

Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens**

Valmir Luiz de Souza^{1**}, Antonio Carlos Maringoni^{1,2}, Renate Krause-Sakate¹

¹Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu, SP <vlSouza@yahoo.com.br>, <maringoni@fca.unesp.br>; ¹Bolsista da CAPES.; ²Bolsista do CNPq.

**Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Trabalho desenvolvido com o apoio da Fapesp.

Autor para correspondência: Valmir L. de Souza.

Data de chegada: 10/12/2004. Aceito para publicação em 08/11/2005.

1154

ABSTRACT

Souza, V.L.; Maringoni, A.C.; Krause-Sakate, R. Genetic variability in *Curtobacterium flaccumfaciens* isolates. *Summa Phytopathologica*, v.32, n. 2, p.170-176, 2006.

The bean crop is exposed to many diseases that lead to significant losses, such as the bacterial wilt of common bean caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Currently, the bacterial wilt of common bean has been a new problem for the bean crops in several Brazilian regions. The genetic resistance has been the most efficient approach for disease control; however, the possible existence of genetic variability in Cff isolates may be a harmful consequence to the plant improvement especially in relation to the resistance stability and durability. For this reason, this study aimed the evaluation of the genetic variability of 26 *Curtobacterium flaccumfaciens* isolates, 20 isolates are from bean plants (Cff) collected in different Brazilian regions, four isolates are from international collections (Cff) and two isolates are from citrus endophytic community (*C. flaccumfaciens*). Two pairs of primers (CffFOR2-CffREV4 and CF4-CF5) were evaluated for its specificity in PCR reaction in the characterization of the 26 isolates studied. In the genetic variability evaluation, the rep-PCR technique with the REP, ERIC and BOX primers was used. From the electrophoresis pattern generated by the amplification of

these repetitive sequences in the genomic DNA of the 26 bacterial isolates, a pertinent analysis (UPGMA – SM) and a dendrogram were performed. Considering a 75% similarity index, the isolates were distributed into four distinct groups. The Cff isolates from Paraná and Distrito Federal were separated in distinct groups, while citrus plant endophytic isolates did not form a distinct group from the bean plant ones. The isolates from São Paulo were genetically heterogeneous; and some of them were grouped with the USA, Santa Catarina and citrus plant isolates, while others were grouped with the ones from France and Paraná. The specificity evaluation of the two pairs of primers (CffFOR2-CffREV4 and CF4-CF5) used in the identification of Cff isolates in bean plant and citrus endophytic *Curtobacterium flaccumfaciens* isolates showed that the CffFOR2-CffREV4 combination was highly specific in the identification for the 26 isolates. The CF4-CF5 primers showed less specificity for two Cff isolates in bean plant (2928) and (2936) and for the citrus endophytic isolates. Therefore, as an auxiliary tool in the Cff identification in bean plant, the primers CffFOR2-CffREV4 are the best indication.

Additional keywords: *Phaseolus vulgaris*, bacterial wilt, rep-PCR.

RESUMO

Souza, V.L.; Maringoni, A.C.; Krause-Sakate, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. *Summa Phytopathologica*, v.32, n. 2, p.170-176, 2006.

A cultura do feijoeiro está sujeita à incidência de várias doenças que acarretam perdas significativas na produção, dentre as quais encontra-se a murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Atualmente a murcha-de-curtobacterium tem se constituído em um novo problema para a cultura do feijoeiro em várias regiões brasileiras. A resistência genética tem sido o meio mais eficiente no controle da doença, porém a possibilidade da existência de variabilidade genética presente em isolados de Cff, pode ser uma conseqüência maléfica ao melhoramento visando a obtenção de cultivares de feijoeiro resistentes,

especialmente na estabilidade e durabilidade da resistência. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da variabilidade genética de 26 isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*, 20 dos quais provenientes de feijoeiro (Cff), coletados em diferentes regiões do Brasil, quatro provenientes de coleções internacionais (Cff) e dois endofíticos de citros (*C. flaccumfaciens*). Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos, CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5, avaliando-se na especificidade em reação de PCR, para a caracterização dos 26 isolados. No estudo da variabilidade genética, utilizou-se da técnica rep-PCR e os iniciadores REP, ERIC e BOX. A partir do padrão

