, patovar e intrapatovar de *X. campestris* (RADEMAKER et al., 2005; VICENTE et al., 2006). Para confirmar a identificação do patovar, o método mais confiável ainda é a inoculação de mudas de brássicas suscetíveis (ROBERTS; KOENRAADT, 2006).

Estudo sobre diversidade genética de isolados indianos de *X. campestris* pv. *campestris* foi realizado utilizando primers de rep-PCR, o qual indicaram uma alta variabilidade entre os isolados, que foram agrupados em 56 diferentes tipos de clusters com um coeficiente de similaridade de 75%. Não foi observada nenhuma relação clara entre as raças, hospedeiros ou origem geográfica (SINGH; RATHAUR; VICENTE, 2016). Análise de fingerprinting de DNA pela técnica de AFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados) foi utilizada em estudo de diversidade de *X. campestris* pv. *campestris* de brássicas selvagens, revelando a presença de sete grupos distintos na população do patógeno em áreas cultivadas e não cultivadas de brássicas na região litorânea e central da Califórnia, constatado que os isolados de plantas daninhas das áreas não cultivadas eram geneticamente distintos da população de isolados das áreas produtoras, incluindo áreas de produção de sementes e áreas circunvizinhas (IGNATOV et al., 2007).

Análise de AFLP (IGNATOV et al., 2007) e análise de sequências multilocus (MLSA) de genes *housekeeping* como *rpoB* (subunidade β - RNA polimerase) e *hrp* (reação de hipersensibilidade), *atpD* (regulação da ATP sintase F₀-F₁ da subunidade beta), *efP* (fator de alongação P), *dnaK* (proteína de choque térmico 70, chaperonina), *glnA* (glutamina

sintetase I), *gyrB* (DNA girase subunidade B), *rpoD* (RNA polimerase sigma- fator 70), *tpiA* (triosefosfatoisomerase), *fyuA* (receptor tonB-dependente), também têm sido utilizadas para inferir diferenças entre populações de *Xanthomonas* (DAHLLÖF et al., 2000; SINGH et al., 2016; FARGIER et al., 2011;).

MLSA é uma técnica poderosa na tipagem molecular para se inferir relações filogenéticas nos níveis intra e interespecíficos de uma grande variedade de bactérias fitopatogênicas. É uma análise que se baseia na utilização de sete loci, sendo considerada como o padrão para a diferenciação entre isolados e identificação de linhagens clonais (MAIDEN, 2006). Nas análises de genes *housekeeping* é amplamente utilizada a técnica MLSA, pois estes são genes codificadores de funções metabólicas essenciais e são compartilhados por todos os membros das espécies (GEVERS et al., 2005). Em estudos de análise de sequência multilocus de 42 isolados pertencentes a seis patovares de *X. campestris* (*aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*) revelaram polimorfismo nos oito loci analisados (*atpD*, *dnaK*, *efP*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* e *tipA*), mostrando uma alta diversidade genética. Todos os isolados que induzem a podridão negra (pvs. *aberrans* e *campestris*) foram geneticamente próximos, mas divididos em dois grupos. Segundo os autores, esta alta diversidade genética está relacionada com deriva igualmente de recombinação e mutação de ponto de acumulação (FARGIER et al., 2011).

Lange et al. (2016) estudaram a diversidade de populações de *X. campestris* a partir de oito genes concatenados (*atpD*, *dnaK*, *efP*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* e *tipA*), utilizando MLSA, com 154 isolados oriundos do estado de New York de diferentes brássicas. Os isolados foram obtidos a partir de sementes, transplantio e campo, sendo 131 do patovar *campestris* e 23 do patovar *raphani*, confirmando uma alta diversidade genotípica para esses patovares, representada por 64 haplótipos.

Existem vários genes *housekeeping*, e a grande maioria tem sido utilizado em trabalhos que determinam a filogenia de bactérias fitopatogênicas, entre eles podemos citar: *gyrB*, *rpoD*, *atpD*, *glnA*, *fyuA* e *tipA*. O gene *gyrB* tem sido bastante utilizado em trabalhos que determinam a estrutura filogenética, diversidade (PARKINSON et al., 2009) e em análises MLSA (FARGIER et al., 2011; LANGE et al., 2016). O gene *gyrB* é responsável por codificar a proteína β da DNA girase, uma topoisomerase tipo II de DNA, que é essencial na replicação do DNA e é encontrada entre espécies bacterianas (PAITAN et al., 1998). Kasai et al. (2000) demonstraram que esse gene é muito utilizado nas análises filogenéticas em nível de espécie.

O gene *rpoD* é o gene que codifica o fator sigma $\alpha 70$, responsável pela transcrição de vários outros genes (SHIOZAWA; UEGUCHI; MIZUNO, 1996). Sequências do gene *rpoD* de isolados de *Pseudomonas* que tinham um alto conteúdo filogenético e a uma alta resolução taxonômica mostraram uma filogenia bem relacionada com a do gene 16S RNAr (GHYSELINCK et al., 2013). O gene *atpD* codifica a subunidade- β da ATP sintetase e tem sido utilizado em análises filogenéticas para várias bactérias fitopatogências (PRUVOST et al., 2010; YOUNG; PARK, 2007). Resultados obtidos a partir do gene *atpD* revelaram que várias espécies de *Xanthomonas*, previamente agrupadas em conjunto, podem ser separadas, proporcionando um método alternativo para a distinção das espécies de *Xanthomonas*, contribuindo para um melhor entendimento das relações filogenéticas. No entanto, este gene não é suficiente para diferenciar todas as espécies de *Xanthomonas*. A análise dos dados combinados é uma ferramenta útil para avaliar as relações genéticas de espécies de *Xanthomonas* (SIMÕES et al., 2007).

Para bactérias, o gene *glnA* codifica glutamina sintetase, uma enzima universalmente distribuída, responsável pela assimilação de amônia e síntese de glutamina (COHEN-KUPIEC; MARX; LEIGH 1999). A estrutura do gene *glnA* é precedida por um sequência de leitura aberta (ORF) que codifica um aminoácido e mostra similaridade para diversas proteínas regulatórias (SEBALD, 1992). Outro gene importante é *fyuA*, responsável por codificar o sistema de produção de sideróforos (JACOBI et al., 2001). E por último, o gene *tipA*, que codifica para a autoregulação da proteína chamada Tipa. Esta proteína responde as alterações de temperatura através da mudança de um monômero inativo para uma proteína dimérica ativa. Todos esses genes são bastante utilizados em trabalhos de análise multilocus do gênero *Xanthomonas* (FARGIER et al, 2011; LANGE et al., 2016; YOUNG et al., 2008). Variações naturais, acopladas à identificação de polimorfismos no DNA, podem ser exploradas para a identificação de genes que controlem o caráter que está sendo estudado. A diversidade natural entre ecótipos, no que tange à diferença de resposta a patógenos, também já começa a ser explorada para a identificação dos loci envolvidos (DENBY et al., 2004).

4. Estrutura genética de população

Existe um grande número de ferramentas moleculares (marcadores genéticos), como rep-PCR, Sequências Simples Repetitivas (SSR) e sequências de nucleotídeos que fornecem aos fitopatologistas a possibilidade de avaliar a estrutura populacional de patógenos, principalmente de bactérias fitopatogências (FRANCISCO, 2014; LEHNER, 2011;

SANTIAGO et al., 2014). É possível determinar a quantidade de variação genética entre indivíduos da mesma população, a forma como esta variação é dividida no tempo e no espaço e as relações genéticas entre os indivíduos dentro e entre linhagens; demonstrar se a fonte de inóculo encontra-se a curtas e longas distâncias, detectar o movimento ou a dinâmica das populações de diferentes genótipos e, em alguns casos, descrever a origem de um fitopatógeno (MILGROOM, 1997; SCORTICHINI, 2005).

A estrutura genética compreende a quantidade e distribuição da variação genética nos indivíduos, entre os indivíduos e entre populações, determinada pela história evolutiva dessa população, que é consequência da interação entre as cinco forças evolutivas: mutação, migração, seleção, deriva e recombinação. Assim, o conhecimento dá uma visão sobre os processos evolutivos que moldaram uma população no passado e oferece conhecimento sobre o futuro evolutivo potencial de populações. O conhecimento da evolução potencial de patógenos pode ser útil para aprimorar o uso de genes de resistência, fungicidas e antibióticos e minimizar as perdas que resultam na redução de eficácia destes métodos de controle (MCDONALD; LINDE, 2002). A evolução refere-se a mudanças no alelo ou frequências genotípicas em populações em escalas de tempo relativamente curtas (MILGROOM, 2015).

Há dois tipos de diversidade genética que contribuem para a estrutura genética, denominadas diversidade genotípica e gênica. A diversidade genotípica refere-se ao número e a frequência dos genótipos ou indivíduos geneticamente distintos em uma população, enquanto que a diversidade gênica infere sobre o número e frequência de alelos em locos individuais numa população (MCDONALD; LINDE, 2002). Alguns estudos sobre estrutura genética de bactérias fitopatogênicas já têm sido realizados, entre elas *Xylela fastidiosa*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *Ralstonia solanacearum* (ADHIKARI et al., 1995; FRANCISCO, 2014; OGUNJOBI; FAGADE; DIXON, 2006; SANTIAGO, 2014;).

No estudo de diversidade, para determinar a estrutura genética da população, pode ser realizada análise dos dados obtidos de rep-PCR, para gerar os valores de diversidade gênica (H), diversidade genética total (H_T), diversidade genética intrapopulacional (H_S), diferenciação genética interpopulacional (G_{ST}) (NEI, 1973, 1978) e número de migrantes (N_m). Com os índices de Hill (1973): N_1 e N_2 a análise de diversidade genotípica pode diferir em riqueza, igualdade e diversidade N_1 refere-se ao número de genótipos comuns de forma uniforme que podem produzir a mesma diversidade H (H= índice de Shannon (1948). N_2 corresponde ao índice de diversidade genotípica de acordo com Stoddart e Taylor (1988): $G = 1/\sum p_i^2$. N_1 e G medem a eficiência da distribuição das concentrações populacionais entre os diferentes genótipos. N_1 geralmente fica entre o número de genótipos observados (g_{obs}) e o

valor de G. A riqueza genotípica que demonstra o número de patótipos esperados na amostra é estimada através de análise de rarefação baseada no tamanho da amostra da menor população, as análises de rarefação são utilizadas quando o tamanho das população são desiguais (GRÜNWALD et al., 2003; HURLBERT, 1971; MILGROM, 2015). O índice de equitabilidade, que mede como os genótipos estão distribuídos na amostra (E_5), é calculado com a fórmula $E_5 = (G - 1)/(N1 - 1)$ (ALATALO, 1981; GRÜNWALD et al., 2003; LUDWIG; REYNOLDS, 1988).

O conhecimento sobre a diversidade dos fitopatógenos tem aplicação direta na agricultura e na compreensão sobre a biologia patógeno-hospedeiro. Em patossistemas agrícolas, a composição genética e a diversidade de populações de patógenos afeta diretamente o manejo de doenças (MILGROOM, 2015).

As dificuldades no controle da podridão negra das crucíferas muitas vezes ocorrem devido ao desconhecimento da variabilidade de *X. campestris* pv. *campestris*. Os estudos das características fenotípicas e genotípicas deste patógeno contribuirão para o melhor entendimento sobre sua diversidade, subsidiando assim a adoção de novas tecnologias adequadas para controle da podridão negra em cultivos de brássicas.

Portanto, esse estudo tem por objetivos, analisar a estrutura de populações de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* através de perfis genômicos de BOX-PCR e estabelecer o relacionamento filogenético de *X. campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco com outros patovares que infectam brássicas a partir da técnica MLSA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, T. B.; VERA CRUZ, C. M.; ZHANG, Q; NELSON, R. J.; SKINNER, D. Z.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Genetic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 966-971, 1995.

ALATALO, R. V. Problems in the measurement of evenness in Ecology. **Oikos**, Copenhagen, v. 37, n. 2, p. 199-204, 1981.

ALMEIDA, D. **Manual de culturas hortícolas**. 1. ed. Editorial Presença, 2006. 346 p.
BILA, J.; MONDJANA, A. M.; MORTENSEN, C. N.; LUND, O. S. **Podridão negra de repolho em Moçambique: estratégias para o manejo sustentável da doença**. Copenhaga, Dinamarca: DSHC, 2012. 9 p.

BRACKMANN, A.; TREVISAN, J. N.; MARTINS, G. A. K.; FREITAS, S. T.; MELLO, A. M. Etileno, 1-metilciclopropeno e qualidade de repolho cv. wakaba armazenado em ambiente refrigerado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 4, p. 403-405, 2003.

CARRIJO, I. V.; RÊGO, A. M. Doenças das brássicas. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. p. 335-371.

CEASA-PE, **Principais municípios fornecedores**. Ceasa-PE, Recife, Brasil, 2012. Disponível em: <http://www.ceasape.org.br/calendario_pdf/PRINCIPAIS_MUNICIPIOS_FORNECEDORES_2012.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2016.

COHEN-KUPIEC, R., MARX, C. J.; LEIGH, J. A. Function and regulation of *glnA* in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 81, n. 1, p. 256-261, 1999.

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. *RpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3376-3380, 2000.

DENBY, K. J.; KUMAR, P.; KLIEBENSTEIN, D. J. Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. **The plant journal**, Oxford v. 38, n. 3, p. 473-486, 2004.

DZHALILOV, F. S.; TIWARI, R. D. Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot. **Archive für Phytopathologie und Pflanzenschutz**, Berlin, v. 29, p.383-387, 1995.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. Gênero *Xanthomonas*, 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/xanthomonas.html>> Acesso em: 05 ago. 2016.

FAO. **FAOSTAT – Agricultural statistics database**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

FARGIER, E.; MANCEAU, C. A. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 56, n. 5, p. 805-818, 2007.

FARGIER, E.; SAUX, M. F.; MANCEAU, C. A. Multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 34, n. 2, p. 156-165, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 421 p.

FRANCISCO, C. S. **Estrutura de populações e inoculações recíprocas de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* com ocorrência em cultivos vizinhos de *Citrus sinensis* e *coffea arabica* sob condições do estado de São Paulo**. 2014, 115f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Botucatu, 2014.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; SADER, R.; CAMARGO, M. Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p.171-176, 2001.

GARMAN, H. A bacterial disease of cabbage. **Kentucky Agricultural Experiment Station**, v. 3, p. 43-46, 1894.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACHEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Review Microbiology**, London, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

GHAZALIBIGLAR, H. **Discovery of a *Paenibacillus* isolate for biocontrol of black rot in brassicas**. 2014, 164f. Tese (Doctor of Philosophy) - Lincoln University, New Zealand, 2014.

GHYSELINCK, J.; COOREVITS, A.; VAN LANDSCHOOT, A.; SAMYN, E.; HEYLEN, K.; DE VOS, P. An *rpoD* gene sequence based evaluation of cultured *Pseudomonas* diversity on different growth media. **Microbiology**, Bethesda, v. 159, n. 10, p. 2097-2108, 2013.

GRÜNWARD, N. J.; GOODWIN S. B.; MILGROOM, M. G.; FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p.738-746, 2003.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; ARAÚJO, S. L. F. **Principais doenças em cultivos de pequenas propriedades do entorno de Boa Vista**. Local: Embrapa Roraima, 2010. 31 p. (Documentos 36).

HILL, M. O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 427-432, 1973.

HURLBERT, S. H. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. **Ecology**, Washington, v. 52, n. 4. p. 577-586, 1971.

IGNATOV, A.; SECHLER, A.; SCHUENZEL, E. L.; AGARKOVA, I.; OLIVER, B.; VIDAVER, A. K.; SCHAAD, N. W. Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in central coastal California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 803-812, 2007.

JACOBI, C. A.; GREGOR, S.; RAKIN, A.; HEESEMANN, J. Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* in vitro and in vivo using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7772-82, 2001.

KASAI, H.; EZAKI, T.; HARAYAMA, S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 8, n.1, p. 301-8, 2000.

LANGE, H. W.; TANCOS, M. A.; CARLSON, M.O.; SMART, C.D. Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York state. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 106, n. 2, p. 113-122, 2016.

