

**DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* PARA
DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
*malvacearum***

FLÁVIA MARA VIEIRA LELIS

2009

FLÁVIA MARA VIEIRA LELIS

**DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* PARA DETECÇÃO DE
Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lelis, Flávia Mara Vieira.

Desenvolvimento de *primers* para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* / Flávia Mara Vieira Lelis. – Lavras : UFLA, 2009.

32 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. *Primers*. 2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. 3. Detecção. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.5194

FLÁVIA MARA VIEIRA LELIS

**DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* PARA DETECÇÃO DE
Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de março de 2009

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira

UFLA

Profa. Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro

UNIMONTES

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A minha mãe, Maria Dalva Vieira
Lelis e minhas irmãs, Júnia Dark
Vieira Lelis e Nélia A. Vieira Lelis,
pela compreensão, incentivo, apoio e
carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, encaminhamento e força dados neste período.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste trabalho.

Ao professor Ricardo Magela de Souza, pelos ensinamentos, confiança, orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

À professora Antônia dos Reis Figueira, pela orientação, disponibilidade e ensinamentos.

À professora Regina Cássia Ferreira Ribeiro, pelas preciosas sugestões.

Às amigas Ana Beatriz, Suellen e Priscilla, pelo auxílio, ensinamentos e amizade.

A Ana Maria de Castro, pela amizade, aprendizado e colaboração no trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, Henrique, Flávio, Roberto, Gustavo, Edgar, Samuel e Helon, pela colaboração no trabalho e pela convivência agradável.

À Dra. Deila Magna dos Santos Botelho, pela força e incentivo.

À Dra. Juliana Franco Barbosa, pela colaboração no trabalho, pelas sugestões e pela disponibilidade.

A minha querida mãe, Maria Dalva, e minhas irmãs, Júnia e Nélia, pelo incentivo, compreensão e amor, imprescindíveis durante o período de realização deste trabalho.

A minha família maravilhosa, sempre presente.

Aos amigos de pós-graduação, em especial Carol, Bernardo, Jucilayne, Rejane, Diego, João Eduardo, Cleilson, Juliano, Rosana, Adriano, Mirella, Luana, Rodrigo e Amanda pela convivência, aprendizado e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia.

A todos os amigos e, principalmente, àqueles que, de certa forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A cultura do algodão	3
2.2 A mancha-angular do algodoeiro.....	4
2.3 Disseminação e transmissão	5
2.4 Detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas em sementes	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Origem e obtenção dos isolados de Xanthomonas.....	9
3.2 Extração do DNA.....	11
3.3 ERIC PCR	12
3.4 Purificação dos produtos da PCR.....	13
3.5 Clonagem e sequenciamento dos produtos da PCR	14
3.6 Teste de especificidade dos primers	15
3.7 Sensibilidade da técnica PCR utilizando-se primers específicos para Xam	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

LELIS, Flávia Mara Vieira. **Desenvolvimento de *primers* para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum***. 2009. 32 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A semente é um dos principais veículos de introdução de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) nas lavouras de algodão. A bactéria pode estar associada às sementes, tanto externa como internamente, sendo ambas as formas igualmente eficientes na transmissão da doença. A técnica de 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. Objetivou-se, com este trabalho, o desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção de Xam em sementes de algodão. Para tanto, *primers* foram desenhados e testados quanto à especificidade e à sensibilidade em dezenove isolados de Xam pertencentes aos estados de MG, SP, GO, MT e PR, três de *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv), dois de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *campestris*, um de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* spp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Os *primers* XMAL970-2F/1R apresentaram resultados positivos para 18 dos 19 isolados de Xam, não amplificando para os demais gêneros e espécies, exceto para o patovar *viticola*. Embora Xam e Xcv apresentem as mesmas bandas, essas bactérias podem ser diferenciadas pelo hospedeiro, sendo o patovar *viticola* patogênico a videira. O isolado IBSBF 1733 produziu um fragmento de, aproximadamente, 2000 pb, não característico de Xam. A técnica PCR é capaz de detectar até 10 ng de Xam, quando se emprega o par de *primers* desenhado XMAL970-2F/1R, permitindo a amplificação de uma banda de, aproximadamente, 903pb.

*Comitê orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (coorientadora)

ABSTRACT

LELIS, Flávia Mara Vieira. **Primers development detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum***. 2009. 32 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The seed is the main vehicle for the introduction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) in the cotton field. The bacterium can be seed-associated extern or internally and both forms are equally efficient in the disease transmission. The PCR technique allows the early pathogen detection, even before symptoms appear in the plant, in a faster, easier and higher sensibility level if compared to the traditional plating methods, resulting in a saving in time and money of the identification and diagnosis. The objective, in this work was the development of specific primers for detection of Xam in cotton seed. For such, primers were designed and tested for specificity and sensitivity in nineteen strains of Xam belonging to the States MG, SP, GO, MT e PR, three of *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv), two of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *campestris*, one of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* spp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. The primers XMAL970-2F/1R showed positive results for 18 out of the 19 Xam strains, no amplification to the other genera and species was observed, but the patovar *viticola*. However, Xam and Xcv presented the same band, this bacterium can be differentiated by host, being the patovar *viticola* pathogenic to grapevine. The strain IBSBF 1733, yielded an estimated 2000 nt fragment not characteristic of Xam. The PCR technique allowed to detect until 10 ng of Xam, when the designed primer pair XMAL970-2F/1R was used, yielding an estimated 903 nt band.

*Guidance Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Adviser), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO GERAL

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum* (Smith) (Vauterin et al., 1995) (= *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) (Xam) é o agente etiológico da mancha-angular do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). Esta é a fitobacteriose de maior importância na cultura, principalmente em regiões sob condições favoráveis (Agrios, 2005).

A utilização de cultivares resistentes é considerada um dos métodos mais seguros no controle da doença (Cia & Fuzatto, 1999), porém, na prática, por razões técnicas ou econômicas, nem sempre é possível adotá-lo, sendo necessária a aplicação de métodos alternativos ou complementares à resistência genética (Chiavegato, 2005).

A semente é um dos principais veículos de introdução de Xam nas lavouras de algodão, portanto, todo o investimento depositado pode ser comprometido com a utilização de sementes contaminadas ou infectadas.

A associação de Xam às sementes pode ocorrer tanto externa como internamente, sendo ambas as formas igualmente eficientes na transmissão da doença (Brinkerhoff & Hunter, 1963).

A estimativa das perdas de rendimento causadas exclusivamente por Xam torna-se difícil, pois muitos fatores estão envolvidos, como o estágio em que a planta é infectada, as condições ambiente prevalecentes durante o ciclo da cultura, a infecção e a capacidade da planta para crescer longe da doença (Zomorodian & Rudolph, 1993). Entretanto, a detecção de Xam associada às sementes é fator essencial para a adoção de práticas de controle e determinação de padrões de tolerância, evitando-se, assim, a introdução do patógeno em novas áreas e a utilização excessiva de defensivos agrícolas ou outras práticas de controle que aumentam o custo de produção.

