**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*
em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares**

Denise Moedim Balani

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Denise Moedim Balani
Bióloga

**Deteção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes
de algodoeiro por meio de técnicas moleculares**

Orientadora:

Profa. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba

2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Balani, Denise Moedim

Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares / Denise Moedim Balani. - - Piracicaba, 2009. 63 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Algodão 2. Mancha angular 3. Reação em cadeia por polimerase 4. Sementes
Título

CDD 632.32
B171d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais SILVIO e ROSELI,

Pelo amor inigualável de pai e mãe, por todo o suporte financeiro ao longo de tantos anos, por acreditarem em minha capacidade e principalmente por não permitirem que eu desistisse, dedico.

Aos meus irmãos CÁSSIA e ANDRÉ,

Como forma de incentivo e como exemplo de perseverança, ofereço.

Agradecimentos

A Deus, por me conceder a vida.

À Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, por gentilmente me receber em seu laboratório, pela orientação e pelas palavras de incentivo.

À Profa. Dra. Suzete A. Lanza Destéfano, pela orientação científica, pelas críticas construtivas, pelo apoio na elaboração da tese, pelo que desenvolvemos juntas nos quase 10 anos de parceria. À Susi, pela amizade, pelo carinho, pela compreensão, pela preocupação, pela confiança, pelos ensinamentos da vida e para a vida.

À Dra. Irene Maria Gatti de Almeida, por compartilhar comigo o seu vasto conhecimento em fitopatologia, pelas lições aprendidas dentro e fora do laboratório, pelo imenso sentimento de amizade e por todo o carinho e preocupação que demonstrou ter por mim.

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, pelo fornecimento das culturas bacterianas utilizadas neste estudo e por todos os esclarecimentos e sugestões apresentadas no decorrer dos experimentos.

Aos amigos do Instituto Biológico: Luís Otávio Saggion Beriam e seu harém; Soninha e Dani; Celeste; Lucas; e as parceiras de bancada Dani, Dê Salomão e Talitha pelo estímulo, pelas horas de descontração, pela amizade e por todo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho que disponibilizou seu laboratório e permitiu que a técnica Nirlei Aparecida Silva me ajudasse a iniciar os experimentos de sequenciamento.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pelo auxílio técnico prestado no sequenciamento das amostras enviadas.

Aos pesquisadores Edivaldo Cia e Reginaldo Roberto Lüders do Instituto Agronômico de Campinas, pela cessão das sementes.

Aos amigos do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ, em especial à minha querida Carolzinha, que com muita paciência ajudou-me a realizar o que nos foi possível.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, em especial às queridas Maria Cândida, Isolda e Estela, pelo apoio indispensável no cumprimento das disciplinas e também nas infindáveis horas de estudo e concentração.

Aos participantes da banca de qualificação: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore e Dra. Valéria Maia de Oliveira, por seus importantes apontamentos e sugestões.

À Dra. Abi Soares dos Anjos Marques, minha maior incentivadora a cursar parte do doutorado fora do país e que não mediu esforços para que isso acontecesse.

À Dra. Marie-Agnès Jacques, que gentilmente abriu as portas de seu laboratório na expectativa de ter-me entre seus alunos numa oportunidade que, infelizmente, não se concretizou.

À Profa. Yvone Greis, assim como eu, uma amante da língua e cultura francesas, que de forma especialíssima trouxe para minha vida conhecimentos e ensinamentos que jamais serão esquecidos.

À Giovana, passando de secretária do programa à intensa incentivadora do meu trabalho, meu profundo agradecimento por todo o estímulo, pela torcida vibrante, pelo ombro amigo.

À amiga Mariana Ferreira Tonin, que acompanhou minha trajetória desde o começo de tudo, que várias vezes dividiu comigo minhas lágrimas, me confortou com palavras de esperança e contagiou meu coração com sua alegria.

Aos pra sempre amigos Vivian, André e Clarinha, que me trouxeram inúmeras alegrias e deram mais sentido aos nossos últimos dias em Campinas.

Aos queridíssimos amigos Patrícia Riva Patrício, Rita Tiemi Matsubara Karazawa, Carlos Henrique Domingues da Silva, Hermy Karina Moris Ortega, Alessandra Rabalho, Ricardo Yukio Honda, Mauricio Batista Fialho, Nivea Maria Tonucci Zanardo, Ana Paula Orlandini Pilleggi, Rosana Banwartt de Moraes, Camila Nazário Cannon, Fernando Hass, Nicolas Michel Bacic, Clara Maria Clemente Mathias Macedo, Marcelo Pires Macedo, Marina Oliveira de Souza Dias, Murillo Fernandes Bernardes, Denise Hippler, Everton Zaccaria Nadalin, Diogo Coutinho Soriano, Lélia Mara Rizzanti Pereira, Ricardo Zanetti, Max Lara, Cirano Shibuya, Letícia Hawerth, Raquel Rinke, Fernanda Winiawer, Leonardo Seligra Lopes, Juliana Todaro e Juliana Rodrigues Moura, que com amor, carinho e atenção me fizeram acreditar que era possível suportar as exigências, superar as aflições e chegar até o fim.

Às médicas psiquiatras Adélia e Lika e às psicoterapeutas Marta e Fernanda, as quais foram excelentes e imprescindíveis profissionais no alcance de minha reabilitação física e mental.

A todos aqueles que possam ter colaborado direta ou indiretamente para a realização e término deste trabalho de tese,

Muito obrigada.

À eterna amiga Marizete de Fátima Pimentel Godoy, exemplo de garra, força, determinação, responsabilidade e alegria,

a minha admiração.

“Concentre-se em conhecer, não em acreditar.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão Bibliográfica	19
2.1.1 A cultura do algodão e sua importância	19
2.1.2 Doenças do algodoeiro	20
2.1.3 Taxonomia de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	21
2.1.4 Sanidade de sementes	23
2.1.5 Detecção de fitobactérias em sementes	24
2.1.6 Genes conservados como marcadores moleculares	26
2.2 Materiais e Métodos	28
2.2.1 Linhagens bacterianas, condições de crescimento e extração de DNA	28
2.2.2 Amplificação parcial do gene <i>rpoB</i>	30
2.2.3 Purificação dos produtos de amplificação para sequenciamento	30
2.2.4 Sequenciamento e desenho de <i>primers</i>	31
2.2.5 Depósito de sequências no <i>GenBank</i>	31
2.2.6 Amplificação específica para <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	32
2.2.7 Nível de detecção dos <i>primers</i>	32
2.2.8 Deslintamento das sementes de algodoeiro	33
2.2.9 Extração do patógeno da semente	34
2.2.10 Isolamento do patógeno	34
2.2.11 Reação de Gram e teste de hidrólise de amido	35
2.2.12 Teste de reação de hipersensibilidade	35
2.2.13 Testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro	35
2.2.14 Detecção do patógeno por PCR, BIO-PCR e <i>nested</i> -PCR	36
2.3 Resultados e Discussão	37
2.3.1 Amplificação parcial do gene <i>rpoB</i> , sequenciamento e desenho dos <i>primers</i> específicos	37

2.3.2 Amplificação com os <i>primers</i> xam1F/2R e teste de especificidade para <i>X. c.</i> subsp. <i>malvacearum</i>	38
2.3.3 Nível de detecção dos <i>primers</i>	39
2.3.4 Isolamento do patógeno e testes de identificação	42
2.3.5 Reação de Gram e teste de hidrólise de amido	42
2.3.6 Teste de reação de hipersensibilidade	43
2.3.7 Testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro	43
2.3.8 Detecção do patógeno por PCR, BIO-PCR e <i>nested</i> -PCR	44
3 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	59

RESUMO

Xanthomonas citri subsp. *malvacearum* é o agente causal da mancha angular do algodoeiro, uma importante doença reportada em áreas de produção no Brasil e em todo o mundo. A partir da análise comparativa de sequências parciais do gene *rpoB* de linhagens de *X. citri* subsp. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *axonopodis* e *X. citri* subsp. *citri*, desenhou-se o par de *primers* xam1R/2R. Foram testadas 19 espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, além de bactérias dos gêneros *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Ralstonia*, e o produto de PCR específico de aproximadamente 560 pares de bases foi observado apenas para linhagens de *X. citri* subsp. *malvacearum*. Os *primers* desenhados mostraram-se altamente sensíveis, apresentando níveis de detecção de 8 ufc/ 5,0 µL para suspensões da cultura pura da bactéria e 1,0 ng de DNA genômico de *X. citri* subsp. *malvacearum*. No isolamento, a partir de amostras de sementes sabidamente contaminadas, foram obtidas colônias bacterianas com características de morfologia e coloração semelhantes à *X. citri* subsp. *malvacearum*. Esses isolados foram submetidos a testes de coloração de Gram, hidrólise de amido, reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo e tomateiro, testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro, amplificação com os *primers* específicos desenhados e sequenciamento do fragmento obtido e os resultados obtidos confirmaram a identificação dos mesmos como *X. citri* subsp. *malvacearum*. Experimentos combinados de BIO-PCR/*nested*-PCR foram realizados a partir do material obtido do processo de extração do patógeno das sementes contaminadas utilizando-se na primeira etapa de amplificação os *primers* correspondentes à parte do gene *rpoB* e na segunda etapa o produto da primeira amplificação e os *primers* específicos xam1F/2R. O resultado foi a observação de uma banda de aproximadamente 560 pb correspondente ao fragmento específico de *X. citri* subsp. *malvacearum* para todas as amostras testadas. Neste trabalho foi desenvolvido um teste de PCR específico para a detecção e identificação rápida e precisa dessa bactéria em amostras de sementes de algodoeiro.

Palavras-chave: *Primers* específicos; Mancha angular do algodoeiro; Detecção em sementes; BIO-PCR; *Nested*-PCR

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *malvacearum* is the causal agent of angular leaf spot of cotton an important disease reported in production areas in Brazil and worldwide. From the comparative analysis of partial *rpoB* gene sequences of *X. citri* subsp. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *axonopodis* and *X. citri* subsp. *citri* strains, the pair of primers xam1F/2R was designed. Nineteen species of the genus *Xanthomonas* and isolates of the genera *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Ralstonia* were tested and the specific PCR product of about 560 base pairs was observed only for strains of *X. citri* subsp. *malvacearum*. The primers were highly sensitive, with detection levels of 8 cfu/ 5.0 µL for suspensions of pure culture of bacteria and 1.0 ng of genomic DNA of *X. citri* subsp. *malvacearum*. From contaminated seed samples, bacterial colonies were obtained with characteristic morphology and coloration similar to *X. citri* subsp. *malvacearum*. These isolates were tested for Gram stain, starch hydrolysis, hypersensitivity reaction (HR) on tobacco and tomato leaves, pathogenicity tests on cotton plants, amplification with the specific primers designed and sequencing of the fragment obtained. The results confirmed their identification as *X. citri* subsp. *malvacearum*. PCR experiments in combination of BIO-PCR/nested-PCR were performed with the material obtained from the extraction process of pathogen from seeds using in the first step of amplification primers corresponding to part of the *rpoB* gene and the second step the product of the first amplification and the specific primers xam1F/2R. The result was a band of approximately 560 bp corresponding to the specific fragment of *X. citri* subsp. *malvacearum* for all samples tested. In this work, a PCR test for the quick detection and accurate identification of this bacterium in seed samples of cotton were developed.