eletroforético gerado pela amplificação dessas seqüências repetitivas no DNA genômico dos 26 isolados bacterianos, foram realizadas análises pertinentes (UPGMA – SM) e obtenção de um dendograma. Considerando-se um índice de similaridade de 75%, os isolados foram distribuídos em quatro grupos distintos. Os isolados de Cff provenientes do Paraná e DF foram separados em grupos diferentes, enquanto que isolados endofíticos de citros não formaram um grupamento distinto dos de feijoeiro. Os isolados procedentes do Estado de São Paulo mostraram-se geneticamente heterogêneos, alguns se agruparam

com o isolado de USA, Santa Catarina e de citros, enquanto outros agruparam-se com isolados provenientes da França e Paraná. A avaliação da especificidade dos dois pares de oligonucleotídeos, mostrou que os oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 detectaram todos os 26 isolados. Os oligonucleotídeos CF4-CF5 apresentaram menor especificidade não detectando dois isolados de Cff de feijoeiro (2928) e (2936) e os isolados endofíticos de citros. Portanto como ferramenta para detecção de Cff em feijoeiro os oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 revelaram ser os mais indicados.

Palavras-chave adicionais: *Phaseolus vulgaris*, murcha-de-curtobacterium, rep-PCR

A murcha-de-curtobacterium ou murcha bacteriana, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, (Hedges) Collins & Jones é uma doença vascular na qual o patógeno infecta o feijoeiro através da semente contaminada, ferimentos e aberturas naturais (2). Os sintomas iniciais consistem na presença de folhas murchas durante as horas mais quentes do dia podendo voltar à turgescência normal durante o período noturno (17). Os sintomas típicos da doença além da murcha incluem o amarelecimento das folhas, nanismo e morte de plantas (5,7). A doença foi descrita inicialmente por Hedges (6) e no Brasil foi identificada pela primeira vez no Estado de São Paulo (12) encontrando-se atualmente distribuída em várias áreas produtoras de feijão, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (17).

A resistência genética tem sido o método mais eficiente e econômico no controle de doenças de plantas (20). Dentre os estudos realizados no Brasil visando a identificação de resistência genética em genótipos de feijoeiro a Cff, recentemente, foram observados diferentes níveis de resistência num conjunto de 333 materiais pertencentes ao banco de germoplasma de feijoeiro do IAC (22).

O desenvolvimento e o sucesso de programa de melhoria visando resistência a doenças depende do conhecimento sobre a variabilidade genética do patógeno (18). A existência de variabilidade genética em isolados do patógeno, tem sido objeto de estudos em diferentes espécies hospedeiras, principalmente, pelas implicações no melhoramento genético visando à obtenção de cultivares, especialmente quanto a estabilidade e durabilidade da resistência (15).

Dentre as várias técnicas moleculares utilizadas em estudos da variabilidade genética, rep-PCR vem sendo utilizada na caracterização de isolados bacterianos (25, 26). Famílias de seqüências de DNA repetitivos altamente conservadas estão dispersos no genoma de diversas espécies bacterianas (11). Três famílias vêm sendo estudadas com mais detalhes: REP (“repetitive extragenic palindromic”) (23), ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”) (8) e BOX (“BOX element”) (13). Oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir das regiões flangeadoras destas seqüências repetitivas e, quando usados na reação de polimerização em cadeia (PCR), produzem uma amplificação seletiva de regiões genômicas localizadas entre os elementos REP, ERIC e BOX. Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, coletivamente chamados de rep-PCR (25; 26). Os produtos de amplificação mostram um perfil de amplificação específica à nível de espécie, sub-espécie, patovar ou mesmo de isolados.

Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em estudos de diversidade, bem como para identificação e classificação de diversas bactérias (1,10,16,27). McDonald & Wong (14) em estudos da diversidade genética de isolados bacterianos em PCR, empregando os oligonucleotídeos REP, ERIC e BOX, observaram que dez isolados de *C. flaccumfaciens* foram distribuídos em dois grupos distintos. No primeiro grupo quatro isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* e no segundo grupo, três isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, com isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *betae* e *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, isolados bacteriano de outros gêneros formaram grupamentos distintos. Scheneider & de Bruijn (19) analisaram padrões de bandas de *Rhizobium meliloti*, *R. loti*, *Bradrhizobium* spp. e *Azorhizobium caulinodans*, obtidos a partir dos oligonucleotídeos REP, ERIC e BOX, concluíram através de análise de grupamento, que a utilização da técnica rep-PCR com esses iniciadores, é um método reproduzível e confiável para estudos de relacionamento filogenético entre essas bactérias. Entretanto, Versalovic et al. (25) ao utilizarem estes iniciadores em várias espécies de bactérias, verificaram maior afinidade de hibridização dos oligonucleotídeos REP e ERIC para bactérias Gram-negativas. Oligonucleotídeos ERIC, foram utilizados juntamente com os oligonucleotídeos REP, na identificação de patovares dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (10), também para análise da diversidade genética entre isolados de *Burkholderia solanacearum* raça 3 (21) e *Rhizobium meliloti* (1). Estudos realizados por Guimarães et al. (3), concluíram que seqüências BOX, encontrava-se presentes no genoma de todos isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. A amplificação do DNA com os oligonucleotídeos (BOX), permitiu a diferenciação de todas as espécies de *Curtobacterium* testados, como também a separação dos dois patovares; *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* e *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, entretanto, não sendo possível a separação entre *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *C. flaccumfaciens* pv. *betae* (4).

Oligonucleotídeos específicos para a detecção e identificação de vários patógenos em diversos hospedeiros vêm sendo utilizados com frequência. Tegli et al. (24) utilizando os oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 em reações de PCR, identificou com êxito a presença de Cff em sementes de feijoeiro. Guimarães et al (3) demonstraram alta especificidade para detecção de Cff utilizando os oligonucleotídeos CF4-CF5.

O presente trabalho teve como objetivos, estudar a variabilidade genética de 26 isolados de *C. flaccumfaciens* de várias procedências através da técnica rep-PCR, utilizando os inicia-

dores ERIC, REP e BOX e, oportunamente, para os mesmos isolados, avaliar a eficiência de dois pares de oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5 em reação de PCR, como auxílio na identificação de *C. flaccumfaciens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Os 26 isolados bacterianos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1, dos quais 20 foram provenientes de feijoeiro (Cff), coletados em diferentes regiões do Brasil, 4 provenientes de coleções internacionais (Cff) e 2 endofíticos de citros (*C. flaccumfaciens*). Os isolados de Cff brasileiros foram obtidos de culturas preservadas pertencentes à coleção do Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, FCA/UNESP, a partir do isolamento de tecido vascular de plantas de feijoeiro com sintomas da doença e isolados importados de coleções internacionais, através da autorização dos setores competentes do Ministério da Agricultura. Dois isolados *C. flaccumfaciens* endofíticos de citros (SR 1/6 e PR 4/3) foram cedidos pelo CENA.

Preparo do inóculo da bactéria para a extração do DNA

Os 26 isolados de *C. flaccumfaciens*, utilizados a partir de culturas preservadas, foram transferidos para tubo de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de água destilada estéril, seguidos de plaqueamento em meio de cultura (NSA) durante 48 - 72 h, a 30°C. As colônias bacterianas formadas na superfície do meio de cultura foram analisadas quanto ao seu formato, coloração, brilho e característica de crescimento. Os 26 isolados apresentaram as características do gênero *Curtobacterium*. Os respectivos isolados foram transferidos para Erlenmeyer contendo 30 mL de nutriente líquido e mantidos a 30° C durante 12 a 16 hs, sob agitação.

Extração do DNA genômico

A técnica utilizada na extração do DNA genômico dos 26 isolados foi a descrita por Li & De Boer (9). Um volume aproximado de 2,4 mL de meio líquido contendo células bacterianas

de cada isolado foram centrifugados a 13.000 rpm / 5 min. Descartou-se o sobrenadante de cada amostra e procedeu-se a lavagem do pellet com adição de 1 mL de água destilada estéril, seguidos de centrifugação (13.000 rpm / 5 min.). Este procedimento foi repetido duas vezes. O pellet foi submetido a -20°C por 1 hora. Após o descongelamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de acetona (-20° C), e as amostras homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida ressuspensas em 500 µL de tampão de extração TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) + 50 µL de 500 mM EDTA pH 8,0 + 50 µL de dodecyl sulfato de sódio SDS a 14% + 10 µL de proteinase K (0,1%), seguidos de homogeneização e incubação por 1 hora a 55° C. Adicionou-se igual volume de acetato de amônio (7,5 M), seguidos de homogeneização e centrifugação (13.000 rpm / 20 min.). Foram retirados 900 µL do sobrenadante de cada amostra e transferidos para um novo microtubo, adicionando 540 µL de isopropanol, seguidos de homogeneização e precipitação a (-20°C) / 1 hora. As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm / 30 min.) a 4° C. O pellet foi lavado com etanol 70% (-20°C), centrifugado por 13.000 rpm / 5 min. e secado à vácuo. O DNA foi ressuspensado em 50 µL de água destilada estéril.

