



GUSTAVO MATEUS DA SILVA

**ESTABELECIMENTO DE CONTROLES
POSITIVOS PARA DIAGNOSE DE BACTÉRIAS
FITOPATOGÊNICAS POR PCR**

LAVRAS - MG

2012

GUSTAVO MATEUS DA SILVA

**ESTABELECIMENTO DE CONTROLES POSITIVOS PARA
DIAGNOSE DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS POR PCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Gustavo Mateus da.

Estabelecimento de controles positivos para diagnose de bactérias fitopatogênicas por PCR / Gustavo Mateus da Silva. – Lavras : UFLA, 2012.
52 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Ricardo Magela de Souza.
Bibliografia.

1. Fitobactérias. 2. Detecção. 3. Clonagem. 4. Identificação. 5. DNA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.32

GUSTAVO MATEUS DA SILVA

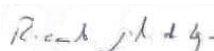
**ESTABELECIMENTO DE CONTROLES POSITIVOS PARA
DIAGNOSE DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS POR PCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal e Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012

Dra. Antônia do Reis Figueira – UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA



Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS - MG

2012

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida,

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pela minha formação,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos,

Aos professores, colegas e técnicos do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e convivência compartilhados,

Ao professor Dr. Ricardo Magela de Souza pela amizade, orientação, paciência e confiança,

À professora Dr^a. Antonia dos Reis Figueira, pela orientação e paciência que foram primordiais para meu aprendizado e conclusão do curso,

À professora Dr^a. Rosane Freitas Schwan, pelas valiosas sugestões e participação na banca examinadora,

Aos colegas de labuta do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Ana Maria, Flávia, Daniel, Melina, Henrique, Luciana, Carol, Thiago, Priscila, Francielly, Samuel, pelas sugestões e apoio constantes,

Aos colegas do curso de Mestrado, Helon, Willian, Cláudio, Fabiano, Davi, Iara, Érica, Thaís, pela convivência solícita,

Aos meus pais, Joaquim e Adélia, aos meus irmãos, Kelly, Willian, Bruno, Agissander pelo amor incondicional,

Aos meus queridos amigos por serem peças fundamentais da minha felicidade e evolução,

À Thais Cristian Rosa pelo carinho, incentivo e presença especial em minha vida,

E a todos aqueles que por meu caminho passaram deixando um rastro de iluminação.

Muito Obrigado, Gustavo

RESUMO

O agronegócio vem exigindo cada vez mais competitividade, redução dos custos e aumento de qualidade de produtos e serviços, com consequências óbvias na área da fitopatologia, levando-se em consideração o risco dos prejuízos causados pelos patógenos. Para se evitar que isso aconteça, a diagnose precoce torna-se indispensável. Na diagnose de fitobactérias, considerando a amplitude de metodologias disponíveis, a tendência atual é de se utilizar uma abordagem múltipla, ou seja, fazer convergir as técnicas de forma a tornar os resultados complementares. Com o avanço das técnicas moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem permitido a detecção precoce de patógenos, antes mesmo do surgimento dos sintomas na planta, de forma mais rápida, fácil e com um alto nível de sensibilidade, se comparada aos métodos tradicionais, de diagnose e identificação. Uma das maiores limitações para o desenvolvimento dessa técnica é a falta de controles positivos, para checar a confiabilidade do teste empregado, pois sempre existe a possibilidade de obtenção de falso negativos e/ou falso positivos. Este trabalho teve como objetivo estabelecer controles positivos para bactérias fitopatogênicas, por meio da clonagem de fragmentos de DNA para serem empregados em diagnose por PCR. Foram clonados fragmentos genômicos de 6 bactérias, os clones se apresentaram como controles positivos confiáveis para serem empregados na diagnose por PCR das respectivas bactérias.

Palavras-chave: Fitobactérias. Detecção. Clonagem. DNA. Identificação.

ABSTRACT

Agribusiness has demanded increasingly more competitive, reduce costs and increase quality of products and services, with obvious consequences in the field of plant pathology, taking into consideration the loss risk caused by pathogens. To prevent this, the early diagnosis is indispensable. In diagnosis of phyto-bacteria considering the extent available methodologies, the current trend is to use a multiple approach, in other words, converge techniques in order to make the complementary results. With advances in molecular techniques, the polymerase chain reaction (PCR) has allowed early pathogens detection, even before the onset symptoms in the plant, more quickly, easily and with a high sensitivity level, compared to traditional methods of diagnosis and identification. One of the major constraints to the development this technique is the lack of positive controls to check the reliability of the test used, because there is always the possibility of obtaining false negative and/or false positives. This study had as objective established positive controls for plant pathogenic bacteria through the cloning of DNA fragments to be used in PCR diagnosis. There were cloned genomic fragments from 6 bacteria, clones presented as reliable positive controls to be used in PCR diagnosis of the respective bacteria.

Keywords: Phyto-bacteria. Detection. Cloning. DNA. Identification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos com *primers* específicos para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-3: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*(AacR1, AacR2) 31
- Figura 2 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), para confirmação da clonagem dos fragmentos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pelo corte com a enzima de restrição *EcoRI*. 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®); 2-5: fragmentos de DNA de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* clonados; 6-7: Produtos da PCR purificados 32
- Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-11: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (isolados da coleção de bactérias do laboratório de bacteriologia do DFP-UFLA)..... 33
- Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*: 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-3: *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* , 4-6: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*..... 34
- Figura 5 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) para confirmação da clonagem de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, pelo corte com a enzima de restrição *EcoRI*. 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-5: Fragmentos de DNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* clonados; 6-7: Produtos da PCR purificados 34

Figura 6	Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para <i>Xanthomonas campestris pv. viticola</i> em comparação com o controle positivo clonado. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2: Fragmento de DNA clonado de <i>X.viticola</i> , 3-7: <i>X. viticola</i> DNA genômico	35
Figura 7	Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i> 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-12: <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i>	36
Figura 8	Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i> com primers externos 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2-3: <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i>	37
Figura 9	Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da Nested-PCR obtidos para <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i> com os primers internos e externos 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2-3: <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i>	37
Figura 10	Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR para <i>Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae</i> para confirmação da clonagem.1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2-3: PCR com fragmentos clonados, 4-5: produtos da PCR purificados.....	38