LEHNER, M. S. **Estrutura genética da população de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoais de Minas Gerais**. 2011, 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.

LEMA, M.; CARTEA, M. E.; SOTELO, T.; VELASCO, P., SOENGAS, P. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by Brassica spp. genotypes and rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, p. 159-169, 2012.

LEU, Y. S.; DENG, W. L.; YANG, W. S.; WU, Y. F.; CHENG, A. S.; HSU, S. T.; TZENG, K. C. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. **Plant Pathology Bulletin**, Taiwan, v. 19, n. 1, p. 137-147, 2010.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA – CNPH. 1997. 70 p.

LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. Diversity indices. In: LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer on methods and computing**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 85-103.

LUZ, F. J. F.; OLIVEIRA, J. M. F. **Orientações técnicas para o cultivo do repolho em Roraima**. Boa Vista: Embrapa-CPAFI Roraima, 1997. 12 p. (Circular Técnica, 3).

MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**. Palo Alto, v. 60, p. 561-588, 2006.

- MARCUZZO, L. L. Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*. **Ágora: Revista de Divulgação Científica**, Mafra, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2009.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Imprensa Universitária UFRPE, 2001. 368 p.
- MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 285-291.
- MARQUELLI, W. A.; ABDALLA, R. P.; MADEIRA, N. R. Irrigação de repolho em sistema de plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 112, p. 32-34, 2009.
- MAY, A.; TIVELLI, S. W.; VARGAS, P. F.; SANRA, A. G.; SACONNI, L. V.; PINHEIRO, M. Q. **A cultura da couve-flor**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 36p. (Boletim Técnico 200).
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 40, n. 1, p. 349-379, 2002.
- MEYER, D.; LAUBER, E.; ROBY, D.; ARLAT, M.; KROJ. T. Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. **Molecular of Plant Pathology**, Oxford, v. 6, n. 3, p.327-333, 2005.
- MILGROOM, M. G. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 79, n. 1, p. 1-13, 1997.
- MILGROOM, M. G. **Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and Evolution**. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 2015. 399p.
- MONTEIRO, L. **Produção de substâncias bioativas de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. 2002, 63f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n.12, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

OGUNJOBI, A. A.; FAGADE, O. E.; DIXON, A. G. O. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the South eastern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1868-1872, 2006.

PAITAN, Y.; BOULTON, N.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E.; ORR, E. Molecular analysis of the DNA *gyrB* gene from *Myxococcus xanthus*. **Microbiology**, Bethesda, v. 144, n. 6, p. 1641-1647, 1998.

PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 264-74, 2009.

PERUCH, L. A. M; MICHEREFF, S. J; ARAÚJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 464-469, 2006.

PRUVOST, O.; BOYER, C.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; JOUEN, E. First report of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* causing bacterial leaf blight of carrot in Mauritius. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 8, p. 1069, 2010.

RADEMAKER, J. L.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE BRUIJN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 9, p. 1098-111, 2005.

ROBERTS, S.J.; KOENRAADT, H. **Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp.** International Rules for Seed Testing: ISTA, Zurich, Switzerland. 2006. 20p.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 183, p. 56-59, 1995.

SANTIAGO, T. R. **A deep analysis of the genetic structure of *Ralstonia solanacearum* in Brazil reveals not much sex in the population.** 2014, 85f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SANTOS, C. E.; KIST, B. B.; CARVALHO, C.; REETZ, E. R.; MÜLLER, I.; BELING, R. R.; POLL, H. **Anuário brasileiro de hortaliças 2015.** Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 68p.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** Saint Paul: APS Press, 2001. p. 175-200.

SEABRA-JUNIOR, S.; PAIXÃO, G.S.; MARIGONI, A. C.; RUMY G.; CAMARA, R. C. Reação de híbridos de brócolis ‘tipo cabeça única’ à podridão negra. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.1, p.76-77, 2008.

SCORTICHINI, M. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 87, n. 1, p. 5-12, 2005.

SEBALD, M. **Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria**. New York: Springer-verlag, 1992. v. 2, 1803 p.

SHANNON, C. A mathematical theory of communication. **The Bell System Technical Journal**, New York, v. 27, p. 379-423, 1948.

SHIOZAWA, T.; UEGUCHI, C.; MIZUNO, T. The *rpoD* gene functions as a multicopy suppressor for mutations in the chaperones, *CbpA*, *DnaJ* and *DnaK*, in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 245-250, 1996.

SILVA, M. R. **Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Brasil**. 2006, 67f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SIMÕES, T. H.; GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B.; MEHTA, A. Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpfB* and *atpD* genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 271, p. 33-39, 2007.

SINGH, D.; DHAR, S.; YADAVA, D. K. Genetic and pathogenic variability of Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot disease in crucifers. **Current Microbiology**, New York, v. 63, p. 551-560, 2011.

SINGH, D.; RATHAUR, P. S.; VICENTE, J. G. Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. **Plant Pathology**, London, 2016. Disponível em: DOI: 10.1111/ppa.12508.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 6, n. 11, p. 16-21, 1999.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**, Madison, v. 118, p. 705-711, 1988.

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

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

VICENTE, J. G.; CONWAY, J.; ROBERTS, S. J.; TAYLOR, J. D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 7, p. 492-499, 2001.

VICENTE, J. G.; EVERETT, B.; ROBERTS, S. J. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 735-745, 2006.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VIGO-SCHULTZ, S. C.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PORTZ, R. L.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, 2006.

WARWICK, S. I.; FRANCIS, A.; FLECHE, J. L. A. **Guide to the wild germplasm of brassica and allied crops (tribe Brassiceae, Brassicaceae)** 2. ed. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, 2000.

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

YOUNG, J. M.; PARK, D. C. Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 7, n. 12, p. 2894-901, 2007.

CAPÍTULO II

Estrutura genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no estado de Pernambuco

1 **Estrutura genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no**
2 **estado de Pernambuco**

3
4 **Edilaine A. Melo¹ · Kátia C. S. Felix¹ · Adriano M. F. Silva¹ · Eduardo S. G.**

5 **Mizubuti² · Rosa L. R. Mariano¹ · Elineide B. Souza³**

6
7 **Resumo**

8
9 Um total de 159 isolados foram utilizados para analisar a estrutura genética de
10 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no estado de Pernambuco. Os isolados foram
11 coletados nos seis principais municípios produtores de brássicas em Pernambuco, dos
12 hospedeiros couve-comum, brócolis, repolho e couve-flor. Os isolados foram
13 genotipados com base no marcador BOX-PCR. Houve alta variabilidade de *X.*
14 *campestris* pv. *campestris*. Constatou-se alta riqueza de haplótipos e alta diversidade
15 genética. Há evidência de ocorrência de população panmítica e de fluxo gênico entre os
16 municípios produtores. Possivelmente, há alta capacidade recombinogênica na
17 população de *X. campestris* pv. *campestris* em Pernambuco. Não se observou

Elineide Barbosa de Souza

elineidebs@yahoo.com.br

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE.

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, CEP 36571-000, Viçosa-MG.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE.

18 estruturação genética em função de municípios ou hospedeiros. Maior percentual de
19 variação estimado pelas análises de variância molecular foi sempre atribuída a
20 diferenças dentro das subpopulações. Aparentemente, sementes das diferentes espécies
21 hospedeiras podem contribuir para a dispersão do patógeno, para distintos locais.
22 Estratégias de controle da podridão negra em brássicas deverão considerar a alta
23 variabilidade genética presente, sua ampla distribuição e a possibilidade da efetiva
24 movimentação de alelos entre os diferentes polos produtores.

25

26 **Palavras chaves** podridão negra · BOX-PCR · estudo de populações

27

28 **Abstract**

29

30 A total of 159 strains were used to analyze the genetic structure of *Xanthomonas*
31 *campestris* pv. *campestris* in the state of Pernambuco. The isolates were collected in six
32 major producing cities of brassicas in Pernambuco, with the hosts: cabbage leaf,
33 broccoli, cabbage and cauliflower. The isolates were genotyped based on BOX-PCR
34 marker. There were a high variability of *X. campestris* pv. *campestris*. It was found a
35 high richness of haplotypes and high genetic diversity. There were evidence of
36 occurrence of panmitic population and gene flow between the cities producers. Possibly,
37 there were a high gene recombination capacity in the population of *X. campestris* pv.
38 *campestris* in Pernambuco. There were no genetic structure among cities or host. Higher
39 percentage of variation, estimated by analysis of molecular variance, was always
40 attributed to differences among the subpopulations. Apparently, seeds of different host
41 species can contribute to the spread of the pathogen in different places. Black rot control
42 strategies in brassica should consider the high genetic variability, the wide distribution,

43 and the possibility of effective movement of alleles between the various producers
44 poles.

45

46 **Keywords:** black rot, BOX-PCR, study populations

47

48 **Introdução**

49

50 No Brasil, a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv.
51 *campestris* (Pammel) Dowson, é uma doença bastante destrutiva e afeta brássicas em
52 todas as regiões produtoras. No estado de Pernambuco, principalmente devido às
53 condições climáticas favoráveis, temperatura elevada e alta umidade relativa do ar, nas
54 áreas de cultivo, tem-se alta prevalência da doença. A podridão negra ocorre em 70 %
55 das áreas cultivadas com repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.), 73,7 % com couve-
56 comum (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC), 80 % com brócolis (*Brassica*
57 *oleraceae* L. var. *italica* Plenk.) e 88,9 % com couve-flor (*Brassica oleraceae* L. var.
58 *botrytis* L.) (Peruch et al. 2006). Outras brássicas também são infectadas por essa
59 bactéria como: couve-chinesa (*Brassica chinensis* L.) e couve de bruxelas (*Brassica*
60 *oleracea* L. var. *gemmifera* Zenk.) (Singh et al. 2016).

61 Muitas vezes o desenvolvimento e o uso de variedades resistentes são difíceis de
62 serem implementados devido à falta de conhecimento sobre a variabilidade do patógeno
63 e sua distribuição geográfica. O uso estratégico de cultivares resistentes depende de
64 informações fundamentais sobre as condições ambientais, características do hospedeiro
65 e variabilidade genética da população do patógeno, que estão sujeitas a alterações.
66 Portanto, o sucesso de programas de melhoramento exige o conhecimento da biologia
67 evolutiva do patógeno e dos mecanismos que influenciam a sua patogenicidade (Strange

68 2005). Além disso, esse conhecimento é de grande importância em programas de controle
69 de doenças.

70 Geralmente, a estrutura genética de população é definida pela quantidade e
71 distribuição da variação genética dentro e entre populações, e essa variação é
72 determinada pelo potencial de alteração dos organismos de uma população e pela
73 história evolutiva. O estudo da dinâmica populacional do agente patogênico é
74 importante para prever as respostas dessas populações às medidas de controle
75 adotadas (Freeman et al. 1997). Atualmente não há relatos sobre a estruturação genética
76 de populações de *X. campestris* pv. *campestris* infectando brássicas em Pernambuco e
77 no Brasil.

78 Análises de fingerprint de DNA através da técnica de BOX-PCR têm sido
79 bastante utilizadas para estudo de diversidade genética entre isolados de *X. campestris*
80 pv. *campestris* (Lange et al. 2016; Rathaur et al. 2015; Valverde et al. 2007) e de outras
81 bactérias fitopatogênicas como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
82 (Tavasoli et al. 2011) e *Acidovorax citrulli* (Melo et al. 2014). A técnica de rep-PCR
83 (iniciadores REP, ERIC e BOX) tem sido amplamente utilizada para avaliar a
84 diversidade genética e/ou estudar a filogenia e taxonomia de *Xanthomonas* (Jensen et al.
85 2010; Popović et al. 2013; Rademaker et al. 2005; Valverde et al. 2007; Vicente et al.
86 2006). Técnicas moleculares têm sido aplicadas com sucesso em estudos de diversidade,
87 identificação e caracterização de *X. campestris* pv. *campestris*.

88 Devido à importância do cultivo das brássicas no estado de Pernambuco e a alta
89 prevalência da podridão negra, estudos sobre a estrutura genética do patógeno devem
90 ser realizados para caracterizar os isolados pertencentes a essa região, gerando
91 informações que irão contribuir significativamente para a adoção de estratégias
92 adequadas de controle da doença. Diante disso o objetivo do presente estudo foi analisar

93 a estrutura de populações de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* através de perfis
94 genômicos de BOX-PCR para diferentes populações de município ou hospedeiro.

95 .

96 **Material e Métodos**

97

98 **Obtenção dos isolados**

99

100 Amstras de folhas de brássicas (brócolis, couve-comum, repolho e couve-flor)
101 com sintomas de podridão negra foram coletadas nos seis principais municípios
102 produtores no estado de Pernambuco, Brasil, localizados nas mesorregiões do Agreste
103 (Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá e Sairé) e Zona da Mata (Chã
104 Grande) (Fig. 1). O isolamento foi realizado em meio 523 (Kado e Heskett 1970) e o
105 teste de patogenicidade foi feito nos hospedeiros de origem com 45 dias de cultivo. As
106 suspensões bacterianas (10^8 UFC mL⁻¹) foram inoculadas nas plantas pela técnica de
107 atomização (Assis et al. 2016), nas três folhas mais novas de cada planta. O teste foi
108 conduzido com três repetições por isolado, sendo cada repetição constituída de uma
109 planta com três folhas inoculadas. O patógeno foi reisolado das lesões características de
110 podridão negra seis dias após a inoculação, completando os postulados de Koch's. Em
111 sequência, os isolados foram preservados pelo método da dessecação em fitas de papel
112 de filtro e em água destilada esterilizada (ADE) (Souza et al. 2016).

113

114 **Extração de DNA**

115

116 A extração de DNA de todos os isolados utilizados neste estudo foi realizada
117 utilizando o Kit Miniprep para extração de DNA genômico bacteriano (Axygen
118 Biosciences, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA

119 genômico foi realizada por comparação com o marcador High DNA Mass Ladder
120 (Invitrogen, Brasil) através da mistura contendo 4 µl de DNA concentrado, adicionado
121 de 2 µl do tampão 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences, Canadá) e 1,5 µl de
122 SYBER® Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies, Brasil). As amostras de DNA
123 foram submetidas a eletroforese (80 V) em gel de agarose a 1 % por 1,5 h. Em seguida,
124 o gel foi visualizado através de fotodocumentador (Analítica, Brasil) e depois as
125 amostras foram armazenadas a -20 ° C.

126

127 **Identificação molecular dos isolados**

128

129 Para identificação molecular foram utilizados os primers 2f (5'-
130 TGGGTTTTTCGCCTATCAAAC -3') /2r (5'- TGCAACTATTCCTAGCACCG-3'),
131 específicos para identificação de *X. campestris* pv. *campestris* (Leu et al. 2010).

132 As amostras foram amplificadas em um termociclador modelo PTC-100 (MJ
133 Research, Estados Unidos). As reações de PCR foram compostas por 12,5 µl de PCR
134 1X Master Mix, 0,25 µM de cada primer e 100 ng de DNA, para um volume final de 25
135 µl. As condições da PCR consistiram de 35 ciclos, com desnaturação inicial de 5 min
136 por 95 °C, cada ciclo com 30 seg por 95 °C, 30 seg por 60 °C e 30 seg por 72 °C, e
137 extensão final a 10 min por 72 °C. As amostras foram coradas com SYBR® Safe DNA
138 Gel Stain (10X) e 3 µl de cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose a
139 1,0 % por 1 h. O resultado foi visualizado em fotodocumentador. O marcador
140 GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Canadá) foi utilizado para
141 determinar o tamanho dos fragmentos amplificados (200 pb).

142

143 **Genotipagem com BOX-PCR**

144

145 As reações de BOX-PCR foram compostas por uma mistura contendo 25 µl de
146 1X PCR Master Mix, 2 µM de cada *primer* e 200 ng de DNA, para um volume final de
147 50 µl. Foi utilizado o Primer BOXAIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')
148 (Louws et al. 1994). As condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial
149 de 95 °C por 7 min; seguido por 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, 53 °C
150 por 1 min e 65 °C por 8 min, e uma extensão final a 65 °C por 15 min. De cada amostra,
151 10 µL foram corados com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (10X), submetidos a
152 eletroforese em gel de agarose a 1,5 % por 3 h e visualizados em fotodocumentador. Foi
153 construída uma matriz binária, onde cada banda visualizada foi marcada como presente
154 (1) ou ausente (0) para cada isolado.

