

AVALIAÇÃO DA REGIÃO ESPAÇADORA 16S-23S DNAR COMO MARCADOR  
MOLECULAR PARA DIFERENCIAÇÃO DE *ACIDOVORAX AVENAE*  
SUBSP. *CATTLEYAE* E *BURKHOLDERIA GLADIOLI* PV.  
*GLADIOLI* PATOGENICAS A ORQUÍDEAS

D.B.A. Corrêa<sup>1,2\*</sup>, M. Ferreira<sup>1</sup>, D.M. Balani<sup>1</sup>, J. Rodrigues Neto<sup>1</sup>, S.A.L. Destéfano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Biológico, Centro Experimental Central do Instituto Biológico, CP 70, CEP 13001-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: suzete@biologico.sp.gov.br

RESUMO

A região espaçadora 16S-23S DNAr foi avaliada como marcador molecular para a diferenciação dos patógenos de orquídeas, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*. Outras espécies pertencentes a esses dois gêneros como *B. gladioli* pv. *alliicola*, *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *A. anthurii*, *A. facilis*, *A. delafieldii* e *A. konjaci* também foram analisadas. A amplificação por PCR dessa região produziu um fragmento de aproximadamente 1.100 pares de bases para todas as linhagens testadas. Os produtos obtidos foram submetidos a digestões com as enzimas *Afa* I, *Alu* I, *Hae* III e *Hpa* II e os resultados mostraram perfis distintos de RFLP para *A. avenae* subsp. *cattleyae* de *B. gladioli* pv. *gladioli* com todas as endonucleases testadas. As seqüências da região espaçadora 16S-23S DNAr foram alinhadas e a análise filogenética confirmou as diferenças entre *A. avenae* subsp. *cattleyae* e *B. gladioli* pv. *gladioli*. A técnica de PCR-RFLP mostrou-se eficiente e muito útil para a identificação desses patógenos, uma vez que eles causam sintomas muito semelhantes em orquídeas.

PALAVRAS-CHAVE: PCR-RFLP, diagnóstico de fitobactérias, *Phalaenopsis* sp.

ABSTRACT

EVALUATION OF 16S-23S rDNA SPACER REGION AS A MOLECULAR MARKER TO DIFFERENTIATION OF *ACIDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CATTLEYAE* AND *BURKHOLDERIA GLADIOLI* PV. *GLADIOLI* PATHOGENIC TO ORCHIDS. The 16S-23S rDNA spacer region was evaluated as a molecular marker to differentiation of orchids pathogens, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* and *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*. Other species belonging to the two genera such as *B. gladioli* pv. *alliicola*, *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *A. anthurii*, *A. facilis*, *A. delafieldii* and *A. konjaci* were also analyzed. The PCR amplification of the 16S-23S rDNA spacer region produced a fragment of 1,100 base pairs. The products obtained from all strains were digested with *Afa* I, *Alu* I, *Hae* III and *Hpa* II and the results showed distinct RFLP patterns for each endonuclease tested. The sequences of 16S-23S rDNA spacer region were aligned and the phylogenetic analysis confirmed the differences between *A. avenae* subsp. *cattleyae* e *B. gladioli* pv. *gladioli*. The PCR-RFLP technique was very efficient and useful to the identification of these pathogens since they cause very similar symptoms in orchids.

KEY WORDS: PCR-RFLP, phytobacteria diagnosis, *Phalaenopsis* sp.

INTRODUÇÃO

As exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais vêm se destacando expressivamente nos últimos anos, principalmente a partir do ano 2000, com crescimento contínuo tanto no valor das exportações quanto no saldo comercial. O setor no

Brasil, que vem crescendo a cada ano, acumulou vendas internacionais no valor de US\$ 29,6 milhões em 2006, representando um aumento de 14,8% em relação ao ano anterior, segundo a Secretaria de Comércio Exterior, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (SECEX/MDCI) (KIYUNA *et al.*, 2007).

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

\*Bolsista CNPq/PIBIC.

As mudas de plantas ornamentais representam o principal produto de exportação brasileira na área de flores e plantas. O segmento apresentou aumento nas exportações nos últimos anos, atestando o vigor e a agressividade do exportador nacional. O mesmo avanço pode ser verificado nas exportações de mudas de orquídeas que acumularam vendas de US\$ 45 mil no primeiro trimestre de 2005, representando um crescimento de 102,37% em relação ao mesmo período de 2004. Os principais mercados internacionais consumidores de orquídeas são Reino Unido, Estados Unidos, Japão, Hong Kong e Alemanha (GONDIM *et al.*, 2005).

Bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Dickeya* (sin. *Erwinia*) e *Pectobacterium* (sin. *Erwinia*) causam diversos prejuízos à exploração comercial de orquídeas, podendo inclusive provocar a morte de plantas afetadas em curto espaço de tempo. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* causa necrose de folhas, morte de gemas e de plantas. As folhas infectadas apresentam inicialmente lesões irregulares e de diferentes tamanhos, podendo atingir todo o limbo e o pseudocaule, e resultar na morte da planta. *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* causa lesões foliares escuras, grosseiramente circulares, que podem levar à destruição do limbo foliar (MALAVOLTA JUNIOR; ALMEIDA, 1998).

Os sintomas de manchas foliares provocados por *A. avenae* subsp. *cattleyae* e *B. gladioli* pv. *gladioli* são muito similares e a identificação do patógeno está baseada em testes bioquímicos convencionais. O diagnóstico com base nos sintomas pode ser efetuado, porém será apenas presuntivo e necessitará de confirmação em laboratório. As técnicas convencionais demandam longo tempo, uma vez que exigem a realização de testes cujos resultados podem requerer dias ou semanas para avaliação. Os métodos moleculares baseados nas análises de seqüências de DNA oferecem maior precisão e sensibilidade quando comparados aos métodos convencionais de análise de caracteres fenotípicos, pois utilizam um critério universal presente em todos os organismos, permitindo, assim, a comparação entre grupos de microrganismos que desempenham funções diferentes no ambiente.

Técnicas moleculares como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction), seqüências 16S do DNA ribossomal (DNAr), região espaçadora 16S-23S DNAr, entre outras, vêm sendo aplicadas no estudo da diversidade dos fitopatógenos em geral acarretando profundas alterações na taxonomia das fitobactérias, e resultando em novas composições de grupos e/ou espécies, inclusive com a proposição de novas espécies e patovares, bem como o conhecimento em nível inter e infra-específico.

Dados de seqüências da região espaçadora entre os genes 16S-23S DNAr têm se acumulado em anos recentes, e o alinhamento de seqüências disponíveis em bancos de dados evidenciou que não existem regiões altamente conservadas nessa molécula e que pode ocorrer variação considerável entre as espécies, tanto no tamanho como na seqüência de bases (GÜRTLER; STANISICH, 1996).

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação da região espaçadora 16S-23S DNAr como marcador molecular para a diferenciação de *A. avenae* subsp. *cattleyae* e *B. gladioli* pv. *gladioli* patogênicas a orquídeas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Linhagens.** As linhagens bacterianas utilizadas no presente estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Laboratório de Bacteriologia Vegetal, Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, SP e estão listadas na Tabela 1. As linhagens, preservadas por liofilização, foram reativadas e cresceram em meio NA (Extrato de carne 3 g; Peptona 5 g; NaCl 5 g e ágar 15 g por litro), a 28° C/48h. Para a extração de DNA, as linhagens foram cultivadas em 5 mL de meio NB (NA sem adição de Ágar) por 16-18h/28° C/180 rpm.

**Extração de DNA e amplificação.** O DNA cromossômico foi extraído segundo a metodologia descrita por PITCHER *et al.* (1989) e a pureza e quantificação do DNA das amostras foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,1 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultra-violeta e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200. Para realização da PCR foram utilizados aproximadamente 200 ng de DNA genômico em reações de 25 mL contendo 2,0 U de *Taq* polimerase (GE Healthcare); tampão da enzima *Taq* 1X; 0,4 mM de uma mistura de dNTPs e 0,4 mM de cada *primer*. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95° C/2min.; seguido de 30 ciclos a 94° C/1min.; 60° C/1min. e 72° C/3min; e um ciclo a 72° C/5min. (extensão final). Os experimentos foram realizados em termociclador da marca Perkin Elmer modelo 9700. O par de *primers* utilizado para a amplificação da região espaçadora 16S-23S foi pHr [5' TGCGGC TGG ATC ACC TCC TT 3'] (MASSOL-DEYA *et al.*, 1995) e p23Suni322-anti [5' GGT TCT TTT CAC CTT TCC CTC 3'] (HONEYCUT *et al.*, 1995).