Atualmente, os testes para detecção de Xam em sementes de algodão são baseados em exame visual, utilização de meio semisseletivo e teste de patogenicidade. No entanto, sementes contaminadas, geralmente, são assintomáticas e os testes, em sua maioria, apresentam baixa sensibilidade e especificidade, sendo demorados e de difícil aplicação em larga escala.

A técnica de 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 de dinheiro nos trabalhos de diagnose e identificação (Gonçalves & Rosato, 2002).

Diante do exposto e considerando-se a importância econômica da mancha-angular do algodoeiro e o efeito não satisfatório dos produtos químicos recomendados para o seu controle no campo, torna-se imperativo o desenvolvimento de um método rápido, sensível e específico que permita a detecção de Xam nas análises de rotina de lotes comerciais de sementes de algodão, para prevenir a ocorrência e os riscos de expansão da doença nas áreas de produção.

Desse modo, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver *primers* específicos para a detecção de Xam em sementes de algodão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do algodão

A cotonicultura brasileira encontra-se em um momento especial, no qual a retomada da produção vem se realizando com duas características inovadoras: o avanço do plantio em regiões não tradicionais de cultivo e o incremento generalizado no nível tecnológico da atividade, com a mecanização da lavoura desde o plantio até a colheita (Fuzatto & Cia, 2001) e a utilização da engenharia genética como forma de facilitar a produção (Agrianual, 2008).

Do mesmo modo, o setor têxtil nacional também passou por transformações que contribuíram para o seu crescimento, com grandes investimentos em modernização tecnológica e expansão da capacidade, evolução do comércio internacional e desconcentração regional da produção (Gorini, 2000).

De acordo com os dados da safra 2007/08, a China é o maior produtor mundial de algodão, com, aproximadamente, 8 milhões de toneladas, o que representa cerca de 30% de todo o algodão em pluma produzido no mundo. A Índia ocupa a segunda posição nesse “ranking”, seguida pelos Estados Unidos. O Brasil é o quinto maior produtor com, aproximadamente, 6% da produção global. Nesta mesma safra, no aspecto produtividade, o Brasil se destaca com o maior índice entre os principais produtores mundiais de pluma, 1.423 kg por hectare (United States Department of Agriculture - USDA, 2009), devido ao alto grau tecnológico empregado nas lavouras, como exigência do padrão de cultivo predominante na cotonicultura atualmente (Agrianual, 2008).

Em algumas atividades agropecuárias, o lucro com os resíduos ultrapassa o da atividade principal. A cultura do algodão tem papel especial no novo modelo de produção integrada de alimentos, fibras e energia. Neste âmbito, a cotonicultura contribui para o aumento da receita e a diversificação da produção, além de manter o equilíbrio bioenergético dos sistemas agropecuários nacionais (Agrianual, 2008).

A cultura do algodão no país é, atualmente, considerada de expressão, devido ao seu valor econômico e social, utilizando mão-de-obra de custo relativamente alto (Cia & Salgado, 2005).

Na agricultura familiar, a cultura do algodão promove o envolvimento de pessoas no cultivo, beneficiamento, industrialização e comércio de seus produtos e subprodutos, contribuindo para a permanência do pequeno produtor diretamente no campo (Araújo et al., 2007).

2.2 A mancha-angular do algodoeiro

A mancha-angular é uma doença potencialmente importante, pois o agente etiológico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), possui grande variabilidade e está presente em praticamente todas as regiões de cultivo. Por ser amplamente disseminada, constitui num grave problema para a cotonicultura (Cia & Salgado, 1997).

Os sintomas típicos da doença surgem nas folhas de algodão como lesões sempre angulosas, inicialmente de coloração verde e oleosa e, posteriormente, parda e necrosada. Quando ocorre a colonização em variedades mais suscetíveis, podem ser visualizadas lesões nos pecíolos das folhas, nas hastes principais da planta e nos pedúnculos das maçãs. Os sintomas também podem aparecer nas

maças, causando manchas semelhantes às induzidas nas folhas (Cia & Fuzatto, 1999).

Quando as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento da doença, sérias perdas podem ocorrer acompanhadas, geralmente, de redução dos estandes, lesões nas mudas, queda das folhas e podridão das maçãs (Watkins, 1981).

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia estrita e movimenta-se por apenas um flagelo polar. Em meio de cultura, as colônias são lisas e amarelas.

As condições ótimas para o desenvolvimento da doença no campo são temperaturas entre 25° e 30°C e alta umidade, com a ocorrência de chuvas ou irrigação (Watkins, 1981).

Hunter et al. (1968) identificaram 15 raças de Xam quanto aos sintomas em diferentes variedades de algodoeiro.

Chiavegato (2005), em estudo adaptado de Cia & Fuzatto (1999) sobre a importância potencial de doenças do algodoeiro nos principais estados produtores do Brasil, entre os anos de 1999 a 2005, constatou que a mancha-angular, antes considerada apenas medianamente importante em alguns estados produtores, tornou-se de grande importância num período relativamente curto de tempo, demandando medidas efetivas de controle.

2.3 Disseminação e transmissão

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum* está associada às sementes, tanto interna como externamente (Brinkerhoff & Hunter, 1963), o que favorece sua sobrevivência e disseminação, uma vez que sementes são propágulos que

apresentam maior potencial de viabilidade no tempo, em comparação com outras partes vegetais de propagação (Machado, 1988).

No campo, a disseminação do inóculo ocorre em razão de chuvas acompanhadas por ventos fortes. Essas condições favorecem também a infecção, pois provocam encharcamento dos tecidos do hospedeiro e injúrias mecânicas, facilitando a penetração. Outro importante fator no desenvolvimento de epidemias é a temperatura, que tem grande influência na manifestação dos sintomas, mesmo em variedades resistentes (Cia & Salgado, 1997).

Sob condições ambientes favoráveis, Xam penetra nas folhas através dos estômatos ou hidatódios, ou pode sobreviver saprofiticamente na superfície de folhas jovens até que as condições ambientais sejam favoráveis à sua penetração (Allen, 2006). Nas lesões, o exsudato bacteriano fica na superfície foliar para posterior dispersão. No momento em que as maçãs infectadas e maduras se abrem e recebem a água da chuva antes da colheita, o patógeno se associa às sementes. Estas poderão armazenar a bactéria para iniciar a infecção primária em mudas jovens na estação seguinte (Watkins, 1981).