155 A diversidade e estrutura genética da população para diferentes municípios e
156 hospedeiros foi inferida através de vários parâmetros que avaliaram a diversidade genética
157 natural: diversidade genotípica estimada pelo índice *G* de Stoddart e Taylor (1988), com
158 *bootstrap* de 1000 repetições; e também pelo índice de Shannon-Weaver (Shannon e
159 Weaver 1949); fração clonal estimada pela fórmula $(N-G)/G$, em que *N* é o tamanho da
160 amostra e *G* o número de genótipos (Zhan et al. 2002); riqueza genotípica $E(g_n)$
161 utilizando curvas de rarefação (Grunwald et al. 2003); equitabilidade genotípica (E_5), a
162 qual mede como os genótipos estão distribuídos na amostra (Alatalo 1981; Grunwald et
163 al. 2003; Ludwig e Reynolds 1988); número de haplótipos e índice de diversidade de
164 Simpson (Lambda) (He e Hu 2005). Além disso, foi construída uma rede de haplótipos.

165 Para analisar o desequilíbrio de ligação em todas as populações foram calculados
166 os índices de associação (I_A e r_d), que é menos sensível à variação do número de locos
167 (Agapow e Burt 2001).

168 Também foi realizada a análise de discriminação de componentes principais
169 (DAPC) (Jombart et al. 2010). Todas essas análises de populações foram executadas
170 pelo programa R versão 2.15.0 (R Development Core Team 2011). Além disso, foi

171 realizada a diferenciação genética entre populações avaliada pelo índice G^{”st} (Meirmans
172 e Hedrick 2011) analisada pelo software GenoDive.

173 Para estimar as diferenças entre e dentro de subpopulações foi realizada a análise
174 de variância molecular (AMOVA), utilizando o software Arlequin versão 3.5.2.2
175 (Excoffier et al. 2005).

176

177 **Resultados**

178

179 **Obtenção e identificação dos isolados**

180

181 Cento e cinquenta e nove isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram obtidos
182 a partir de amostras das quatro principais brássicas cultivadas em seis municípios do
183 estado de Pernambuco (Tabela 1), sendo 15 isolados de repolho, 12 de couve-flor, 36 de
184 brócolis e 96 de couve-comum. Esses isolados encontram-se depositados na Coleção de
185 Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal
186 Rural de Pernambuco.

187 No teste de patogenicidade, todos os isolados induziram os sintomas típicos de
188 podridão negra, com escurecimento das nervuras e clorose, as quais progrediram para
189 manchas em forma de “V” após 6 dias de inoculação.

190 A identidade dos isolados foi confirmada pela reação de PCR utilizando os
191 primers 2f/2r, que permitiu a amplificação de um fragmento específico para *X.*
192 *campestris* pv. *campestris* de aproximadamente 200 bp.

193

194 **Genotipagem com BOX-PCR**

195

196 Todos os 159 isolados produziram 16 bandas variando de 100 a 3000 pb. Um
197 total de 98 haplótipos foram derivados a partir do padrão de vários locos. A fração
198 clonal média foi de 26 %, com uma variação de 15 a 32 % para os municípios de Chã
199 Grande e Camocim de São Félix, respectivamente, enquanto para os hospedeiros a
200 fração clonal média foi de 23,8 %, com uma variação de 17 % para brócolis e repolho a
201 39 % para couve-comum. Altos níveis de diversidade genotípica foram detectados
202 quando as análises foram divididas por hospedeiro ou municípios. A maior diversidade
203 genotípica foi detectada nos municípios de Chã Grande (8,81) e Bom Jardim (8,65)
204 seguido dos municípios Camocim de São Félix (8,13), Bezerros (6,25), Sairé (6,16) e
205 Saloá (6,10), enquanto para hospedeiros foi maior em couve-comum (10,33) e brócolis
206 (9,95) (Tabela 2).

207 A diversidade gênica total para municípios foi 2,23 sendo os maiores valores
208 estimados também para os municípios Chã Grande ($H_e = 2,20$ % locos
209 polimórficos=100) e Bom Jardim ($H_e = 2,18$ % locos polimórficos=81,25). Para os
210 hospedeiros, a maior diversidade gênica foi encontrada para couve-comum ($H_e = 2,36$ %
211 locos polimórficos=93,75) e a menor para couve-flor ($H_e = 2,09$, % locos
212 polimórficos=56,25). Houve alta equitabilidade genotípica, variando de 0,88 para os
213 municípios Bezerros, Saloá e Sairé a 0,96 para os municípios de Chã Grande e Bom
214 Jardim, enquanto para hospedeiros foi de 0,87 a 0,96 para couve-flor e couve-comum,
215 respectivamente.

216 A riqueza genotípica estimada com curvas de rarefação com menor tamanho de
217 amostra $E(g_{10})$ variou de 7,38 até 9,34 para os municípios de Saloá e Chã Grande,
218 respectivamente. Enquanto para hospedeiros, a riqueza genotípica estimada pela
219 rarefação com menor tamanho de amostra $E(g_{12})$ foi menor em couve-flor (9,00) e
220 maior em couve-comum (10,96). O índice de diversidade genotípica de Simpson foi
221 menor para a população de Bezerros (0,84) e maior para os municípios de Chã Grande e

222 Bom Jardim (0,96). Para hospedeiros, o índice de Simpson variou de 0,86 a 0,97 para
223 couve-flor e couve-comum, respectivamente.

224 Pela rede de haplótipos foi possível observar que 15 haplótipos foram
225 encontrados em mais de um município, evidenciando a presença de fluxo gênico. A
226 maioria (75 haplótipos) ficou restrita a um único município (Fig. 3). Um total de 11
227 haplótipos compartilharam pelo menos dois hospedeiros distintos (Fig. 4). Foi
228 observada alta variabilidade, já que indivíduos do mesmo município e do mesmos
229 hospedeiros possuem uma grande distância genética.

230 Os índices de associação foram utilizados para estimar o desequilíbrio de
231 ligação. Em todas as populações os valores de I_A e r_d detectaram baixo nível de
232 desequilíbrio para populações entre municípios ($I_A=-0,13$ a $0,24$ e $r_d=-0,01$ a $0,03$) e
233 hospedeiros ($I_A=-0,12$ a $0,19$, $r_d=-0,009$ a $0,02$) (Tabela 3). Em todas as situações os
234 valores de I_A e r_d não diferiram significativamente de 0.

235 Na estrutura de população, inferida pela DAPC, representada nas Fig. 5 e 6 foi
236 observada a ausência de estruturação populacional, seja por município ou hospedeiro,
237 isto é, não há como relacionar qualquer grupo genético a partir das populações
238 estudadas. A diferenciação genética das populações foi testada de acordo com o índice
239 G''_{st} , cujos baixos valores entre as populações, indicaram ausência diferenciação entre
240 as mesmas (Tabela 4), seja, quando avaliadas por municípios ou hospedeiros. Pela
241 análise de variância molecular (AMOVA) a porcentagem de variação total dentro das
242 subpopulações para municípios foi 93,10%, enquanto para hospedeiros foi 94,38%
243 (Tabela 5).

244

245 **Discussão**

246

247 O presente estudo confirmou a presença de *X. campestris* pv. *campestris*
248 causando doença em brássicas nos principais municípios produtores do estado de
249 Pernambuco, destacando a importância da podridão negra. Constatado o problema
250 desta doença na região em estudo, torna-se relevante determinar a estrutura genética da
251 população deste patógeno.

252 No presente trabalho a análise da variabilidade genética entre 159 isolados de *X.*
253 *campestris* pv. *campestris* utilizando BOX-PCR revelou uma alta variabilidade entre
254 esses isolados. Este é o primeiro estudo que avalia a estrutura genética de populações de
255 *X. campestris* pv. *campestris* infectando brássicas no estado de Pernambuco. A
256 diversidade genética diz respeito às diferenças nos indivíduos, entre os indivíduos e
257 entre populações (Lewis-Rogers et al. 2004). Existem dois tipos de diversidade genética
258 que contribuem para estudos sobre estrutura genética: diversidade genotípica, a qual se
259 refere ao número e a frequência dos genótipos ou indivíduos geneticamente distintos na
260 mesma população e diversidade gênica, que infere sobre o número e frequência de
261 alelos em locos individuais numa população (McDonald e Linde 2002). No presente
262 estudo, a população de *X. campestris* pv. *campestris* apresentou alta variabilidade para
263 os seis municípios das mesorregiões do Agreste e Zona da Mata, evidenciada pela
264 grande diversidade genotípica (6,16 a 8,81) e gênica (1,90 a 2,10). Essa alta diversidade
265 pode ser devido a ampla ocorrência desta bactéria em várias regiões, além de sua alta
266 variabilidade patogênica (Singh et al. 2011). Azevedo et al. (2002) mostraram a grande
267 adaptabilidade da espécie *X. campestris* pv. *campestris* às diferentes condições
268 ambientais no estado de Pernambuco, o que pode influenciar a alta variabilidade deste
269 patógeno. A seleção de hospedeiros, associadas a diversas práticas culturais e fatores
270 ambientais (temperatura e precipitação), bem como a presença de hospedeiros
271 alternativos de bactérias podem influenciar e desempenhar um papel significativo na
272 estrutura de populações de patógenos (Scortichini 2005).

273 A presença de haplótipos que compartilham o mesmo município indica a
274 migração de isolados e conseqüentemente a ocorrência de fluxo gênico, facilitado pelo
275 tráfego de material vegetal, como por exemplo a utilização de sementes e mudas
276 infectadas distribuídas pela região, que é um dos principais modos de dispersão dessa
277 bactéria (Vicente e Holub 2013). O mesmo ocorreu em populações de *Xylella fastidiosa*
278 subsp. *pauca* que infectam cafeeiros em São Paulo, sendo a explicação para a migração
279 de haplótipos o fato de que as regiões compartilhem migrantes provenientes de um
280 reservatório de inóculo comum ou o fato de que mudas de café infectadas com a
281 bactéria foram obtidas na região Central e depois introduzidas na região Noroeste para o
282 estabelecimento de novos cultivos de café (Francisco 2014). Garcia et al. (2013)
283 relataram que a baixa a moderada diversidade de populações de *Ralstonia*
284 *solanacearum* no estado de Pernambuco foi relacionada ao fluxo gênico dentro dos
285 municípios estudados devido à disseminação da bactéria por mudas, rizosfera e até
286 mesmo máquinas agrícolas utilizadas nos municípios.

287 Considerando que o menor valor de índice de diversidade genotípica de Simpson
288 foi para a população de Bezerros e Sairé (0,84) e para hospedeiros o menor valor desse
289 índice foi de 0,86 em couve-flor, é possível estabelecer uma alta variabilidade para
290 essas populações, uma vez que o Índice de Simpson, também chamado índice de
291 dominância, mostra a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na mesma
292 população pertencerem ao mesmo haplótipo. Os valores desse índice variam de 0 a 1 e
293 quanto mais alto for, maior a variabilidade (Brower e Zar 1984).

294 Houve uma alta riqueza e uma baixa fração clonal nas populações tanto para
295 hospedeiros, quanto para municípios, uma vez que estas populações não sofreram
296 redução significativa de tamanho, causada por ausência de hospedeiro, clima, etc., já
297 que o cultivo de brássicas é realizado durante todo o ano no Agreste e Zona da Mata de
298 Pernambuco, mantendo altas populações do patógeno. Segundo McDonald e Linde.

299 (2002) populações de patógenos que se mantêm altas durante todo o ano são mais
300 diversificadas.

301 A baixa fração clonal (15 a 32 %) encontrada neste trabalho é o primeiro indício
302 de uma tendência para um equilíbrio de ligação dentro das populações, o que aponta
303 para a ausência de estrutura clonal para os seis municípios. Entretanto, o
304 estabelecimento do equilíbrio de ligação apoiado pelos resultados das análises dos
305 índices de associação e índice alternativo (I_A e r_d) sugerem a ocorrência de
306 acasalamento aleatório e por conseguinte recombinação nessas populações. O I_A deste
307 trabalho contradiz Fargier et al. (2011), os quais obtiveram $I_A=1,27$ a $2,43$ para
308 população de *X. campestris* indicando a existência de uma população de estrutura clonal
309 e conseqüentemente raros eventos de recombinação. No entanto, a importância da
310 recombinação foi demonstrada no mesmo trabalho por teste de homoplasia,
311 demonstrando estrutura clonal $H=0$. Em outro estudo foi levantada a hipótese da
312 ocorrência de eventos de recombinação genética entre populações de *X. campestris* pv.
313 *campestris*, uma vez que foi observada ausência de correlações significativas entre
314 sensibilidade a antibióticos e sulfato de cobre e atividade de esterase, indicando que as
315 características são determinadas por diferentes grupos de genes não associados, dessa
316 forma, a população seria espontaneamente recombinada (Santos et al. 2008). A causa da
317 variabilidade entre os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* analisados pode estar
318 associada à adaptação da bactéria às diferentes espécies de brássicas e/ou cultivares de
319 uma mesma espécie que são plantadas numa mesma área pelos agricultores das
320 mesoregiões do Agreste e Zonas da Mata de Pernambuco. A recombinação gênica
321 possui a capacidade de aumentar a diversidade genotípica em populações do patógeno e
322 gerar genótipos distintos, permitindo melhor adequação às mudanças climáticas, diferentes
323 cultivares e resistência a fungicidas (Milgroom 1996).

324 A análise de DAPC, método que permite identificar agrupamentos de indivíduos
325 geneticamente relacionados independente de modelos de genética de populações
326 (Jombart et al. 2010), não revelou nenhum tipo de estrutura de população por município
327 ou hospedeiro. No entanto, Lange et al. (2016) analisando a diversidade de isolados de
328 *X. campestris* no estado de Nova York utilizando genes *housekeeping*, verificaram a
329 formação de grupos consistentes com a filogenia, demonstrando estruturação da
330 população. Análises de DAPC possibilitam obter conhecimentos reais sobre a
331 representação do relacionamento entre grupos para as populações, uma vez que encontra
332 os principais componentes que melhor resumem as diferenças entre os grupos (Jombart
333 et al. 2010).

334 As análises baseadas no índice $G''st$, não mostraram diferenciação entre as
335 populações estudadas. Provavelmente o fluxo gênico e repetidas introduções de
336 sementes ou material propagativo contaminado nas diferentes regiões não permitiu
337 detectar a estruturação. Esse resultado corrobora com as análises de variância molecular
338 (AMOVA), a qual se estimou a porcentagem de variação total dentro e entre as
339 subpopulações, onde foi detectado que maior parte da variação ocorre dentro das
340 subpopulações, tanto para municípios quanto para hospedeiros. Análises de AMOVA
341 aplicadas a 71 locos de RAPD em *X axonopodis* pv. *passiflorae* isolada em quatro áreas
342 de maracujá-amarelo e uma de maracujá-doce, demonstraram que a maior parte da
343 variabilidade genética dos isolados estava dentro das subpopulações (89,4%), embora
344 existissem diferenças significativas entre as subpopulações (10,6%) (Nakatani et al.
345 2009). A variação dentro de subpopulações não é um fato isolado e tem sido observada
346 em vários fitopatógenos (Lima 2012; Salgueiro et al. 2004). A habilidade que os
347 indivíduos possuem em trocar alelos, frente ao fluxo gênico diminui as diferenças por
348 seleção e a deriva genética entre populações, reduzindo a diversidade genética entre
349 populações (Kageyama et al. 2003).

350 Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as populações de *X. campestris*
351 *pv. campestris* dos principais municípios produtores de brássicas de Pernambuco
352 possuem uma alta variabilidade genética é recombinogênica e não estruturadas. Os
353 dados obtidos são importantes para direcionar as estratégias de controle da podridão
354 negra em brássicas, principalmente o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes ao
355 patógeno. Faz-se necessário um estudo detalhado sobre a qualidade sanitária das
356 sementes de Brassicas comercializadas no estado.