- Figura 11 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos a partir de *primers* específicos para *Xanthomonas citri* em comparação com o controle positivo clonado. 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2: Fragmento de DNA clonado de *X. citri*, 3-8: *X. citri*.(UFLA), 9: *X. citri* (Isolado referência XAC 306-2)..... 39
- Figura 12 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Pseudomonas cichorii*. 1: Marcador 100 pb DNA (Amresco®), 2-3: *Pseudomonas cichorii* (coleção de bactérias do Laboratório de bacteriologia do DFP-UFLA)..... 40
- Figura 13 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Pseudomonas cichorii* para confirmação da clonagem. 1: Marcador 100 pb DNA (Amresco®), 2: PCR com fragmento clonado, 3: PCR DNA genômico *Pseudomonas cichorii* 41
- Figura 14 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos com *primers* específicos para *Ralstonia solanacearum*. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2: *Ralstonia solanacearum*- Isolado de batata; 3: *Ralstonia solanacearum*- Isolado de eucalipto- UFV 32..... 42
- Figura 15 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) dos produtos da PCR para confirmação da clonagem de fragmentos de DNA de *Ralstonia solanacearum*. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®) 2-3: produtos da PCR com fragmentos clonados; 4-5: produtos da PCR purificados..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados e procedências.....	23
Tabela 2	Descrição dos iniciadores utilizados no estudo.....	26
Tabela 3	Descrição dos ciclos de temperatura dos iniciadores	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Fitobacterioses transmitidas por sementes e ou materiais de propagação vegetativa	14
2.2	Deteção de Bactérias Fitopatogênicas	17
2.3	Controles positivos	20
3	HIPÓTESE	21
4	OBJETIVO	22
5	MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1	Obtenção dos isolados	23
5.2	Extração do DNA bacteriano	24
5.3	Reação em cadeia da polimerase- PCR	25
5.4	Purificação dos produtos da PCR	27
5.5	Clonagem e extração do DNA plasmidial (Miniprep)	27
5.6	Digestão dos plasmídeos da Clonagem com a Enzima de Restrição EcoRI	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1	Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	30
6.2	Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	32
6.3	Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	35
6.4	Emprego de um fragmento de DNA clonado de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> em teste de diagnose por PCR	38
6.5	Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de <i>Pseudomonas cichorii</i>	39
6.6	Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de <i>Ralstonia solanacearum</i>	41
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é um dos setores mais rentáveis da economia nacional. A produção de cereais, leguminosas e oleaginosas para 2012 está estimada para 160,5 milhões de toneladas, 0,6% superior a 2011 devido aos ganhos esperados nas regiões: nordeste, sudeste e centro-oeste. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012). Calcula-se que as doenças, os insetos e as plantas daninhas, juntos provocam perdas em torno de 36,5% na produção mundial de alimentos. Desse total, 14,1% são causados por doenças (AGRIOS, 2005). O processo de globalização interligando os mercados vem exigindo cada vez mais competitividade, redução dos custos e aumento de qualidade de produtos e serviços do agronegócio. Como consequências dessa ampliação, acompanham mudanças na área da fitossanidade, levando em consideração o risco da introdução de patógenos em áreas onde não ocorriam.

A proteção do país contra a entrada de patógenos quarentenários listados na Instrução Normativa nº 41, de 1º de julho de 2008 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA, é uma das principais preocupações do Sistema de Defesa Vegetal (BRASIL, 2008). A quarentena vegetal visa prevenir a entrada de organismos nocivos em uma área isenta, baseando-se em proibição ou fiscalização de trânsito de plantas ou produtos vegetais através da legislação fitossanitária, enquadrando-se no princípio de exclusão para controle de doenças de plantas e se fundamenta em princípios biológicos (KIMATI, 1978). Nesse contexto, são necessárias medidas como inspeções rotineiras no campo de produção, aquisição de sementes e materiais de propagação certificados, além de exames periódicos de sanidade das sementes em laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura. Fitobactérias como pragas significam risco, pois podem sobreviver de forma latente em sementes e

mudas, têm a capacidade de serem disseminadas a longas distâncias e serem introduzidas em áreas isentas da doença (SMITH et al., 1997).

O controle de doenças causadas por fitobactérias, geralmente requer uma detecção precisa, seguida de correta identificação do organismo causal. Embora o diagnóstico presuntivo de doenças bacterianas possa ser relativamente simples quando a sintomatologia típica é evidente, os sintomas em plantas nem sempre são específicos e podem ser confundidos com outros agentes bióticos ou abióticos. Por outro lado, a detecção de bactérias em plantas assintomáticas é necessária para o controle preventivo, mas pode ser extremamente difícil devido à baixa população do organismo somando-se a isso a distribuição desigual no material vegetal. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos altamente sensíveis para detecção e identificação do organismo, o que se tem buscado através de ferramentas moleculares (LOPEZ et al., 2006). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma técnica de rotina, e empregada em muitos protocolos desenvolvidos pela European Union and the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) (LOPEZ et al., 2006) para detecção e diagnose de patógenos.

A utilização de controles positivos como referência em reações de PCR torna-se indispensável, de modo a evitar a ocorrência de resultados falso positivos, quando o organismo alvo não está presente, ou falso negativos, quando este se encontra associado ao material vegetal. Fragmentos de DNA clonados utilizados como controles positivos constituem uma alternativa viável para laboratórios, pois permite que os fragmentos sejam facilmente replicados, através de clonagem, garantindo a manutenção de um grande número de cópias e também elimina a necessidade de se trabalhar com o organismo-alvo na sua forma infectiva, evitando-se o risco de contaminação, em teste de diagnose por PCR.

O presente trabalho estabeleceu controles positivos para 6 bactérias fitopatogênicas através da clonagem de fragmentos de DNA genômico para uso em diagnose por PCR, que poderão ser multiplicados *in vitro* e transportados para outros laboratórios sem riscos de contaminação e disseminação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fitobacterioses transmitidas por sementes e ou materiais de propagação vegetativa

As bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes infectando ou infestando-as, constituindo uma fonte primária de inóculo e um eficiente mecanismo de disseminação a longa distância. Nas sementes, as bactérias se encontram na fase latente, em baixas populações e muitas das bactérias fitopatogênicas permanecem viáveis pelo mesmo período de viabilidade da semente e a maioria das sementes infectadas não apresenta sintomas. Lopes e Quezado-Duval (2005) afirmam que, em se tratando de diagnose em condições de quarentena, a detecção em material assintomático com vistas a um diagnóstico confiável e acurado requer o uso de uma abordagem integrada, baseada no uso de várias técnicas.

Um levantamento abrangente e detalhado a respeito das principais doenças bacterianas transmitidas por sementes, incluindo todas as regiões produtoras no Brasil e baseado na expressão econômica da cultura, torna-se necessário. Através desse levantamento seria possível consignar níveis de danos, a composição das diferentes populações no tocante à virulência as flutuações sazonais, hospedeiros alternativos e grau de sanidade do material (ARAÚJO; ROBBS; RIBEIRO, 2003).

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é uma doença importante nas regiões de clima tropical e subtropical, nas culturas de tomate, batata e eucalipto. A bactéria sobrevive no solo e pode ser transmitida pela batata-semente, e a transmissão por sementes de tomate ainda não foi comprovada (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2007). Na cultura do eucalipto a bactéria ataca muda, na produção de mudas clonais a bactéria pode ser facilmente multiplicada e disseminada para outras localidades. A espécie é

divida fenotipicamente em cinco raças, com base na reação de uma gama de hospedeiros (HE; SEQUEIRA; KELMAN, 1983), e em cinco biovares com base em propriedades bioquímicas (HAYWARD, 1994). O sucesso do manejo depende do conhecimento de qual biovar de *R. solanacearum* ocorre na lavoura. Tal situação decorre das diferenças que existem entre estirpes das biovares, principalmente em aspectos relacionados à agressividade, sobrevivência e latência.

A mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* é um problema para a cultura do meloeiro na região Nordeste do Brasil, onde foram estimadas perdas em torno de 40 a 50%, podendo atingir 100% em períodos chuvosos (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001). Sementes contaminadas, plântulas infectadas e restos culturais constituem as principais fontes de inóculo da bactéria e frutos assintomáticos podem conter sementes infestadas (WALCOTT; GITAITIS; CASTRO, 2003).

A queima bacteriana, causada por *Pseudomonas cichorii* já foi relatada em diversas culturas, destacando-se alface, girassol, brócolis, café, tomate, couve, pimentão e beldroega (SILVA JÚNIOR et al., 2009b). A bactéria pode ser transmitida pela água da chuva e irrigação, disseminando-se rapidamente em condições de clima quente e úmido e tem gerado grandes perdas em condições de cultivo protegido (COTTYN et al., 2011). Até agora não há uma medida de controle eficiente. Uma alternativa é a aquisição de mudas saudáveis.

A mancha bacteriana do maracujazeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* tem merecido grande atenção na região norte do país, já que encontrou na região condições ótimas para seu desenvolvimento e multiplicação, tornando-se uma doença de difícil controle (ISHIDA, 2009). A doença manifesta-se principalmente nas partes tenras ou suculentas dos tecidos, estendendo-se aos elementos vasculares adjacentes podendo, além de inutilizar os frutos para o consumo, acarretar a destruição total da planta afetada (LEITE

JÚNIOR et al., 2002). A medida de controle mais eficiente se restringe à utilização de sementes e mudas saudáveis.