Os sintomas da mancha-angular desenvolvem-se à temperatura média de 25°C e umidade relativa de 85%. O vento e as chuvas de granizo aumentam a severidade da doença significativamente.

A bactéria pode sobreviver por vários anos associada às sementes ou em resíduos infectados, como folhas, caules e capulhos, de colheitas anteriores, condições nas quais é resistente à dessecação, calor seco e radiação solar. A sobrevivência em resíduos de colheita é favorecida por condições de tempo seco. A bactéria pode provocar lesões nos cotilédones durante a germinação da semente. A associação com as sementes permite sua dispersão por longas distâncias e introdução, incluindo novas raças, em novas áreas, países e campos (Allen, 2006).

2.4 Detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas em sementes

De acordo com Schaad (1989), métodos utilizados para a detecção de bactérias em sementes devem ser eficientes e seguros, já que o nível de infestação e/ou infecção tende a ser baixo.

Meios semisseletivos foram descritos para detecção de *Xam* em sementes de algodão. O meio desenvolvido por Mehta et al. (2005) é recomendado para o plaqueamento direto das sementes, enquanto o de Soares (2006) e Barbosa (2007) é para o plaqueamento de extratos de sementes não trituradas e o de Dezordi (2006), para extratos de sementes trituradas. Entretanto, o plaqueamento em meios de cultura semisseletivo é um processo lento e trabalhoso, que pode levar até 6 dias para apresentar resultados (Tebaldi et al., 2007).

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 et al., 1999).

Recentemente, foram publicados trabalhos testando a eficiência de sondas de DNA específicas na detecção de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Gonçalves et al., 2002) utilizando diretamente o DNA da fitobactéria, imunofluorescência em extratos de sementes para *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Chitarra, 2006; Barbosa, 2007) e avaliação da região espaçadora 16S-23S DNAr como marcador molecular para a diferenciação de *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, ambas patogênicas a orquídeas (Corrêa et al., 2007). A aplicação da técnica de hibridização DNA-DNA, associada ao sistema Biolog, testes bioquímicos e análise do perfil de ácidos graxos em 183 diferentes isolados de *Xanthomonas*, permitiu a Vauterin et al. (1995) a proposição de uma nova classificação para o gênero.

Métodos baseados em “Enzyme linked immunosorbent assay”, ou ELISA, podem ser ferramentas adicionais na detecção de bacterioses (Gutiérrez, et al., 1998). Anticorpos policlonais foram utilizados na identificação de *Xanthomonas albilineans* (Comstock & Irey, 1992) e *X. fragariae* (Opgenorth et al., 1996), embora estes últimos autores tenham observado reações-cruzadas do anticorpo policlonal para *X. fragariae* com outros patovares de *Xanthomonas campestris*.

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 et al., 1991).

Três *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 et al., 1999). Estes *primers* são designados para amplificar a região entre dois elementos repetitivos adjacentes, entretanto, pode ocorrer o anelamento do *primer* a outras sequências de DNA homólogas (Gillings & Holley, 1997). A técnica de rep-PCR tem sido muito utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (Opgenorth et al., 1996; Louws et al., 1999; Trindade et al., 2005; Barbosa, 2007; Tegli et al., 2002).

A técnica de amplificação enzimática direcionada por *primers* de DNA, ou reação da polimerase em cadeia (PCR), tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose, na detecção de algumas fitobactérias em plantas e sementes (Deuner, 2007).

Segundo Louws et al. (1999), especificidade é a habilidade em identificar o patógeno de interesse, na ausência de falsos positivos, quando este não está

presente ou na ausência de falsos negativos, quando está presente. Em métodos baseados em PCR, especificidade depende das condições de amplificação e da seleção de *primers* (Louws et al., 1999; Schaad et al., 2001). Alguns trabalhos foram publicados, evidenciando a eficiência do uso de *primers* específicos na detecção de *Xanthomonas* (Halfeld-Vieira et al., 2001; Gonçalves & Rosato, 2002) e outros gêneros de fitobactérias (Leite Junior et al., 1994; Maes et al., 1996; Guimarães et al., 2001; Tegli et al., 2002).

A correta detecção e identificação do agente causal de uma doença é fator essencial para se evitar a sua introdução em novas áreas de cultivo, bem como na adoção de práticas eficientes de controle (Schaad et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Bacteriologia e Virologia Vegetal e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

3.1 Origem e obtenção dos isolados de *Xanthomonas*

Os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* utilizados, descritos na Tabela 1, foram repicados e/ou isolados em meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970).

TABELA 1 Origem dos Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

Isolado	Hospedeiro	Ano
IBSBF 555 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	1985
IBSBF 1038 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	1993
IBSBF 1153 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	1995
IBSBF 1562 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2001
IBSBF 1733 ^{1*}	<i>Gossypium hirsutum</i>	1958
IBSBF 1779 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002
IBSBF 1880 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003
IBSBF 1913 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003
IBSBF 1953 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2004
IBSBF 1954 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2004
IBSBF 2003 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003
IAPAR 13601 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002
IAPAR 13858 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002
IAPAR 11999 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	1997
IAPAR 15219 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002
UFLA 5100	<i>Gossypium hirsutum</i>	2005
UFLA 6200	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003
UFLA 1101	<i>Gossypium hirsutum</i>	2005
UFLA 1102	<i>Gossypium hirsutum</i>	2006
UFLA 6500	<i>Gossypium hirsutum</i>	2006

¹ Isolados provenientes da Coleção de Culturas do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto Biológico – Curador Dr. Júlio Rodrigues Neto, *Isolado Tipo

² Isolados doados pelo pesquisador Rui Pereira Leite Junior, do IAPAR.

Para a confirmação da patogenicidade, foram preparadas as suspensões de todos os isolados, a partir de colônias com 24 horas de crescimento em meio 523, na concentração ajustada para 10⁸ UFC/mL. As suspensões foram inoculadas em plantas de algodão da cultivar suscetível Deltapine Acala 90, com

o segundo par de folhas definitivas, por aspersão na superfície abaxial das folhas, com um pulverizador manual. As plantas foram colocadas em câmara úmida 24 horas antes e depois de inoculadas, sendo, posteriormente, levadas para casa de vegetação. As avaliações iniciaram-se uma semana após a inoculação, verificando-se a presença ou não dos sintomas característicos da mancha angular. Após o aparecimento dos sintomas, as folhas sintomáticas foram herborizadas para a preservação do inoculo, o qual foi também reisolado em meio 523 e preservado em água mineral autoclavada e em meio peptona glicerol (Lazo & Gabriel, 1987) a -80°C.