357

358 **Agradecimentos**

359

360 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela
361 concessão da bolsa de estudo a Edilaine A. de Melo e auxílio a pesquisa (Proc. No.
362 23038.003635/2013-60, AUXPE 1585/2013), e ao Conselho Nacional de
363 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa
364 a Elineide B. Souza (Proc. No. 307348/2011-3) e Rosa L. R. Mariano (Proc. No.
365 309697/2011-5), e auxílio a pesquisa (Proc. nº 448020/2014-9)

366

367 **Referências**

368

- 369 Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular*
370 *Ecology Notes* 1:101-102.
- 371 Alatalo RV (1981) Problems in the measurement of evenness in Ecology. *Oikos* 37:199-
372 204.
- 373 Assis SMP, Mariano RLR, Albuquerque GMR (2016) Inoculação de bactérias
374 fitopatogênicas. In: Mariano RLR, Silveira EB (Eds) *Manual de Práticas em*
375 *Fitobacteriologia*. 3ed. Recife, Pernambuco. Edufrpe. pp. 37-49.

- 376 Azevedo SS, Michereff SJ, Mariano RLR (2002) Epidemiologia comparativa da
377 podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco.
378 Fitopatologia Brasileira 27:17-26.
- 379 Brower JE, Zar JH (1984) Field & laboratory methods for general ecology. 2 ed.
380 Dubuque, Iowa. Brown Publishers.
- 381 Excoffier L, Laval G, Schneider S, Arlequin (2005) (version 3.0): an integrated software
382 package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics
383 Online 1:47–50.
- 384 Fargier E, Saux MF, Manceau CA (2011) Multilocus sequence analysis of *Xanthomonas*
385 *campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this
386 species. Systematic and Applied Microbiology 34:2-156-165.
- 387 Ferreira AFTAF (2014) Diversidade genética e estrutura de população entre isolados de
388 *Corynespora cassiicola* no estado do amazona. PhD Thesis. Universidade Federal
389 do Amazonas, Manaus, AM.
- 390 Francisco CS (2014) Estrutura de populações e inoculações recíprocas de *Xylella*
391 *fastidiosa* subsp. *pauca* com ocorrência em cultivos vizinhos de *Citrus sinensis* e
392 *Coffea arabica* sob condições do estado de São Paulo. PhD Thesis, Faculdade de
393 Ciências Agrárias e Veterinárias, Botucatu, SP.
- 394 Freeman S, Redman RS, Grantham G, Rodriguez RJ (1997) Characterization of a linear
395 DNA plasmid from the filamentous fungal plant pathogen *Glomerella musae*
396 [Anamorph: *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx.]. Current Genetics
397 32:152-156.
- 398 Garcia AL, Lima WG, Souza EB, Michereff1 SJ, Mariano RLR (2013) Characterization
399 of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in bell pepper in the state of
400 Pernambuco, Brazil. Journal of Plant Pathology 95:2-237-245.

- 401 Grunwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE (2003) Analysis of genotypic
402 diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:6-738-746.
- 403 Hampl V, Pavlicek A, Flegr J (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA
404 fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree:
405 application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and*
406 *Evolutionary Microbiology* 51:731-735.
- 407 He F, Hu X (2005) Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the Simpson
408 diversity index. *Ecology Letters* 8:386-390.
- 409 Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal
410 components: a new method for the analysis of genetically structured populations.
411 *BMC Genetics* 11:94.
- 412 Kado CI, Heskett MG (1970) Seletive media for isolation of *Agrobacterium*,
413 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopatology*
414 60:969-976.
- 415 Kageyama PY, Sebbenn AM, Ribas LA, Gandara FB, Castellen M, Perecim M.B,
416 Vencovsky R (2003) Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de
417 diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia florestalis*
418 64:93-107.
- 419 Jensen BD, Vicente JG, Manandhar HK, Roberts SJ (2010) Occurrence and diversity of
420 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable *Brassica* fields in Nepal.
421 *Plant Disease* 94:298-305.
- 422 Lange HW, Tancos MA, Carlson MO, Smart CD (2016) Diversity of *Xanthomonas*
423 *campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York state.
424 *Phytopathology* 106:113-122.
- 425 Leu YS, Deng WL, Yang WS, Wu YF, Cheng AS, Hsu ST, Tzeng KC (2010) Multiplex
426 polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Xanthomonas campestris*

- 427 pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. Plant Pathology Bulletin 19:137-
428 147.
- 429 Lewis-Rogers N, Crandall KA, Posada D (2004) Evolutionary analyses of genetic
430 recombination, In: Parisi V, De Fonzo V, Aluffi-Pentini F (Eds.) Dynamical
431 Genetics. Trivandrum, India. Research Signpost. pp. 49–78.
- 432 Lima EM (2012) Diversidade genética de clones de aceroleira e reação a *Lasiodiplodia*
433 *theobromae*. PhD Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- 434 Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints
435 of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains
436 generated with repetitive sequences and PCR. Applied Environment Microbiology
437 60: 2286–2295.
- 438 Ludwig JA, Reynolds JF (1988) Diversity Indices. In: Ludwig JA Reynolds JF (Eds.)
439 Statistical ecology: a primer on methods and computing. New York, EUA. John
440 Wiley & Sons. pp. 85-103.
- 441 Melo LA, Tebaldi ND, Mehta A, Marques ASA (2014) Comparing *Acidovorax citrulli*
442 strains from melon and watermelon: Phenotypic characteristics, pathogenicity and
443 genetic diversity. Tropical Plant Pathology 39:154-162.
- 444 Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: F(ST) and related
445 measures. Molecular Ecology Resource 11:5-18.
- 446 Milgroom M (1996) Recombination and the multilocus structure of fungal populations.
447 Annual Review of Phytopathology 34:457-477.
- 448 Nakatani AK, Lopes R, Camargo LEA (2009) Variabilidade genética de *Xanthomonas*
449 *axonopodis* pv. *passiflorae*. Summa Phytopathologica 35:116-120.
- 450 Peruch L, Michereff SJ, Araújo IB (2006) Levantamento da intensidade da alternariose
451 e podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa
452 Catarina. Horticultura Brasileira 24:464-469.

- 453 Popović T, Jošić D, Starović M, Milovanović P, Dolovac N, Poštić D, Stanković S
454 (2013) Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris*
455 strains isolated from cabbage, kale and broccoli. Archives of Biological Science
456 Belgrade 65:585-593.
- 457 Rademaker JL, Louws FJ, Schultz MH, Rossbach U, Vauterin L, Swings J, De Bruijn,
458 FJA (2005) comprehensive species to strain taxonomic framework for
459 *Xanthomonas*. Phytopathology 95:1098-111.
- 460 Rathaur PS, Singh D, Raghuwanshi R, Yadava DK (2015) Pathogenic and Genetic
461 Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races Based on Rep-
462 PCR and Multilocus Sequence Analysis. Journal of Plant Pathology &
463 Microbiology 6:317.
- 464 Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Pinheiro MM, Margis R (2004) Even population
465 differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a
466 widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. Diversity
467 and Distributions, 10:201-210.
- 468 Santos LA, Bandeira DA, Silva JP, Silveira EB, Gomes A, Mariano RLR (2008)
469 Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* de sistemas
470 de produção orgânicos e reação de brássicas à podridão-negra. Horticultura
471 Brasileira 26:486-491.
- 472 Scortichini M (2005) The population structure of some plant pathogenic bacteria: an
473 ecological and adaptive perspective. Journal of Plant Pathology 87:5-12.
- 474 Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University
475 of Illinois Press, Urbana, IL.
- 476 Singh D, Dhar S, Yadava DK (2011) Genetic and pathogenic variability of Indian
477 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot disease in
478 crucifers. Current Microbiology 63:551–560.

- 479 Singh D, Rathaur PS, Vicente JG (2016) Characterization, genetic diversity and
480 distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot
481 disease in cruciferous crops of India. Plant Pathology. DOI: 10.1111/ppa.12508
- 482 Smith MJ, Smith NH, O'rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria?
483 Proceedings of the National Academy of Sciences of the, USA 90:4384-4388.
- 484 Souza EB, Mariano RLR, Félix KCS, Silva JR (2016) Isolamento de bactérias
485 fitopatogênicas. In: Mariano RLR, Silveira EB (Eds) Manual de Práticas em
486 Fitobacteriologia. 3ed. Recife, Pernambuco. Edufrpe. pp. 37-49.
- 487 Stoddart JA, Taylor JF (1988) Genotype diversity: Estimation and prediction in
488 samples. Genetics 118:705-711.
- 489 Strange RN, Scott PR (2005) Plant Disease: A Threat to Global Food Security. Annual
490 Review of Phytopathology 43:83-116.
- 491 Tavasoli E, Marefat AR, Hassanzadeh N (2011) Identity and genetic diversity of
492 *Pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. African
493 Journal of Plant Science 5:329-336.
- 494 Valverde A, Humbert T, Stolov A, Dagar A, Kopelowitz J, Burdiman S (2007)
495 Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv *campestris*
496 isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. Plant Pathology
497 56:17-25.
- 498 Vicente JG, Everett B, and Roberts SJ (2006) Identification of isolates that cause a leaf
499 spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic
500 and genetic comparison with related pathovars. Phytopathology 96:735-745.
- 501 Vicente JG, Holub EB (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black
502 rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops.
503 Molecular Plant Pathology 14:2-18.

504 Zhan J, Mundt CC, Hoffer ME, McDonald BA (2002) Local adaptation and effect of host
505 genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant
506 pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* 15:634-647.

507 **Tabela 1** Isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, oriundos dos principais municípios produtores de brássicas de Pernambuco.

Isolado	Hospedeiro	Origem*	Isolado	Hospedeiro	Origem	Isolado	Hospedeiro	Origem
CRMXcc22	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc317	Repolho	Sairé	CRMXcc313	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc309	Couve-flor	Chã Grande	CRMXcc304	Repolho	Sairé	CRMXcc33	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc132	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc101	Repolho	Sairé	CRMXcc385	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc122	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc98	Repolho	Sairé	CRMXcc349	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc18	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc136	Repolho	Sairé	CRMXcc35	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc118	Couve-flor	Chã Grande	CRMXcc106	Repolho	Sairé	CRMXcc8	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc16	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc345	Repolho	Saloá	CRMXcc140	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc137	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc130	Repolho	Sairé	CRMXcc152	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc25	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc347	Repolho	Sairé	CRMXcc328	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc15	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc105	Repolho	Sairé	CRMXcc315	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc119	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc102	Repolho	Bom Jardim	CRMXcc302	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc17	Couve-flor	Bezerros	CRMXcc365	Repolho	Saloá	CRMXcc359	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc343	Repolho	Chã Grande	CRMXcc141	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc326	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc308	Repolho	Sairé	CRMXcc370	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc60	Brócolis	Chã Grande
CRMXcc97	Repolho	Sairé	CRMXcc154	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc113	Brócolis	Chã Grande

CRMXcc388	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc196	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc168	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc320	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc26	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc75	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc325	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc300	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc256	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc353	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc264	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc229	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc153	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc190	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc290	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc116	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc201	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc158	Couve-comum	Saloá
CRMXcc117	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc177	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc251	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc314	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc289	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc164	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc348	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc212	Couve-comum	Saloá	CRMXcc176	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc334	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc215	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc175	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc23	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc198	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc171	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc324	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc174	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc310	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc150	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc222	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc180	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc128	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc262	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc169	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc301	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc252	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc159	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc65	Brócolis	Chã Grande	CRMXcc268	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc161	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc205	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc250	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc228	Couve-comum	Bom Jardim

CRMXcc160	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc299	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc226	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc181	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc311	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc219	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc157	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc187	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc69	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc239	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc195	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc71	Couve-comum	Saloá
CRMXcc76	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc186	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc230	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc217	Couve-comum	Saloá	CRMXcc265	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc278	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc241	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc386	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc275	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc209	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc258	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc263	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc282	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc224	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc279	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc192	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc199	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc288	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc231	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc162	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc285	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc276	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc210	Couve-comum	Saloá	CRMXcc261	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc254	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc200	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc240	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc173	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc189	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc235	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc286	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc214	Couve-comum	Saloá	CRMXcc232	Couve-comum	Bom Jardim
CRMXcc246	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc204	Couve-comum	Saloá	CRMXcc170	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc260	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc206	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc165	Couve-comum	Camocim de São Félix

CRMXcc259	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc163	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc68	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc253	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc311	Couve-comum	Camocim de São Félix	CRMXcc178	Couve-comum	Camocim de São Félix
CRMXcc216	Couve-comum	Bom Jardim	CRMXcc243	Couve-comum	Saloá	-	-	-
CRMXcc166	Couve-comum	Saloá	CRMXcc172	Couve-comum	Camocim de São Félix	-	-	-
CRMXcc156	Couve-comum	Saloá	CRMXcc167	Couve-comum	Saloá	-	-	-

508 * Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá, Sairé, municípios do Agreste Pernambucano; Chã Grande, município da Zona da Mata

509 Pernambucana.

510

511 **Tabela 2** Índices de diversidade genética entre populações de *X. campestris* pv. *campestris*
 512 por municípios e hospedeiros no estado de Pernambuco-Brasil.

513 A. Município

População	Bom Jardim	Bezerros	Camocim	Saloá	Sairé	Chã Grande	Total
	de São Félix						
N	57	10	29	13	11	39	159
N° haplótipos	40	8	21	9	8	33	98
G	8,65 (5,56-10)	6,25 <NA>	8,13 (5,56-10)	6,10 (4,54-8,33)	6,16 (5,56- 7,14)	8,81 (5,56-10)	9,17 (6,25-10)
E ₅	0,96 (0,85- 1)	0,88 <NA>	0,95 (0,85- 1)	0,88 (0,85-0,95)	0,88 (0,85-0,93)	0,96 (0,85- 1)	0,98 (0,85- 1)
H _e	2,18 (1,83-2,30)	1,97 <NA>	2,13 (1,83- 2,30)	1,90 (1,64-2,16)	1,92 (1,83-2,02)	2,20 (1,83-2,30)	2,23 (1,97- 2,30)
Fração Clonal	0,30	0,20	0,32	0,30	0,27	0,15	0,39
Índice de Simpson	0,96 (0,82- 0,9)	0,84 <NA>	0,94 (0,82- 0,9)	0,85 (0,78- 0,88)	0,84 (0,82-0,86)	0,96 (0,82-0,9)	0,98 (0,84-0,9)
E(g ₁₀)	9,13	8,00	8,75	7,38	7,45	9,34	9,47
% locus polimorficos	81,25	56,25	87,5	68,75	81,25	100	100

514

515

516

517

518 B. Hospedeiro

População	Couve-comum	Brócolis	Couve-flor	Repolho	Total
N	96	36	12	15	159
Nº haplótipos	59	29	9	12	98
G	10,33 (7,2-12)	9,95 (6-12)	<NA>	8,64 (7,2-10,28)	10,74 (8-12)
E ₅	0,96 (0,86-1)	0,94 (0,76-1)	<NA>	0,90 (0,86-0,95)	0,96 (0,86-1)
H _e	2,36 (2,09-2,48)	2,34 (2,02-2,48)	<NA>	2,23 (2,09-2,48)	2,39 (2,13-2,48)
Fração Clonal	0,39	0,17	0,19	0,20	0,39
Índice de Simpson	0,97 (0,86-0,92)	0,95 (0,83-0,910)	<NA>	0,89 (0,86-0,90)	0,98 (0,87-0,91)
E(g ₁₂)	10,96	10,88	9,00	9,97	11,24
% locus polimórficos	93,75	93,75	56,25	87,5	100

519

520 N= Tamanho da amostra; Nº haplótipos= Número de haplótipos para cada população;

521 G= Diversidade genotípica; E₅= Índice de equitabilidade genotípica; H_e=Diversidade gênica

522 de Shannon-Weaver (1949); Fração Clonal= Índice de diversidade genotípica, calculado por

523 (1-(número de diferentes genótipos)/(total de números de isolados)). Índice de Simpson;

524 E(g_n)= Riqueza genotípica ou número esperado de genótipos pelo método de rarefação.

525

526

527

528

529

530 **Tabela 3** Estimativa do desequilíbrio de ligação por meio dos índices de associação (I_A e r_d)
 531 entre seis populações de *X. campestris* pv. *campestris* oriundas de municípios de Bom Jardim,
 532 Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá, Sairé (Agreste Pernambucano) e Chã Grande (Zona
 533 da Mata Pernambucana) e diferentes hospedeiros (couve-comum, brócolis, couve-flor e
 534 repolho).