Amplificação com oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5

Os iniciadores CffFOR2 5' GTTATGAACTTCACTCC 3' e CffREV4 5' GATGTTCCCGGTGTTTCAG 3' descritos por Tegli et al. (24) e CF4 5' CACAGCCACCTACATGC 3' e CF5 5' GATCGGGAGTCCGAG 3' Guimarães et al. (3), foram utilizados na identificação dos 26 isolados. As condições de PCR para os oligonucleotídeos CF4-CF5 foram as descritas por Guimarães et al. (3), onde em 25 µL de reação foram adicionados 2,5 µL de DNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeos, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 25 mM dNTP. A reação de PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação à 96 °C por 2 min; 34 ciclos constituídos de desnaturação à 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão à 72 °C por 30 s, com um ciclo final de extensão à 72 °C por 10 min. O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Lader. Para os oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 foi utilizada a condição de PCR descrita por Tegli et al. (24). Aos 25 µL de reação foram

Tabela 1. Procedência dos isolados de *Curtobacterim flaccumfaciens* testados

Isolados	Hospedeiro	Procedência	Isolados	Hospedeiro	Procedência
1 -2500	Feijoeiro	SP	14 -2773	Feijoeiro	França
2 -2502	Feijoeiro	SP	15 -2774	Feijoeiro	SP
3 -2624	Feijoeiro	SP	16 -2855	Feijoeiro	SP
4 -2628	Feijoeiro	SP	17 -2910	Feijoeiro	PR
5 -2634	Feijoeiro	SP	18 -2912	Feijoeiro	PR
6 -2648	Feijoeiro	SP	19 -2927	Feijoeiro	SC
7 -2716	Feijoeiro	SP	20 -2928	Feijoeiro	SC
8 -2718	Feijoeiro	SP	21 -2929	Feijoeiro	SC
9 -2720	Feijoeiro	SP	22 -P-29	Feijoeiro	SP
10 -2721	Feijoeiro	SP	23 -2936	Feijoeiro	DF
11 -2769	Feijoeiro	USA	24 -2937	Feijoeiro	DF
12 -2771	Feijoeiro	USA	25 -2932	Citros	SP
13 -2772	Feijoeiro	USA	26 -2933	Citros	SP

adicionados 2,5µL de DNA, 0,5 µM de cada oligonucleotídeos, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 25mM dNTP. A reação de PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação à 94 °C por 3 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação à 94 °C por 1 min, anelamento a 60 °C por 45 s e extensão à 72 °C por 30 s, com um ciclo final de extensão à 72 °C por 5 min. O produto amplificado por PCR foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5%, corado com brometo de etídeo.