Tabela 1 - Linhagens utilizadas neste estudo.

Linhagens	IBSBF	Hospedeiro	Origem
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	209 <sup>P</sup>	Orquídea (gênero e espécie não caracterizados)	USA
	1009	<i>Phalaenopsis</i> sp.	Brasil
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	1854 <sup>T</sup>	<i>Zea mays</i>	USA
	342	<i>Saccharum officinarum</i>	Ilhas Reunião
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	1851 <sup>P</sup>	<i>Citrullus lanatus</i>	USA
	1521	<i>Cucumis melo</i>	Brasil
<i>Acidovorax anthurii</i>	1977 <sup>T</sup>	<i>Anthurium</i> sp.	Martinique
	1542	<i>Anthurium</i> sp.	Martinique
<i>Acidovorax konjaci</i>	1973 <sup>T</sup>	<i>Amorphophallus rivieri</i>	Japão
<i>Acidovorax delafieldii</i>	1978 <sup>T</sup>	Solo	USA
<i>Acidovorax facilis</i>	1976 <sup>T</sup>	Solo	USA
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>Gladioli</i>	546 <sup>T</sup>	<i>Gladiolus</i> sp.	USA
	1277	Orquídea (gênero e espécie não caracterizados)	Brasil
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	534 <sup>P</sup>	<i>Allium cepa</i>	USA
<i>Xanthomonas</i> sp.*	-	-	-

<sup>T</sup> = linhagem tipo; <sup>P</sup> = linhagem referência do patovar; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil).

\*Número de acesso no GenBank AY940636.

**Análise dos fragmentos de restrição.** Do produto gerado da amplificação por PCR, 4 mL foram digeridos individualmente com as seguintes enzimas de restrição: *Afa* I, *Alu* I, *Hae* III ou *Hpa* II em reações de 15 mL contendo 5U da enzima por reação. As condições de temperatura foram empregadas de acordo com as recomendações do fabricante (Fermentas). A observação do perfil de restrição obtido foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 3%.

**Sequenciamento e análise filogenética da região espaçadora 16S-23S DNAr.** Os produtos de amplificação correspondentes à região espaçadora 16S-23S DNAr das linhagens de *Acidovorax* spp. e *Burkholderia* spp. foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences) de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior sequenciamento. Após as purificações, o DNA das diferentes linhagens foi quantificado em gel de agarose 1%. As reações para sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems) utilizando-se o par de primers pHr e p23Suni322-anti e a purificação da reação foi feita segundo o fabricante do kit. As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no sequenciador automático, marca Applied Biosystems, modelo ABI Prism 377. Para a comparação foi utilizada a região espaçadora 16S-23S das linhagens sequenciadas neste estudo assim como de uma linhagem de *Xanthomonas* sp., cuja sequência foi obtida na base de dados do GenBank e foi utilizada como grupo externo na análise filogenética. As sequências foram editadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas com o uso do programa ClustalX (THOMPSON

*et al.*, 1997). As seqüências alinhadas foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética usando-se o método *Neighbour-Joining* no programa MEGA (KUMAR *et al.*, 2004). Análises de *bootstrap* com 1000 repetições foram realizadas para prover suporte para aos braços da árvore filogenética obtida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr de *A. avenae* subsp. *avenae* (IBSBF 1854<sup>T</sup>), *A. avenae* subsp. *citrulli* (IBSBF 1851<sup>P</sup>), *A. avenae* subsp. *cattleyae* (IBSBF 209<sup>P</sup>), *A. anthurii* (IBSBF 1977<sup>T</sup>), *A. konjaci* (IBSBF 1973<sup>T</sup>), *A. delafieldii* (IBSBF 1978<sup>T</sup>), *A. facilis* (IBSBF 1976<sup>T</sup>), *B. gladioli* pv. *alliicola* (IBSBF 534<sup>P</sup>) e *B. gladioli* pv. *gladioli* (IBSBF 546<sup>T</sup>) produziu um fragmento de aproximadamente 1.100 pares de bases (pb) para todas as linhagens testadas. Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à digestão com as endonucleases e apresentaram sítios de restrição para todas as enzimas testadas, sendo detectado polimorfismo entre a maioria das linhagens analisadas (Figs. 1 e 2).