535

536

A. Município

	I_A	r_d
Bom Jardim	-0,08	-0,007
Bezerros	0,24	0,03
Camocim de São Félix	-0,13	-0,01
Saloá	-0,12	-0,01
Sairé	-0,01	-0,001
Chã Grande	-0,04	-0,003

537

538

539

B. Hospedeiro

	I_A	r_d
Couve-comum	-0,10	-0,008
Brócolis	-0,02	-0,001
Couve-flor	0,19	0,02
Repolho	-0,12	-0,009

540

541

542 **Tabela 4** Diferenciação entre cinco populações de *X. campestris* pv. *campestris* oriundas de
 543 municípios de Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá, Sairé (Agreste
 544 Pernambucano) e Chã Grande (Zona da Mata Pernambucana) e diferentes hospedeiros
 545 (couve-comum, brócolis, couve-flor e repolho), usando G²st.

546

547 A. Municípios

	Bom Jardim	Bezerros	Camocim de São Félix	Saloá	Sairé
Bezerros	0,226				
Camocim	0,075	0,119			
Saloá	0,058	0,129	-0,036		
Sairé	0,142	0,145	0,124	0,110	
Chã Grande	0,037	0,239	0,038	0,019	0,076

548

549

550 B. Hospedeiros

	Couve-comum	Brócolis	Couve-flor	
Brócolis		0,030		
Couve-flor		0,156	0,249	
Repolho		0,071	0,041	0,108

551

552

553

554

555

556

557

558

559 **Tabela 5** Análise de variância molecular (AMOVA) em subpopulações de 133 isolados de *X.*
 560 *campestris* pv. *campestris* em Pernambuco, usando BOX-PCR.

561 A. Municípios

F,V	G,L	S,Q	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	5	29,08	0,15 Va	6,90
Dentro de subpopulações	153	319,37	2,06 Vb	93,10
Total	158	348,447	2,21	

562

563 B. Hospedeiros

F.V	G.L	S.Q	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	3	16,66	0,12 Va	5,62
Dentro de subpopulações	155	308,13	2,08 Vb	94,38
Total	158	324,796	2,20	

564

565

566

567

568

569

570

571

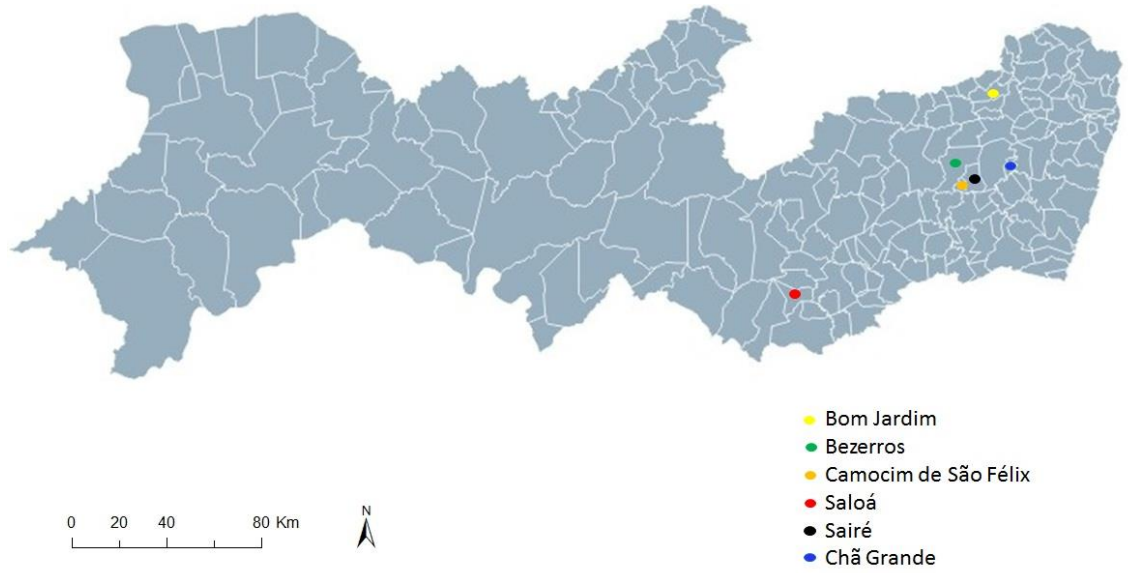
572

573

574

575

576



577

578 **Figura 1.** Localização dos principais municípios produtores de brássicas no estado de
579 Pernambuco.

580

581

582

583

584

585

586

587

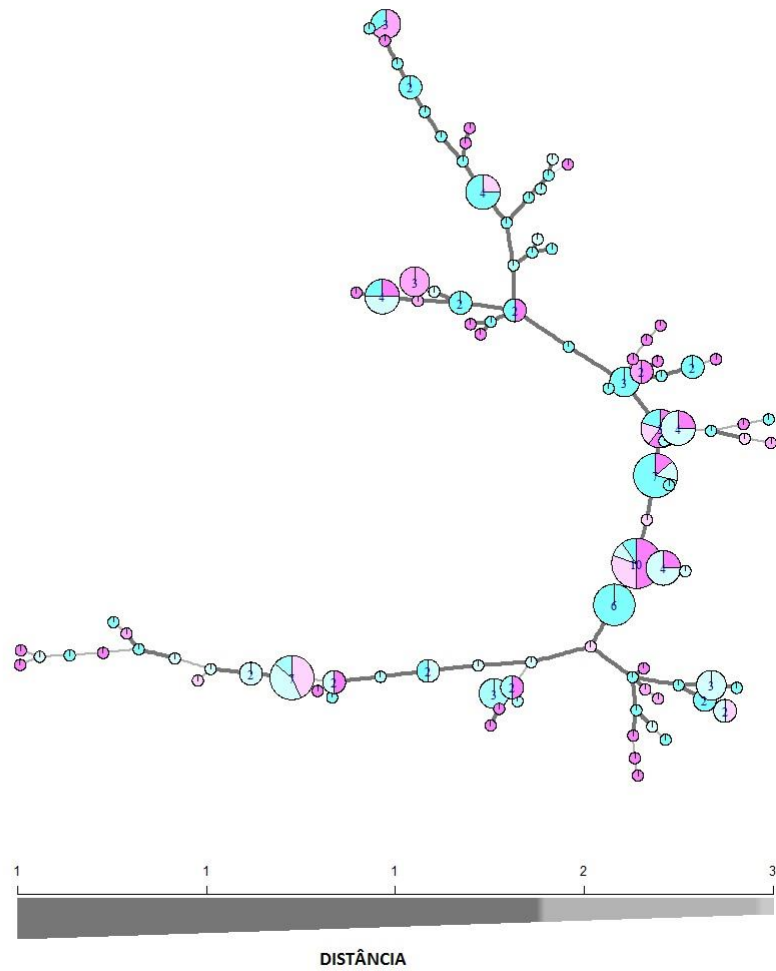
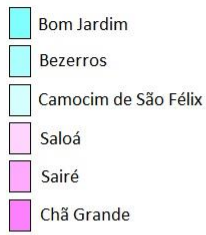
588

589

590

591

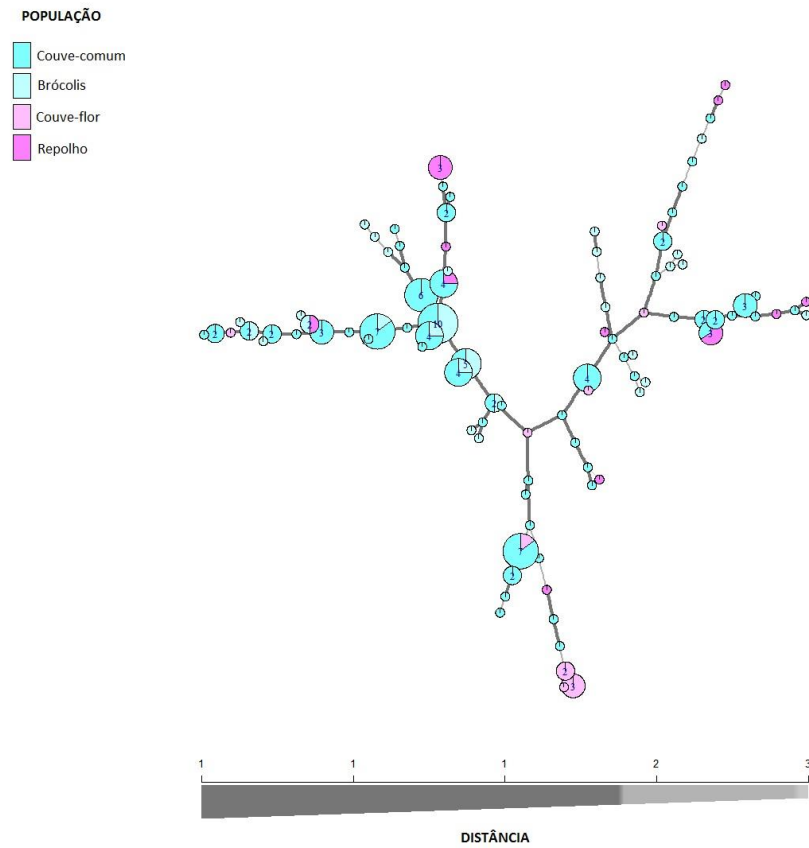
POPULAÇÃO



592

593 **Figura 2.** Rede de haplótipos nas populações de diferentes municípios do estado de
 594 Pernambuco (Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá, Sairé e Chã Grande). As
 595 cores indicam a presença de haplótipos por município.

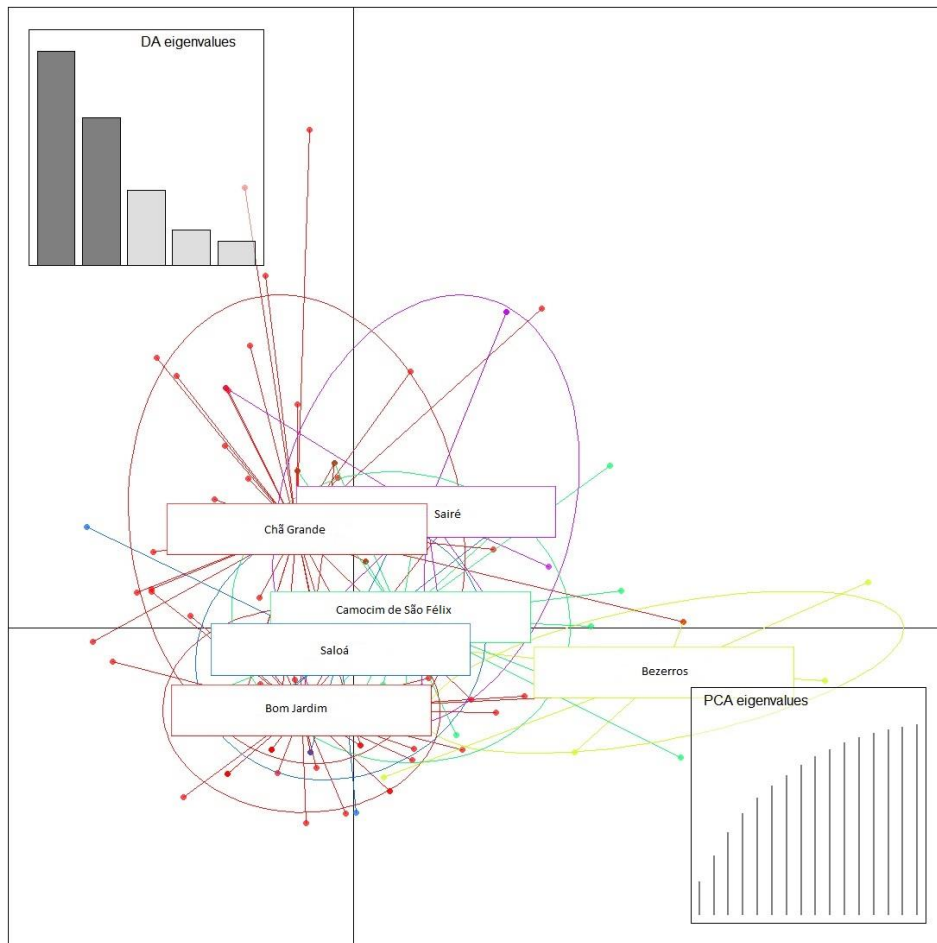
596



597

598 **Figura 3.** Rede de haplótipos nas populações de diferentes hospedeiros de *X. campestris* pv.599 *campestris* do estado de Pernambuco (couve-comum, brócolis, couve-flor e repolho). As

600 cores indicam a presença de haplótipos por hospedeiros.



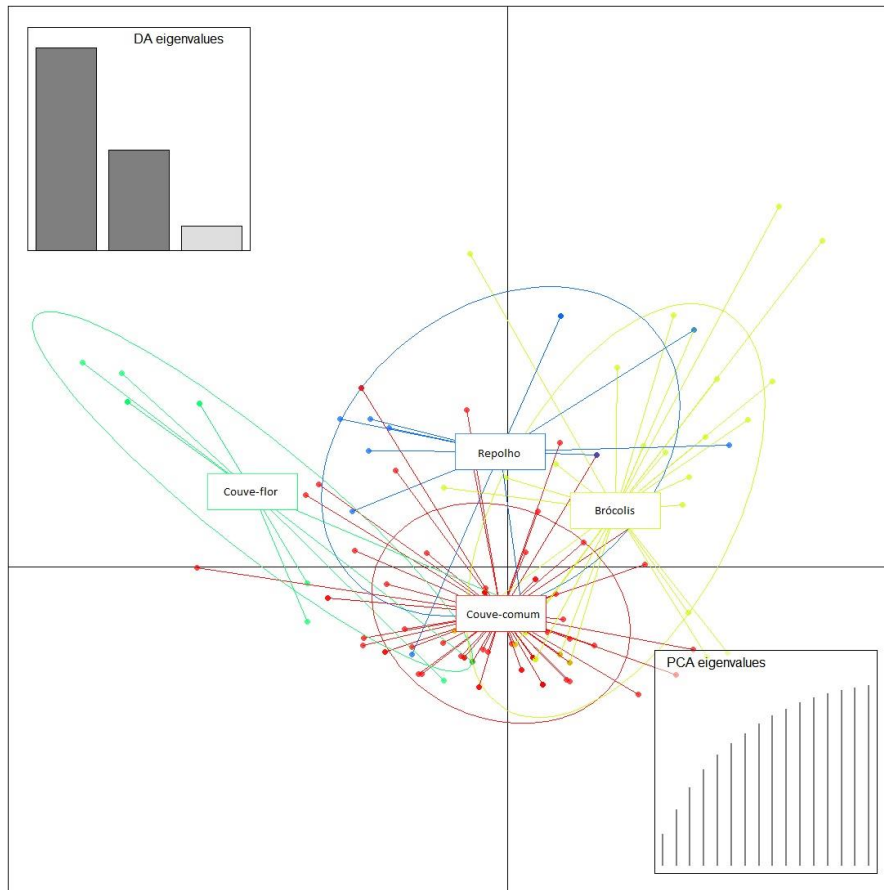
601

602 **Figura 4.** Análise discriminante de componentes principais (DAPC) entre os isolados de *X.*603 *campestris* pv. *campestris* de populações de diferentes municípios do estado de Pernambuco

604 (Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá, Sairé e Chã Grande).

605

606



607

608

609 **Figura 5.** Análise discriminante de componentes principais (DAPC) entre os isolados de *X.*610 *campestris* pv. *campestris* de populações de diferentes hospedeiros (couve-comum, brócolis,

611 couve-flor e repolho).