3.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA, utilizou-se uma versão modificada da metodologia descrita por Ausubel et al. (1987). Aliquotas de 2,0 mL de suspensão bacteriana cultivada em meio líquido 523 (Kado & Heskett, 1970), por 48 horas, a 28°C, sob agitação, foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 2 minutos e os pellets ressuspendidos em solução contendo 567 µL TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA), 30 µL de SDS (10% p/v) e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL). Os tubos foram incubados em banho-maria, a 37°C, por 1 hora. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, seguindo-se de agitação em agitador orbital tipo vortex. Adicionaram-se 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água), seguindo-se de agitação. Os tubos foram, então, incubados em banho-maria, a 65°C, por 10 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente, adicionaram-se 550 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1, seguido de centrifugação, a 12.000 rpm, por 5 minutos. Após este processo, transferiu-se o sobrenadante para novo tubo, medindo-se o volume. Nesta etapa adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, 25:24:1, seguido de agitação em vortex e centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos.

Adicionaram-se 0,6 volumes de isopropanol, misturando-se gentilmente até a precipitação do DNA; centrifugou-se, a 12.000 rpm, por 2 minutos, descartando-se, em seguida, o sobrenadante e lavando-se o pellet com 1 mL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente, a 12.000 rpm, por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e procedeu-se à secagem a vácuo do precipitado. O pellet foi ressuspendido em 30 µL de TE e armazenado a 4°C.

3.3 ERIC PCR

A utilização do *primer* ERIC foi definida com base nos trabalhos de Barbosa (2007) que, utilizando a técnica de rep-PCR e os mesmos isolados aqui empregados, observou que, embora a técnica fosse efetiva para todos os isolados de Xam e para outras espécies analisadas, a amplificação via PCR utilizando o *primer* REP apresentou o número de padrões de bandas em cada isolado de Xam significativamente menor se comparado ao *primer* ERIC. Desse modo, optou-se por esse *primer* para se ter maior parâmetro de comparação com os outros gêneros e espécies utilizados.

Os *primers* ERIC1R (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3'), ERIC2 (5'AAGTAAGTG-ACTGGGGTGAGCG3') (Opgenorth et al., 1996), sintetizados pela empresa Invitrogen Brasil Ltda., foram utilizados na amplificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. A reação foi realizada em volume de 50 µL, contendo 10,0 µL de Buffer 5X; 3,0 µL de MgCl₂ (25 mM); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 2,5 µL de cada *primer*; 28,75 µL de água ultrapura autoclavada, 0,25 µL de Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 2,0 µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100TM (*Programmable Thermae Controller*, MJ Research, Inc.), com as seguintes etapas de amplificação descritas por Opgenorth et al. (1996): desnaturação inicial a 95°C, por 6 minutos; 35 ciclos constituídos de desnaturação, a 94°C, por 1

minuto, anelamento, por 1 minuto, a 52°C e extensão, a 65°C, por 8 minutos, com um ciclo final de extensão, a 68°C, por 16 minutos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5% e corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). O marcador utilizado foi 1 Kb Ladder (AMRESCO). Também se procedeu à reação de amplificação utilizando-se o *primer* ERIC para: isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; *Candidatus Liberibacter americanus*; *C. L. asiaticus*; *Pantoea* spp; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; *Pectobacterium* spp. e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Fundamentado na amplificação positiva do DNA dos 19 isolados de Xam utilizando-se o *primer* ERIC, foram sugeridos 3 isolados de Xam (IAPAR 15219, UFLA 1102 e UFLA 5100) para serem purificados, clonados e sequenciados.

3.4 Purificação dos produtos da PCR

O produto da amplificação utilizando-se o *primer* ERIC foi visualizado em gel de agarose a 1% e fragmentos de DNA de, aproximadamente, 935, 348, 244 pb, obtidos dos isolados IAPAR 15219, UFLA 1102 e UFLA 5100, foram cortados do gel e purificados utilizando-se o kit de purificação (Promega). As etapas da purificação foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante, consistindo na dissolução do gel, filtração, duas lavagens do filtro com etanol e eluição do DNA em água livre de nuclease.

A escolha dos fragmentos de cada isolado citados anteriormente foi feita com base na comparação do padrão de bandas apresentado pelos isolados de Xam e outros gêneros e espécies, sendo escolhido o fragmento dos isolados de Xam que não se repetiam nos outros gêneros e espécies utilizados.

3.5 Clonagem e sequenciamento dos produtos da PCR

O DNA purificado foi clonado utilizando-se o Kit de clonagem pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) conforme instruções do fabricante. Foram utilizados fragmentos de DNA purificado de, aproximadamente, 935, 348, 244 pb. Célula competente de *Escherichia coli* DH5ac 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). Levou-se, então, para agitação em “shaker” (80 rpm), por 30 minutos, à temperatura de 37°C.

Em placas descartáveis foi vertido 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). Em seguida, este foi 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 armazenou-se a 37°C.

Posteriormente, fez-se o plaqueamento das células transformadas e incubaram-se as placas a 37°C, por 18 horas. Após a incubação, realizou-se 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). Estes 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; 1,5 mL das culturas crescidas overnight foi transferido para microtubos, que foram centrifugados, a 12.000 rpm, por 10

segundos. Descartando-se o sobrenadante, o pellet foi ressuspendido, agitado em vórtex e foram adicionados 300 µL TENS buffer, seguido de agitação em vórtex. Em seguida, adicionaram-se 150 µL de NaOAc 3M, centrifugou-se por 3 minutos, descartou-se o pellet e adicionaram-se 5 µL de RNAase A, incubando-se, a 37°C, por 30 minutos. Ao conteúdo dos tubos adicionaram-se 200 µL de PCI (fenol: clorofórmio:álcool isoamílico), na proporção 25:24:1, agitou-se em vórtex e centrifugou-se, por 5 minutos, a 12.000 rpm. Após este processo, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e a estes se adicionaram 900 µL de etanol absoluto (EtOH 95%) gelado, seguindo-se de agitação em vortex e centrifugação, a 12.000 rpm. por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o pellet com 300 µL de etanol 70% e secou-se o precipitado a vácuo. O pellet foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura autoclavada. A presença do insert nos plasmídeos purificados foi verificada com a digestão por enzima de restrição (EcoRI), de acordo com as indicações no kit de clonagem.

O DNA clonado foi sequenciado pela empresa Macrogen, na Coreia do Sul.

As sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA obtidas de cada isolado foram comparadas entre si e com outras sequências disponíveis no “GenBank”, utilizando-se os programas BLAST (Altschul et al., 1997) e CLUSTAL W (Thompson et al., 1994).

A partir das sequências foram desenhados *primers* específicos para Xam. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Oligonet, em Gaithersburg, Maryland.

3.6 Teste de especificidade dos *primers*

A especificidade dos *primers* foi testada com a amplificação dos DNAs genômicos extraídos. Primeiramente, foram testados os isolados de Xam e, posteriormente, os de outras espécies e gêneros pertencentes à coleção do

Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, nas condições descritas anteriormente.