Keywords: Specific primers, Cotton angular leaf spot, Bacteria detection on seeds; BIO-PCR; Nested-PCR

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é hoje o quinto maior produtor mundial de algodão, sendo antecedido por China, Índia, Estados Unidos e Paquistão. A taxa de produtividade chega a aproximadamente 1,5 tonelada de algodão por hectare, num total de 855.000 hectares de área plantada. Boa parte da produção é utilizada para o consumo interno e, ainda assim, o Brasil exporta praticamente um terço do que produz. Uma pequena parcela do produto é importada, especialmente do Egito e de Israel. Estima-se que em 2015 o país passe a ser responsável por 9,5 % do mercado mundial de algodão, produzindo 2 milhões de toneladas e exportando a metade disso (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO - ABRAPA, 2009).

Um importante fator que pode diminuir drasticamente os valores finais da produção de uma dada cultura é a presença de pragas no campo e o consequente desenvolvimento de doenças. Com relação às bactérias, sua importância como patógenos de plantas se deve não só à gravidade das doenças que causam nas culturas de valor econômico, mas também à facilidade com que podem se espalhar. Dentre as doenças que afetam o algodoeiro podemos citar a mancha angular, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm), que ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtoras de algodão.

O método mais eficaz para controle da doença é a utilização de variedades resistentes, entretanto a eficácia dessas cultivares pode ser reduzida devido ao surgimento de novas raças do patógeno. Um método alternativo para se evitar a ocorrência da mancha angular é a utilização de material propagativo sadio, porém, uma vez que a bactéria pode ser disseminada por meio das sementes, a dificuldade se torna maior. Isto se deve ao fato de que o patógeno pode estar presente numa amostra de sementes em concentração muito baixa e não ser detectado, mesmo nos testes de sanidade realizados antes do plantio. Uma vez no campo e em condições favoráveis, a bactéria pode se multiplicar nas plântulas e dar início a um processo epidêmico.

Os métodos utilizados para a detecção do patógeno em sementes baseiam-se especialmente em técnicas de isolamento em meio de cultura, seguido de testes

bioquímicos, fisiológicos, serológicos e de patogenicidade. Contudo, esses testes demandam várias semanas até a completa identificação.

Por outro lado, os métodos moleculares baseados em sequências específicas de DNA têm sido amplamente empregados na detecção de bactérias fitopatogênicas mostrando-se bastante rápidos, específicos e altamente sensíveis. O avanço da biologia molecular e, em particular da PCR, abriu novos caminhos para a caracterização e identificação de patógenos de plantas e também para o desenvolvimento de estratégias de manejo de doenças.

No caso de *X. citri* subsp. *malvacearum*, a detecção da bactéria é efetuada por meio do isolamento em meio de cultura semi-seletivo e posterior identificação por meio de testes bioquímicos convencionais, ou seja, até o momento não havia descrição de uma ferramenta molecular para a detecção deste patógeno.

O presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia para a detecção e identificação de *X. citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio da utilização de métodos moleculares.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura do algodão e sua importância

O algodão é considerado a mais importante fibra têxtil. Suas primeiras referências históricas vêm de 4.000 anos a.C.. Tecidos de algodão foram encontrados na Índia 3.000 anos a.C.. Na América, vestígios encontrados no Peru datados de muitos séculos antes de Cristo evidenciaram que povos que ali habitaram já manipulavam o algodão. No Brasil, pouco se sabe da história dessa malvácea, porém, constatou-se na época do descobrimento do Brasil que os indígenas cultivavam a planta e eram capazes de converter a fibra em fios e tecidos (CRIAR E PLANTAR, 2009).

O algodoeiro é uma planta de amplo aproveitamento. O caroço (semente), que representa em torno de 65 % do peso da produção, é rico em óleo e contém 20-25 % de proteína bruta. O óleo extraído da semente é refinado e destinado à alimentação humana e à fabricação de margarina e sabão. O bagaço (farelo ou torta), subproduto da extração do óleo, é destinado à alimentação animal (bovinos, aves, suínos) devido ao seu alto valor protéico (40-45 % de proteína bruta). Os restos de cultura como caule, folhas, maçãs e capulhos são utilizados na alimentação de animais em geral (SOAVE; MORAES, 1987). A fibra, representando 35 % do peso da produção (WATKINS, 1981), tem mais de 400 aplicações industriais, entre as quais a confecção de fios para tecelagem (tecidos variados), algodão hidrófilo para enfermagem, confecção de feltro de cobertores, de estofamentos, obtenção de celulose, entre outros (SOAVE; MORAES, 1987).

Para a safra de 2009/ 2010, a previsão para a área plantada no país chega a aproximadamente 48 milhões de hectares. Deste total, estima-se que 800 mil hectares sejam plantados com algodão, posicionando esta cultura em sexto lugar, atrás de outras grandes culturas como a soja, o milho, o feijão, o arroz e o trigo. Os estados com maior produção são Mato Grosso, Bahia e Goiás (ABRAPA, 2009), sendo que o Estado do Mato Grosso representa cerca de 46% da área plantada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2009).

Em termos mundiais, o Brasil ocupa hoje o quinto lugar dentre os maiores produtores de algodão, ficando atrás da China, dos Estados Unidos, da Índia e do Paquistão. Outro destaque do Brasil se deve à produtividade obtida não só na região dos Cerrados, mas em todo o território no qual o algodão é cultivado, pois atingindo patamares superiores a 1.300 kg/ha de pluma, se posicionou como a maior do mundo em condições de sequeiro (ABRAPA, 2009; CONAB, 2009).

A produção brasileira deve continuar crescendo gradativamente, uma vez que a indústria têxtil de todo o mundo vem demandando maiores quantidades de matéria-prima a cada ano. A utilização de tecnologia de ponta permite a obtenção de maiores níveis de produtividade e a melhora na qualidade da pluma, o que é fundamental na comercialização do produto. Nos próximos anos, com a incorporação de novas tecnologias no processo produtivo, o custo da produção tende a reduzir, o que dá ao produto um valor mais competitivo.

Ao contrário dos demais países, o Brasil é o único do mundo que tem condições de aumentar a produção, pois ainda dispõe de recursos naturais a serem empregados no processo produtivo.

2.1.2 Doenças do algodoeiro

O algodoeiro é uma das culturas anuais mais importantes para o Brasil em razão do seu alto valor econômico e social. Para que o país consiga suprir a crescente demanda atual da fibra, principal produto extraído, é necessário que se mantenha o aumento da produtividade ao mesmo tempo em que se promova a expansão das áreas de plantio. Um dos alicerces para isso é a produção e distribuição de variedades selecionadas.

Para se obter uma variedade comercial, dentre outras coisas, os melhoristas buscam a resistência a pragas e doenças. Nesse caso específico, são muitos os patógenos de importância relatados que causam sérias perdas na produção, alguns limitantes para a cultura. Existem centenas de agentes patogênicos, sendo que 90 % desses são fungos, 16 vírus, 2 micoplasmas, 10 nematóides e quatro bactérias (CIA; SALGADO, 2005; GOTO, 1990; BRADBURY, 1986).

Dentre as bacterioses do algodoeiro, a mancha angular, provocada pela *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtoras de algodão do mundo.

Os sintomas visualizados em folhas são caracterizados por lesões angulosas delimitadas pelas nervuras de coloração inicialmente verde e aspecto oleoso, evoluindo para uma coloração parda e a consequente necrose do tecido. Não raramente ocorre também a coalescência das lesões, o que provoca a rasgadura do limbo foliar (CIA; SALGADO, 2005). Nos caules e ramos, podem ser observadas lesões deprimidas, escuras e alongadas, podendo atingir vários centímetros de comprimento e se estender longitudinalmente e transversalmente. Nas maçãs, as lesões podem ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento. Quando jovens, podem não se desenvolver. Se mais maduras, podem formar-se na parede do carpelo lesões circulares encharcadas e de coloração verde escuro, que posteriormente se tornam ainda mais escuras, com aspecto de podridão (VALE; ZAMBOLIM, 1997).

A disseminação do patógeno pode ser favorecida por chuvas frequentes e contínuas e a bactéria é transmitida de uma planta para outra por meio de respingos de água (OLIVEIRA, J. R. de; MOURA, A. B.; SOUZA, R. M., 2005; VAUTERIN et al.; 1995; VALARINI; MENTEN, 1992), sendo que o tempo de sobrevivência dessa bactéria no solo pode alcançar até 11 anos, e nas sementes e restos culturais até quatro anos (CIA; SALGADO, 2005).

O controle desta doença é feito basicamente com a utilização de cultivares resistentes e sementes saudáveis, uma vez que o controle químico utilizando-se antibióticos ou fungicidas cúpricos tem elevado custo e eficiência duvidosa (NASCIMENTO et al., 2000; PEREIRA et al., 2000).

2.1.3 Taxonomia de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

Xanthomonas citri subsp. *malvacearum* pertence ao grupo de bactérias Gram-negativas, aeróbicas e são visíveis ao microscópio óptico, onde apresentam morfologia de bastonetes retos, isolados, medindo 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm, e são móveis por meio de um flagelo polar. A maioria das linhagens do gênero *Xanthomonas* apresenta colônias lisas, mucóides e de coloração amarelada devido à presença de um pigmento amarelo,

insolúvel, denominado de xantomonadina (BRADBURY, 1986; BRADBURY, 1984). Dentre as características fisiológicas e bioquímicas para descrever o gênero *Xanthomonas* pode-se citar oxidase negativa, catalase positiva, negativa para a produção de indol, acetofina e urease, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, não redutora de nitrato, positiva para hidrólise do amido (HOLT et al., 1994).

A bactéria foi descrita inicialmente por Smith em 1901, que a denominou *Pseudomonas malvacearum*. Em 1905, a sua denominação foi alterada por Smith para *Bacterium malvacearum* e por Holland em 1920 para *Bacillus malvacearum*. Mais tarde, em 1923, Bergey et al. propuseram alteração para *Phytomonas "malvacera"*, e com a criação do gênero *Xanthomonas* por Dowson em 1939, a bactéria passou a ser designada como *Xanthomonas malvacearum*. Em 1978, com a criação da terminologia "patovar", Dye propôs a denominação *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (BRADBURY, 1986).

A combinação de dados de homologia DNA-DNA, dados fenotípicos de diferentes grupos da espécie, análise de açúcares por BIOLOG e características de patogenicidade levaram Vauterin et al. (1995) a propor uma nova classificação do gênero *Xanthomonas*. Nesta nova classificação, a espécie mais numerosa, *X. campestris*, foi dividida em 16 espécies: *Xanthomonas campestris*, *X. arboricola*, *X. bromi*, *X. axonopodis*, *X. cassavae*, *X. codiae*, *X. cucurbitae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. pisi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* e *X. vesicatoria*. Neste, *X. campestris* pv. *malvacearum* foi alocada na espécie *X. axonopodis* sendo denominada *X. axonopodis* pv. *malvacearum*.

Em 2005, Schaad et al. sugeriram a reclassificação para *X. smithii* subsp. *smithii*, mas pouco tempo depois o mesmo grupo de pesquisadores elaborou uma emenda e, seguindo as regras estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias foi proposta a nomeação de *X. citri* subsp. *malvacearum* (SCHAAD et al., 2006). Recentemente, Ah-You et al. (2009) propuseram que a espécie *X. citri* seja dividida em vários patovares, incluindo *X. citri* pv. *malvacearum*.