Condições de PCR para os iniciadores REP, ERIC e BOX

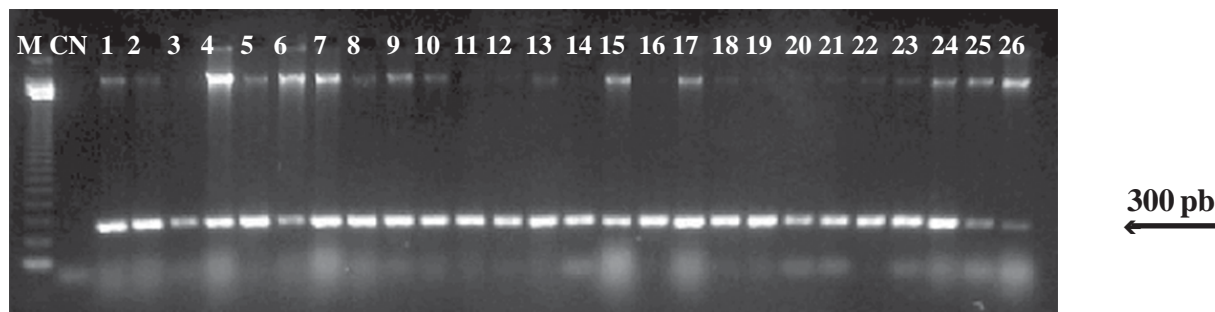
Para a amplificação do DNA utilizou-se os iniciadores ERIC (ERIC1R 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3') e ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'), BOX (BOXA1R 5'CTACCCAAGGCGACGCCTGACG3') e REP (REPIR-I 5'III-CGICGICATCIGGC 3' e REP2I 5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3'). As condições de PCR utilizadas, foram as descritas por McDonald & Wong (14), com algumas modificações. A reação foi realizada em um volume de 25 µL contendo 50 ng de DNA, 50 pmol de oligonucleotídeo iniciadores, 2 U de *Taq* DNA polimerase e 1,25 mM dNTP (Gibco BRL, Burlington, Ont). As etapas de amplificação incluíram desnaturação inicial à 95 °C por 7 min; 34 ciclos constituídos de desnaturação à 94 °C por 3 s, e 92 °C por 30 s, anelamento por 1 min para os iniciadores REP à 40 °C e ERIC e BOX à 50 °C e extensão à 65 °C por 8 min com um ciclo final de extensão à 65 °C por 8 min. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5%, por 6 horas à 40 V/cm e em seguida corado com brometo de etídeo. O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Lader (Invitrogen Brasil).

Um dendograma foi obtido por meio de uma análise de matriz de similaridade gerada com a utilização do algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) no programa NTSYS-pc (versão 1,70; Exeter Software, Setaukat, NY, EUA) para comparar a similaridade entre os isolados estudados (Figura 3). A análise de agrupamento foi obtida pelos dados gerados pela combinação dos iniciadores REP, ERIC e BOX (Figura 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas moleculares surgem como importante ferramenta para a detecção dos isolados de *C. flaccumfaciens*. Os oligonucleotídeos CF4-CF5 desenvolvidos por Guimarães et al. (3), em PCR a partir de seqüência de fragmentos obtidos de DNA cromossômico por sub-clonagem da porção específica hibridizada para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, demonstraram alta especificidade para a detecção dos isolados utilizados pelos autores, porém, neste estudo, dois isolados de Cff de feijoeiro (Feij 2928 e Feij 2936) previamente caracterizados como Cff e dois isolados endofíticos de citros (2932) e (2933), não foram detectados (Figura 1). Em estudo recente Tegli et al. (24), demonstrou a eficiência dos oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 na detecção de Cff em sementes de feijoeiro, porém não ocorreu amplificação, quando utilizados os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsetiae* e outros gêneros de bactérias como *Clavibacter*, *Xanthomonas* e *Rhodococcus*. Os oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4



Oligonucleotídeos CF4-CF5

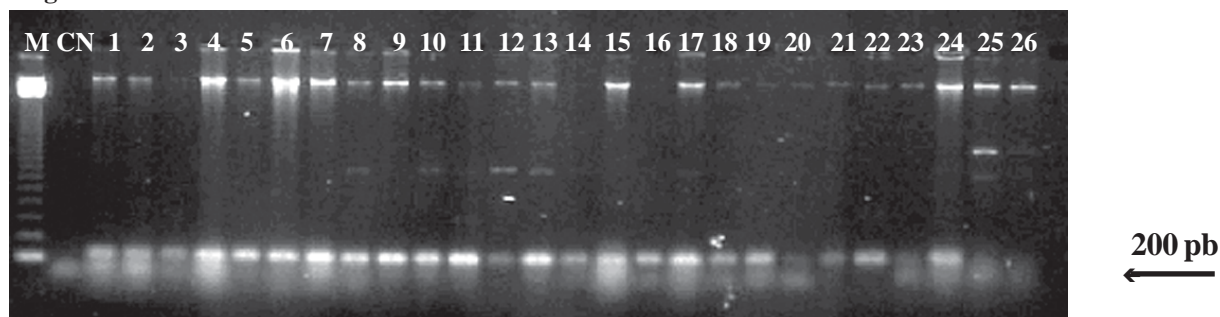


Figura 1. Identificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Curtobacterium flaccumfaciens* endofíticos de citros, com os oligonucleotídeos CffFOR2-CffREV4 e CF4-CF5. M: Marcador de peso molecular; CN Controle Negativo.