612

CAPÍTULO III

Caracterização filogenética por análise de sequência multilocus de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco, Brasil

1 **Caracterização filogenética por análise de sequência multilocus de isolados de**
2 ***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco, Brasil**

3
4 **E. A. Melo¹, K. C. S. Felix¹, G. M. R. Albuquerque¹, M. A. S. Gama¹, R. L. R. Mariano¹ e**
5 **E. B. Souza²**

6 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Recife, PE,
7 Brasil

8 ² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, Recife, PE,
9 Brasil

10
11 Autor para correspondência: Elineide Barbosa de Souza

12 E-mail: elineidebs@yahoo.com.br

13
14 **RESUMO**

15 A espécie *Xanthomonas campestris* atualmente possui seis patovares (*aberrans*, *armoraciae*,
16 *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*) separados a partir da patogenicidade em plantas de
17 brássicas. Técnicas moleculares tem sido utilizadas para compreender as diferenças entre
18 esses patovares, sendo a análise da sequência multilocus (MLSA) de genes housekeeping uma
19 alternativa valiosa em estudos filogenéticos. O objetivo do presente estudo foi inferir relações
20 filogenéticas entre 19 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* de brássicas do estado de
21 Pernambuco, e os outros cinco patovares dessa espécie, utilizando seis genes *housekeeping*
22 (*atpD*, *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD* e *tpiA*) e a técnica análise da sequência multilocus (MLSA).
23 As árvores filogenéticas demonstraram a alta diversidade de *X. campestris* pv. *campestris*
24 através da formação de dois grupos e o estreito relacionamento do grupo 1, subgrupo 1A com
25 o patovar *aberrans*. Foi também obtida a distinção dos patovares *raphani*, *barbareae* e
26 *incanae*. Com os dados dos genes concatenados um total de 19 haplótipos foi encontrado para

27 os 19 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. O gene *rpoD* foi o que melhor revelou as
28 relações filogenéticas entre os patovares.

29

30 **Palavras-chaves:** podridão negra; genes *housekeeping*; MLSA; relações filogenéticas; ·
31 patovares

32

33 **ABSTRACT**

34

35 The *Xanthomonas campestris* specie currently includes six pathovars (*aberrans*, *armoracia*,
36 *barbareae*, *campestris*, *incanae* and *raphani*) separated from the pathogenicity in brassica
37 plants. Molecular techniques have been used to understand the differences between those
38 pathovars, being analysis of multilocus sequence (MLSA) of genes housekeeping are a
39 valuable alternative of phylogenetic studies. The objective of this study was to infer
40 phylogenetic relationships among 19 isolates of *X. campestris* pv. *campestris* brassica in the
41 state of Pernambuco, and the other five pathovars of this specie. Using six genes
42 housekeeping (*atpD*, *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD* and *tpiA*) and technical analysis of multilocus
43 sequence (MLSA). Phylogenetic trees showed high diversity of *X. campestris* pv. *campestris*,
44 by forming two groups and the closest relationship of group 1, 1A subgroup with *aberrans*
45 patovar. Was also obtained the distinction of pathovars *raphani*, *barbareae* and *incanae*. On
46 the concatenated data genes a total of 19 haplotypes were found for the 19 strains of *X.*
47 *campestris* pv. *campestris*. The *rpoD* gene was the best phylogenetic relationships revealed
48 among pathovars.

49 **Keywords:** black rot, housekeeping genes, MLSA, phylogenetic relations, pathovars

50

51 **INTRODUÇÃO**

52 No gênero *Xanthomonas* são encontradas espécies de bactérias fitopatogênicas que
53 causam doenças de grande importância econômica em diversas culturas (Moreira et al. 2010).
54 Algumas modificações taxonômicas nesse gênero ao longo dos anos, têm sugerido a
55 reclassificação de espécies e patovares. Atualmente, a espécie *X. campestris*, responsável por
56 causar doenças em brássicas, contém seis patovares: *X. campestris* pv. *aberrans* (Knösel)
57 Dye, *X. campestris* pv. *armoraciae* (McCulloch) Dye, *X. campestris* pv. *barbareae*
58 (Burkholder) Dye, *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, *X. campestris* pv.
59 *incanae* (Kendrick & Baker) Dye e *X. campestris* pv. *raphani* (White) Dye (Bradbury, 1986;
60 Vauterin et al., 1995).

61 Os patovares *aberrans* e *campestris* são os únicos capazes de causar podridão negra
62 em diversas brássicas (Celetti e Callow, 2002). O patovar *barbareae* causa podridão negra ou
63 pequenas manchas em folhas de agrião da terra (*Barbarea vulgaris* L.). O patovar *raphani* é
64 responsável por causar mancha foliar castanho claro ou cinza, às vezes rodeada por um halo
65 encharcado, tanto em brássicas quanto nas solanáceas: tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.),
66 pimentão (*Capsicum annuum* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (Vicente, 2006). O patovar
67 *armoraciae* causa manchas foliares, às vezes com halo amarelado, em brássicas e tomate,
68 (Zhao et al., 2000), e o patovar *incanae* produz lesões típicas de crestamento bacteriano em
69 ornamentais (*Matthiola* sp. W.T. Aiton) (Fargier e Manceau, 2007). Entretanto, dúvidas têm
70 surgido quanto à classificação desses patovares. Alguns autores têm questionado a
71 classificação de *X. campestris* pv. *aberrans* com base em testes de patogenicidade e análise
72 da sequência multilocus (MLSA), sugerindo que este seja reclassificado como pv. *campestris*
73 (Fargier e Manceau, 2007; Fargier et al., 2011). Além disso, Vicente et al. (2006) propuseram
74 que todos os isolados que causam mancha foliar em brássicas e solanáceas sejam identificados
75 como pv. *raphani* e não pv. *armoraciae*.

76 Atualmente várias técnicas moleculares têm sido empregadas para realizar estudos
77 taxonômicos que permitem delimitar espécies. Hibridização DNA-DNA, sequenciamento da

78 região 16S do DNA ribossomal, MLSA, amplified fragment length polymorphism (AFLP) e
79 repetitive DNA - polymerase chain reaction- (rep-PCR) têm sido bastante utilizadas para
80 avaliar a variabilidade e os relacionamentos taxonômicos e filogenéticos de espécies e
81 patovares de *Xanthomonas* (Vauterin et al., 1995; Rademaker et al., 2000; Jensen et al., 2010;
82 Young et al., 2010; Zhu et al., 2010).

83 A técnica MLSA é amplamente empregada na tipagem molecular para a inferência das
84 relações filogenéticas nos níveis intra e interespecíficos de uma grande variedade de bactérias
85 fitopatogênicas (Maiden, 2006). Em estudos de MLSA, sequências parciais de genes
86 *housekeeping* são utilizados para gerar árvores filogenéticas e subsequentemente deduzir
87 filogenias (Glaeser e Kämpfer, 2015). Os genes *housekeeping* são codificadores de funções
88 metabólicas essenciais e são compartilhados por todos os membros da espécie (Gevers et al.,
89 2005). Os genes mais utilizados são: *gyrB* (subunidade β da girase do DNA), *rpoB*
90 (subunidade β da RNA polimerase) *atpD* (subunidade β da F1-Fo ATP sintetase da cadeia
91 beta), *efP* (fator de alongação P), *dnaK* (proteína de choque térmico 70, chaperonina), *glnA*
92 (glutamina sintetase I), *rpoD* (RNA polimerase fator sigma70), *tpiA* (triosefosfato isomerase),
93 *fyuA* (receptor tonB-dependente) e *fusA* (proteína fator de alongamento de cadeias) (Boudon
94 et al., 2005; Parkinson et al., 2009; Almeida et al., 2010; Fargier et al., 2011; Tonin et al.,
95 2012). Na técnica MLSA, a seleção de genes dependerá do objetivo do trabalho. No entanto,
96 os genes devem ser cópias únicas no genoma, homólogos e ubíquos nos taxa estudados e não
97 estarem sobre pressão de seleção (Glaeser e Kämpfer, 2015).

98 Estudo de seis patovares de *X. campestris* pela técnica MLSA com oito genes
99 *housekeeping*, revelou alta diversidade genética dentro da espécie *X. campestris* pv.
100 *campestris*, onde foram encontrados dois grupos. Além disso, os patovares *aberrans* e
101 *campestris* que induzem a podridão negra foram geneticamente próximos (Fargier et al.,
102 2011). Lange et al. (2016) também demonstraram a alta diversidade entre isolados de *X.*
103 *campestris*, comprovando a eficiência da MLSA, e corroborando os resultados de Fargier et

104 al. (2011), sendo formados dois grupos para *X. campestris* pv. *campestris* e um grupo para *X.*
105 *campestris* pv. *raphani*.

106 Embora exista conhecimento sobre a diversidade da espécie *X. campestris* e o
107 relacionamento entre seus patovares, nenhum trabalho dentro dessa perspectiva foi encontrado
108 em Pernambuco, onde, a exemplo de outros estados do Brasil, a podridão negra das brássicas
109 causa grandes prejuízos (Peruch et al., 2006). Este estudo objetivou o conhecimento dos
110 patovares de *X. campestris* que ocorrem no estado de Pernambuco, inferindo relações
111 filogenéticas entre estes isolados e os outros patovares da espécie (*aberrans*, *armoraciae*,
112 *raphani*, *barbareae* and *incanae*), utilizando a técnica MLSA.

113

114 MATERIAL E MÉTODOS

115

116 Obtenção de isolados e extração de DNA

117 Dezenove isolados de *X. campestris* pv. *campestris* utilizados neste estudo foram
118 obtidos da Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE
119 (Tabela 1). Esses isolados foram identificados pelos primers específicos 2f/2r e representam a
120 diversidade de uma população de 138 isolados, caracterizada com o marcador BOX-PCR
121 (Melo, 2016). Também foram incluídos neste estudo cinco isolados tipo dos patovares
122 *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris* e *raphani* (IBSBF) obtidos da Coleção de
123 Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico. Para inferir relações filogenéticas sobre o
124 patovar *incanae*, a sequência do mesmo foi obtida do Genbank (Tabela 2).

125 Todos os isolados foram cultivados em meio NYDA (10 g dextrose, 3 g extrato de
126 carne, 5 g extrato de levedura, 3 g peptona e 18 g agar L⁻¹) a 28°C por 36 h, e a extração de
127 DNA foi realizada utilizando o Kit Miniprep (Axygen Biosciences, USA), de acordo com as
128 recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado a partir da comparação com marcador
129 High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Brasil), sendo utilizado 4 µl de DNA concentrado,

130 adicionado de 2 μ l do tampão 6X DNA Loading Dye (Fermentas Life Sciences, Canadá) e
131 2,0 μ l de Syber[®] Safe DNA Gel Stain (10X) (Life Technologies, Brasil). Todas as amostras
132 de DNA foram submetidas à eletroforese (80V) em gel de agarose a 0.8% por 1,5 h, o gel foi
133 visualizado através de fotodocumentador (Analítica, Brasil) e as amostras armazenadas a -
134 20°C.

135

136 **PCR e Sequenciamento**

137

138 Os genes *housekeeping atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *fyuA*, *rpoD* e *tpiA* foram utilizados para
139 MLSA (Fargier et al., 2011). As sequências dos *primers* estão descritas na Tabela 3. Todas as
140 amplificações foram realizadas utilizando um volume final de 25 μ l contendo 1X de PCR
141 Master Mix, 400 nM de cada primer e 50 ng de DNA. As reações foram realizadas em 35
142 ciclos, com desnaturação inicial de 3 min a 94°C e cada ciclo consistindo de 50 s a 94°C para
143 desnaturação, 50 s na temperatura de anelamento específica para cada *primer* (Tabela 3) e
144 extensão por 1 min a 72°C. Ao final dos ciclos foi realizada a extensão final por 7 min a
145 72°C. A visualização foi feita em gel de agarose a 1% por 1,0 h. A purificação dos produtos
146 de PCR foi realizada com auxílio do Kit Clean-up (Axygen Biosciences, EUA) e o
147 sequenciamento das fitas *forward* e *reverse* foi realizado pela Macrogen[®] (Seul, Coréia do
148 Sul).

149

150 **Filogenia Multilocus**

151

152 A análise da qualidade das sequências de DNA e a montagem dos contigs foram
153 realizadas com o auxílio do Staden Package (Staden et al., 1998). Os alinhamentos das
154 sequências foram realizados com a ferramenta ClustalW, implementada na suite do software
155 MEGA 6.0. Posteriormente, os genes foram concatenados, formando o dataset com 3354

156 nucleotídeos e analisados. Para avaliar a variação de sítios polimórficos e número de
157 haplótipos foi utilizado o software DNASP v. 5.0.

158 As sequências obtidas a partir de isolados *X. campestris* pv. *campestris* do estado de
159 Pernambuco foram analisadas para os genes concatenados com um isolado tipo de cada um
160 dos patovares de *X. campestris*: *campestris*, *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *raphani*
161 (Tabela 1) e *incanae* (Tabela 2). Foi utilizado o método Neighbour-Joining (NJ), com o
162 algoritmo Jukes-Cantor e *bootstrap* de 1000 repetições para todas as sequências. Três isolados
163 de outras espécies de *Xanthomonas* também foram incluídos na análise: *X. oryzae* pv. *oryzae*
164 (Ishiyama) Dye, *X. axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Dye e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*
165 (Doidge) Dye.

166 A árvore de Máxima Verossimilhança foi gerada para comparação entre todos os
167 isolados de Pernambuco, isolados tipo (IBSBF) e sequências de referência obtidas do
168 Genbank incluindo isolados de *X. campestris* pv. *campestris* de Nova York, Chile, Espanha e
169 Reino Unido, representativos dos dois grupos do patovar *campestris* (Fargier et al., 2011;
170 Lange et al., 2016) (Tabela 3). Para a análise foi empregado o software MEGA 6.0, utilizando
171 o modelo Tamura-Nei, com *bootstrap* de 1000 repetições. Os resultados foram visualizados
172 com os programas Fig Tree 1.4.1 e MEGA 6.0.

173 As sequências de *X. campestris* utilizadas no método NJ também foram analisadas
174 individualmente para cada gene através de gráficos SplitsTree utilizando o programa MEGA
175 6.0.

176

177 **RESULTADOS**

178

179 Análises filogenéticas usando o método NJ revelaram um grupo monofilético para *X.*
180 *campestris*, claramente distinto das outras duas espécies de *Xanthomonas*, *X. oryzae* e *X.*
181 *axonopodis* (Figura 1). Os 19 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* ficaram separados em

182 dois grupos. No grupo 1, foi alocada a maioria dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*,
183 com dois subgrupos; o subgrupo 1A incluiu 13 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* e os
184 isolados tipo dos patovares *aberrans*, *armoraciae* e *campestris* com alto valores de *bootstrap*;
185 o subgrupo 1B incluiu três isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. O grupo 2 também foi
186 subdividido, formando os subgrupos 2A e 2B, com um e três isolados de *X. campestris* pv.
187 *campestris*, respectivamente. Isolados dos patovares *raphani*, *barbareae* e *incanae* não foram
188 agrupados com o patovar *campestris*, no entanto, foi verificado que o subgrupo 2B está bem
189 próximo a estes patovares, com *bootstrap* de 76%. Não foi verificada correlação dos
190 grupos/subgrupos com origem dos isolados.

191 Resultados similares à análise por NJ foram obtidos na análise filogenética pelo
192 método de Máxima Verossimilhança, onde dois grupos distintos para o patovar *campestris*
193 também foram encontrados. A grande maioria dos isolados de Pernambuco abrigou-se no
194 grupo 1 junto com os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* de outros países (Figura 2).

195 Na análise MLSA o número de sítios polimórficos variou de 5 a 47 para os genes *gyrB*
196 e *rpoD*, respectivamente com índices de sítios variáveis de 1,0% (*gyrB*) e 10,5% (*rpoD*).
197 Nenhum gap ou inserção foi encontrado para qualquer gene. O número de haplótipos variou
198 para cada gene, sendo 11 o maior número de haplótipos encontrados para o gene *fyuA*, e três,
199 o menor número para *gyrB* (Tabela 4). Com os dados dos genes concatenados um total de 19
200 haplótipos foi encontrado para os 19 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, demonstrando
201 uma alta diversidade.