Neste trabalho foi mantida a denominação *X. citri* subsp. *malvacearum*, em razão da sua validação na lista 115 do “*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*” (EUZÉBY, 2007).

2.1.4 Sanidade de sementes

A alta qualidade das sementes é a base para a elevação da produtividade agrícola. Os aspectos genéticos, fisiológicos, físicos e sanitários, quando avaliados conjuntamente, ressaltam o valor real e potencial do uso de um determinado lote de sementes. Essa avaliação assume diferentes graus de importância, dependendo, principalmente, do perfil da produção (BORÉM, 2005).

O transporte de patógenos por meio de sementes ocorre quando estes se encontram misturados a elas (parte da fração impura do lote), aderidos passivamente na superfície da mesma ou estando presentes em seu interior.

A preocupação com a utilização de sementes infestadas/ infectadas ou contaminadas não reside apenas nos danos diretos que isso pode causar à cultura, mas também nas consequências deste fato, considerando-se a possível ocorrência de uma epidemia (MACHADO, 1987).

O cultivo de sementes contaminadas em mistura com sementes sadias é um dos meios mais eficientes de se introduzir ou acumular patógenos em áreas novas ou tradicionais de cultivo. Tal eficiência está relacionada ao fato de que sementes contendo patógenos constituem o foco primário de infecção na fase inicial da cultura, pois não são facilmente reconhecidas em um lote e, por conseguinte, acabam sendo distribuídas aleatoriamente no campo. Nestas circunstâncias, as chances para o estabelecimento das doenças são enormes (MACHADO, 1987).

A diagnose da doença no campo baseada nos sintomas visíveis tem limitações, especialmente porque a bactéria pode sobreviver em tecidos de plantas resistentes sem causar sintomas (CAFATI; SAETTLER, 1980). Ensaio para identificar e quantificar bactérias em tecidos vegetais isolando o patógeno em meio semi-seletivo, por tipagem, por imunoensaios e por inoculação no hospedeiro são válidos, mas também trabalhosos e não são suficientemente precisos para o uso rotineiro (SHEPPARD, J. W.; ROTH, D. A.; SAETTLER, A. W., 1989).

2.1.5 Detecção de fitobactérias em sementes

O sucesso dos programas de quarentena e de certificação de sementes está baseado no desenvolvimento de metodologias que permitam a detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes e que possam ser aplicadas em análise de rotina nos laboratórios (NEERGAARD, 1977).

A detecção de fitobactérias em sementes pode ser realizada por diversas técnicas, incluindo o plantio em ambiente controlado e substrato esterilizado, o uso de meios de cultura seletivos e semi-seletivos, a inoculação do patógeno em plantas hospedeiras, o uso de bacteriófagos, a aplicação de técnicas sorológicas e moleculares por meio de sondas de DNA. No entanto, muitas vezes, faz-se necessário combinar dois ou mais métodos para facilitar a detecção e a identificação do patógeno (CHITARRA, 2001; ROMEIRO; RODRIGUES NETO, 2001; SCHAAD et al., 2001; SAETTLER; SCHAAD; ROTH, 1995).

Métodos baseados na inoculação de extratos em plantas testes, ensaios imunológicos e uso de meio de cultura semi-seletivo já foram empregados para detecção de inúmeras espécies de bactérias em sementes. Entretanto, tais métodos mostraram-se pouco eficientes devido à baixa sensibilidade e ocorrência de resultados falso-positivos como observado em *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, agente causal do cretamento de halo do feijoeiro (GUTHRIE; HUBER; FENWICK, 1965; LAHMAN; SCHAAD, 1985; MOHAN; SCHAAD, 1987). Posteriormente, a detecção deste patógeno foi efetuada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se o gene da phaseolotoxina com resultados mais rápidos e precisos (PROSEN et al., 1993; MOSQUEDA-CANO; HERRERA-ESTRELLA, 1997).

O emprego da técnica de PCR para detecção de fitobactérias em sementes apresenta limitações como a ocorrência de inibidores da reação e, além disso, caso haja um baixo número de células bacterianas presentes nas sementes a detecção do patógeno pode ficar comprometida. Em 1995, Schaad et al. desenvolveram uma metodologia para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em sementes de feijão baseada no crescimento da bactéria em meio de cultivo antes da amplificação por PCR. Esta técnica foi denominada BIO-PCR e não exige a prévia extração de DNA, uma vez que a lise das células ocorre naturalmente durante o ciclo inicial de

desnaturação do protocolo de amplificação. A partir daí muitos outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se esta mesma técnica para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (KOBAYASTI, 2002), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (SCHAAD et al., 1999), *Ralstonia solanacearum* bv-2 (ITO et al., 1998; WELLER et al., 2000a e 2000b), *Xanthomonas albilineans* (WANG et al., 1999), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (SCHAAD et al., 2001; SONG et al., 2004), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (SAKTHIEVEL; MORTENSEN; MATHUR, 2001) e *Rhizobium radiobacter* (sin. *Agrobacterium tumefaciens*) (WELLER; STEAD, 2002).

Uma outra metodologia denominada *nested-PCR* foi utilizada para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em sementes de mandioca naturalmente infectadas. Esta técnica consiste em uma segunda etapa de amplificação utilizando-se *primers* ou iniciadores internos ao primeiro produto da primeira reação de PCR. Os autores concluíram que esta técnica mostrou-se específica, rápida e sensível apresentando níveis de detecção de 1 a 2 células viáveis por reação (OJEDA; VERDIER, 2000; VERDIER; OJEDA ; MOSQUERA, 2001).

O método mais comum descrito para a detecção da *X. axonopodis* pv. *malvacearum* baseia-se no plaqueamento direto em meio de cultura. Zachowski e Rudolph (1988) desenvolveram um meio de cultura que possibilitou verificar a presença de colônias individualizadas sobre a placa após 3 a 5 dias de incubação. Dezordi (2006) conclui em seu trabalho que a semeadura de uma suspensão de macerado de sementes de algodoeiro de amostras naturalmente infectadas em meio de cultura semi-seletivo pode ser indicada para a detecção desta bactéria em análises de rotina de sanidade de sementes. Soares (2006) obteve resultados semelhantes ao detectar *X. citri* subsp. *malvacearum* em placas de Petri, permitindo o isolamento do patógeno com baixo índice de contaminantes. Em 2007, Barbosa, realizando modificações no meio 523, verificou que o mesmo foi eficiente para o crescimento *in vitro* de *X. citri* subsp. *malvacearum*.

A utilização dos meios semi-seletivos em análises de rotina em laboratórios que certifiquem a sanidade de sementes pode apresentar algumas desvantagens. Não raramente, esses meios têm em sua composição reagentes importados de custo elevado. Além disso, a preparação dos meios de cultura normalmente é laboriosa e a

observação do resultado final demanda tempo. É preciso considerar também o alto risco de contaminação durante a manipulação do meio e a realização dos testes.

2.1.6 Genes conservados como marcadores moleculares

O aprimoramento de técnicas baseadas em sequências de DNA ao longo dos últimos anos forneceu a base necessária para a utilização de métodos moleculares e análise filogenética de sequências de DNA e proteínas como instrumentos de rotina no estudo da diversidade de micro-organismos. Diversas áreas da microbiologia, em especial a sistemática, evolução e ecologia microbianas, se desenvolveram em ritmo exponencial nos últimos anos com a aplicação de novos métodos e geração de dados moleculares (MOREL, 1997).

Assim, sequências do operon ribossomal DNAr 16S, 23S, 5S e regiões espaçadoras 16S-23S figuram entre as mais utilizadas em estudos de filogenia de bactérias. Milhares de sequências encontram-se disponíveis em bases de dados como o RDP e o *GenBank*. Os genes do operon ribossômico (DNAr) codificam os RNA ribossomais 16S, 23S e 5S integrantes do ribossomo, uma organela de função essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos (WOESE, 1987; GÜRTLER; STANISICH, 1996). A análise filogenética da sequência de genes do operon ribossomal, particularmente do DNAr 16S, é uma metodologia relativamente simples e com alto poder de resolução, empregada na identificação de micro-organismos em nível de gênero e, em alguns casos, também de espécie (WOESE, 1987; GÜRTLER; STANISICH, 1996).

Em bactérias do gênero *Xanthomonas*, Moore et al. (1997) analisaram sequências de 16S DNAr de oito taxa-espécies e verificaram que há um grau muito elevado de conservação entre elas, limitando a possibilidade do desenvolvimento de *primers* específicos para a diferenciação de espécies.

A região espaçadora 16S-23S DNAr, medianamente conservada, tem sido frequentemente utilizada em estudos de identificação, permitindo a classificação de muitas bactérias por meio de estudos de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (SEAL; COOPER; CLARKSON, 1990; GÜRTLER, 1993; HONEYCUTT; SOBRAL; McCLELLAND, 1995; GÜRTLER; STANISICH, 1996; MAES; GARBEVA;

KAMOEN, 1996; MANCEAU; HORVAIS, 1997; MENDOZA et al., 1998; RIFFARD et al., 1998). Maes, Garbeva e Kamoen (1996) desenharam *primers* específicos para diferenciação de patovares de *Xanthomonas* que causam sintomas de estrias foliares em cereais, a partir da análise de sequências variáveis da região espaçadora do DNAr 16S-23S de linhagens de dois patovares associados a doenças em cereais. No entanto, em alguns casos, o alto nível de similaridade entre sequências dessa região para diferentes espécies de um mesmo gênero tem dificultado o desenho de *primers* específicos.

A partir de 1997, um outro marcador molecular passou a ser utilizado para identificação e diferenciação de espécies de micro-organismos. O gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, uma enzima envolvida no processo transcricional, vem surgindo como um importante gene em análises filogenéticas e de identificação de bactérias, especialmente nos estudos de linhagens cujas relações genéticas são muito próximas (DAHLLÖF; BAILLIE; KJELLEBERG, 2000; KO et al., 2002; DA MOTA et al., 2004; KIM et al., 2004; ADÉKAMBI et al., 2006; MUN et al., 2007; ADÉKAMBI; DRANCOURT; RAOULT, 2009) e tem se mostrado uma valiosa ferramenta para a identificação de micro-organismos em nível de espécie (MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997; RENESTO et al., 2001; KIM et al., 2003). Segundo Dahllöf, Baillie e Kjelleberg (2000), esse gene funciona como um marcador, uma espécie de relógio evolucionário, sendo comum a todas as bactérias e permanecendo conservado, bem como possui suas regiões variáveis, assemelhando-se ao gene 16S rRNA. Apesar da base de dados ainda não ser tão extensa, os dados que se acumulam hoje já nos permitem abranger mais amplamente potenciais associações que não podiam ser determinadas pelas análises de sequências do gene 16S DNAr.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Linhagens bacterianas, condições de crescimento e extração de DNA

As linhagens bacterianas das diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* e dos demais gêneros utilizados neste estudo estão descritas na Tabela 1. Todas as linhagens foram cultivadas em meio Nutriente Ágar (5,0 g de cloreto de sódio, 5,0 g de peptona e 3,0 g de extrato de carne), exceto *X. albilineans* (IBSBF 1374^T), que foi crescida em meio YSG (DYE, 1962), sem cloreto de sódio e acrescido de 0,5 % de glicose. As linhagens foram incubadas a 28 °C por um período de 48 horas.