*Cff*FOR2-*Cff*REV4, até então específicos para a detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, no presente estudo foram capazes de detectar isolados endofíticos de citrus (*C. flaccumfaciens*), que aparentemente não pertencem ao patovar *flaccumfaciens* (isolados cedidos pelo CENA/SP). Portanto conclui-se neste trabalho que os oligonucleotídeos *Cff*FOR2-*Cff*REV4, são mais indicados para detecção de isolados de *Cff*, porém não são específicos somente para este patovar, como pode ser verificado pela detecção dos isolados endofíticos de citros. Os oligonucleotídeos CF4-CF5 apresentam a desvantagem de proporcionarem resultados falsos negativos, como ob-

servado para dois isolados de *Cff* provenientes de feijoeiro.

As comparações dos padrões de amplificação dos fragmentos de DNA genômico geradas pelos elementos repetitivos amplificados pelos iniciadores REP, ERIC e BOX, estão representados na Figura 2. A reação de amplificação da região genômica do DNA de *C. flaccumfaciens* via PCR, utilizando-se a unidade repetitiva REP, foi efetiva para poucos isolados, enquanto para o iniciador ERIC, obteve-se amplificação do DNA para a maioria dos isolados, no entanto, o número de padrões de bandas em cada isolado foi significativamente pequeno quando comparado aos oligonucleotídeos BOX (Figura 2). A baixa