O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* afeta a maioria das áreas produtoras de citrus do mundo (LEITE JÚNIOR, 2003). *X. citri* é um organismo quarentenário para algumas regiões e está sujeito a rigorosas medidas fitossanitárias, a sua correta identificação se faz criticamente importante, pois restringe mercado de regiões produtoras afetadas. Coletta Filho et al. (2006) detectaram a presença de *X. axonopodis* pv. *citri* através de PCR com a utilização de *primers* específicos e relataram o método como sendo adequado para monitorar plantas assintomáticas em áreas onde a bactéria é endêmica, além de se obter diagnose confiável em curto espaço de tempo.

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, praga quarentenária A2 e restrita aos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco, é caracterizado por lesões necróticas extensas produzidas nas hastes com descoloração dos vasos. O controle é basicamente a utilização de materiais propagativos isentos do patógeno, inspeções rotineiras em campo, podas de ramos infectados, desinfestação de ferramentas e veículos, que reduzem a disseminação da bactéria (LIMA et al., 1999). Considerando a ocorrência restrita do patógeno e o risco de seu estabelecimento em outras regiões produtoras do sul e sudeste do país, torna-se necessário o desenvolvimento de mecanismos para uma rápida identificação do patógeno nas regiões afetadas, bem como para se evitar a sua disseminação para outras regiões produtoras (TRINDADE et al., 2007).

2.2 Detecção de Bactérias Fitopatogênicas

Diversas são as situações em que o diagnóstico adequado de problemas fitossanitários é requerido. Para esse fim, considerando a amplitude de metodologias disponíveis, a tendência atual é de se utilizar uma abordagem múltipla no diagnóstico, ou seja, fazer convergir as técnicas de forma a tornar os resultados complementares (MARQUES et al., 2000).

O diagnóstico preciso é premissa fundamental da análise, pois será usado nas mais diversas tomadas de decisão como medidas de controle, aceitação ou rejeição de lotes de materiais de propagação vegetativa, estendendo-se a sistemas onde a sensibilidade da técnica adotada deve permitir que seja evidenciada uma infecção latente, como os sistemas quarentenários. Ao enfocar diagnóstico de fitobactérias em sementes, o uso de mais de uma metodologia pode tornar essa análise mais acurada.

O plaqueamento em meios de cultura semisseletivo tem sido utilizado rotineiramente para detectar e acessar a viabilidade de bactérias, no entanto, é trabalhoso. Para a identificação de cada patógeno há necessidade de técnicos especializados, com índices consideráveis de insucesso, como no caso de *Xylella fastidiosa*, além de consumirem tempo e serem insensíveis (COPLIN et al., 2002). Esse longo processo leva a grandes perdas econômicas e, por conseguinte, seria desejável dispor de métodos rápidos e seguros para a identificação da bactéria (PALOMO et al., 2000). Porém, o isolamento bacteriano é requerido objetivando a obtenção de culturas puras necessárias à identificação e realização de testes de patogenicidade. Há, entretanto, aspectos ligados à bioecologia das fitobactérias em que o isolamento pode ser negativo, especialmente para as espécies de crescimento lento ou quando a bactéria na amostra encontra-se no estado “viável, mas não cultivável”, denominado VBNC (*viable but non culturable*) (GHEZZI; STECK, 1999), as células bacterianas

quando neste estado, mesmo viáveis, não são detectadas, gerando falsos negativos.

Com o avanço da biotecnologia, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas em procedimentos de detecção, no intuito de rapidamente diagnosticar e caracterizar o patógeno (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999). A técnica de amplificação enzimática direcionada por *primers* de DNA, ou reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose, na detecção de algumas fitobactérias em plantas e sementes (MORETTI; AMATULLI; BUONAURO, 2009; KAZEMPOUR et al., 2010; SAKTHIVEL; MORTENSEN; MATHUR, 2001). A PCR tem permitido a detecção precoce de patógenos, antes mesmo do surgimento dos sintomas na planta, de forma mais rápida, fácil e com um alto nível de sensibilidade, se comparada aos métodos tradicionais, trazendo economia de tempo e dinheiro nos trabalhos de diagnose e identificação (GONÇALVES et al., 2002).

Na PCR, a especificidade depende das condições de amplificação e da seleção de *primers* (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). Variações da técnica PCR, como a rep-PCR, tem sido muito utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (BARBOSA, 2007; LELIS, 2009; LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002).

Dentro do genoma de diversas bactérias existem sequências repetitivas conservadas chamadas sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), sequências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (ERIC) e elementos BOX. A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na observação da ocorrência dessas sequências repetitivas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Três pares de *primers* são comumente usados para análise rep-

PCR *fingerprinting*, correspondendo às sequências ERIC, REP e BOX. Os protocolos são denominados ERIC-PCR, REP-PCR e BOX-PCR, respectivamente e, quando utilizados coletivamente, rep-PCR (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999).

Outra variação da PCR é a BIO-PCR (SCHAAD et al., 1995), uma técnica bastante utilizada em rotina pelo Laboratório de bacteriologia de plantas da UFPA, para análise de sementes. Essa técnica consiste em um enriquecimento biológico antes da amplificação enzimática da PCR convencional ou quantitativa, através do plaqueamento do extrato bruto de sementes, diluído, em meio de cultivo semisseletivo, visando o aumento do número de células do organismo-alvo e a redução do número de saprófitas. Uma vantagem dessa técnica é a sua capacidade de diferenciar células mortas de células vivas presentes na amostra, que é importante em medidas fitossanitárias e a PCR por si só não consegue distinguir, além de se poder realizar, paralelamente, teste de patogenicidade com as colônias suspeitas.

A identificação do organismo suspeito através da BIO-PCR pode ser totalizada dentro de 2-3 dias, tempo bem menor que os 10-14 dias requeridos para os métodos tradicionais de cultivo e posterior identificação, e quando utilizada a qRT-PCR ao invés da PCR convencional, esse período pode ser reduzido, e ainda, as chances de contaminação da amostra são também reduzidas. Entretanto o custo do equipamento é mais caro que o requerido para o método convencional e, portanto não está disponível em muitos laboratórios (SONG et al., 2004).

De uma maneira geral, a BIO-PCR facilita a detecção do organismo alvo e tem sido utilizada com sucesso na detecção e identificação de bactérias associadas a sementes e plantas assintomáticas (PENYALVER et al., 2000; SAKTHIVEL; MORTENSEN; MATHUR, 2001; SCHAAD; BERTHIER-

SCHAAD; KNORR, 2007; SCHAAD et al., 1995, 1999; WELLER et al., 2000; WELLER; STEAD, 2002).

2.3 Controles positivos

Controles positivos são bactérias ou seu material genético, utilizados como referência em testes-diagnóstico. Controles positivos clonados são obtidos por isolamento de DNA genômico das células bacterianas, seguido de ligação de fragmentos bem caracterizados de DNA a um carreador, chamado de vetor. O DNA recombinante é introduzido na célula hospedeira, processo denominado transformação, dessa forma o DNA inserido é replicado junto com o vetor, gerando um grande número de moléculas de DNA idênticas. Tem princípio semelhante ao de uma biblioteca subgenômica, as quais pequenos fragmentos caracterizados são utilizados, porém, nessas bibliotecas os fragmentos são obtidos após cortes aleatórios feitos com enzima de restrição (AUSUBEL et al., 1996).