Os perfis de restrição das linhagens de *Burkholderia* foram idênticos nas digestões com as enzimas *Hae* III, *Hpa* II e *Alu* I. No entanto, a digestão com a enzima *Afa* I gerou diferentes perfis entre os patovares de *Burkholderia gladioli*. O padrão de bandas de *B. g.* pv. *gladioli*, patogênica a orquídeas, mostrou fragmentos de aproximadamente 900 e 100 pb. *B. g.* pv. *alliicola* exibiu um perfil de restrição distinto com fragmentos de aproximadamente 500, 340 e 100 pb (Fig.1).

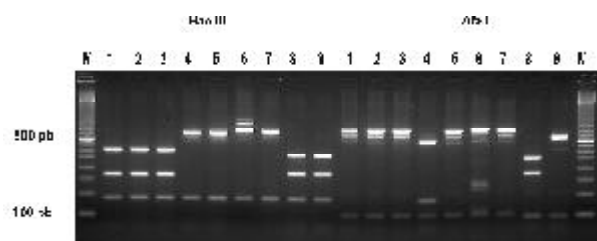


Fig. 1 - Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr com as enzimas *Hae* III e *Afa* I. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Amersham Biosciences); (1) *A. a.* subsp. *avenae* (IBSBF 1854<sup>T</sup>); (2) *A. a.* subsp. *cattleyae* (IBSBF 209<sup>T</sup>); (3) *A. a.* subsp. *citrulli* (IBSBF 1851<sup>T</sup>); (4) *A. anthurii* (IBSBF 1977<sup>T</sup>); (5) *A. konjaci* (IBSBF 1973<sup>T</sup>); (6) *A. delafieldii* (IBSBF 1978<sup>T</sup>); (7) *A. facilis* (IBSBF 1976<sup>T</sup>); (8) *B. g. pv. alliicola* (IBSBF 534<sup>T</sup>); (9) *B. g. pv. gladioli* (IBSBF 546<sup>T</sup>).

Com relação às linhagens do gênero *Acidovorax*, nas digestões com *Alu* I, *Hae* III e *Hpa* II as linhagens da espécie *A. avenae* apresentaram perfis distintos das outras espécies do gênero. Nos testes com as enzimas *Afa* I, *Alu* I e *Hae* III as linhagens *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *A. a.* subsp. *citrulli* e *A. a.* subsp. *avenae* apresentaram perfis idênticos, o que evidenciou alta similaridade dessa região nessas subespécies. Das enzimas utilizadas apenas *Hpa* II gerou perfil que permitisse a diferenciação de *A. a.* subsp. *citrulli* das demais subespécies que nova-

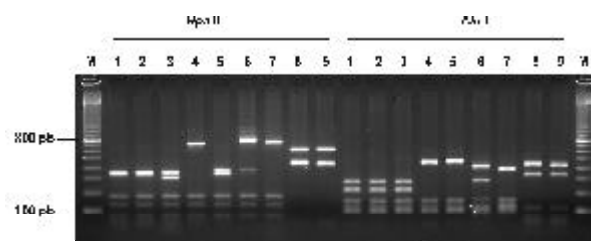


Fig. 2 - Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr com as enzimas *Hpa* II e *Alu* I. (M) marcador de peso molecular de 100pb (Amersham Biosciences); (1) *A. a.* subsp. *avenae* (IBSBF 1854<sup>T</sup>); (2) *A. a.* subsp. *cattleyae* (IBSBF 209<sup>T</sup>); (3) *A. a.* subsp. *citrulli* (IBSBF 1851<sup>T</sup>); (4) *A. anthurii* (IBSBF 1977<sup>T</sup>); (5) *A. konjaci* (IBSBF 1973<sup>T</sup>); (6) *A. delafieldii* (IBSBF 1978<sup>T</sup>); (7) *A. facilis* (IBSBF 1976<sup>T</sup>); (8) *B. g. pv. alliicola* (IBSBF 534<sup>T</sup>); (9) *B. g. pv. gladioli* (IBSBF 546<sup>T</sup>).

mente apresentaram perfis idênticos. O padrão de restrição de *A. avenae* subsp. *cattleyae* e *A. a.* subsp. *avenae*, mostrou fragmentos de aproximadamente 350, 180, 140 e outros menores que 100 pb. *A. a.* subsp. *citrullise* diferenciou das demais subespécies por apresentar, além dos fragmentos já citados, uma banda de 300 pb (Fig. 2).