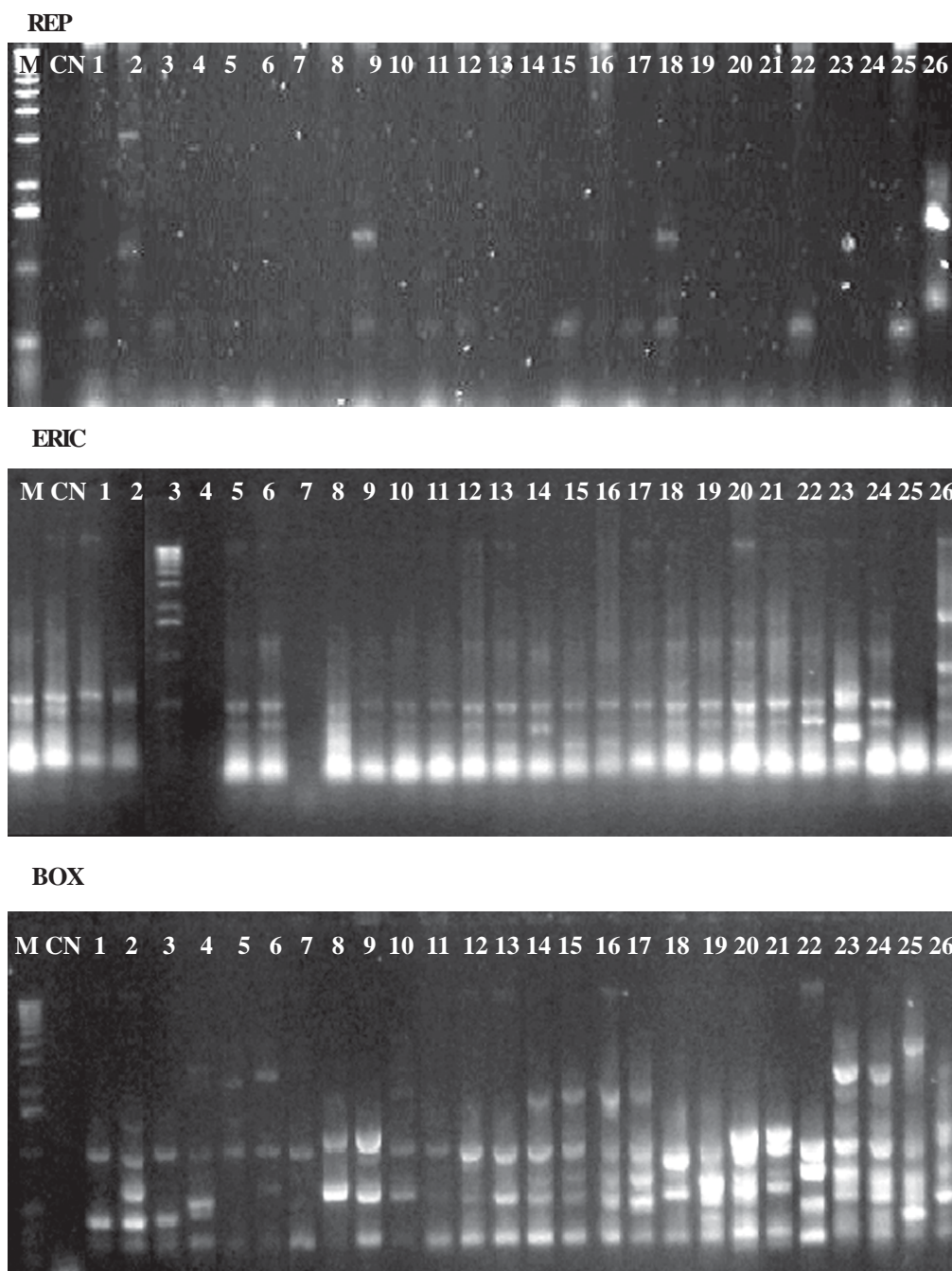


Figura 2. Perfil eletroforético de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (1 a 24) e *Curtobacterium flaccumfaciens* (25 e 26), obtido com os iniciadores REP, ERIC e BOX. M: Marcador de peso molecular, CN: Controle Negativo.

afinidade dos oligonucleotídeos REP e ERIC para os 26 isolados, confirmam os resultados obtidos por Versalovic et al. (25), que ao utilizarem estas seqüências repetitivas para várias espécies de bactérias, constataram a preferência de hibridização dos oligonucleotídeos REP e ERIC para bactérias Gram-negativas. Neste sentido a utilização conjunta dos iniciadores REP, ERIC e BOX, em especial ERIC e BOX, foram fundamentais na avaliação da variabilidade genética dos 26 isolados de *C. flaccumfaciens*. Em bactérias Gram-negativas os oligonucleotídeos ERIC e BOX foram também utilizados com sucesso na identificação de patovares nos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (10) e diversidade genética entre isolados de *Ralstonia solanacearum* raça 3 (21).

O estudo da diversidade genética dos 26 isolados (Tabela 1) por meio desta técnica, permitiu separar os mesmos em quatro grupos distintos de acordo com os padrões de bandas gerados pelos iniciadores REP, ERIC e BOX, considerando um índice de similaridade de 75%, pelo método UPGMA (Figura 3). Isolados procedentes do mesmo Estado, ou mesma região nem sempre se encontram no mesmo ramo filogenético. Isolados de Cff oriundos do Estado de São Paulo são geneticamente heterogêneos, alguns se agrupam com isolados de USA, Santa Catarina e o isolado endofítico de citros, enquanto outros com isolados de USA, França e Paraná. Dentre os três isolados de Cff procedentes do Estado de Santa Catarina, Feij 2927 foi bastante divergente dos demais. O isolado endofítico de citros (2932) foi agrupado com isolados de feijoeiro, enquanto o outro isolado (2933) está geneticamente mais próximo dos isolados Feij 2936 e Feij 2937, procedentes do Distrito Federal. A formação de quatro grupos distintos, dentro do qual encontram-se distribuídos os 26 isolados de *C. flaccumfaciens* a partir do índice de similaridade de 75%, indica a existência de diversidade genética entre os isolados avaliados (Figura 3).