3 HIPÓTESE

A confiabilidade da técnica de diagnose por PCR se baseia na utilização de controles positivos para a validação da metodologia, que podem ser apenas os fragmentos de DNA de interesse, não sendo necessário manter a bactéria viável nos laboratórios de diagnose, pois a sua substituição por um clone de um fragmento de seu DNA genômico também é eficiente. Portanto, a manutenção do banco de controles positivos através da clonagem de um fragmento genômico de valor diagnóstico de bactérias fitopatogênicas irá propiciar a segurança necessária aos laudos diagnósticos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas em apoio à Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

4 OBJETIVO

Estabelecer controles positivos para diagnose de bactérias fitopatogênicas, para uso em testes de diagnose por PCR.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Bacteriologia e Virologia vegetal do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

5.1 Obtenção dos isolados

Os isolados bacterianos utilizados no trabalho são provenientes da coleção de bactérias do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFLA. A escolha das bactérias levou em consideração a demanda por testes diagnósticos na clínica fitossanitária da UFLA, foram também utilizados isolados obtidos de amostras vegetais naturalmente infectadas provenientes de regiões produtoras.

Tabela 1 Isolados e procedências

Bactérias	Hospedeiras	Procedência
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Melão, Melancia	UFRPE
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	Videira	UFLA
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Citrus	UFLA; APTA citrus
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	Maracujá	EMBRAPA Amazônia Oriental
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Eucalipto, Batata	UFLA; UFV
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Cafê	UFV

5.2 Extração do DNA bacteriano

As espécies bacterianas foram cultivadas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) e o DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo de Ausubel et al. (1992) modificado. Aliquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas de cada isolado, cultivadas sob agitação por 24h a 28°C em meio líquido 523 (KADO; HESKETT, 1970), foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 segundos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspendidos em 567µL de TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6, 1mM EDTA), 30µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20mg/mL), seguindo-se de agitação manual. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37⁰C por 1 hora. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, seguindo-se de agitação em vórtex. Novamente, foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água) seguindo-se de agitação em vórtex. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 65⁰C por 10 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente, adicionou-se igual volume (780 µL) de clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, seguindo-se de agitação manual por 10 minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após esse processo, a fase superior de cada tubo foi transferida para novo tubo, medindo-se o volume (500 µL). Nessa etapa adicionou-se 0,6 volumes (300 µL) de álcool isopropílico, agitando-se gentilmente até o DNA precipitar. Novamente procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, seguindo-se de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e posterior descarte do etanol 70%. O *pellet* foi ressuspendido em 30 µL de TE e armazenado a -20°C.

5.3 Reação em cadeia da polimerase- PCR

A reação foi realizada para um volume total de 50µL, contendo: 35,5µL de água livre de nuclease, 5,0µL de 5X PCR *Buffer*, 3,0 µL de MgCl₂ – 25mM, 1,0 µL de dNTP mix 10mM, 1,0 µL do *primer* anti-senso, 1,0 µL do *primer* senso, 0,5µL da enzima Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega[®]) e 3,0 µL do DNA.

Os ciclos no termociclador foram variáveis com o tipo de isolado bacteriano e dos *primers* empregados (Tabela 3). Os produtos finais das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, previamente acrescido do corante Gel Red[®], com visualização das bandas de DNA sob luz ultravioleta.

Após a confirmação positiva das ampliações específicas, os produtos da PCR foram então clonados e armazenados em *Deep freezer* a -80°C.

Os *primers* empregados no estudo foram Xmal 970 R/ 2f (LELIS, 2009) para *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Wfb1/2 (WALCOTT; GITAITIS, 2000) para *Acidovorax aveane* subsp. *citrulli*, Xac 01/02 (COLETTA FILHO et al., 2006) para *Xanthomonas citri*, Xapas-F/Ri/Ro (MUNHOZ et al., 2011) para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, PS1/PS2 (PASTRIK; MAISS, 2000) para *Ralstonia solanacearum* e PscHrc662F/ PscHrc751R (COTTYN et al., 2011) para *Pseudomonas cichorii* (Tabela 2.).

Tabela 2 Descrição dos iniciadores utilizados no estudo

Primer	Sequência	Fragmentos
Xmal 970 R	5'(CCG CCT TCAG) 3'	970 pb
Xmal 970 2f	5' (CAG CGA TCGC)3'	
wfb1	5' (GAC CAG CCA CAC TGG GAC) 3'	360 pb
wfb2	5' (CTG CCG TAC TCC AGC GAT) 3'	
xac 01	5' (CGC CAT CCC CAC CAC CAC CAC GAC) 3'	581 pb
xac 02	5' (AAC CGC TCA ATG CCA TCC ACT TCA) 3'	
Xapas-f	5' (ATC CCG ACA GGC TCC ACC) 3'	520 e 641pb
Xapas-Ri	5'(TTC GCT TCC AGC AGC TATAC)3'	
Xapas-Ro	5'(TTC CAG ATT GTT TTT CTA AAGC)3'	
Ps1	5'(AGT CGA ACG GCA GCG GGG)3'	553 pb
Ps2	5'(GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA) 3'	
PscHrc662F	5' (AGGCTTTATGGAAACCCTGACG) 3'	90 pb
PscHrc751R	5' (ACAATCACC GCCACGATCAG) 3'	

Tabela 3 Descrição dos ciclos de temperatura dos iniciadores

Primer	Condições de temperatura
Xmal 970 R	95°C/2 min (95°C/1min, 57°C/45s, 72°C/1min) 30X, 72°C/5min
Xmal 970 2f	
wfb1	95°C/5min (95°C/30s, 65°C/30s, 72°C/30s) 30X, 72°C/5min
wfb2	
xac 01	94°C/3min (94°C/45s, 60°C/45s, 72°C/45s) 36X, 72°C/5min
xac 02	
Xapas-f	
Xapas-Ri	94°C/3min (94°C/1min, 58°C/1min, 72°C/1min) 35X, 72°C/5min
Xapas-Ro	
Ps1	95°C/5min (95°C/30 s, 68°C/30s, 72°C/45s) 35X, 72°C/5min
Ps2	
PscHrc662F	95°C/5 min (95°C/1min, 63°C/1min, 72°C/ 30s) 30X, 72°C/10min
PscHrc751R	

5.4 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos selecionados das amplificações por PCR a partir de *primers* específicos foram purificados utilizando-se o *kit* de purificação comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System – Promega®. A purificação ocorreu diretamente da reação da PCR.

5.5 Clonagem e extração do DNA plasmidial (Miniprep)

O DNA purificado foi clonado utilizando-se o *Kit* de clonagem pGEM®-T Easy Vector (Promega®) conforme instruções do fabricante. A Célula competente de *Escherichia coli* DH5α foi transformada, adicionando-se 2 µL da reação de ligação (5 µL 2X Rapid Ligation Buffer; 1 µL pGEM®-T Easy Vector; 1 µL T4 DNA ligase; 2 µL produto da PCR e 1 µL H₂O deionizada), seguido de incubação dos tubos por 30 minutos no gelo e choque térmico por 30 segundos a 42°C. Novamente os tubos foram colocados no gelo por 5 minutos. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 280 µL de meio líquido SOC (2 g triptona; 0,5 g extrato de levedura; 1 mL NaCl 1M; 0,25 mL KCl 1M; 97 mL de água destilada; 1mL de glicose 2M, filtrado e 1 mL Mg²⁺ 2M, filtrado). A seguir os tubos foram levados para agitação em “*shaker*” (80 rpm), por 30 minutos, à temperatura de 37°C. Em placas descartáveis foi vertido o meio LB sólido (10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; 15 g ágar, completando-se para 1.000 mL com água destilada) contendo ampicilina (100 mg/mL) e em seguida, suplementado com IPTG (isopropylthio-β-D-gactoside) e X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), espalhando-se até a secagem e armazenadas a 37°C.