A reação de PCR foi realizada em volume total de 50 µL, contendo 5,0 µL de Buffer 5X; 3,0 µL de MgCl₂ (25 mM); 1,0 µL de dNTP (10 mM); 1,0 µL de cada *primer*; 35,5 µL de água ultrapura autoclavada, 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (Phoneutria) e 3,0 µL de DNA.

As condições da reação foram: 1 ciclo de desnaturação, a 95°C, por 2 minutos; 25 ciclos a 95°C, por 1 minuto; 58°C por 1 minuto, 72°C, por 2 minutos e extensão final a 72°C, por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese e, posteriormente, visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed.

3.7 Sensibilidade da técnica PCR utilizando-se *primers* específicos para Xam

A sensibilidade da técnica utilizando os *primers* XMAL970-2F/1R foi avaliada por meio de diluições em série (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg) do DNA genômico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, isolados IBSBF 1880 e IAPAR 13601. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1% e corado com GelRed.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 isolados de Xam inoculados em plantas de algodão, 19 foram positivos quanto à patogenicidade, ou seja, após a inoculação, surgiram sintomas característicos da doença. Apenas o isolado IBSBF 1953 não apresentou patogenicidade e não foi utilizado nos demais experimentos.

A utilização do *primer* ERIC levou à amplificação de diversos fragmentos a partir do DNA genômico dos isolados de Xam e de outras bactérias fitopatogênicas, pela técnica PCR. Os padrões de banda obtidos com o uso desse *primer* foram semelhantes para os isolados de Xam, com pequenas variações e diferentes de outros gêneros e patovares de *Xanthomonas* testados (figura 1).

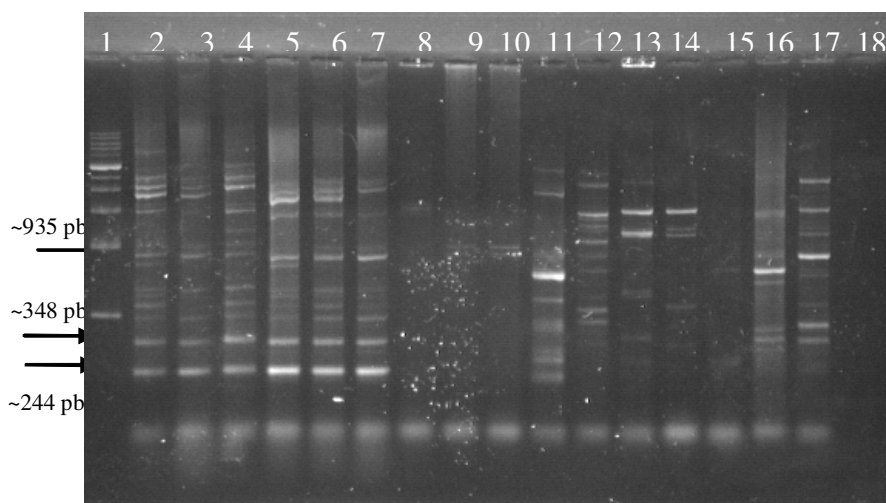


FIGURA 1 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o *primer* ERIC. (1) DNA Marcador 1Kb ladder; (2-7) isolados de Xam: UFLA 6200, IBSBF 555, UFLA 1102, IBSBF 1913, IBSBF 1153, IBSBF 1880; (8) *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; (9) *Candidatus Liberibacter americanus*; (10) *C. L. asiaticus*; (11-12) *Pantoea* spp; (13-14) *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; (15) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; (16) *Pectobacterium* spp.; (17) *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; (18) água ultrapura.

Resultados semelhantes foram obtidos por Opgenorth et al. (1996) e Tegli et al. (2002) que utilizaram esse mesmo *primer* para a amplificação do DNA de isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e de *Xanthomonas fragariae*, respectivamente.

Como se pode observar, nas bandas da Figura 1, três dos fragmentos, contendo 244pb, 348pb e 935pb, apareceram em todos os isolados de Xam estudados, mas não nos demais gêneros e espécies de bactérias testadas. Isso indicou a possibilidade de se desenhar *primers* que fossem específicos para Xam e que gerassem um menor número de bandas que o obtido pelo ERIC, facilitando a diagnose dessa bactéria.

Essas bandas foram, então, purificadas e sequenciadas, e o resultado pode ser visto nas Figuras 2, 3 e 4. A partir dos alinhamentos das sequências, foram desenhados os *primers* para Xam (XMAL213-1F, XMAL213-1R, XMAL327-1F, XMAL327-1R, XMAL970-1F, XMAL970-2F, XMAL970-1R e XMAL970-2R) que estão indicados pelas setas.

Fragmento de 244 pb

	XMAL213-1F		
Xam	GAGCGTCCGTCGCGACACGTTGGACGACTTGGAAACCGATGTGCAAGCCGGTGGGGCGCT	77	
X. citri	GAGCGTCCGTCGCGACACGTTGGACGACTTGGAAACCGATGTGCAAGCCGGTAGGGCGCT	7990	
Xam	ACTCCATTGCACGCTCGCTTGGCATAGGTGCATTGCGTGTGGGTATGCCAGGCGCTGTGC	137	
X. citri	ACTCCATTGCACGCTCGCTTGGCATAGGTGCATTGCGTGTGGGTATGCCAGGCGCTGTGC	8050	
Xam	CTGAGACATCTGCATCAAGCGAGCGCATTGGCGTGCAGTTCGCCAACGCCCTGCCATT	197	
X. citri	CTGAGACATCTGCATCAAGCGAGCGCATTGGCGTGCAGTTCGCCAACGCCCTGCCATT	8110	
			XMAL213-1R
Xam	TGACGCATGACTTTCAGGCCAGGCCCGATGCCTGCAGTCTCGCTCAC	244	
X. citri	TGACGCATGACTTTCAGGCCAGGCCCGATGCCTGCAGTCTCGCTCAC	8157	

FIGURA 2 Localização dos *primers* XMAL213-1F e XMAL213-1R no alinhamento das sequências parciais de DNA dos fragmentos amplificados com o *primer* ERIC dos isolados de Xam, IAPAR 15219 e UFLA 1102, com *X. axonopodis* pv. *citri*.