202 Nos gráficos SplitsTree de cada gene, os paralelogramos indicaram a presença de
203 homoplasia dentro da espécie (Figura 3). O gene *rpoD* apresentou-se como o mais adequado
204 para inferir relações filogenéticas entre os isolados de *X. campestris*, mostrando topologia
205 semelhante a árvore concatenada (Figura 1). Essa topologia foi confirmada com a construção
206 de uma árvore filogenética pelo método NJ para esse gene (Figura 4). As sequências de todos

207 os genes dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* de Pernambuco foram depositadas no
208 Genbank.

209

210 **DISCUSSÃO**

211

212 A inferência filogenética por meio de MLSA utilizando sequências de genes
213 conservados (genes *housekeeping*) tem sido aplicada, principalmente, em estudos
214 filogenéticos de espécies procariotas, dentre elas as pertencentes ao gênero *Xanthomonas*
215 (Gevers et al., 2005; Young et al., 2008; Ah-You et al., 2009; Almeida et al., 2010; Fargier et
216 al., 2011; Lange et al., 2016). Neste trabalho, a MLSA com os genes *housekeeping atpD*,
217 *gyrB*, *dnaK*, *fyuA* *rpoD* e *tpiA* foi utilizada para descrever as relações filogenéticas
218 intraespecíficas de *X. campestris* através da análise comparativa entre 19 isolados de *X.*
219 *campestris* pv. *campestris* previamente selecionados, com os outros cinco patovares da
220 espécie.

221 Os resultados foram similares aos de Fargier et al. (2011), que a partir da árvore
222 concatenada dos genes *gyrB*, *dnaK*, *fyuA* e *rpoD*, encontraram dois grupos de *X. campestris*
223 pv. *campestris*, revelando a alta diversidade desse patovar. Também a formação de um grupo
224 contendo isolados de *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *aberrans* e *X.*
225 *campestris* pv. *campestris* foi corroborada com a formação do grupo 1, subgrupo A, neste
226 estudo (Figura 2).

227 A formação de dois grupos distintos de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*,
228 grupo 1 (A e B) e grupo 2 (A e B), com o subgrupo 2B agrupando-se bem próximo aos
229 isolados tipos dos patovares *raphani*, *barbareae* e *incanae*, confirmou a análise de
230 diversidade de isolados de *X. campestris* do estado de Nova York (EUA), realizada utilizando
231 oito genes *housekeeping* concatenados (*atpD*, *dnaK*, *efP*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* e *tipA*)
232 (Lange et al., 2016). Deste modo, embora os patovares *raphani*, *barbareae*, *incanae* e

233 *campestris* estejam próximos, são geneticamente distintos. Várias outras técnicas moleculares
234 também mostraram estas diferenças em *X. campestris* (Alvarez et al., 1994; Vicente et al.,
235 2006; Ignatov et al., 2007). A distinta separação dos isolados de *X. campestris* de outras
236 espécies do gênero (*X. oryzae* e *X. axonopodis*) indicam que essa espécie forma um grupo
237 geneticamente diferenciado (Figura 1, 2 e 4).

238 A adaptação da espécie *X. campestris* às brássicas hospedeiras pode ter moldado sua
239 estrutura genética, uma vez que genes *housekeeping* codificam funções metabólicas
240 essenciais compartilhadas por todos os membros da espécie. Porém, espera-se que haja efeito da
241 seleção purificadora, já que a maioria das alterações ocorridas nesses genes é do tipo não
242 sinônima, isto é uma substituição de nucleotídeos não alteram a sequência de codificação de
243 aminoácidos (Fargier et al., 2011; Sadava et al., 2013). A interação entre os patovares de *X.*
244 *campestris* e espécies de brássicas sugere que os mesmos coevoluíram ao longo dos anos
245 (Fargier e Manceau, 2007).

246 Na análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, os isolados de
247 Pernambuco apresentam o mesmo padrão genético que sequências similares de isolados de *X.*
248 *campestris* pv. *campestris* de outros países depositadas no Genbank por Fargier et al. (2011) e
249 Lange et al. (2016), confirmando a formação de dois grupos.

250 O isolado IBSBF1102 (*X. campestris* pv. *armoraciae*) foi incluído no grupo 1,
251 subgrupo 1A de *X. campestris* pv. *campestris*. Isto suporta o estudo de Vicente et al. (2006),
252 no qual este mesmo isolado, não agrupou com isolados do patovar *armoraciae*, mas agrupou
253 com alguns isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. Quando inoculado em *Iberis* sp.,
254 IBSBF1102 induziu sintomas típicos de infecção sistêmica, característicos do patovar
255 *campestris* (Fargier e Manceau, 2007). Isto explica a permanência desse isolado no grupo do
256 patovar *campestris*, o que levou alguns pesquisadores a questionar a posição desse isolado
257 como patovar *armoraciae* (Bogdanove et al., 2011; Fargier et al., 2011).

258 Dois isolados do patovar *aberrans* agruparam com os isolados de *X. campestris* pv.
259 *campestris* grupo 1, subgrupo 1A, possivelmente por também causarem podridão negra em
260 brássicas. Portanto, o presente estudo apoia a proposição de Vicente et al. (2001) e Fargier e
261 Manceau (2007), de que todos os isolados do patovar *aberrans* sejam reclassificados para *X.*
262 *campestris* pv. *campestris*.

263 Os estudos sobre patovares estreitamente relacionados que infectam grande número de
264 espécies de plantas tem proporcionado uma nova visão sobre a capacidade e potencial de
265 linhagens de *Xanthomonas* em infectar novas hospedeiras. Estes estudos irão fornecer
266 respostas importantes relacionadas a alterações na composição genética de *Xanthomonas*
267 (Parkinson et al., 2009).

268 Os dezenove haplótipos encontrados na análise dos genes concatenados para a amostra
269 de 19 isolados, confirmou a alta diversidade dessa espécie, já verificada por Fargier et al.
270 (2011) e Lange et al. (2016). Diversas outras técnicas moleculares comprovam essa hipótese
271 (Alvarez et al., 1994; Vicente et al., 2006; Jensen et al., 2010; Rathaur et al., 2015; Singh et
272 al., 2016), sugerindo que *X. campestris* pv. *campestris* é uma espécie heterogênea que passou
273 por uma evolução substancial (Fargier et al., 2011). A migração de haplótipos é bastante
274 comum, pois a disseminação de *X. campestris* pv. *campestris* ocorre através de sementes ou
275 mudas distribuídas entre as principais regiões produtoras de brássicas. Em Nova York, o
276 haplótipo H45 de *X. campestris* pv. *campestris*, obtido de viveiro, foi reisolado dois anos
277 depois, a partir de cultivos no campo, confirmando a facilidade de disseminação do patógeno
278 (Lange et al., 2016).

279 As análises de isolados representativos de *X. campestris* com cada gene
280 individualmente através de gráficos SplitsTree mostraram variações nas estruturas
281 filogenéticas. Um único gene *housekeeping* não deve ser utilizado para representar a filogenia
282 de um organismo, pois fatores tais como taxas de mutações simples e variáveis, possibilidade
283 de transferência de genes horizontal ou recombinação podem interferir nessa filogenia

284 (Gevers et al., 2005; Martens et al., 2007). No entanto, ficou evidenciado a semelhança do
285 gráfico do gene *rpoD* (Figura 4) com a árvore concatenada (Figura 2), podendo ser utilizado
286 para inferir relações filogenéticas entre isolados de *X. campestris*. Young et al. (2008)
287 demonstraram que as variações nas estruturas filogenéticas não são atribuídas ao algoritmo
288 utilizado, mas, principalmente, à escolha do gene em questão. A comparação entre filogenia
289 de genes individuais, de forma geral mostra variações (Acqua, 2011).

290 Foi demonstrada a alta diversidade presente nos isolados de *X. campestris* pv.
291 *campestris* de Pernambuco e confirmada a existência de uma relação muito estreita entre os
292 patovares da espécie *X. campestris*. Sugere-se que o posicionamento taxonômico de *X.*
293 *campestris* pv. *aberrans* e *X. campestris* pv. *armoraciae* sejam revistos. O gene *rpoD* mostrou
294 ser o melhor para revelar as relações filogenéticas entre os patovares.

295

296 **AGRADECIMENTOS**

297

298 A CAPES pela concessão da bolsa de estudo a Edilaine A. Melo e auxílio à pesquisa (Proc.
299 No. 23038.003635/2013-60, AUXPE 1585/2013), e ao CNPq pela concessão da bolsa de
300 pesquisa a Elineide B. Souza (Proc. No. 307348/2011-3) e Rosa L. R. Mariano, e auxílio a
301 pesquisa (Proc. nº 448020/2014-9).

302

303 **REFERÊNCIAS**

304

305 Acqua FCD (2011). Análise por sequências multilocus de *Xanthomonas fuscans* subsp.
306 *aurantifolii*. Doctoral thesis, UNESP, Jaboticabal.
307 Ah-You N, Gagnevin L, Grimont PAD, Brisse S, Nesme X, Chiroleu F, Bui, TL, Jouen E,
308 Lefeuvre P, Vernière C and Pruvost O (2009). Polyphasic characterization of

- 309 xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to
310 species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 306-318.
- 311 Almeida NF, Yan SC, Cai RM, Clarke CR, Morris CE, Schaad NW, Schuenzel EL, Lacy GH,
312 Sun XA, Jones JB, Castillo JA, Bull CT, Leman S, Guttman DS, Setubal JC, Vinatzer
313 BA (2010). PAMDB, A multilocus sequence typing and analysis database and website
314 for plant-associated Microbes. *Phytopathology* 100: 208-215.
- 315 Alvarez AM, Benedict AA, Mizumoto CY, Hunter JE and Gabriel DW (1994). Serological,
316 pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv.
317 *campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84: 1449-1457
- 318 Bogdanove AAJ, Koebnik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli SSV, Patil PPB, Van Sluys MA,
319 Ryan RP, Meyer DF, Han SW, Aparna G, Rajaram M, Delcher AL, Phillippy AM, Puiu
320 D, Schatz MC, Shumway M, Sommer DD, Trapnell C, Benahmed F, Dimitrov G,
321 Madupu R, Radune D, Sullivan S, Jha G, Ishihara H, Lee SW, Pandey A, Sharma V,
322 Sriariyanun M, Szurek B, Vera-Cruz CM, Dorman KS, Ronald PC, Verdier V, Dow
323 JM, Sonti RV, Tsuge S, Brendel VP, Rabinowicz PD, Leach JE, White FF e Salzberg
324 SL (2011). Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue
325 specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J. Bacteriol.* 193: 5450-5464.
- 326 Boudon S, Manceau C e Nottéghem JL (2005). Structure and Origin of *Xanthomonas*
327 *arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western
328 Europe. *Phytopathology* 95: 1081–1088.
- 329 Bradbury JF (1986). *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International, Kew, Surrey,
330 UK.
- 331 Celetti MJ e Callow KA (2002). *Black rot of crucifer crops*. Ministry of Agriculture and
332 Food, Ontary.

- 333 Fargier E e Manceau CA (2007). Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas*
334 *campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv.
335 *campestris*. Plant Pathol. 56: 805–818.
- 336 Fargier E, Saux MF e Manceau CA (2011). Multilocus sequence analysis of *Xanthomonas*
337 *campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this
338 species. Syst. Appl. Microbiol. 34: 156–165.
- 339 Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van De
340 Peer Y, Vandamme P, Thompson FL e Swings J (2005). Opinion: Re-evaluating
341 prokaryotic species. Nature Rev. Microbiol. 3: 733-739.
- 342 Glaeser SP e Kämpfer P (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic
343 taxonomy. Syst. Appl. Microbiol. 38: 237–245.
- 344 Ignatov A, Sechler A, Schuenzel EL, Agarkova I, Oliver B, Vidaver AK e Schaad NW
345 (2007). Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in
346 cruciferous weeds in central coastal California. Phytopathology 97: 803-812.
- 347 Jensen BD, Vicente JG, Manandhar HK e Roberts SJ (2010). Occurrence and diversity of
348 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable *Brassica* fields in Nepal. Plant
349 Dis. 94: 298-305.
- 350 Lange HW, Tancos MA, Carlson MO e Smart CD (2016). Diversity of *Xanthomonas*
351 *campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York state. Phytopathology 106:
352 113-122.
- 353 Maiden MCJ (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 60: 561-
354 588.
- 355 Martens M, Delaere M, Coopman P, Vos PD, Gillis M e Willems A (2007). Multilocus
356 sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 489-503.

- 357 Melo EA (2016). Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de
358 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco. Doctoral thesis,
359 Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife.
- 360 Moreira LM, Almeida NF, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, Silva AC, Silva
361 AM, Moraes FE, Oliveira JC, Souza RF, Facincani AP, Ferraz AL, Ferro MI, Furlan
362 LR, Gimenez DF, Jones JB, Kitajima EW, Laia ML, Leite RP, Nishiyama MY, Neto
363 JR, Nociti LA, Norman DJ, Ostroski EH, Pereira HA, Staskawicz BJ, Tezza RI, Ferro
364 JA, Vinatzer BA e Setubal JC (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus
365 canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp.
366 *aurantifolii*. BMC Genomics 11: 1-25.
- 367 Parkinson N, Cowie C, Heeney J e Stead D (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas*
368 determined by comparison of *gyrB* sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 264-74.
- 369 Peruch L, Michereff SJ e Araújo IB (2006). Levantamento da intensidade da alternariose e
370 podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina.
371 Hortic. Bras. 24: 464-469.
- 372 Rademaker JLW, Hoste B, Lowus FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P e Bruijn
373 FL (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA- DNA
374 homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:
375 665-677.
- 376 Rathaur PS, Singh D, Raghuwanshi R e Yadava DK (2015). Pathogenic and genetic
377 characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races based on Rep-PCR
378 and Multilocus Sequence Analysis. J. Plant Pathol. Microbiol. 6: 317.
- 379 Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum e MR (2013). Life: The Science of Biology. 10^o
380 ed. Sinauer Associates, U.S.A.

- 381 Singh D, Rathaur PS e Vicente JG (2016). Characterization, genetic diversity and distribution
382 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in
383 cruciferous crops of India. Plant Pathol. DOI: 10.1111/ppa.12508.
- 384 Staden R, Beal KF e Bonfield JK (1998). The Staden Package. Bioinform. Met. Prot. 132:
385 115-130.
- 386 Tonin MF, Rodrigues-Neto J, Harakava R e Destefano SAL (2012). Phylogenetic analysis of
387 *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-
388 RFLP. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1419–1424.
- 389 Vauterin L, Hoste B, Kersters K e Swing J (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J.
390 Syst. Bacteriol. 45: 472-489.
- 391 Vicente JG, Conway J, Roberts SJ e Taylor JD (2001). Identification and origin of
392 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. Phytopathology
393 91: 492-499.
- 394 Vicente JG, Everett B e Roberts SJ (2006). Identification of isolates that cause a leaf spot
395 disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic
396 comparison with related pathovars. Phytopathology. 96: 735-745.
- 397 Young JM, Park DS, Shearman HM e Fargier E (2008). A multilocus sequence analysis of the
398 genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 31: 366-377.
- 399 Young JM, Wilkie JP, Park DC e Watson DRW (2010). New Zealand strains of plant
400 pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of
401 *Xanthomonas dyei* sp. nov. Plant Pathol. 59: 270–281.
- 402 Zhao Y, Damicone JP, Demezas DH e Bender CL (2000). Bacterial leaf spot diseases of leafy
403 crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. Plant Dis. 84:
404 1008-1014.
- 405 Zhu L, Xie H, Chen S e Ma R. (2010). Rapid isolation, identification and phylogenetic
406 analysis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. J. Plant Pathol. 92: 479-483.

407 **Tabela 1.** Isolados de *Xanthomonas campestris* utilizados no estudo.