Posteriormente, foi feito o plaqueamento e incubação das células transformadas a 37°C, por 18 horas. Após a incubação, foi realizada a

multiplicação das colônias transformadas, ou seja, colônias que, provavelmente, continham o inserto (colônias brancas), em meio LB líquido com ampicilina (10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; completando-se para 1000 mL com água destilada). Os tubos foram incubados novamente sob agitação (80 rpm), a 37°C, por 18 horas.

Decorrido esse tempo, fez-se a extração do DNA plasmidial, pelo método da lise alcalina (Miniprep): 1,5 mL das culturas crescidas *overnight* foram transferidas para microtubos, centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 segundos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado, agitado em vórtex e adicionado 300 µL TENS *buffer*, seguido de agitação em vórtex. Em seguida, foram adicionados 150 µL de NaOAc 3M e centrifugados por 3 minutos, descartou-se o *pellet* e adicionou-se 5 µL de RNAase A, seguido de incubagem a 37°C, por 30 minutos. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 200 µL de PCI (fenol: clorofórmio:álcool isoamílico), na proporção 25:24:1, agitados em vórtex e centrifugados, por 5 minutos, a 12.000 rpm. Após esse processo, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e a esses foram adicionados 900 µL de etanol absoluto (EtOH 95%) gelado, seguindo-se de agitação em vórtex e centrifugação, a 12.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, o *pellet* lavado com 300 µL de etanol 70% e o precipitado secado a vácuo e ressuspensionado em 30 µL de água ultrapura autoclavada.

A presença do *insert* nos plasmídeos purificados (miniprep) foi verificada com a digestão por enzima de restrição (*EcoRI*), de acordo com as indicações no *kit* de clonagem, ou com a PCR utilizando o plasmídeo clonado como DNA molde da reação. Os fragmentos genômicos clonados foram armazenados no Banco de Controles Positivos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia (DFP – UFLA), em *Deep Freezer* a -80°C.

5.6 Digestão dos plasmídeos da Clonagem com a Enzima de Restrição EcoRI

Para verificar a clonagem dos produtos amplificados que não puderam ser confirmados pela PCR, foi utilizado a enzima de restrição *EcoRI*. As reações de digestão dos plasmídeos foram realizadas com o *Kit* da enzima de restrição *EcoRI* (Promega[®]), contendo 1 µg de plasmídeo clonado, 1 µL da enzima *EcoRI*, 1 µL do tampão 10x e 7 µL de água ultrapura. As reações foram incubadas por 2 horas a 37°C e os produtos da digestão visualizados em gel de agarose, previamente acrescido do corante Gel Red[®], a 0,7% sob luz ultravioleta.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubados a 28°C por um período de 48 horas. Após o cultivo, procedeu-se a extração de DNA genômico utilizando-se o protocolo de Ausubel et al. (1992) modificado. Uma alíquota do DNA de cada isolado foi utilizada na PCR com *primers* específicos. Os produtos da PCR foram purificados e clonados com o auxílio de um *kit* comercial. As cópias foram verificadas através de restrição enzimática do plasmídeo vetor e através da PCR. Os fragmentos clonados foram empregados como controles positivos em testes diagnósticos e comparados com os fragmentos de DNA genômico através do peso molecular em análise eletroforética utilizando-se de um marcador como referência.

6.1 Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

Isolados referência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* foram submetidos a PCR com *primers* específicos (Figura 1). Os produtos da PCR foram purificados, clonados e a fidelidade da cópia foi verificada pela comparação entre os padrões de banda dos fragmentos clonados e os purificados (Figura 2). Os produtos da amplificação foram específicos para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, estando de acordo com Walcott e Gitaitis (2000). Os clones se mostraram eficientes quando aplicados como molde de DNA em reações de PCR, produzindo fragmentos de peso molecular semelhante aos fragmentos de DNA genômico, tornando-se um eficiente controle positivo para a reação e serviu para dar suporte aos testes de diagnose por PCR realizados pela

Clínica Fitossanitária da UFPA, para análise da ocorrência da bactéria em lotes comerciais de sementes de melão e melancia.

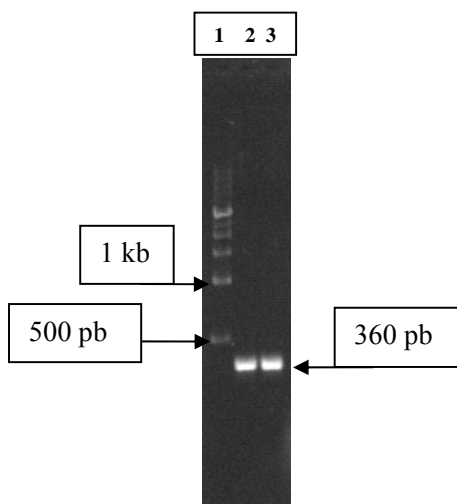


Figura 1 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos com *primers* específicos para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-3: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*(AacR1, AacR2)

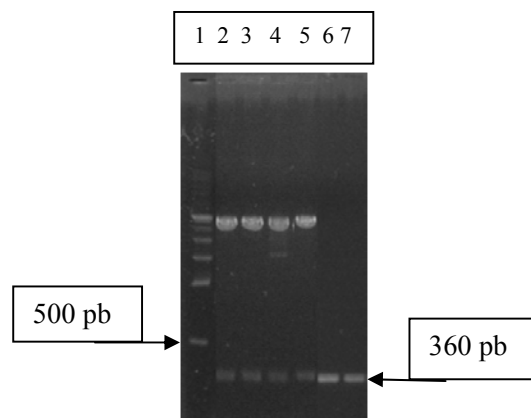


Figura 2 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), para confirmação da clonagem dos fragmentos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, pelo corte com a enzima de restrição *EcoRI*. 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®); 2-5: fragmentos de DNA de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* clonados; 6-7: Produtos da PCR purificados

6.2 Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

No presente estudo, isolados de *X. viticola*, da coleção de bactérias do laboratório de bacteriologia DFP-UFLA foram submetidos a PCR com o emprego de um par de *primers* que amplificaram um fragmento com peso molecular de 970 pares de bases (pb) no DNA de todos os isolados de *X. viticola* testados (Figura 3). O *amplicon* gerado foi clonado e utilizado como controle positivo para o agente causal do cancro bacteriano da videira em diagnose por PCR. Verificou-se que o fragmento clonado produziu cópias de mesmo peso molecular que aquelas produzidas pelo DNA genômico, portanto, os fragmentos clonados podem substituir os fragmentos de DNA genômico de *X. viticola* em teste diagnóstico por PCR (Figuras 5 e 6). Lelis (2009) quando utilizou o mesmo par de *primers* para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, verificou ao testar a especificidade dos indicadores que o mesmo

fragmento era amplificado por *X. viticola* e que os dois organismos compartilham a mesma sequência-alvo em seus genomas (Figura 4).