A extração de DNA foi efetuada de acordo com Pitcher, Saunders e Owen (1989).

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo

Linhagem	Nº na coleção	Hospedeiro
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	IBSBF 1163 ^P	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>
<i>X. albilineans</i>	IBSBF 1374 ^T	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	IBSBF 1375 ^T	<i>Juglans regia</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	IBSBF 1444 ^P	<i>Axonopus scoparius</i>
<i>X. bromi</i>	IBSBF 1567 ^T	<i>Bromus carinatus</i>
<i>X. cassavae</i>	IBSBF 270 ^T	<i>Manihot esculenta</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	IBSBF 1412 ^P	<i>Citrus limon</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	IBSBF 1671	<i>Citrus sinensis</i>
<i>X. codiae</i>	IBSBF 1389 ^T	<i>Codiaeum variegatum</i> var. <i>pictum</i>
<i>X. cucurbitae</i>	IBSBF 268 ^T	<i>Cucurbita maxima</i>
<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	IBSBF 1391 ^P	<i>Hedera helix</i>
<i>X. hyacinthi</i>	IBSBF 1390 ^T	<i>Hyacinthus orientalis</i>
<i>X. melonis</i>	IBSBF 68 ^T	<i>Cucumis melo</i>
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	IBSBF 1732 ^T	<i>Oryza sativa</i>
<i>X. pisi</i>	IBSBF 1356 ^T	<i>Pisum sativum</i>
<i>X. sacchari</i>	IBSBF 1313 ^T	<i>Saccharum officinarum</i>
<i>X. theicola</i>	IBSBF 1565 ^T	<i>Camellia sinensis</i>
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	IBSBF 581 ^P	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	IBSBF 865 ^P	<i>Sorghum bicolor</i>
<i>X. vesicatoria</i>	IBSBF 1338 ^T	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	IBSBF 1733 ^P	<i>Gossypium</i> sp.
<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	IBSBF 559	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	IBSBF 1153	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	IBSBF 1880	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	IBSBF 1954	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	IBSBF 2003	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	IBSBF 1854 ^T	<i>Zea mays</i>
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	IBSBF 546 ^P	<i>Gladiolus</i> sp.
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	IBSBF 1691	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	IBSBF 276 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	IBSBF 292 ^T	<i>Lycopersicon esculentum</i>

T, linhagem tipo; P, linhagem patotipo; IBSBF, Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, LBV, Campinas, Brasil (<http://www.biologico.sp.gov.br/bacterias.php>).

2.2.2 Amplificação parcial do gene *rpoB*

Os DNAs genômicos de seis linhagens de *X. citri* subsp. *malvacearum*, (IBSBF 1733^P, IBSBF 559, IBSBF 1153, IBSBF 1880, IBSBF 1954, IBSBF 2003), as linhagens tipo de *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T), *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T) e *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^T) foram submetidos à amplificação por PCR de parte do gene *rpoB* utilizando-se os oligonucleotídeos descritos por Ferreira e Destéfano (2007). As reações da PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 0,4 µM de cada *primer* (rpoB2F e rpoB3R), 100 ng do DNA genômico, 0,2 mM de dNTPs, 2 U da enzima *Taq* polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 1X tampão da enzima. A amplificação consistiu de um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 63 °C e 30 segundos a 72 °C, com um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % (p/v) corado com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizado em fonte de luz UV e fotografado em sistema digital Alpha Innotech 2200 (Alpha Innotech Corporation).

2.2.3 Purificação dos produtos de amplificação para sequenciamento

Os produtos de amplificação correspondentes a parte do gene *rpoB* das linhagens de *X. citri* subsp. *malvacearum*, (IBSBF 1733^P), das linhagens tipo de *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T), *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T) e de *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^T) foram purificados para posterior sequenciamento. Para a purificação, foram adicionados aos microtubos 50 µL de uma solução gelada de isopropanol 65 %. Em seguida, os tubos foram levados à centrifuga por 3 minutos, a 13.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 50 µL de uma solução gelada de etanol 70 % e novamente os tubos foram submetidos à centrifugação, a 13.000 rpm por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e os tubos foram levados para secagem em estufa a 37 °C por cerca de 20 minutos. Em seguida, os produtos de PCR foram suspensos em água milli-Q.

Após as purificações, os DNAs foram quantificados em gel de agarose 1,5 %.

2.2.4 Sequenciamento e desenho de *primers*

Produtos de PCR purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). As reações para sequenciamento foram efetuadas com o kit Big Dye (Applied Biosystems) utilizando-se os pares de *primers* rpoB2F/3R (Ferreira e Destéfano, 2007) e as purificações das reações foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante do kit. As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese no sequenciador automático, marca Applied Biosystems, modelo ABI Prism 377. O sequenciamento foi efetuado no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP. Nas análises foram utilizadas sequências de partes do gene *rpoB* das espécies de *X. citri* subsp. *malvacearum*, (IBSBF 1733^P), das linhagens tipo de *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T), *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T) e de *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^T).

As sequências foram então alinhadas utilizando-se o algoritmo CLUSTAL_X (THOMPSON et al., 1997). A sequência da linhagem de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P) foi submetida ao BLAST (version 8.1, University of Wisconsin, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA), para comparação com as demais sequências disponíveis nos bancos de dados. Uma região em que foi possível detectar diferenças entre as sequências das linhagens correlatas foi escolhida para o desenho dos *primers* específicos. Para tanto, utilizou-se o software Primer3 web v. 0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), disponível na rede mundial de computadores.

Para verificação da especificidade dos mesmos, as sequências dos *primers* desenhados foram confrontadas com dados depositados no GenBank (2008).

2.2.5 Depósito de sequências no *GenBank*

As sequências parciais do gene *rpoB* geradas neste estudo foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso GU074400 (*X. citri* subsp. *malvacearum*, IBSBF 1733^P), GU074401 (*X. campestris* pv. *campestris*, IBSBF 1163^T), GU074402 (*X. citri* subsp. *citri* IBSBF 1412^T) e GU074403 (*X. axonopodis* pv. *axonopodis*, IBSBF 1444^T).

2.2.6 Amplificação específica para *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

Além de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P e 1153), foram testadas as espécies *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^P), *X. albilineans* (IBSBF 1374^T), *X. arboricola* pv. *juglandis* (IBSBF 1375^T), *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^P), *X. bromi* (IBSBF 1567^T), *X. cassavae* (IBSBF 270^T), *X. codiae* (IBSBF 1389^T), *X. cucurbitae* (IBSBF 268^T), *X. hortorum* pv. *hederae* (IBSBF 1391^P), *X. hyacinthi* (IBSBF 1390^T), *X. melonis* (IBSBF 68^T), *X. oryzae* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^T), *X. pisi* (IBSBF 1356^T), *X. sacchari* (IBSBF 1313^T), *X. theicola* (IBSBF 1565^T), *X. translucens* pv. *translucens*; (IBSBF 581^P), *X. vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^P) e *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^T). Além dessas, linhagens de outros gêneros bacterianos como *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (IBSBF 1854^T), *Burkholderia gladioli* subsp. *gladioli* (IBSBF 546^T), *Erwinia carotovora* subsp. *brasiliensis* (IBSBF 1691), *Pseudomonas viridiflava* (IBSBF 276^T) e *Ralstonia solanacearum* (IBSBF 292^T) (Tabela 1) também foram testadas com os *primers* desenhados xam1F e xam2R para verificar a especificidade dos mesmos.

As reações foram realizadas num volume total de 25 µL contendo 0,4 µM de cada *primer*, 100 ng de DNA genômico, 0,3 µM de dNTPs, 2 U da enzima *Taq* polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 1X tampão da enzima. O programa de amplificação foi definido por um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, encerrando-se com um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos.

2.2.7 Nível de detecção dos *primers*

O nível de detecção dos *primers* desenhados foi avaliado com cultura pura de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P) e com diluições do DNA genômico da mesma linhagem.

No caso das culturas puras utilizou-se uma suspensão bacteriana crescida em meio Nutriente Líquido por 16 horas e diluída em série em água destilada esterilizada até 10⁻⁹. Aliquotas de 5,0 µL das diluições de 10⁻⁴ a 10⁻⁸ foram acrescentadas à 95 µL de água destilada esterilizada, perfazendo um total de 100 µL e foram semeadas na superfície de placas de Petri contendo meio Nutriente Ágar e espalhadas com o auxílio

de uma alça de Drigalsky. Alíquotas de 5 µL destas mesmas diluições foram utilizadas nos experimentos de amplificação utilizando-se os *primers* específicos.

Como alternativa à essa metodologia, empregou-se um processo de lise das células bacterianas em termobloco, a 100 °C por 20 minutos, antes da amplificação. Neste caso, para as reações de amplificação testou-se os volumes de 5,0 µL, 2,5 µL e 1,0 µL e optou-se pela utilização de 1,0 µL de cada diluição devido aos resultados obtidos preliminarmente.

Para se verificar a quantidade mínima de DNA detectada pelo par de *primers* desenhados, foram testadas as seguintes concentrações do DNA genômico da linhagem de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P), utilizada controle positivo de amplificação: 200, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % (p/v) corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e fotografado em sistema digital Alpha Innotech 2200 (Alpha Innotech Corporation).

2.2.8 Deslintamento das sementes de algodoeiro

Foram utilizadas sementes de algodoeiros provenientes de plantas que compuseram o “Teste anual para resistência a doenças - Safra 2006-2007”, conduzido pelo Departamento de Grãos e Fibras do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em experimentos de campo realizados na Fazenda Santa Elisa do IAC, em Campinas, SP.

Plantas de algodoeiro crescidas no campo por aproximadamente 10 semanas foram inoculadas artificialmente por meio de aspersão de suspensão bacteriana (10^5 ufc/mL) de *X. citri* subsp. *malvacearum* e após 20-25 dias da inoculação no campo, sintomas da mancha angular foram observados variando na sua intensidade dependendo da cultivar avaliada.

Após colheita dos frutos, foram selecionadas e separadas quatro amostras de sementes das cultivares DELTAOPAL, EPAMIG 99-364, LD CV-2 e STONEVILLE 8M. Cada amostra foi composta por 4 sub-amostras, denominadas pelas letras A, B, C e D.

No laboratório, as sementes foram submetidas ao processo de deslintamento de acordo com o seguinte procedimento: cerca de 130 gramas das amostras de sementes provenientes das diferentes amostras foram depositadas em um béquer de vidro de 1

litro e o líter foi retirado através de tratamento químico com 100 mL de ácido sulfúrico p.a., agitando-se com um bastão de vidro por tempo suficiente para que o líter se dissolvesse. O ácido foi neutralizado através da adição de 200 mL de solução de bicarbonato de sódio a 4,2 %. Após o deslntamento e abundante lavagem com água destilada, as sementes foram espalhadas em bandejas de 30X35 cm sobre papel toalha e mantidas à temperatura ambiente para secagem.