Strains*	Host	Origin
<i>X. campestris</i> pv. <i>aberrans</i>		
IBSBF885	<i>B. oleracea</i>	Austrália
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>		
IBSBF1102	<i>Iberis</i> sp.	Tanzânia
<i>X. campestris</i> pv. <i>barbareae</i>		
IBSBF773	<i>Barbarea vulgaris</i>	USA
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
CRMXcc71	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Saloá
CRMXcc75	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Camocim de São Félix
CRMXcc158	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Saloá
CRMXcc189	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Bom Jardim
CRMXcc219	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Bom Jardim
CRMXcc230	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Bom Jardim
CRMXcc232	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Bom Jardim
CRMXcc240	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Bom Jardim
CRMXcc265	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Bom Jardim
CRMXcc15	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Bezerros
CRMXcc18	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Bezerros
CRMXcc343	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Chã Grande
CRMXcc345	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Saloá
CRMXcc308	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Sairé
CRMXcc8	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Chã Grande
CRMXcc150	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Chã Grande
CRMXcc302	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Chã Grande
CRMXcc313	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Chã Grande
CRMXcc324	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Chã Grande
IBSBF 959	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i>	Brasil
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>		
IBSBF1590	<i>Raphanus sativus</i>	USA

408 * CRMXcc = isolados oriundos do estado de Pernambuco, Brasil, obtidos da Coleção de
409 Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE, Pernambuco, Brasil;
410 IBSBF = isolados obtidos da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, São
411 Paulo, Brasil;

412 **Tabela 2.** Sequências de referência da espécie *Xanthomonas campestris* usados para análises
 413 filogenéticas.

Isolados*	Hospedeiro	Origem
<i>X. campestris</i> pv. <i>aberrans</i>		
CFPB6865	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Austrália
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
CFPB ² 5241	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Reino Unido
CFPB5817	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Chile
CFPB5818	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Espanha
CFPB5820	<i>B. oleracea</i>	-
0407	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	New York
<i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i>		
CFPB1606	Ornamental crucifers	França
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>		
756C	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	East Ásia

414 * Sequências do Genbank (Fargier et al. 2011; Lange et al. 2016).

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427 **Tabela 3.** *Primers* utilizados para amplificação por PCR de genes *housekeeping* (Fargier et
 428 al., 2011)

Genes	Temperatura de anelamento (°C)	Sequência (5'-3')
<i>atpD</i>	60	GGGCAAGATCGTTCAGAT GCTCTTGGTCGAGGTGAT
<i>glnA</i>	62	ATCAAGGACAACAAGGTCG GCGGTGAAGGTCAGGTAG
<i>gyrB</i>	60	TGCGCGGCAAGATCCTCAAC GCGTTGTCCTCGATGAAGTC
<i>rpoD</i>	62	ATGGCCAACGAACGTCCTGC AACTTGTAACCGCGACGGTATTCG
<i>fyuA</i>	62	ACCATCGACATGGACTGGACC GTCGCCGAACAGGTTACC
<i>tpiA</i>	57	GGAAATTGGAAGCTGCATGG GAARTCTTCGGCRACCAGT

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441 **Tabela 4.** Variação genética de seis genes de 19 isolados de *Xanthomonas campestris* pv.
 442 *campestris* do estado de Pernambuco

Genes	Fragmento sequenciado (pb)	Nº Haplótipos	Nº de sítios polimórficos	Sítios variáveis (%)
<i>atpD</i>	448	8	13	2,9%
<i>glnA</i>	543	5	8	1,4%
<i>gyrB</i>	478	3	5	1,0%
<i>rpoD</i>	684	9	47	10,5%
<i>fyuA</i>	638	11	31	4,8%
<i>tpiA</i>	558	10	21	3,8%
Concatenado	3349	19	125	3,7%

443

444

445

446

447

448

449

450

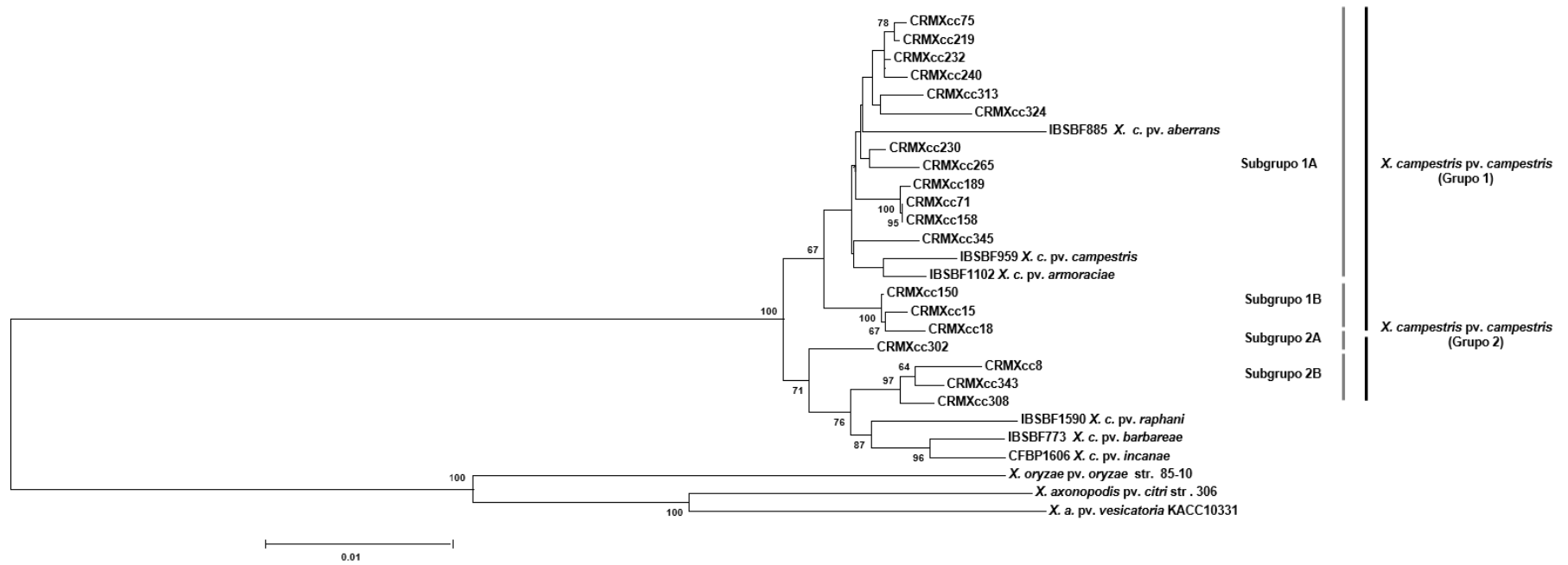
451

452

453

454

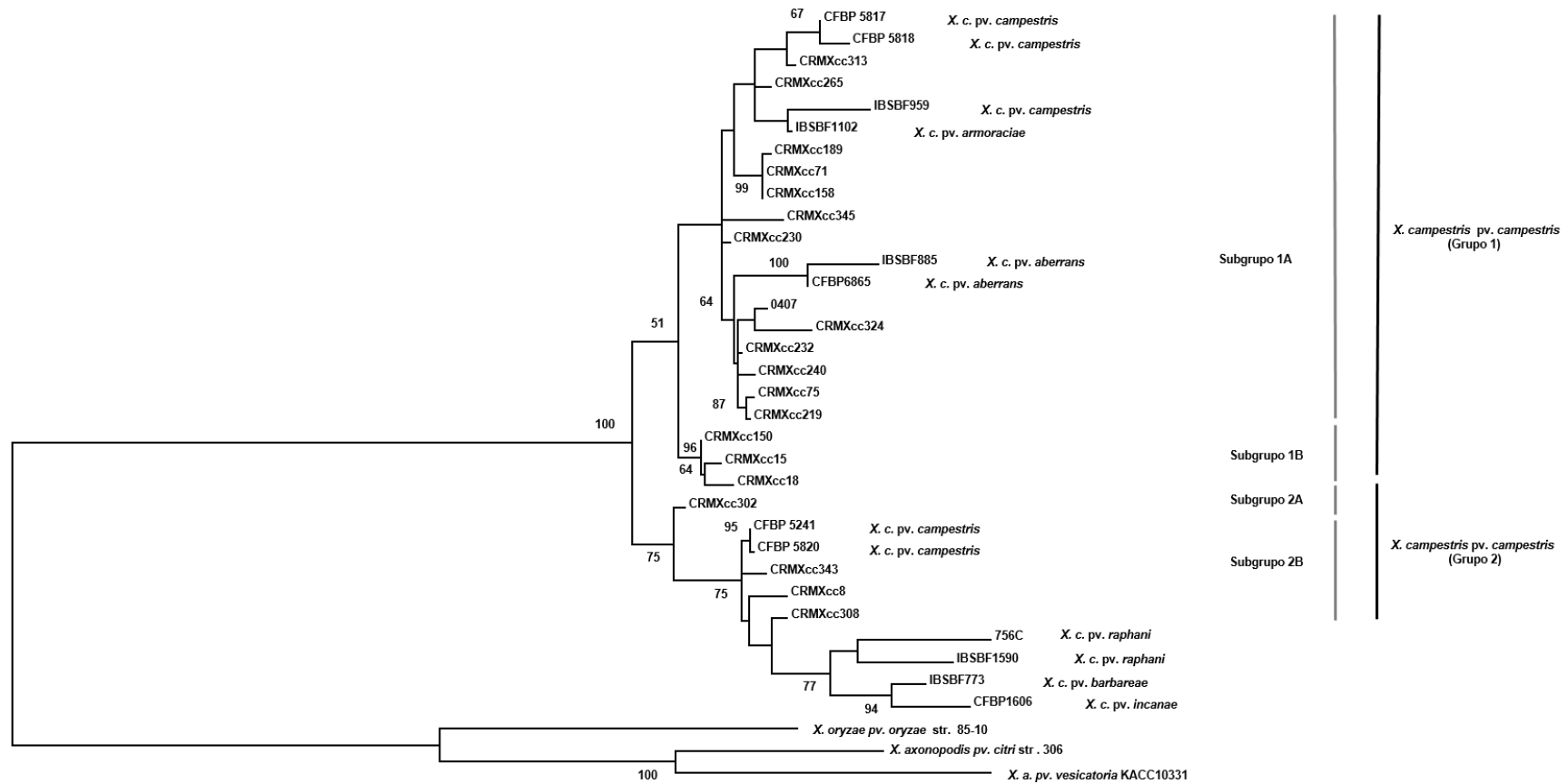
455



456

457 **Figura 1.** Árvore filogenética de sequências de seis genes concatenados (*atpD*, *fyuA*, *glnA*, *rpoD*, *tipA* e *gyrB*) para isolados de *Xanthomonas campestris* pv.
 458 *campestris*, baseado no método Neighbor-Joining (NJ) com o coeficiente de Jukes-cantor. Os valores dos ramos indicam porcentagem de bootstrap de 1000
 459 repetições.

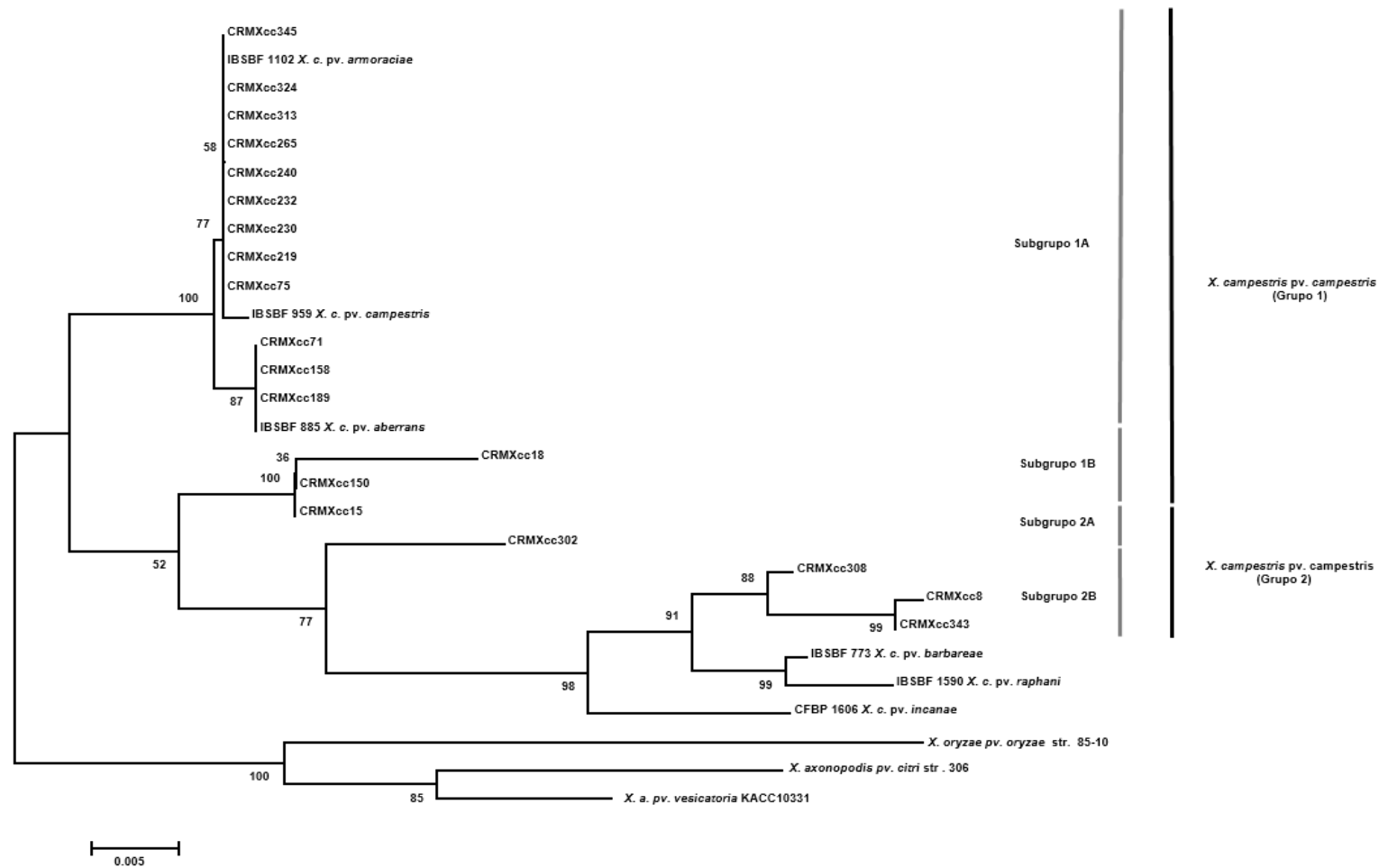
460



461

462 **Figura 2.** Árvore filogenética de seqüências de seis genes concatenados (*atpD*, *gyrB*, *fyuA*, *glnA*, *rpoD* e *tipA*) para isolados de *Xanthomonas campestris* pv.

463 *campestris*, baseado no método Máxima verossimilhança. Os valores dos ramos indicam porcentagem de bootstrap de 1000 repetições.



484

485 **Figura 4.** Árvore filogenética do gene *rpoD* para isolados da espécie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, baseado no método Neighbor-Joining (NJ) com
 486 o coeficiente de Jukes-cantor. Os valores dos ramos indicam porcentagem de bootstrap de 1000 repetições.

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- A população de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* dos principais municípios produtores de brássicas de Pernambuco possui uma alta variabilidade genética e é recombinogênica.
- Não existe uma estruturação populacional de *X. campestris* pv. *campestris* nos municípios pernambucanos de Bom Jardim, Bezerros, Camocim de São Félix, Saloá e Sairé (Agreste) e Chã Grande (Zona da Mata), e nos hospedeiros brócolis, couve-comum, couve-flor e repolho.
- Esse é o primeiro estudo sobre estruturação genética de populações de *X. campestris* pv. *campestris* infectando brássicas em Pernambuco e no Brasil.
- Alta diversidade genética de 19 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* também foi demonstrada através da análise filogenética de seis genes *housekeeping* (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *fyuA*, *rpoD* e *tpiA*), com formação de 19 haplótipos.
- Para estudos de relações filogenéticas de *X. campestris* pv. *campestris* com outros patovares desta espécie é indicado o gene *rpoD*.