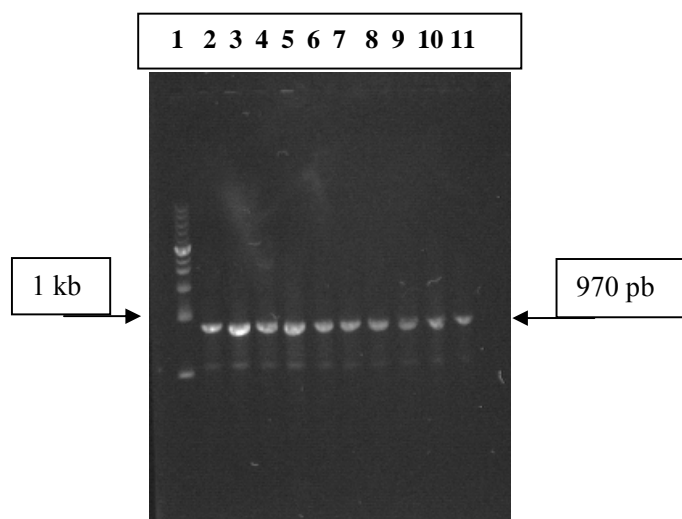


Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-11: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (isolados da coleção de bactérias do laboratório de bacteriologia do DFP-UFLA)

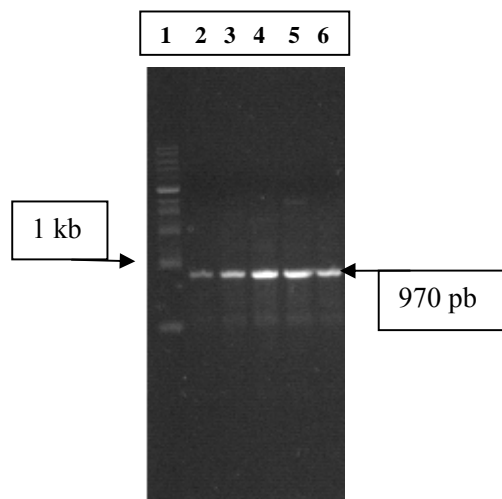


Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*: 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco[®]), 2-3: *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* , 4-6: *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

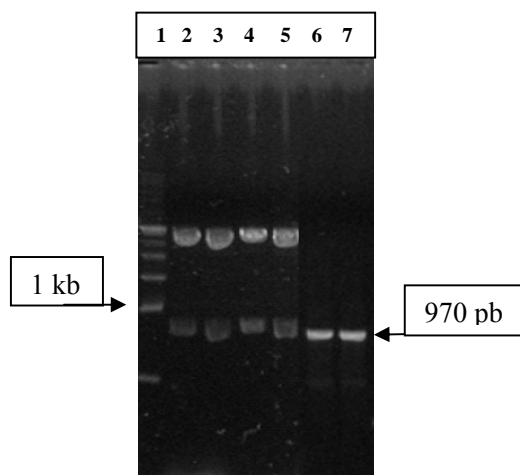


Figura 5 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) para confirmação da clonagem de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, pelo corte com a enzima de restrição *EcoRI*. 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco[®]), 2-5: Fragmentos de DNA de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* clonados; 6-7: Produtos da PCR purificados

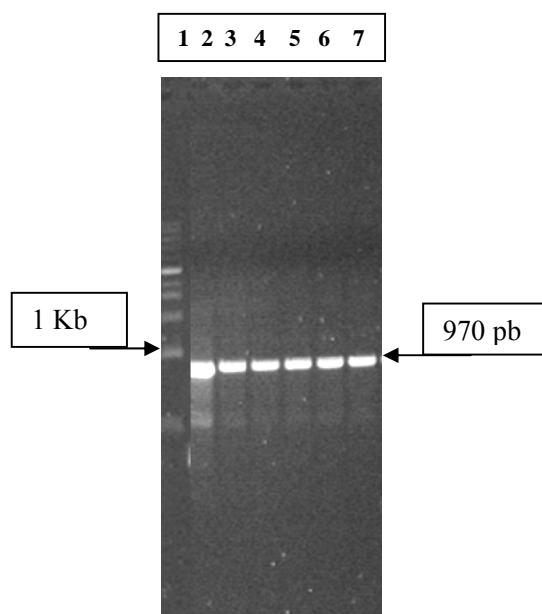


Figura 6 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em comparação com o controle positivo clonado. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2: Fragmento de DNA clonado de *X.viticola*, 3-7: *X.viticola* DNA genômico

6.3 Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Onze Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* da coleção de bactérias do laboratório de bacteriologia DFP-UFLA, provenientes de regiões produtoras do Estado do Pará foram submetidos a PCR com *primers* específicos e amplificaram os fragmentos esperados, estando de acordo com Munhoz et al. (2011). Um conjunto de 3 *primers* foi projetado para amplificar dois fragmentos, um de maior tamanho com a combinação dos *primers* Xapas-F e Xapas-Ro (641 pb) que é comum a todos os patovares de *Xanthomonas*, pois anelam as sequências conservadas e outro de menor tamanho com a combinação dos

primers Xapas-F e Xapas-Ri (*Reverse* interno) (520 pb), que é específico ao pv. *passiflorae* (Figura 7). A amplificação específica é dependente do *amplicon* de maior tamanho, portanto, foi o fragmento escolhido para clonagem (Figura 8). Uma *Nested-PCR* utilizando o produto da primeira PCR com os *primers* externos foi realizada com o objetivo de verificar se o fragmento escolhido a ser clonado iria reproduzir a amplificação esperada do fragmento específico quando na presença dos 3 *primers* na reação (Figura 9). O fragmento reproduziu o esperado na PCR, teve a amplificação do fragmento específico, comum a todos os isolados de *X. passiflorae*, o fragmento foi purificado, clonado e se apresenta útil para ser utilizado como controle positivo em testes diagnósticos por PCR (Figura 10).

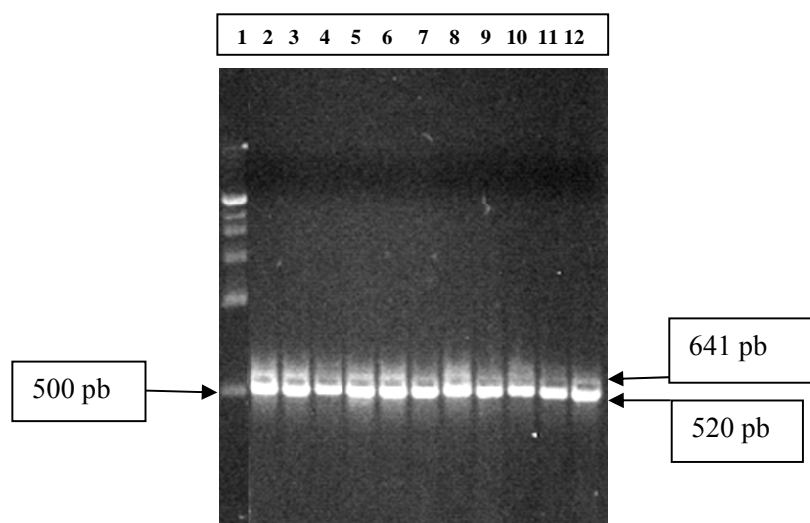


Figura 7 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco®), 2-12: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

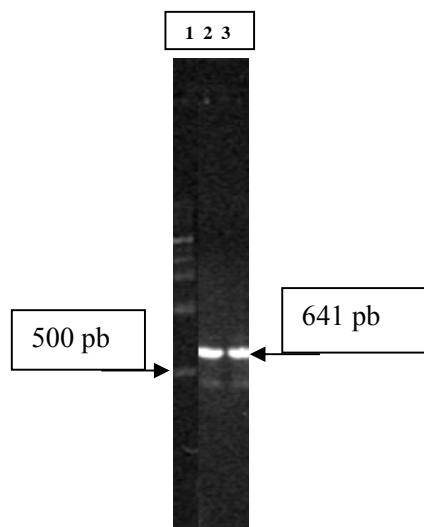


Figura 8 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com *primers* externos 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2-3: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

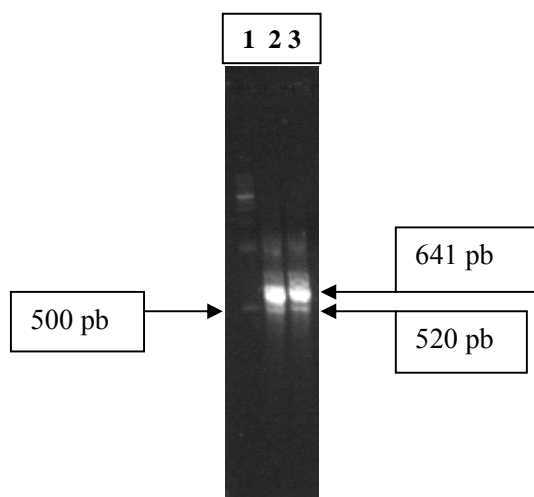


Figura 9 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da *Nested-PCR* obtidos para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com os *primers* internos e externos 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2-3: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