Os patógenos de orquídeas, *A. avenae* subsp. *cattleyae* e *B. g. pv. gladioli*, apresentaram perfis de restrição distintos com todas enzimas utilizadas e com isso puderam ser claramente diferenciados.

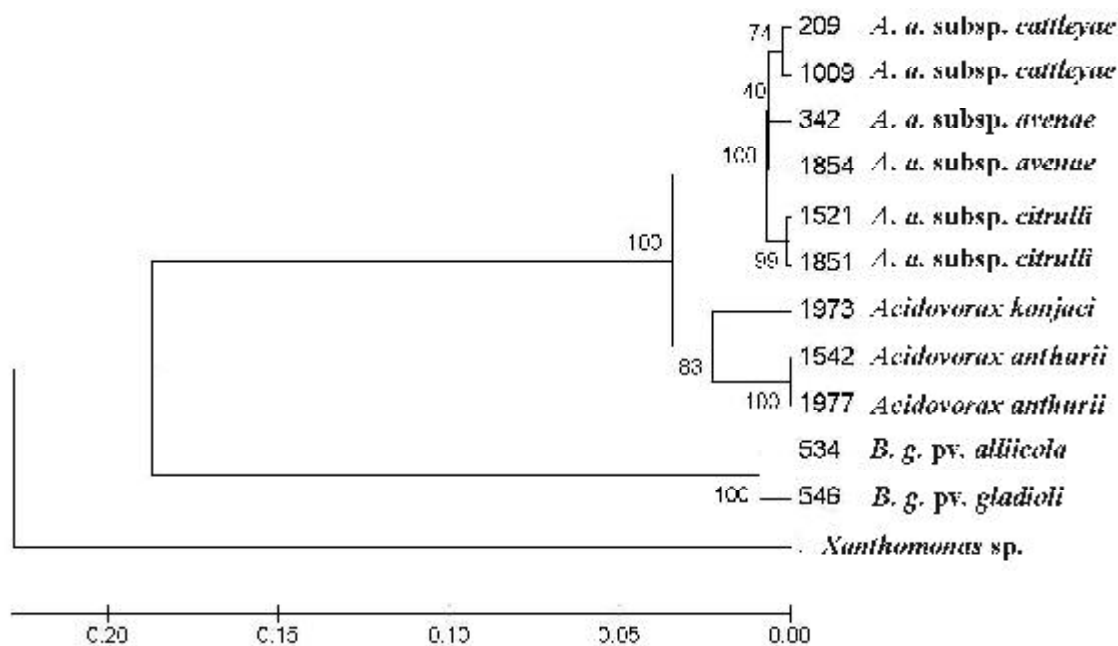


Fig. 3 - Árvore filogenética construída usando o método *Neighbour-Joining*, baseada em seqüências da região espaçadora 16S-23S DNAr de linhagens de *Acidovorax* e *Burkholderia*, com *Xanthomonas* sp. como grupo externo. O número sobre os braços são valores de *bootstrap* obtidos em 1000 repetições (expressos em porcentagem).

A partir do resultado do sequenciamento, as seqüências correspondentes à região espaçadora 16S-23S DNAr foram alinhadas para a construção de uma árvore filogenética (Fig. 3). A análise da árvore revelou que as linhagens do gênero *Burkholderia* e as pertencentes ao gênero *Acidovorax* formaram grupos distintos. Além disso, as linhagens representantes do gênero *Acidovorax* formaram dois agrupamentos principais separando as linhagens da espécie *A. avenae* das demais espécies do gênero. Em cada um dos grupos, isolados de uma mesma espécie se mostraram muito similares ou idênticos entre si e o que os diferenciaram foram poucas bases distintas presentes em suas seqüências, como observado com as subespécies de *A. avenae*. O dendrograma mostra, também, alta similaridade entre os patovares da espécie *Burkholderia gladioli*, as quais formaram um agrupamento bem distinto do grupo de *Acidovorax*, indicando que as seqüências da região espaçadora 16S-23S DNAr, podem distinguir claramente esses dois gêneros.