Fragmento de 348 pb

		XMAL327-1F	
		→	
Xam	GGTGAAGCGTGGCGGTGAAAGGCAGATG	CACCTCGAAATGACGCAGCCATTGGAAGTTCGG	62
X. citri	GGTGAAGCGTGGCGGTGAAAGGCAGATG	CACCTCGAAATGACGCAGCCATTGGAAGTTCGG	6263
Xam	GTCCACGTCCGGCAGCGGCATGTCCACCGAATAATTGCCCACGGTGCTCAGGTAGTCGGC		122
X. citri	GTCCACGTCCGGCAGCGGCATGTCCACCGAATAATTGCCCACGGTGCTCAGGTAGTCGGC		6323
Xam	ATTGAAGCCGGTCGGCGTTTCGGTGCGGGTGTAGGCCGGCACTTCGCGCTTGTCGGCTG		182
X. citri	ATTGAAGCCGGTCGGCGTTTCGGTGCGGGTGTAGGCCGGCACTTCGCGCTTGTCGGCTG		6383
Xam	GGCGAAGGTGGCGGTGTGCACGAAGGCCGAAATGCGCCACGTCGATGAAGCCTTCCAGCTG		242
X. citri	GGCGAAGGTGGCGGTGTGCACGAAGGCCGAAATGCGCCACGTCGATGAAGCCTTCCAGCTG		6443
Xam	GCGCGCGGCGCTGCCGCCGATGTGCAAGGCCGGGCACACGATCTGCTGGAAGCCGACTTC		302
X. citri	GCGCGCGGCGCTGCCGCCGATGTGCAAGGCCGGGCACACGATCTGCTGGAAGCCATCTTC		6503
		XMAL327-1R	
		←	
Xam	GTCCCAGCCCGGCATCGGCGGGATCTGGATGTC	CGCTCACC	348
X. citri	GTCCCAGCCCGGCATCGGCGGGATCTGGATGTC	CGCTCACC	6549

FIGURA 3 Localização dos *primers* XMAL327-1F e XMAL327-1R no alinhamento das sequências parciais de DNA dos fragmentos amplificados com o *primer* ERIC do isolado de Xam, UFLA 1102, com *X. axonopodis* pv. *citri*.

Fragmento de 935 pb

		XMAL970-2F	
		→	
Xam	GTAAGC--TCCTGGGGATTAC	GATGGCGCCAGCGATGGCATTCTTGAAGAGCGAGCCG	59
X. citri	GTAAGCGATCCTGGG-ATGCAC	GATGGCGCCAGCGATGGCATTCTTGAAGAGCGAGCCG	1179
		XMAL970-1F	
		→	
Xam	CAGAGTCTCAATGATCTCCATAGGACGGCGATTGGTATTCCAAAGTGCAGCGACGTAACG		119
X. citri	CAGAGTCTCAATGATCTCCATAGGACGGCGATTGGTATTCCAAAGTGCAGCGACGTAACG		1239
Xam	TCTGCCTTGGTGTTCCTGCGCGAGTAACAACCCGGGACTGCCAGACTTCGATGATCTT		179
X. citri	TCTGCCTTGGTGTTCCTGCGCGAGTAACAACCCGGGACTGCCAGACTTCGATGATCTT		1299
Xam	GAAAATGATGGGTTCACACCTAGACGATGCCTGCAGTGAGCGCCGCCCTCGCGGCCAG		239
X. citri	GAAAATGATGGGTTCACACTCAAACGATGCCTGCAGTGAGCGCCGCCCTCGCGGCCAG		1359
Xam	TGCAGGCGGTTCGGCAATGACCAGGGCC-AGGATCAACATCGTCCAACGGCATCAAGCAAG		298
X. citri	TGCAGGCGGTTCGGCAATGACCAGGGCCAGGATCAACATCGTCCAACGGCATCAAGCAAG		1419



FIGURA 4 Localização dos *primers* XMAL970-1F, XMAL970-1R, XMAL970-2F e XMAL970-2R no alinhamento das sequências parciais de DNA dos fragmentos amplificados com o *primer* ERIC do isolado de Xam, IAPAR 15219, com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *(-)Gaps, sequências em negrito e sublinhadas indicam os *primers* sintetizados no trabalho

Foram possíveis as seguintes combinações: (1) XMAL970-1F/XMAL970-1R, (2)XMAL970-1F/XMAL970-2R, (3) XMAL970-

2F/XMAL970-1R, (4) XMAL970-2F/XMAL970-2R, (5) XMAL327-1F/XMAL327-1R, (6) XMAL213-1F/XMAL213-1R, (7) XMAL970-2F/XMAL970-1R + XMAL327-1R, (8) XMAL970-2F/XMAL970-1R + XMAL213-1R, (9) XMAL970-2F/XMAL327-1R + XMAL213-1R, (10) XMAL327-1F/XMAL327-1R + XMAL213-1R.

O DNA do isolado IBSBF 1562 de Xam foi utilizado na técnica PCR com as combinações de *primers* descritas anteriormente.

Dentre as combinações de *primers* empregadas, as que apresentaram melhor resultado, utilizando as condições de ciclo modificado descrito abaixo, foram as combinações 1 (XMAL970-1F/XMAL970-1R) e 3 (XMAL970-2F/XMAL970-1R). Essas combinações amplificaram fragmentos de tamanhos esperados de, aproximadamente, 920 e 903 pb, respectivamente. Os *primers* da combinação 1 foram sintetizados com base no genoma de *X. axonopodis* pv. *citri* (Figura 4). Logo, não são específicos para Xam. Desse modo, a combinação 3 foi selecionada para o teste de especificidade.

Os *primers* XMAL970-2F/1R utilizados na reação de PCR, com modificações no ciclo original descrito na metodologia, apresentaram resultados positivos para 18 dos 19 isolados de Xam utilizados neste estudo, confirmando os resultados esperados para uma amplificação de, aproximadamente, 903 pb a partir do DNA de Xam (Figura 5). As condições da reação modificada foram: 1 ciclo de desnaturação, a 95°C, por 2 minutos; 20 ciclos, a 95°C, por 1 minuto; 65°C, por 45 segundos; 72°C, por 1 minuto e extensão final, a 72°C, por 5 minutos.

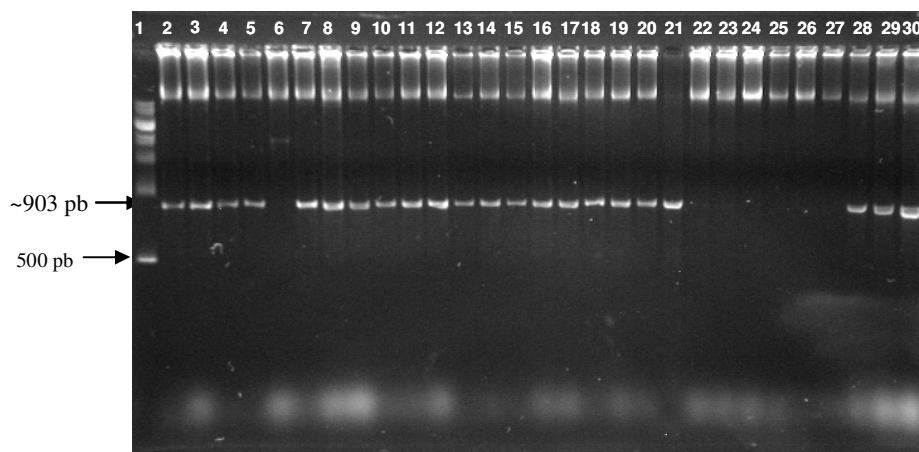


FIGURA 5 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o *primer* XMAL970-2F/1R. (1) DNA Marcador 1Kb ladder; (2-20) isolados de Xam; (21) Xam Isolado IBSBF 1562, utilizando a enzima GoTaq; (22-23) *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; (24) *X. axonopodis* pv. *glycines*; (25-26) *X. campestris* pv. *campestris*; (27) *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; (28-30) *X. campestris* pv. *viticola*.