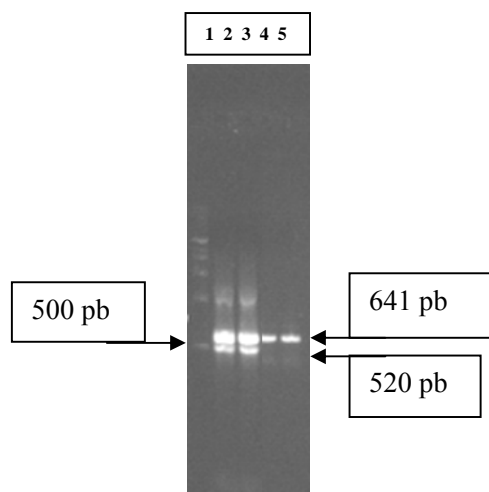


Figura 10 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* para confirmação da clonagem. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2-3: PCR com fragmentos clonados, 4-5: produtos da PCR purificados

6.4 Emprego de um fragmento de DNA clonado de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em teste de diagnose por PCR

O fragmento de DNA de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* clonado foi utilizado como controle positivo na detecção por PCR. O Produto da PCR foi um fragmento específico de 581 (pb), que foi comparado pela análise eletroforética com os produtos obtidos, quando utilizou-se de DNA genômico extraído dos isolados de *X. citri* da coleção de bactérias do laboratório de bacteriologia DFP-UFLA e do isolado referência XAC 306-2. O uso do fragmento clonado como molde na reação de PCR amplificou um único fragmento de peso molecular 581(pb), semelhante àqueles amplificados pelo DNA genômico extraído de *X.citri*, evidenciando a sua utilidade como controle positivo para teste diagnóstico por PCR (Figura 11).

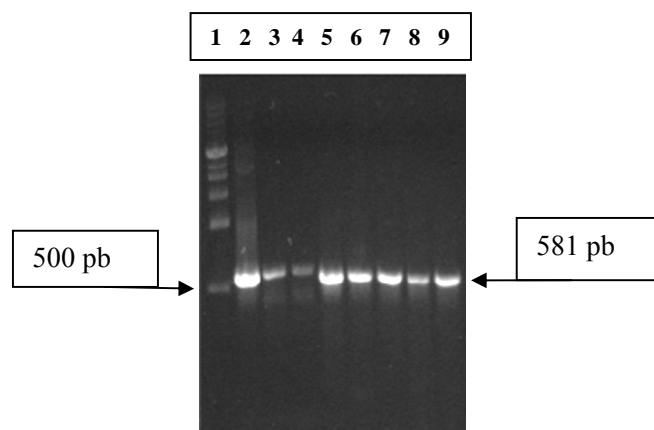


Figura 11 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos a partir de *primers* específicos para *Xanthomonas citri* em comparação com o controle positivo clonado. 1: Marcador 1Kb DNA (Amresco[®]), 2: Fragmento de DNA clonado de *X. citri*, 3-8: *X. citri*.(UFLA), 9: *X. citri* (Isolado referência XAC 306-2)

6.5 Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de *Pseudomonas cichorii*

Pseudomonas cichorii é um patógeno de grande importância econômica no Brasil, sua ocorrência foi descrita em culturas de diferentes espécies botânicas, tais como eucalipto, couve, cenoura, feijão, fumo, mamona (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2008), tomate (SILVA JÚNIOR et al., 2009a) e café. Para o presente estudo, os *primers* utilizados para a detecção específica de *P. cichorii* foram os mesmo utilizados por Cottyn et al. (2011), inicialmente projetados para uso em qRT-PCR. Para a sua utilização na PCR convencional, foi realizada uma adaptação das condições de temperatura da reação para que as temperaturas em cada etapa estivessem próximas da temperatura ótima de funcionamento da enzima de trabalho, Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega[®]), seguindo as recomendações do fabricante. As modificações foram suficientes para amplificar o fragmento específico, de tamanho 90 pb (Figura

12). O produto da PCR que continha o fragmento de interesse foi purificado e o fragmento clonado (Figura 13).

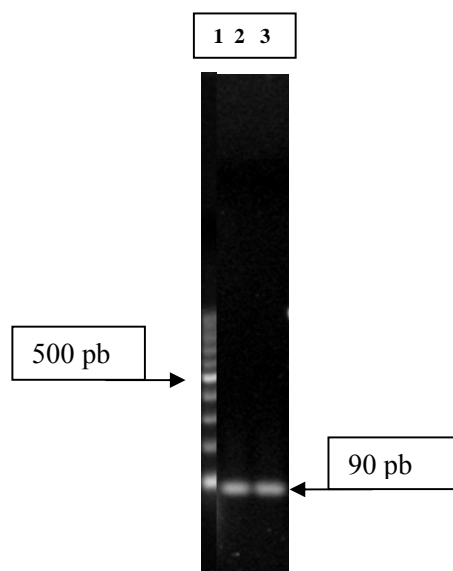


Figura 12 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Pseudomonas cichorii*. 1: Marcador 100 pb DNA (Amresco[®]), 2-3: *Pseudomonas cichorii* (coleção de bactérias do Laboratório de bacteriologia do DFP-UFLA)

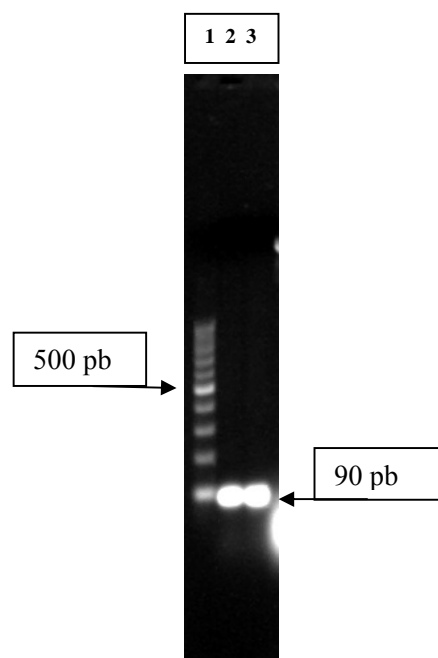


Figura 13 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos para *Pseudomonas cichorii* para confirmação da clonagem. 1: Marcador 100 pb DNA (Amresco[®]), 2: PCR com fragmento clonado, 3: PCR DNA genômico *Pseudomonas cichorii*

6.6 Clonagem dos fragmentos de DNA e diagnose por PCR de *Ralstonia solanacearum*

Na análise de *Ralstonia solanacearum*, patógeno de merecido destaque devido às perdas econômicas causadas pela sua infecção em diversas culturas, os *primers* utilizados na PCR amplificaram um fragmento de 553 pb estando de acordo com Pastrik e Maiss (2000). Isolados patogênicos a tubérculos de batata e um isolado patogênico a eucalipto, apresentaram a amplificação esperada (Figura 15). Um fragmento foi escolhido para a purificação e clonagem e os clones foram comparados com os produtos da PCR purificados (Figura 16).

Entretanto, para isolados de *Ralstonia solanacearum* suspeitos de pertencerem à raça 2, nenhuma amplificação foi verificada.