2.2.9 Extração do patógeno da semente

Depois de secas, 10 g de cada sub-amostra de sementes, o equivalente a 100 unidades, em média, foram acondicionados em garrafas com tampa de rosca, às quais se acrescentou 20 mL de solução salina esterilizada 0,85 %. As garrafas foram então deixadas sob refrigeração (10 °C) por um período de 14 a 16 horas. Após esse período, acrescentou-se 30 µL de Tween 20 a 0,2 % (v/v) para promover o desprendimento de algumas células que ainda pudessem estar aderidas ao pericarpo da semente. As garrafas foram submetidas a uma leve agitação durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As suspensões obtidas foram filtradas em papel de filtro, com o auxílio de funil de vidro, e transferidas para tubos de volume equivalente a 15 mL, levados à centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804R, eppendorf®) a 5000 rpm/ 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 5,0 mL de tampão TE pH 8,0.

2.2.10 Isolamento do patógeno

Alíquotas de 100 µL da suspensão resultante do processo de extração do patógeno foram semeadas em meio de cultura Nutriente Ágar suplementado com 2,0 g de sacarose e 5,0 g de amido solúvel. Para inibir o crescimento de outros micro-organismos, adicionou-se ao meio de cultura 40 mg/L de cicloheximida e 30 mg/L de cefadroxil. Foram efetuadas três repetições para cada sub-amostra das quatro amostras analisadas.

2.2.11 Reação de Gram e teste de hidrólise de amido

Colônias bacterianas de morfologia e coloração semelhantes à *X. citri* subsp. *malvacearum*, foram selecionadas para o teste de Gram, segundo metodologia de Ryu (1940). O método consistiu em se fazer um esfregaço da colônia bacteriana em lâmina contendo 4-5 gotas de KOH a 3,5 %, homogeneizando com a própria alça de platina por 1-2 minutos.

Uma vez que *X. citri* subsp. *malvacearum* apresenta resultado positivo para hidrólise de amido, este teste foi utilizado como técnica auxiliar na identificação do patógeno. Assim, colônias selecionadas foram transferidas para placas com meio Nutriente Ágar suplementado com 2,0 g de sacarose e 5,0 g de amido solúvel e, após 48 horas, foi adicionada às placas uma solução de lugol (Iodo 1,0 g; Iodeto de Potássio 2,0 g; 100 mL água destilada) em quantidade suficiente para cobrir a superfície do meio.

2.2.12 Teste de reação de hipersensibilidade

As colônias bacterianas obtidas foram submetidas ao teste de reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo e tomateiro. O teste de HR consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana das colônias isoladas com aproximadamente 10^7 a 10^8 ufc/mL. Em seguida, procedeu-se à inoculação por meio da técnica de infiltração com o auxílio de uma seringa hipodérmica direcionando-se o bisel da agulha para baixo contra o mesófilo da folha até que se observasse uma zona de “encharcamento” (coloração verde-escura). Após 24 horas, observou-se a necrose do tecido vegetal na área infiltrada.

2.2.13 Testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro

Das linhagens obtidas nos isolamentos, quatro delas foram selecionadas e utilizadas nos testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro. Essas plantas foram obtidas a partir de sementes sabidamente sadias, cedidas também pelo IAC. As plantas cultivadas em vasos foram inoculadas com suspensões bacterianas em água destilada esterilizada (aproximadamente 10^6 ufc/mL) a partir de culturas crescidas em meio NA (por 48 horas). As inoculações foram realizadas em três folhas por planta/ isolado, com

três repetições, infiltrando-se 0,5 mL da suspensão bacteriana em folhas, utilizando-se agulhas e seringas descartáveis de 1 mL. Após as inoculações as plantas foram mantidas em casa de vegetação para observação dos sintomas por aproximadamente 21 dias.

2.2.14 Detecção do patógeno por PCR, BIO-PCR e *nested*-PCR

Inicialmente foram efetuadas amplificações utilizando-se os *primers* específicos desenhados a partir de alíquotas de 5,0 µL das suspensões obtidas no processo de extração do patógeno das sementes. As condições de amplificação foram as mesmas descritas no item 2.2.6.

Para o BIO-PCR, alíquotas de 50 e 100 µL do material obtido do processo de extração do patógeno (item 2.2.9) foram previamente inoculadas em tubos de ensaio com tampa, em 5,0 mL de meio Nutriente líquido suplementado com sacarose e amido, acrescido de 40 mg/L de cicloheximida e 30 mg/L de cefadroxil. Os tubos de ensaio foram alocados em agitador por uma noite, à temperatura de 28 °C e agitação de 120 rpm. Volumes de 5,0 µL foram utilizados para as amplificações com os *primers* específicos.

Empregou-se, também, a técnica de BIO-PCR aliada ao *nested*-PCR. Alíquotas de 5,0 µL do processo de enriquecimento foram utilizados, numa primeira etapa, para as amplificações de parte do gene *rpoB*, em uma mistura de 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos *primers* *rpoB*2F/3R (Ferreira e Destéfano, 2007), 1,5 mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X, BSA 1X (10 mg/mL) e 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase para cada reação de 25 µL.

Na segunda etapa de amplificação, *nested*-PCR, foram utilizadas alíquotas de 1,0 µL, 2,5 µL e 5,0 µL do produto de amplificação por BIO-PCR, em reações de 25 µL contendo 0,3 mM de dNTPs, 0,4 µM de cada um dos *primers* específicos desenhados (*xam*1F/2R), 1,5 mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X, BSA 1X (10 mg/mL) e 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Os perfis obtidos foram visualizados em gel de agarose de concentração 1,4 %, corados com brometo de etídeo (10 mg/mL) e visualizados em transluminador sob luz ultravioleta.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Amplificação parcial do gene *rpoB*, sequenciamento e desenho dos *primers* específicos

As linhagens de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P, IBSBF 559, IBSBF 1153, IBSBF 1880, IBSBF 1954, IBSBF 2003), *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T), *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T) e *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^T) foram submetidas à amplificação por PCR para posterior sequenciamento e desenho dos *primers* específicos. Após a reação de PCR, foi visualizado em gel de agarose um fragmento de cerca de 800 pb, correspondente à parte do gene *rpoB*, delimitado pelos *primers* rpoB2F/3R (Ferreira e Destéfano, 2007) (Figura 1). Depois de purificados, os produtos de PCR foram sequenciados. A partir do alinhamento das sequências, *primers* específicos foram desenhados com o auxílio do programa Primer3. O par de *primers* foi denominado “xam1F”, composto por 20 nucleotídeos e sequência 5'-GTCGCAGTTCATGGATCAGA-3', e “xam2R”, composto por 19 nucleotídeos e sequência 5'-CTTCTGCGAACGCAAGTGT-3'.

Figura 1 – Amplificação de parte do gene *rpoB* utilizando-se os *primers* rpoB2F/3R. (M) Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); (1) *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P); (2) *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^T); (3) *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^T); (4) *X. citri* subsp. *citri* (IBSBF 1412^T); (5) controle negativo (sem DNA)

2.3.2 Amplificação com os *primers* xam1F/2R e teste de especificidade para *X. citri* subsp. *malvacearum*

Para se avaliar a especificidade dos *primers* desenhados, foram realizados experimentos de amplificação com DNAs das diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*. Além de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P e IBSBF 1153) foram testadas *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^P), *X. albilineans* (IBSBF 1374^T), *X. arboricola* pv. *juglandis* (IBSBF 1375^T), *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^P), *X. bromi* (IBSBF 1567^T), *X. cassavae* (IBSBF 270^T), *X. codiae* (IBSBF 1389^T), *X. cucurbitae* (IBSBF 268^T), *X. hortorum* pv. *hederae* (IBSBF 1391^P), *X. hyacinthi* (IBSBF 1390^T), *X. melonis* (IBSBF 68^T), *X. oryzae* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^T), *X. pisi* (IBSBF 1356^T), *X. sacchari* (IBSBF 1313^T), *X. theicola* (IBSBF 1565^T), *X. translucens* pv. *translucens* (IBSBF 581^P), *X. vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^P), *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^T). O fragmento esperado de 560 pb delimitado pelo par de *primers* xam1F/2R somente foi observado para as linhagens de *X. citri* subsp. *malvacearum*, identificadas pelas canaletas 1 e 10 (Figura 2).

Figura 2 - Amplificação dos DNAs de diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* utilizando-se os *primers* xam1F/2R. (M) Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); (1) *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P); (2) *X. campestris* pv. *campestris* (IBSBF 1163^P); (3) *X. albilineans* (IBSBF 1374^T); (4) *X. arboricola* pv. *juglandis* (IBSBF 1375^T); (5) *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (IBSBF 1444^P); (6) *X. bromi* (IBSBF 1567^T); (7) *X. cassavae* (IBSBF 270^T); (8) *X. codiae* (IBSBF 1389^T); (9) *X. cucurbitae* (IBSBF 268^T); (10) *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1153); (11) *X. hortorum* pv. *hederae* (IBSBF 1391^P); (12) *X. hyacinthi* (IBSBF 1390^T); (13) *X. melonis* (IBSBF 68^T); (14) *X. oryzae* pv. *oryzae* (IBSBF 1732^T); (15) *X. pisi* (IBSBF 1356^T); (16) *X. sacchari* (IBSBF 1313^T); (17) *X. theicola* (IBSBF 1565^T); (18) *X. translucens* pv. *translucens* (IBSBF 581^P); (19) *X. vasicola* pv. *holcicola* (IBSBF 865^P); (20) *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^T)

Os DNAs das linhagens de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (IBSBF 1854^T), *Burkholderia gladioli* subsp. *gladioli* (IBSBF 546^T), *Erwinia carotovora* subsp. *brasiliensis* (IBSBF 1691), *Pseudomonas viridiflava* (IBSBF 276^T) e *Ralstonia solanacearum* (IBSBF 292^T) também foram testados e não ocorreu amplificação do fragmento específico de 560 pb.

O desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção e identificação de patógenos tem sido reportado para um grande número de bactérias fitopatogênicas (SEAL; JACKSON; DANIELS, 1992; PROSEN et al., 1993; PAN et al., 1999; CATARA et al., 2000; LORETI; GALLELLI, 2001), incluindo o gênero *Xanthomonas*. Neste estudo, os *primers* desenhados xam1F/2R mostraram-se altamente específicos para a detecção e identificação de *X. citri* subsp. *malvacearum*, representando o primeiro relato da descrição de *primers* relacionados à essa espécie bacteriana.

2.3.3 Nível de detecção dos *primers*

O nível de detecção dos *primers* desenhados foi avaliado partindo-se de culturas puras e também de diluições do DNA genômico da linhagem patotipo de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P). Nos ensaios foram testadas a suspensão concentrada (com aproximadamente 10^8 ufc/ mL) e as diluições de 10^{-1} a 10^{-8} . Entretanto verificou-se a ocorrência de amplificação apenas na suspensão concentrada e nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} . Uma vez que no plaqueamento das diluições verificou-se um alto número de células nas diluições posteriores (10^{-3} e 10^{-4} com crescimento confluyente), suspeitou-se que a não ocorrência de amplificação poderia estar associada ao processo de lise das células bacterianas. Assim, decidiu-se promover esta lise em termobloco (100 °C/ 20 minutos) antes da amplificação. Após este procedimento, observou-se o fragmento específico de 560 pb até a diluição 10^{-7} , correspondente a 8 ufc/ 5,0 µL (Figura 3).

Nos experimentos de amplificação utilizando-se 200, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng do DNA genômico de *X. citri* subsp. *malvacearum*, verificou-se redução gradativa da intensidade da banda correspondente ao fragmento esperado de 560 pb de acordo com a quantidade de DNA utilizado e foi possível se observar sinal de amplificação até a diluição equivalente a 1,0 ng do DNA genômico da bactéria (Figura 4).