Não houve amplificação a partir de DNA extraído de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* spp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, quando os *primers* XMAL970-2F/1R foram utilizados. Entretanto, a amplificação a partir de DNA extraído de três isolados de *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv) (Figuras 5 e 6) também foi positiva quando os *primers* XMAL970-2F/1R foram utilizados.

Os produtos de PCR no número 5 e 21 foram obtidos a partir do mesmo isolado, Xam IBSBF 1562. É interessante observar que, no número 5, apareceu outra banda, com mais de 10.000 pb, notada também nos demais isolados, enquanto que no número 21, em que foi empregada uma Taq DNA polimerase de

outra origem, apenas uma banda na altura esperada (~903 pb) foi obtida. Isso demonstra a importância de se utilizar material de boa qualidade nos trabalhos, para não haver influências nos resultados.

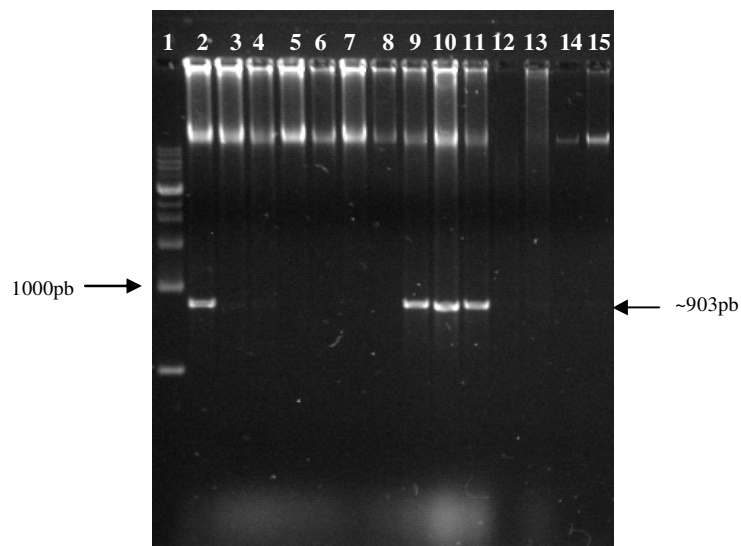


FIGURA 6 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o *primer* XMAL970-2F/1R. (1) DNA Marcador 1Kb ladder; (2) isolado de Xam IBSBF 555; (3-4) *X. axonopodis* pv. *phaseoli*; (5) *X. axonopodis* pv. *glycines*; (6-7) *X. campestris* pv. *campestris*; (8) *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; (9-11) *X. campestris* pv. *viticola*; (12) *Ralstonia solanacearum*; (13) *Pectobacterium* spp.; (14) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e (15) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Halfeld-Vieira et al. (2001) também observaram o aparecimento de uma banda com o mesmo número de pares de bases que o esperado na amplificação do DNA de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, quando *X. axonopodis* pv. *vitians* foi testada com o par de *primers* X4c e X4e (Audy et al., 1996), considerado específico para *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, o que sugere existir identidade entre estes patovares, na região amplificada, com o mesmo número de pares de bases.

O presente estudo demonstra haver também identidade entre Xam e Xcv, na mesma região do genoma utilizada na confecção destes *primers*. O fato foi confirmado quando se utilizaram os *primers* Xcv1F/Xcv3R, desenvolvidos por Trindade et al. (2007), específicos para Xcv, na amplificação dos DNAs de Xam (IBSBF 1880 e IAPAR 13601) e de *X. campestris* pv. *viticola*, ocorrendo a amplificação positiva tanto na concentração de 100 quanto na de 10 ng de DNA extraído (Figura 7).

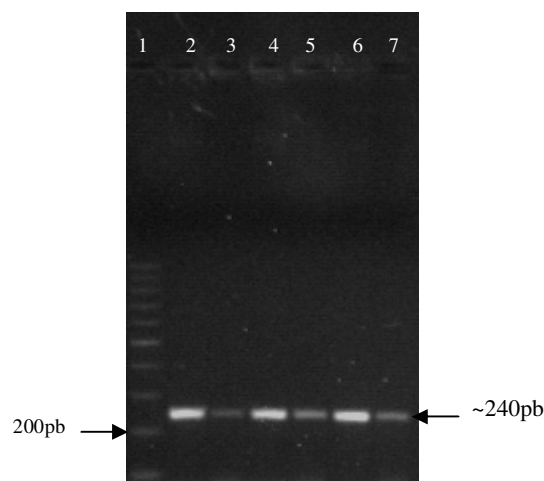


FIGURA 7 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o *primer* Xcv1F/Xcv3R. (1) DNA Marcador 1Kb ladder; (2-3) Isolado Xam IBSBF 1880; (4-5) isolado Xam IAPAR 13601; (6-7) *X. campestris* pv. *viticola*; (2, 4 e 6) 100 ng de DNA; (3, 5 e 7) 10 ng de DNA.

Embora Xam e Xcv apresentem as mesmas bandas quando seus DNAs são amplificados a partir dos *primers* XMAL970-2F/1R, essas bactérias podem ser diferenciadas em análises de rotina, pois, apesar do gênero *Xanthomonas* ter como característica a produção de xantomonadinas, um pigmento que confere coloração amarela às colônias, normalmente, os isolados de *X. campestris* pv. *viticola* apresentam coloração branca. Outros pontos a serem considerados é que esses isolados não ocorrem no mesmo hospedeiro.

Quando se utilizou o DNA do isolado IBSBF 1733, número 6 (Figura 5), com o ciclo ajustado para a temperatura de anelamento de 65°C, ocorreu uma fraca amplificação, produzindo um fragmento de, aproximadamente, 2000 pb, não característico. Halfeld-Vieira et al. (2001) observaram que a redução da temperatura de anelamento para 45°C gerou a amplificação de uma banda não característica em isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

O limite de detecção dos *primers* XMAL970-2F/1R para os isolados de Xam foi de 10 ng (Figura 8). Os *primers* Xcv1F/Xcv3R apresentaram maior sensibilidade, permitindo a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a partir de 1 pg do DNA (Trindade et al., 2007). Tegli et al. (2002) também detectaram *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a partir de 5pg de DNA.