A amplificação por PCR tem permitido a análise da região espaçadora 16S-23S de microrganismos com o propósito de detectar heterogeneidade entre e dentro de espécies (BARRY *et al.*, 1991; JENSEN *et al.*, 1993; KOSTMAN *et al.*, 1995), possibilitando a identificação e tipagem dos organismos. Desse modo, MANCEAU; HORVAIS (1997) obtiveram a diferenciação em nível infra-específico de linhagens de *Pseudomonas syringae* por meio da técnica de PCR-RFLP da região espaçadora. *Xanthomonas* patogênicas aos citros (DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2002) e à cana-de-açúcar (DESTÉFANO *et al.*, 2003) também puderam ser diferenciadas por essa metodologia. A partir da análise de seqüências variáveis dessa região em linhagens de dois patovares associados a doenças em cereais, MAESET *al.* (1996) desenharam *primers* específicos para os diversos patovares de *Xanthomonas* que causam CLS (*Cereal Leaf Streak*).

No presente estudo, os resultados obtidos reforçaram a aplicabilidade da região espaçadora na diferenciação de microrganismos. O PCR-RFLP bem como a árvore filogenética, construída a partir de dados de alinhamento das seqüências da região espaçadora 16S-23S DNAr, revelaram que há grandes diferenças nessa região entre os patógenos de orquídeas. A técnica empregada mostrou-se eficiente para o diagnóstico de *A. a.* subsp. *cattleyae* e *B. g.* pv. *gladioli*, uma vez que esses microrganismos causam sintomas muito semelhantes naqueles hospedeiros. Esses resultados demonstram a possibilidade de utilização desta região para o desenho de *primers* específicos para a detecção de cada um desses patógenos, otimizando assim, a metodologia de diagnóstico desenvolvida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica PIBIC/IB concedida para a aluna Daniele Bussioli Alves Corrêa e ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LBV) do Centro Experimental Central do Instituto Biológico (CEIB), Campinas (SP) pela cessão das instalações para a condução dos experimentos.

## REFERÊNCIAS

- BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L.K.; GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods and Applications*, v.1, p.51-56, 1991.
- DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES NETO, J. Rapid Differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants based on Polymerase Chain Reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Summa Phytopathologica*, v.28, p.167-172, 2002.
- DESTÉFANO, S.A.L.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; FERREIRA, M.; BALANI, D.M. Differentiation of *Xanthomonas* species pathogenic to sugarcane by PCR-RFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology*, v.109, p.283-288, 2003.
- GONDIM, A.; GONDIM, P.; LAGE, M.; BONELLI, A.; FRAGA, F.; TEIXEIRA, G.; TAVARES, K. Sudeste - São Paulo: Olíder do agronegócio de flores. *Revista Sebrae - Agronegócios*, n.1, p.36-37, 2005. Disponível em: <[http://www.sebrae.com.br/br/revista\\_agro/sp.asp](http://www.sebrae.com.br/br/revista_agro/sp.asp)>. Acesso em: 12 ago. 2006.
- GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, v.142, p.3-16, 1996.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98, 1999.
- HONEYCUT, R.J.; SDBRAL, B.W.S.; MCCLELLAND, M. Trna intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic of *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*, v.141, p.3229-3239, 1995.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.4, p.945-952, 1993.
- KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J. Floricultura: desempenho do comércio exterior em 2006. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, São Paulo, v. 1, n. 2, 2007. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=8748>>. Acesso em: 10 jul. 2007.
- KOSTMAN, J.R.; ALDEN, M.B.; MAIR, M.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J.; STULL, T.L. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Infection Disease*, v.171, p.204-208, 1995.

- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, versão 3.1. *Briefings in Bioinformatics*, v.5, p.150-163, 2004.
- MAES, M.; GARBEVA, P.; KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, v.86, n.1, p.63-69, 1996.
- MALAVOLTA JUNIOR.; V.A.; ALMEIDA, I.M.G. Doenças Bacterianas. In: BERGMANN, E.C.; ALEXANDRE, M.A.V. (Coord.). *Aspectos fitossanitários das orquídeas*. São Paulo: Instituto Biológico, 1998. p.40-44. (Boletim Técnico, n.11)
- MANCEAU, C.; HORVAIS, A. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.2, p.498-505, 1997.
- MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HCKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D.L., VAN ELSAS, J.D., DE BRUIJN, F.J. (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic, 1995. p.3.3.2/1-3.3.2/8.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v.8, p.151-156, 1989.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS D.G. The ClustalX windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v.24, p.4876-4882, 1997.

Recebido em 11/9/06

Aceito em 2/8/07