Figura 3 – Amplificação com os *primers* específicos xam1F/2R. (M) Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico (200 ng) de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P), (2) suspensão bacteriana após lise na diluição 10^{-5} (800 ufc/ 5,0 μ L); (3) diluição 10^{-6} (90 ufc/ 5,0 μ L); (4) diluição 10^{-7} (8 ufc/ 5,0 μ L); (5) controle negativo

Figura 4 – Amplificação com os *primers* específicos xam1F/2R utilizando-se diferentes concentrações do DNA genômico de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P). (M) Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); (1) 200 ng; (2) 100 ng; (3) 10 ng; (4) 1,0 ng; (5) 0,1 ng; (6) 0,01 ng; (7) 0,001 ng

Limites de detecção similares, variando de 10^1 a 10^2 células, foram também descritos para *Ralstonia solanacearum* (anteriormente classificada como *Pseudomonas solanacearum*) por Seal, Jackson e Daniels (1992). *Primers* específicos desenvolvidos para *Xanthomonas albilineans* mostraram um limite de detecção de 1,25 pg de DNA genômico, ou cerca de 4 ufc de uma cultura bacteriana (PAN et al., 1999), e também de 3 a 5 células de *X. albilineans* em suspensão bacteriana diluída (HONEYCUTT; SOBRAL; McCLELLAND, 1995). Em um estudo para a identificação de *Pseudomonas corrugata* em tomate, o nível de detecção tanto para células bacterianas quanto para o DNA genômico foi de aproximadamente 2 a 4×10^3 ufc mL⁻¹, ou cerca de 20 pg de DNA purificado (CATARA et al., 2000).

Loreti e Gallelli (2001) desenharam *primers* para a detecção rápida e específica de *Pseudomonas avellanae* baseando-se em sequências do gene *hrpW*. O nível de detecção foi avaliado partindo-se tanto do DNA genômico da bactéria quanto de extratos obtidos do tecido de cascas de avelã infectado por *P. avellanae*. Os autores reportaram um limite de detecção de 2×10^3 ufc/ reação, quando foram utilizados os extratos. Para o DNA genômico, o limite foi de cerca de 20 pg.

O nível de detecção para o DNA genômico de *X. citri* subsp. *malvacearum* observado neste estudo foi de 1,0 ng, quantidade superior ao observado na literatura (SEAL; JACKSON; DANIELS, 1992; PAN et al., 1999; LORETI; GALLELLI, 2001). Entretanto, há que se considerar que a visualização de bandas em géis de agarose corados com brometo de etídeo pode ser comprometida pela concentração do corante utilizado, e portanto, contribuir para uma interpretação imprecisa dos resultados. Assim, o cálculo do nível de detecção a partir da suspensão de culturas puras torna o experimento mais consistente, uma vez que, paralelamente ao experimento de amplificação, é efetuado o plaqueamento e posterior contagem das células utilizadas nas alíquotas para as reações de amplificação. E neste caso, os *primers* específicos desenhados apresentaram um alto nível de detecção (8 ufc/ 5,0 µL), similar ao observado para *X. albilineans* (PAN et al., 1999; HONEYCUTT; SOBRAL; McCLELLAND, 1995).

2.3.4 Isolamento do patógeno e testes de identificação

A partir do processo de deslntamento foi possível isolar colônias bacterianas com características de morfologia e coloração amarela semelhantes à *X. citri* subsp. *malvacearum* em três das quatro amostras testadas. Em uma das amostras não foi possível o isolamento do patógeno, provavelmente devido à presença do grande número de micro-organismos contaminantes presentes no material.

As colônias características de *X. citri* subsp. *malvacearum* foram selecionadas para os testes de coloração de Gram, hidrólise de amido e testes de hipersensibilidade em folhas de fumo e tomateiro.

2.3.5 Reação de Gram e teste de hidrólise de amido

A partir do esfregaço das colônias bacterianas em lâminas contendo gotas de KOH, foi possível confirmar que todas as colônias selecionadas eram Gram-negativas. Bactérias Gram-negativas tornam-se viscosas, aderentes à alça de platina, formando um fio contínuo, enquanto que as Gram-positivas permanecem não viscosas e não formam fio de aderência. A viscosidade obtida nas células Gram-negativas deveu-se à dissolução da parede celular e consequente liberação de DNA bacteriano.

Posteriormente, as colônias obtidas no isolamento foram testadas para hidrólise de amido, uma vez que *X. citri* subsp. *malvacearum* apresenta resultado positivo para esse teste. A adição de solução de lugol às placas de Petri em que as bactérias foram cultivadas permitiu a visualização de halo claro ao redor de todas as colônias, indicando a hidrólise do amido, reagente presente no meio de cultura (Figura 5).

Figura 5 – *X. citri* subsp. *malvacearum* em placa de Petri. A. Colônias obtidas do isolamento a partir das amostras de sementes crescidas em meio de cultura com amido. B. Formação de halo translúcido ao redor das colônias, observada após a adição de lugol sobre superfície do meio

2.3.6 Teste de reação de hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade (HR) em folhas de tomateiro e fumo com as linhagens selecionadas no isolamento apresentaram resultado positivo para todas as colônias testadas. Esse teste foi muito útil para a confirmação da patogenicidade dos isolados obtidos, uma vez que somente espécies fitopatogênicas têm a capacidade de induzir esse tipo de resposta, enquanto que bactérias saprofíticas não induzem HR. Além disso, esse teste foi rápido e de fácil interpretação.

2.3.7 Testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro

Quatro linhagens obtidas no isolamento foram selecionadas para os testes de patogenicidade em plantas de algodoeiro que foram efetuados pelo método de infiltração nas folhas. Após cerca de 21 dias da inoculação, observou-se o aparecimento de anasarca (tecido encharcado) nas áreas infiltradas com a suspensão bacteriana. Do material vegetal apresentando sintomas característicos da doença foi efetuado o reisolamento do patógeno.

A identificação dos isolados como *X. citri* subsp. *malvacearum* foi confirmada por meio da amplificação com os *primers* específicos desenhados e posterior sequenciamento do fragmento obtido. As linhagens foram incorporadas à Coleção de

Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), sob os números IBSBF 2530, IBSBF 2531, IBSBF 2532 e IBSBF 2533.

2.3.8 Detecção do patógeno por PCR, BIO-PCR e *nested*-PCR

Inicialmente foram efetuadas amplificações partindo-se de alíquotas retiradas diretamente do material resultante da extração do patógeno das sementes utilizando-se os *primers* específicos xam1F/2R. Entretanto, não foi observada amplificação em nenhuma das amostras testadas. Este resultado pode ser justificado pela presença de inibidores da PCR, como compostos fenólicos ou outras substâncias químicas (AUDY et al., 1996).

Uma vez que a técnica de PCR permite a amplificação do DNA proveniente tanto de células viáveis quanto de células não viáveis, decidiu-se empregar a técnica de enriquecimento antes do processo de amplificação a fim de aumentar o número de células presentes na solução de extração do patógeno. Para que a BIO-PCR seja bem sucedida, é necessário que o meio de cultura permita o crescimento da bactéria de interesse ao mesmo tempo em que suprima o dos demais micro-organismos presentes na amostra. Além de proporcionar um considerável aumento no nível de detecção, confirmado posteriormente na leitura do gel de agarose, o procedimento de enriquecimento ainda ajuda a reduzir a presença de inibidores da reação da polimerase em cadeia (SONG et al., 2004; SCHAAD et al., 1995; SCHAAD et al., 2003).

No presente estudo, o enriquecimento foi efetuado em meio de cultura líquido por aproximadamente 24 horas e após esse período foram efetuadas as amplificações empregando-se os *primers* xam1F/2R. Como resultado, além da observação do fragmento esperado de 560 pb, também foram verificadas várias bandas inespecíficas em todas as amostras analisadas.

Diante dos dados obtidos, optou-se pela combinação das técnicas de BIO-PCR e *nested*-PCR, utilizando-se na primeira etapa de amplificação os *primers* correspondentes à parte do gene *rpoB* (rpoB2F/3R) e na segunda etapa os *primers* xam1F/2R. No primeiro experimento, foi possível a observação de uma única banda de peso molecular de 800 pb, correspondente ao fragmento de parte do gene *rpoB*. Como

controle positivo das amplificações, utilizou-se 200 ng do DNA genômico da linhagem de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P) (Figura 6).

A adição de um segundo passo de amplificação aumenta a sensibilidade do protocolo. Isso porque nenhum amplicon não específico produzido pela amplificação anterior atua como molde para a amplificação seguinte. Para o experimento de BIO-PCR/*nested*-PCR, foram utilizados 1,0 µL dos produtos da amplificação de parte do gene *rpoB* como molde. O resultado obtido foi uma banda de aproximadamente 560 pb, correspondente ao tamanho do fragmento específico de interesse, para todas as amostras testadas, incluindo na amostra em que não foi possível isolar o patógeno em placas de meio de cultura (Figura 7).

Figura 6 - Amplificação por BIO-PCR/*nested*-PCR para parte do gene *rpoB*. (M) Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); (1 a 6) Amostras provenientes do material resultante do processo de extração do patógeno; (7) DNA genômico (200 ng) de *X. citri* subsp. *malvacearum* (IBSBF 1733^P) (controle positivo da reação)

Figura - 7 Amplificação por BIO-PCR/*nested*-PCR com *primers* específicos para Xcm. (1 a 6) Produto da BIO-PCR/*nested*- PCR; (7) DNA da linhagem IBSBF 1733^P, como controle positivo; (8) água, como controle negativo

Embora a PCR seja uma técnica altamente sensível, ela não permite a diferenciação entre células viáveis e células não viáveis. Essa limitação é um dos fatores que dificulta a aplicação da PCR em laboratórios de quarentena. No método desenvolvido por Sakthivel, Mortensen e Marthur (2001) para a detecção de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em sementes e em plantas de arroz, essa limitação pôde ser solucionada com o emprego da BIO-PCR, que consistiu no plaqueamento das sementes ou de extratos obtidos das mesmas antes da reação de PCR, utilizando-se uma suspensão das células bacterianas obtidas como molde para a reação. Os autores concluíram que o método eliminou tanto o problema de resultados falso-negativos devido à presença de inibidores da PCR em plantas ou em extratos de sementes, quanto o de falso-positivos resultantes da presença de células não viáveis.

No trabalho de Song et al. (2004) que descreve a detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* em sementes de arroz, os autores verificaram que os resultados obtidos de amostras de sementes sem enriquecimento variaram consideravelmente, apontando a necessidade do passo do enriquecimento para se obter reprodutibilidade nos resultados e um grau mais elevado de sensibilidade da técnica. Os autores afirmaram que a BIO-PCR foi uma valiosa ferramenta não só para fins de detecção do

patógeno como também para monitorar a ocorrência natural da bactéria e estudar a localização do patógeno no campo. A análise completa do lote de sementes pôde ser concluída num intervalo de 2 a 3 dias, enquanto que utilizando-se os métodos convencionais, o processo se encerrava em um prazo que variava de 10 a 14 dias.