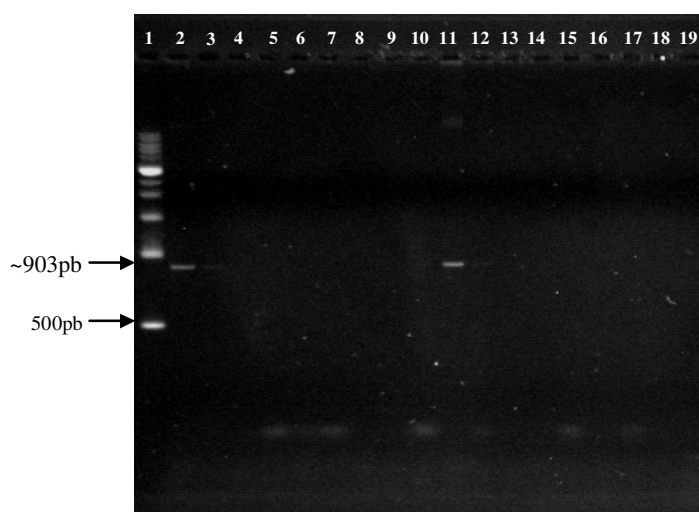


FIGURA 8 Gel de agarose dos produtos da PCR utilizando o *primer* XMAL970-2F/1R. Diliuições em série: (2) 100ng; (3) 10ng; (4) 1ng; (5) 100pg; (6) 10pg; (7) 1pg; (8) 100fg; (9) 10fg; (10) 1fg; (11) 100ng; (12) 10ng; (13) 1ng; (14) 100pg; (15) 10pg; (16) 1pg; (17) 100fg; (18) 10fg; (19) 1fg; (2-10) isolado de Xam IBSBF 1880; (11-19) isolado de Xam IAPAR 13601; (1) DNA Marcador 1Kb ladder.

5 CONCLUSÃO

Os *primers* XMAL970-2F/1R são eficientes para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* por meio da técnica PCR, permitindo a amplificação de uma banda de, aproximadamente, 903pb.

A técnica PCR é capaz de detectar Xam a partir de 10 ng de DNA, quando se emprega o par de *primers* desenhado XMAL970-2F/1R.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2008. 173 p.

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

ALLEN, S. J. Bacterial blight: *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: _____. **National cotton industry biosecurity plan**: appendix 3: pest risk reviews, communications manager. Melbourne: Plant Health, 2006. Disponível em: <www.planthealthaustralia.com.au>. Acesso em: 8 nov. 2008.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. H.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, J. M.; SANTOS, J. A. T.; FIGUEIREDO, L. P. F. A cultura do algodão na agricultura familiar gerando cidadania. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia, 2007. CD-ROM.

AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 361-367, 1996.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHEL, K. **Short protocols in molecular biology**: a compendium of methods: current protocols in molecular biology. 3. ed. New York: Greene, 1987. 122 p.

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

BRINKERHOFF, L. A.; HUNTER, R. E. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 1397-1401, 1963.

CHIAVEGATO, E. J. O problema crescente do uso de fungicidas na cultura do algodoeiro: manejo e propostas para a minimização do problema. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Campina Grande, PB. **Anais...** Campina Grande, 2005. CD-ROM.

CHITARRA, L. G. Métodos para detecção e avaliação da viabilidade de bactérias em sementes: vantagens e desvantagens. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 9., 2006, Passo Fundo. **Resumos...** Passo Fundo: UPF, 2006. v. 1. CD-ROM.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. dos. **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Potafos, 1999. p. 121-131.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. cap. 8, p. 40-55.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 8, p. 41-52.

COMSTOCK, J. C.; IREY, M. S. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. **Plant Disease**, Quebec, v. 76, p. 1033-1035, 1992.

CORRÊA, D. B. A.; FERREIRA, M.; BALANI, D. M.; RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L. Avaliação da região espaçadora 16s-23s DNAr como marcador molecular para diferenciação de *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* e *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* patogênicas a orquídeas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 233-238, jul./set. 2007.

DEUNER, C. C. **Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão**. 2007. 120 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DEZORDI, C. **Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. 96 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FUZATTO, M. G.; CIA, E. Algodoeiro: novas cultivares IAC destacam-se pela resistência à doenças. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 19-20, 2001.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) *primers* is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p. 17-21, 1997.

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

GORINI, A. P. F. Panorama do setor têxtil no Brasil e no mundo: reestruturação e perspectivas. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 12, p. 17-50, 2000. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set1202.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

GUIMARÃES, 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**, Amsterdam, v. 80, p. 1-10, 2001.

GUTIÉRREZ, R.; GARCÍA, T.; GONZÁLEZ, I.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P. E.; MARTÍN, R. Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 372-376, 1998.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; SOUZA, R. M.; FIGUEIRA, A. R.; BOARI, A. J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 737-740, 2001.

HUNTER, R. E.; BRINKERHOFF, L. A.; BIRD, L. S. The development of a set of upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, p. 830-832, 1968.

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, 1970.

LAZO, G. R.; GABRIEL, D. W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 448-453, 1987.

LEITE JUNIOR, R. P.; MINSAVAGE, G. V.; BONAS, U.; STALL, R. E. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1068-1077, 1994.

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

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília, DF: MEC/ESAL/FAEP, 1988. 106 p.

MAES, M.; GARBEVA, P.; KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 63-69, 1996.

MEHTA, Y. R.; BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A semi-selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 489-496, 2005.

OPGENORTH, D. C.; SMART, C. D.; LOUWS, F. J.; BRUIJIN, F. J. de; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprintings. **Plant Disease**, Quebec, v. 80, p. 868-873, 1996.

SCHAAD, N. W. Detection and identification of bacteria. In: SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: APS, 1989. p. 9-16, 122 p.

SCHAAD, N. W.; GAUSH, P.; POSTNIKOVA, E.; FREDERICK, R. On-site one hour PCR diagnosis of bacterial diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. S79-S89, 2001. Abstract.

SOARES, J. **Desenvolvimento de meio semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro**. 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

TEBALDI, N. D.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 56-58, jan./fev. 2007.

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.

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

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 46-54, 2005.

TRINDADE, L. C.; MARQUES, E.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 1, p. 16-23, 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, supply and distribution online**: cotton, table 05 cotton supply and distribution MY 2008/09. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

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

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.

WATKINS, G. M. **Compendium of cotton diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1981. 87 p.

ZOMORODIAN, A.; RUDOLPH, K. *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*: cause of bacterial blight of cotton. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 25-30.