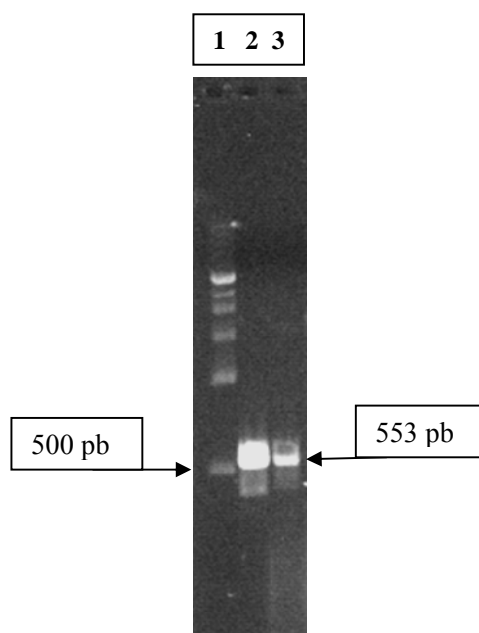


Figura 14 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%), dos produtos da PCR obtidos com *primers* específicos para *Ralstonia solanacearum*. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2: *Ralstonia solanacearum*- Isolado de batata; 3: *Ralstonia solanacearum*- Isolado de eucalipto-UFV 32

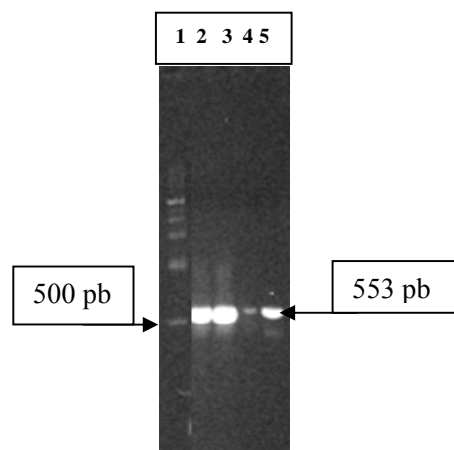


Figura 15 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) dos produtos da PCR para confirmação da clonagem de fragmentos de DNA de *Ralstonia solanacearum*. 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®) 2-3: produtos da PCR com fragmentos clonados; 4-5: produtos da PCR purificados

A manutenção de um banco de controles positivos com fragmentos genômicos clonados de interesse para uso na detecção de bactérias fitopatogênicas, permite uma maior confiabilidade nos testes de diagnose utilizando a técnica da PCR, por evitar que falhas na execução durante a montagem da reação da PCR ocasionem a emissão de laudo com falso negativo quando o patógeno está presente na amostra ou falso positivo na ausência deste. Outro importante aspecto acerca dos controles positivos obtidos de fragmentos genômicos específicos clonados, é a possibilidade de se realizar testes diagnósticos moleculares para pragas quarentenárias sem a necessidade de manutenção de culturas viáveis, estando de acordo com as normas fitossanitárias.

Testes de diagnose que se baseiam na metodologia da PCR devem ser conduzidos com cautela, pois erros de pipetagem e contaminação da amostra são frequentemente observados e a presença de inibidores da PCR na amostra, se

houver, requer uma metodologia que garanta a sua eliminação antes ou durante a extração do DNA bacteriano.

7 CONCLUSÃO

A utilização de fragmentos de DNA clonados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Xanthomonas citri*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas cichorii* e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, para emprego em testes de diagnose por PCR, revelou-se uma eficiente ferramenta para uso como controle positivo. Verificou-se que os fragmentos clonados substituem os fragmentos obtidos diretamente a partir do DNA genômico dos isolados de cada bactéria na diagnose por PCR e ainda possibilitam a sua multiplicação e armazenamento indefinidos, visando à manutenção do estoque de fragmentos, além de eliminar o risco de acidentes laboratoriais que resultam na disseminação de patógenos para áreas isentas.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. London: Academic, 2005. 922 p.

ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. H.; RIBEIRO, R. L. D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 107-131, 2003. Parte 1.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: J. Wiley, 1992. v. 1.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: J. Wiley, 1996. 606 p.

BARBOSA, J. F. Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 2007. 134 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 41, de 1º de julho de 2008**. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18888>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

COLETTA FILHO, H. D. et al. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 279–285, 2006.

COPLIN, D. L. et al. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 304-311, 2002.

COTTYN, B. et al. Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 453–461, 2011.

GHEZZI, J.; STECK, T. R. Induction of the viable but non cultivable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosmos and sterile soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 203-208, 1999.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se sondas de DNA e "primers" específicos. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 28, p. 20-27, 2002.

HAYWARD, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HAYWARD A. C.; HARTMAN, G. L. **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB, 1994. p. 123-135.

HE, L.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, p. 1357-1361, 1983.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 3 jan. 2012.

ISHIDA, A. K. N. **Mancha-Bacteriana do maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*)**: etiologia e estratégias de controle. Belém: Embrapa Amazônia oriental, 2009. 23 p.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, June 1970.

KAZEMPOUR, M. N. et al. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 20, p. 2860-2865, 2010.

KIMATI, H. Princípios gerais de controle de doenças de plantas. In: GALLI, F. (Coord). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. v. 1, p. 289-296.

LEITE JÚNIOR, R. P. Bacteriose do maracujazeiro e estratégias para seu controle. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3., 2002, Viçosa. **Anais...Viçosa**, MG: UFV, 2002. p. 97-98.

LEITE JÚNIOR, R. P. Surviving with citrus canker in Brazil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 9., 2003, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 2003. p. 890–896.

LELIS, F. M. V. **Primers development detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum***. 2009. 32 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LIMA, M. F. et al. Bacterial canker of rapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 440-443, 1999.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças de tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 55-73.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Epidemiologia e controle das bactérias das hortaliças. In: ZAMBOLIN, L. et al. **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa, MG: UFV/DFP, 2007. p. 115-162.

LOPEZ, M. M. et al. Update on molecular tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses. In: RAO, J. R.; FLEMING, C. C.; MOORE, J. E. (Ed.). **Molecular diagnostics: current technologies and applications**. Norfolk: Horizon Bioscience, 2006. p. 1-46.

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

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 34, p. 1-87, 2008.

MARQUES, A. S. A. et al. Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 106, p. 715-734, 2000.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, p. 466–471, 2009.

MUNHOZ, C. F. et al. Genetic diversity and a PCR-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v.101, n. 4, p. 416-424, 2011.

PALOMO, J. L. et al. Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* based on the stable low molecular weight RNA (LMW RNA) profiles. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 106, p. 789–793, 2000.

PASTRIK, K. H.; MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by Polymerase chain reaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 619-626, 2000.

PENYALVER, R. et al. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2673-2677, 2000.

SAKTHIVEL, N.; MORTENSEN, C. N.; MATHUR, S. B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 435-441, 2001.

SALES JÚNIOR, R.; MENEZES, J. B. **Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no estado do RN**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 2001. 25 p. Relatório Técnico.

SCHAAD, N. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; KNORR, D. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 1-8, 2007.

SCHAAD, N. W. et al. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 243-248, 1995.

SCHAAD, N. W. et al. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 1095-1100, 1999.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2001.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. et al. Comunicação científica: ocorrência de *Pseudomonas cichorii* em tomateiro no estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 285-290, 2009a.

SILVA JÚNIOR, T. A. F. et al. Gama de hospedeiros e reação de genótipos de tomateiro a *Pseudomonas cichorii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 35, n. 2, p. 127-131, 2009b.

SMITH, J. M. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. In: QUARANTINE pests for Europe. Cambridge: University, 1997. p. 986–990.

SONG, W. Y. et al. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 667-676, 2004.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Cutobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 331-337, 2002.

TRINDADE, L. C. et al. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 1, p. 16-23, 2007.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 528-534, 2003.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Watermelon Seed using Immunomagnetic Separation and the Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 470-474, 2000.

WELLER, S. A. et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2853-2858, 2000.

WELLER, S. A.; STEAD, D. E. Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 118-126, 2002.