Uma das vantagens em se utilizar o processo de *nested*-PCR consiste no considerável aumento da sensibilidade do protocolo, além de tornar possível a detecção do patógeno em extratos, macerados ou embriões de sementes. Além disso, o procedimento de extração do patógeno das sementes por simples lavagem não é destrutivo e não há necessidade da extração do DNA antes de se processar as sementes (VERDIER; OJEDA; MOSQUEDA, 2001).

Robène-Soustrade e colaboradores (2006) desenvolveram um teste baseado na técnica de *nested*-PCR para a detecção de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, agente causal do cretamento bacteriano em antúrio. Com a inclusão do segundo passo de amplificação (*nested*-PCR), o nível de detecção obtido com culturas puras e extratos de plantas foi de 10^3 ufc/mL, o que permitiu a detecção do patógeno a partir de plantas contaminadas 12 dias antes do aparecimento dos sintomas. Esses resultados demonstraram que métodos baseados em *nested*-PCR podem ser uma ferramenta de diagnose útil para a certificação de material de propagação em viveiros e para a vigilância fitossanitária internacional.

Num estudo para a detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em sementes de feijão, Schaad et al. (1995), otimizaram um método já descrito por eles adicionando um passo de plaqueamento da suspensão bacteriana em ágar. Após o plaqueamento, lavou-se a superfície do meio e procedeu-se à primeira amplificação diretamente deste material. Em seguida, um par de *primers* diferente foi utilizado para a segunda amplificação. Com isso, conseguiu-se reduzir e, por vezes, eliminar, a amplificação de DNA de células não viáveis, além de remover os inibidores de PCR, que poderiam estar presentes nas amostras de sementes. O aprimoramento dessa metodologia proporcionou o aumento da sensibilidade de detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em lotes de sementes com baixos níveis de contaminação, alcançando o número de 2 ufc da bactéria.

Xanthomonas citri subsp. *malvacearum* pode ser disseminada no campo por meio de eventos climáticos ou práticas culturais, mas a introdução do patógeno em novas áreas de cultivo de algodoeiro é devida, principalmente, à utilização de sementes contaminadas. Uma vez que as sementes contaminadas podem ser distribuídas aleatoriamente no campo, estas se tornam fonte primária de inóculo da doença. Sabendo-se da importância de se preservar áreas de plantio indenes à mancha angular do algodoeiro, procurou-se desenvolver uma metodologia baseada em técnicas moleculares que permitissem a detecção e identificação do patógeno causador dessa doença. Os *primers* desenhados neste estudo mostraram-se altamente específicos para a *X. citri* pv. *malvacearum* e foram utilizados em ensaios de BIO-PCR/*nested*-PCR em análises de sementes de algodoeiro sabidamente contaminadas, possibilitando a detecção e identificação do patógeno, evitando, assim, as etapas laboriosas de isolamento em meios de cultura semi-seletivos e identificação por métodos bioquímicos convencionais.

3 CONCLUSÕES

- o par de *primers* xam1F/2R mostraram-se altamente específicos na detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*;
- o nível de detecção dos *primers* xam1F/2R utilizando-se suspensões de cultura pura de *X. citri* subsp. *malvacearum* foi de 8 ufc/ 5,0 µL e de 1,0 ng do DNA genômico da bactéria;
- a combinação das técnicas de BIO-PCR e *nested*-PCR possibilitou a detecção e identificação do patógeno em amostras de sementes de algodoeiro;
- a metodologia desenvolvida neste estudo permitiu a detecção do patógeno mesmo na amostra em que não foi possível isolar o patógeno em meio de cultura.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO – ABRAPA.
Disponível em: <http://www.abrapa.com.br>. Acesso em: 19 nov. 2009

ADÉKAMBI, T.; BERGER, P.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletti* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 133-143, 2006.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, p. 37-45, 2009.

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P.A.D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 59, p. 306-318, 2009.

AUDY, P.; BRAAT, C.; SAINDON, G.; HUANG, H.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common halo blights in bean seed. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 361-366, 1996.

BARBOSA, J.F. **Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2007. 135p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

BORÉM, A. Biotecnologia e sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 1-34.

BRADBURY, J.F. Genus II. *Xanthomonas* In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 600p.

BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Aberystwyth: CAB International, 1986. 332p.

CAFATI, C.R.; SAETTLER, A.W. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. **Phytopathology**, Lancaster, v. 70, p. 675-679, 1980.

CATARA, V.; DAWN, A.; CIRVILLERI, G.; VIVIAN, A. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata* by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 753-762, 2000.

CHITARRA, L.G. **Fluorescence techniques to detect and to assess viability of plant pathogenic bacteria**. 2001. 101p. Thesis (PhD in Food Science and Microbiology) - Wageningen University, Wageningen, 2001.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 41-52.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 19 nov. 2009.

CRIAR E PLANTAR. Disponível em: <http://www.criareplantar.com.br>. Acesso em: 19 nov. 2009.

DA MOTA, F.F.; GOMES, E.A.; PAIVA, E.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 34-40, 2004.

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

DEZORDI, C. **Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. 95p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DYE, D.W. The inadequacy of the usual determinative tests for identification of *Xanthomonas* spp. **New Zealand Journal of Science**, Wellington, v. 5, p. 393-416, 1962.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, p. 893-897, 2007.

FERREIRA, M.; DESTÉFANO, S.A.L. Avaliação do gene *rpoB* (sub-unidade β da RNA polimerase) como marcador taxonômico e filogenético para fitobactérias do gênero *Xanthomonas*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. S13, 2007. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 30., 2007, Jaboticabal – Resumo.

GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathogens. San Diego: Academic Press, 1990. 342p.

GÜRTLER, V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16s-23s rDNA spacer regions. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, p. 3089-3097, 1993.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. **Microbiology**, Reading, v. 142, p. 3-16, 1996.

GUTHRIE, J.W.; HUBER, D.M.; FENWICK, H.S. Serological detection of halo-blight. **Plant Disease Reports**, Saint Paul, v. 49, p. 297-299, 1965.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.S.; Mc CLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic of *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, Reading, v. 141, p. 3229-3239, 1995.

ITO, S.; USHIJIMA, Y.; FUJII, T.; TANAKA, S.; KAMEYA-IWAKA, M.; YOSHIWANA, S.; KISHI, F. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using semiselective medium and a PCR technique. **Journal of Phytopathology**, Berlín, v. 146, p. 379-384, 1998.

KIM, B.J.; KIM, C.J.; CHUN, J.; KOH, Y.H.; LEE, S.H.; HYUN, J.W.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 593-598, 2004.

KIM, K.S.; KO, K.S.; CHANG, M.W.; HAHN, T.W.; HONG, S.K.; KOOK, Y.H. Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, p. 299-305, 2003.

KO, K.S.; LEE, H.K.; PARK, M.Y.; LEE, K.H.; YUN, Y.J.; WOO, S.Y.; MIYAMOTO, H.; KOOK, Y.H. Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2653-2658, 2002.

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-Pcr de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2002. 127p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

LAHMAN, L.K.; SCHAAD, N.W. Evaluation of the "Dome Test" as a reliable assay for seedborne bacterial blight pathogens of beans. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 680-683, 1985.

LORETI, S.; GALLELLI, A. Rapid and specific detection of virulent *Pseudomonas avellanae* strains by PCR amplification. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 237-244, 2001.

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.V.S (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 480p.

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**, Lancaster, v. 86, p. 63-69, 1996.

MANCEAU, C.; HORVAIS, A. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 498-505, 1997.

MENDOZA, M.; MEUGNIER, H.; BES, M.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 1049-1055, 1998.

MOHAN, S.K.; SCHAAD, N.W. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. **Phytopathology**, Lancaster, v. 77, p. 1390-1395, 1987.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 1005-1011, 1997.

MOORE, E.R.B.; KRÜGER, A.S.; HAUBEN, L.; SEAL, S.E.; DE BAERE, R.; DE WACHTER, R.; TIMMIS, K.N.; SWINGS, J. 16S rRNA gene sequence analysis and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 151, p. 145-153, 1997.

MOREL, V. Microbiology's scarred revolutionary. **Science**, London, v. 276, p. 699-702, 1997.

MOSQUEDA-CANO, G.; HERRERA-ESTRELLA, L. A simple and efficient PCR method for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v. 13, p. 463-467, 1997.

MUN, H.S.; OH, E.J.; KIM, H.J.; LEE, K.H.; KOH, Y.H.; KIM, C.J.; HYUN, J.W.; KIM, B.J. Differentiation of *Streptomyces* spp. which cause potato scab disease on the basis of partial *rpoB* gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 30, p. 401-407, 2007.

NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, Z.E.; SILVA, V.A.V. Sensibilidade “*in vitro*” de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a bactericidas e a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, suplemento, p. 326-327, 2000.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mc Millan Press, 1977. 839p.

OJEDA, S.; VERDIER, V. Detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava true seeds by nested polymerase chain reaction assay. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 22, p. 241-247, 2000.

OLIVEIRA, J.R. de; MOURA, A.B.; SOUZA, R.M. Transmissão e controle de fitobactérias em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes**: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV, 2005. p. 113-134.

- PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L.; WEI, Q. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 218-222, 1999.
- PEREIRA, J.L.A.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, M.R. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ao cobre. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, suplemento, p. 328, 2000.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extration of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 151-156, 1989.
- PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W.; PANOPOULOS, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, p. 965-970, 1993.
- RENESTO, P.; GOUVERNET, J.; DRANCOURT, M.; ROUX, V.; RAOULT, D. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 430-437, 2001.
- RIFFARD, S.; LO PRESTI, F.; NORMAND, P.; FOREY, F.; REYROLLE, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Species identification of *Legionella* via intergenic 16S-23S ribosomal spacer analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 723-730, 1998.
- ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; LAURENT, P.; GAGNEVIN, L. ; JOUEN, E. PRUVOST, O. Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in anthurium (*Anthurium andreaeanum*) tissues by nested-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1072-1078, 2006.
- ROMEIRO, R.S.; NETO, J.R. **Diagnose de enfermidades de plantas incitadas por bactérias**. Viçosa: UFV, 2001, 67p.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.
- RYU, E. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 17, p. 58-63, 1940.
- SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Saint Paul: APS Press, 1995. 125p.

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 and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 435-441, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

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

SCHAAD, N.W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; SECHLER, A.; KNORR, D. 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, v. 41, p. 1095-1100, 1999.

SCHAAD, N.W.; GAUSH, P.; POSTNIKOVA, E.; FREDERICK, R. On-site one hour PCR diagnosis of bacterial diseases. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. S79-89, 2001. Abstract.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, E.; HATZILOUKAS, E.; PANOPULOS, N.J.A. Combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 243-248, 1995.

SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W.L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M.D.; LUSTER, D.G. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**, Lancaster, v. 41, p. 305-324, 2003.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smithii, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 494-518, 2005.

_____. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 690-695, 2006.

SEAL, S.E.; COOPER, R.M.; CLARKSON, J.M. Identification of a pathogenicity locus in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 222, p. 452-456, 1990.

SEAL, S.E.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Isolation of *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3751-3758, 1992.

SHEPPARD, J.W.; ROTH, D.A.; SAETTLER, A.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* in bean. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (Ed.). **Detection of bacteria seed and other planting material**. Saint Paul: APS Press, 1989. p. 17-29.

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

SOAVE, J.; MORAES, S. A. **Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987.