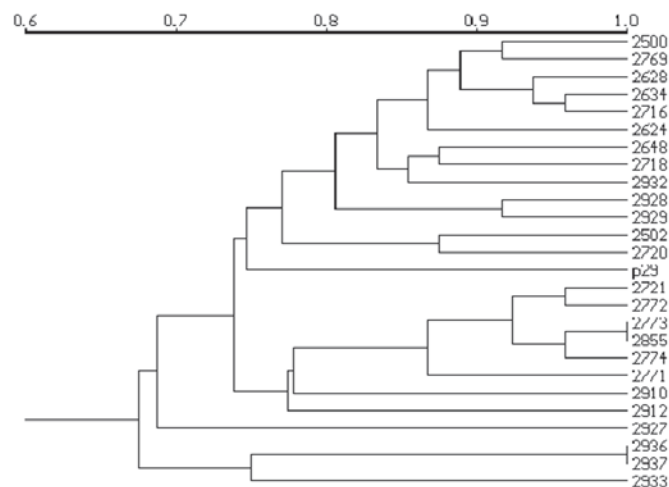


Figura 3. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise de bandas polimórficas geradas por rep-PCR de 24 isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (feijoeiros) e dois isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* (Citros).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Bruijn, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase Caín reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melilot* isolates and other soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.3, p.2180-2187, 1992.
2. Dinesen, I.G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plant (*Phaseolus vulgaris*). **International Conference Plant Pathogenic Bacteria**, Washington, v.2, p.929-33, 1978.
3. Guimaraes, P.M.; Palmano, S.; Smith, J.J.; Sa, M.F.G.; Saddler, G.S. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Holanda, v. 80, p.1-10, 2001.
4. Guimarães, P.M.; Smith, J.J.; Palmano, S.; Saddler, G.S. Characterisation of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.109, p.817-825, 2003.
5. Hall, R. **Compendium of Bean Diseases**. American Phytopathological Society Press. St. Paul, 1991, p.31.
6. Hedges, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, Washington, v.55, n.1, p.433-434, 1922.
7. Hedges, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 16, n.3, p.1-22, 1926.
8. Hulton, C.S.; Higgins, C.F.; Sharp, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, n.4, p.825-834, 1991.
9. Li, XI.; De Böer, S. H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.837-842, 1995.
10. Lows, F. J.; Fulbright, D. W.; Stephens, C. T.; de Bruijn, F.J. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences an PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p.2286-2295, 1994.
11. Lupski, J.R.; Weinstock, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n.14, p. 4525-4529, 1992.
12. Maringoni, A.C.; Rosa, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.23, p.160-162, 1997.
13. Martin, B.; Humberto, O.; Camara, M.; Guenzi, E.; Walker, J.; Mitchell, T.; Andrew, P.; Prudhomme, M.; Alloing, G.; Hakenbeck, R.; Morrison, D.A.; Boulnois, G.J.; Claverys, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.20, n.13, p.3479-3483, 1992.
14. McDonald, J.G.; Wong, E. High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 22, n.5, p.17-22, 2000.
15. Morgado, H.S. ; Lopes, C.A.; Takatsu, A. Virulência de isolados de *Pseudomonas solanacearum* à berinjela. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, n.4, p.430-434, 1992.
16. Openorth, D.C.; Smarth, C.D.; Lows, F.J. Identification of *Xan-*

- thomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.12, p.868-873, 1996.
17. Rava, C.A.; Costa, J.G.C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à Murcha-de-curtobacterium. In: Reunião Sul-Brasileira de Feijão, 5. **Anais**: Reunião Anual Paranaense de Feijão, 2001, Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2001. p.55-56.
 18. Rava, C. A.; Costa, J. G. C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à Murcha-de-curtobacterium. In: Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão, 4., 2003, Londrina **Resumos Expandidos**. Londrina: Ceres, 2003. p. 246-247.
 19. Scheider, M.; de Bruijn, F.J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of *rhizobia* and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Washington, v. 12, p.163-174, 1996.
 20. Sinclair, J. B. **Compendium of soybean diseases** 2 nd. ed. American Phytopathology Society: St. Paul, p.104, 1982.
 21. Smith, R. F.; Wiese, B. A.; Wojzynski, M. K.; Davison, D. B.; Worley, K. C. Search Launcher-an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. **Genome Research**, Ottawa, v. 6, n. 5, p. 454-462, 1996.
 22. Souza, V. L.; Maringoni, A. C.; Carbonell, S. A. M.; Ito, M. F. Detecção de resistência à murcha-de-curtobacterium em genótipos de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.1, 2004 (Resumo).
 23. Stem, M.J. ; Ames, G. F. L.; Smith, N. H.; Robinson, E. C.; Higgins, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Washington, v. 37, n.3, p.1015-1026, 1984.
 24. Tegli, S.; Seren, I. A.; Surico, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **The Society for Applied Microbiology**, St. Paul, v. 35, p. 331-337, 2002.
 25. Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupiski, J.R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 19, p.6823-6831, 1991.
 26. Versalovic, J.; Scheneider, M.; de Bruijn, F.J.; Lupiski, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.5, p.25-40, 1994.
 27. Weingart, H.; Volksch, B. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC, REP, IS50-PCR; **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, n.6, p.339-345, 1997.