SONG, W.Y.; KIM, H.M.; HWANG, C.Y.; SCHAAD, N.W. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Phytopathology**, Lancaster, v. 152, p. 667-676, 2004.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, suplemento, 1992.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas**. v. 2. Viçosa: UFV, 1997. 415p.

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

VERDIER, V.; OJEDA, S.; MOSQUERA, G. Methods for detecting the cassava bacterial blight pathogen: A practical approach for managing the disease. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 103-107, 2001.

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA, and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, p. 245-252, 1999.

WATKINS, G.M. **Compendium of cotton disease**. Saint Paul: APS Press, 1981. 78p.

WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan™ PCR. **OEPP/EPPO Bulletin**, Amsterdam, v. 30, p. 381-383, 2000.

WELLER, S.A.; ELPHINSTONE, J.G.; SMITH, N.C.; BOONHAM, N.; STEAD, D.E. 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.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

ZACHOWSKI, M.A.; RUDOLPH, K. Characterization of isolates of bacterial blight of cotton (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) from Nicaragua. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 123, p. 344-352, 1988.

APÊNDICES

Apêndice 1 Sequências parciais do gene *rpoB*

>IBSBF 1163 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

GACCCCGCAGGAACTGATCAACGCCAAGCCAGTGGCTGCTGCGATCAAGGAATTCTTCGGCTCCTCGCAGCTGT
CGCAGTTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGAAGTGACGCACAAGCGTCGCGTCTCCGCGCTGGGCCCCGGG
CGGTCTGACCCGCGAGCGCGCCGGCTTCGAAGTGCGCGACGTGCATCCGACCCATTACGGCCGCGTCTGCACC
ATCGAAACACCGGAAGGCCCGAACATCGGCCTGATCAACTCGCTGGCCGTGTTGCCCCGCACCAACCAGTACG
GCTTCCTTGAGACGCCGTACCGTAAGGTGCTGGACGGCAAGGTCTCCGACGACGTGAGTACCTGTCGGCGAT
CGAAGAAAACGAGTACGTGATCGCACAGGCGAATGCGCTGACCGACGCCAAGAACATGCTCACCAGCAGTTC
GTGCCGTGCCGTTCAGGGCGAGTCGCTGCTCAAGCCGCCGGCTGAAGTGCACTTCATGGACGTCTCGCCGA
TGCAGACCGTGTCCGGTCGCCGCGGCGTTGGTGCCGTTCTTGAGCACGATGACGCGAACCCGCGCACTGATGG
GCGCCAACATGCAACGCCAGGCCGTGCCGACCCTGCGTTTCGAGAAGCCGCTGGTGGGTACCGGTATCGAGC
GTGCGGTTGCGCGCGACTCGGGCGTGACCGTGAATGCCCGCCGTGGTGGTGTGATCGAACAGATCACC

>IBSBF 1412 *Xanthomonas axonopods* pv. *citri*

GACCCCGCAGAAGCTGATCAACGCCAAACCCGGTGGCTGCCGCGATCAAGGAATTCTTCGGCTCCTCGCAGCTGT
CGCAGTTCATGGACCAGAACAACCCGCTGTCGGAAGTGACGCACAAGCGTCGCGTCTCCGCGCTGGGTCCAGG
CGGTCTGACCCGCGAACGCGCCGGCTTCGAAGTGCGCGACGTGCACCCGACCCATTACGGCCGCGTCTGCACC
ATCGAAACGCGGAAGGCCCGAACATCGGCCTGATCAACTCGCTGGCCGTGTTGCCCCGCACCAACCAGTACG
GCTTCCTCGAGACGCCGTACCGTAAGGTGCTGGACGGCAAGGTCTCCGACGACGTGCAATACCTGTCGGCGAT
CGAGGAAAACGAGTACGTGATCGCCCAGGCGAACGCGCTGACCGATGCCAAGAACATGCTCACCAGCAGTTC
GTGCCGTGCCGTTCAGGGCGAATCGCTGTTGAAGCCGCCGTCCGAAGTGCACTTCATGGACGTCTCGCCGA
TGCAGACCGTGTCCGGTCGCAGCGGCGCTGGTGCCGTTCTCGAGCACGACGACGCCAACCCGCGCACTGATGG
GCGCCAACATGCAGCGCCAGGCCGTGCCGACACTGCGTTTCGAGAAGCCGCTGGTCCGTACCGGCATCAAGC
GTGCGGTTGCGCGCGACTCGGGCGTGACCGTCAATGCGCTGCGTGGTGGCGTGATCGAGCAGATCGAC

>IBSBF 1444 *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*

GACCCCGCAGGAACTGATCAACGCCAAGCCGGTGGCCGCGGCGATTAAAGGAATTCTTCGGCTCCTCGCAGCTG
TCGCAGTTCATGGACCAGAACAACCCGCTATCGGAAGTGACGCACAAGCGTCGCGTCTCTGCGCTGGGCCCCG
GCGGTCTGACCCGCGAACGCGCCGGCTTCGAAGTGCGCGACGTGCACCCGACCCATTACGGCCGCGTTCGAC
CATCGAAACGCCTGAAGGCCCGAACATCGGCTTGATCAACTCGCTGGCCGTGTTGCCCCGCACCAACCAGTACG
GCTTCCTCGAGACGCCGTACCGTAAGGTGCTGGACGGCAAGGTCTCCGACGACGTGCAATACCTGTCGGCGAT
CGAAGAAAACGAGTACGTAATCGCCCAGGCGAACGCGCTGACCGATGCCAAGAACATGCTCACCAGCAGTTC
GTGCCGTGCCGTTCAGGGCGAATCGCTGTTGAAGCCGCCGTCCGAAGTGCACTTCATGGACGTCTCGCCGA
TGCAGACCGTGTCCGGTCGCAGCGGCGCTGGTGCCGTTCTCGAGCACGACGACGCCAACCCGCGCACTGATGG
GCGCCAACATGCAGCGCCAGGCCGTGCCGACACTGCGTTTCGAAAAACCCCTTGTCGGTACCGGCATCGAGCG
TGCGGTTGCGCGCGACTCCGGCGTGACCGTGAATGCGTTGCGTGGTGGCGTGATCGAACAAATCGAC

>IBSBF 1733 *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

GACCCCGCAGGAGCTGATCAACCCCAAGCCGGTGGCTGCCGCGATCAAGGAATTCTTCGGCTCCTCGCAGCTG
TCGCAGTTCATGGATCAGAACAACCCGCTGTCGGAAGTGACGCACAAGCGTCGCGTCTCCGCGCTGGGTCCGG
GCGGTCTGACCCGCGAACGCGCCGGCTTCGAAGTGCGCGACGTGCACCCGACCCATTACGGCCGCGTCTGCA
CCATCGAAACGCGGAAGGCCCGAACATCGGCCTGATCAACTCGCTGGCCGTGTTGCCCCGCACCAACCAGTA
CGGCTTCCTCGAGACGCCGTACCGTAAGGTGCTGGACGGCAAGGTCTCCGACGACGTGCAATACCTGTCGGCG
ATCGAGGAAAACGAGTACGTGATCGCCCAGGCGAACGCGCTGACCGATGCCAAGAACATGCTCACCAGCAGT
TCGTGCCGTGCCGTTCAGGGCGAATCGCTGTTGAAGCCGCCGTCCGAAGTGCACTTCATGGACGTCTCGCC
GATGCAGACCGTGTCCGTGCGAGCGGCGCTGGTGCCGTTCTCGAGCACGACGACGCCAACCCGCGCACTGATG
GGCGCCAACATGCAGCGCCAGGCCGTGCCGACACTGCGTTTCGAGAAGCCGCTGGTCCGTACCGGCATCGAG
CGTGCGGTTGCGCGCGACTCGGGCGTGACCGTGAATGCGTTGCGTGGTGGCGTGATCGAACAGATCGAC

1 GATGCCGAGCTCCGCAAGGCCCGTTGACCCCGCAAGTAGNTATCAACCCCAAGCCGGTGG
61 CTGCCGCGATCAAGGAATTCTTCGGCTCCTCGCAAGCTGTTCGCAGTTCATGGATCAGAAC
>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 AACCCGCTGTTCGGAAGTGACGCACAAGCGTCGCGTCTCCGCGCTGGGTCCGGGCGGTCTG
181 ACCCGCGAACGCGCCGGCTTCGAAGTGCGCGACGTGCACCCGACCCATTACGGCCGCGTC
241 TGCACCATCGAAACGCCGGAAGGCCCGAACATCGGCCTGATCAACTCGCTGGCCGTGTTT
301 GCCCGCACCAACCAGTACGGCTTCCTCGAGACGCCGTACCGTAAGGTGCTGGACGGCAAG
361 GTCTCCGACGACGTCTGAATACCTGTTCGGCGATCGAGGAAAACGAGTACGTGATCGCCCAG
421 GCGAACGCGCTGACCGATGCCAAGAACATGCTCACCAGACAGTTCGTGCCGTGCCGGTTT
481 CAGGGCGAATCGCTGTTGAAGCCGCCGTCCGAAGTGCACTTCATGGACGTCTCGCCGATG
541 CAGACCGTGTTCGGTTCGACGCGGCGCTGGTGCCGTTTCCTCGAGCACGACGACGCCAACCGC
601 GCACTGATGGGGGCCAACATGCAGCGCCAGGCCGTGCCGACACTTTCGTTCGCAGAAGCC
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
661 GCTGGTTCGGTACCGGCATCGAGCGTGCGGTTGCGCGCGACTTCGGGCGTGACCGTCAATG
721 CGCTGCCGTGGTGGCGTGATCGAACAGATCGACGCGAGCCCGCATCTGGTCANACGNTC

KEYS (in order of precedence):

>>>>> left primer

<<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
1 LEFT PRIMER	72	20	59.79	50.00	6.00	0.00	
AAGGAATTCTTCGGCTCCTC							
RIGHT PRIMER	658	19	60.19	52.63	6.00	2.00	CTTCTGCGAACGCAAGTGT
PRODUCT SIZE: 587, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00							
2 LEFT PRIMER	112	20	60.67	55.00	4.00	2.00	
GATCAGAACAACCCGCTGTC							
RIGHT PRIMER	658	19	60.19	52.63	6.00	2.00	CTTCTGCGAACGCAAGTGT
PRODUCT SIZE: 547, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00							
3 LEFT PRIMER	71	20	60.70	50.00	6.00	0.00	
CAAGGAATTCTTCGGCTCCT							
RIGHT PRIMER	658	19	60.19	52.63	6.00	2.00	CTTCTGCGAACGCAAGTGT
PRODUCT SIZE: 588, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00							
4 LEFT PRIMER	95	20	60.83	50.00	4.00	2.00	
AGCTGTCGCAGTTCATGGAT							
RIGHT PRIMER	658	19	60.19	52.63	6.00	2.00	CTTCTGCGAACGCAAGTGT
PRODUCT SIZE: 564, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 0.00							

Statistics

	con sid ered	too many Ns	in tar get	in excl reg	bad GC%	no GC clamp	tm too low	tm too high	high any compl	high 3' compl	poly X	high end stab
ok												
Left	748	19	0	0	22	0	37	564	0	2	0	28
76												
Right	791	9	0	0	8	0	14	692	0	2	0	15
51												

Pair Stats:

considered 88, unacceptable product size 83, ok 5

primer3 release 1.1.0

(primer3_results.cgi 0.4.0 modified for WI)